



Facultad de Veterinaria

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TESIS DOCTORAL

**Efecto de la adición de fitasa sobre la
biodisponibilidad mineral *in vitro* en papillas
infantiles**

**Effect of phytase addition on *in vitro* mineral bioavailability
from infant cereals**

Carmen Frontela Saseta

Murcia, 2007

I. INTRODUCCIÓN	12
II. OBJETIVOS	14
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
III.1. ALIMENTACIÓN INFANTIL	15
III.1.1. Introducción	15
III.1.2. Composición de los alimentos infantiles	18
III.1.2.1. Reglamentación. Clasificación.....	18
III.1.2.2. Características y composición nutricional.....	20
III.1.2.2.a. Viscosidad y contenido energético.....	20
III.1.2.2.b. Proteína y grasa.....	20
III.1.2.2.c. Fibra dietética.....	21
III.1.2.2.d. Micronutrientes.....	21
III.2. NECESIDADES NUTRICIONALES DE LOS MINERALES	21
III.3. ABSORCIÓN Y METABOLISMO DE HIERRO, CALCIO Y CINC	23
III.3.1. Hierro	23
III.3.1.a. Absorción de hierro inorgánico.....	24
III.3.1.b. Absorción de hierro hemo.....	24
III.3.1.c. Factores que afectan la absorción de hierro.....	28
III.3.2. Calcio	29
III.3.3. Cinc	31
III.4. ANTINUTRIENTES	32
III.4.1. Ácido fólico	33
III.4.1.a. Recuerdo histórico.....	33
III.4.1.b. Características generales.....	33
III.4.1.c. Estructura y nomenclatura.....	35
III.4.1.d. Ácido fólico en las plantas.....	36
III.4.1.e. Ácido fólico en los animales.....	38
III.4.1.f. Métodos de determinación del ácido fólico.....	39
III.4.1.f.1. Introducción.....	39
III.4.1.f.2. Métodos cualitativos.....	39
III.4.1.f.3. Métodos cuantitativos.....	39
III.4.1.f.3.a. Precipitación.....	40
III.4.1.f.3.b. Cromatografía.....	40
-HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia).....	40
-HPIC Cromatografía de intercambio iónico.....	41
III.5. INFLUENCIA DEL PROCESADO INDUSTRIAL DE LOS ALIMENTOS SOBRE EL ÁCIDO FÓLICO	42
III.5.1. Introducción	42
III.5.2. Tratamiento térmico	44
III.5.2.1. Cocinado casero.....	44
III.5.2.2. Autoclavado.....	44
III.5.3. Maceración y germinación	45
III.5.4. Fermentación	45
III.6. INFLUENCIA DEL ÁCIDO FÓLICO EN LA DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES	46
III.6.1. Interacción con proteínas y almidón	46
III.6.2. Interacción con minerales y elementos traza	47
III.7. OTROS EFECTOS DEL ÁCIDO FÓLICO EN EL ORGANISMO	48
III.7.1. Efecto antitumoral	48

III.7.2. Enfermedades cardiovasculares	49
III.7.3. Cálculos renales	49
II.8. ABSORCIÓN DE NUTRIENTES EN LA MUCOSA INTESTINAL	49
III.8.1. Absorción y transporte de nutrientes en la mucosa intestinal	50
III.8.1.1. Absorción.....	50
III.8.1.2. Transporte.....	52
III.8.1.2.a. Ruta paracelular.....	52
III.8.1.2.b. Ruta transcelular.....	52
III.9. BIODISPONIBILIDAD MINERAL	53
III.9.1. Introducción	53
III.9.2. Biodisponibilidad del hierro	56
III.9.2.1. Captación celular de hierro.....	58
III.9.2.2. Transporte de hierro.....	59
III.9.2.3. Reservas de hierro en el organismo.....	60
III.9.2.4. Regulación de la captación y almacenamiento de hierro.....	61
III.9.3. Biodisponibilidad del calcio	62
III.9.4. Biodisponibilidad del cinc	63
III.9.5. Métodos <i>in vitro</i> para la determinación de la biodisponibilidad mineral	64
III.10. LÍNEA CELULAR CACO-2: ESTUDIO “IN VITRO” DE LA CAPTACIÓN Y TRANSPORTE MINERAL EN EL EPITELIO INTESTINAL	65
III.10.1. Captación y transporte de hierro, calcio y cinc en células Caco-2	67
III.10.1.1. Disoluciones patrón.....	67
III.10.1.1.a. Hierro.....	67
III.10.1.1.b. Calcio.....	69
III.10.1.1.c. Cinc.....	70
III.10.2. Alimentos	71
III.10.2.1. Digestión “in vitro”.....	71
III.10.2.2. Influencia de otros factores dietéticos en la captación y transporte de hierro, calcio y cinc en Caco-2.....	73
III.11. ESTRATEGIAS EMPLEADAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA PARA MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD MINERAL EN LOS CEREALES INFANTILES	77
III. 11.1. Fitasas	81
III.11.1.1. Introducción.....	81
III.11.1.2. Tipos de fitasas.....	82
III.12. NORMATIVA SOBRE LA UTILIZACIÓN DE FITASA Y SU EMPLEO EN NUTRICIÓN HUMANA	86
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	88
IV.1. MUESTRAS	88
IV.1.1. Descripción.....	88
IV.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	89
IV.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANALÍTICA	92
IV.3.1. ESTUDIO 1	92
IV.3.1.1 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO E INOSITOLES FOSFATO	92
IV.3.1.1.a. Validación del método analítico.....	92
IV.3.1.1.b. Patrones.....	93
IV.3.1.1.c. Inositoles fosfato.....	94
IV.3.1.1.d. Harinas de cereales y papillas infantiles.....	95

IV.3.1.2. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MINERAL EN Ca, Fe Y Zn DE LAS PAPILLAS INFANTILES, Y DE SUS MATERIAS PRIMAS	98
IV.3.1.2.a. Razones molares fitato:mineral (Fe, Ca, Zn)	102
IV.3.2. ESTUDIO 2	103
IV.3.2.1 PROCESADO DE LAS PAPILLAS INFANTILES: TOSTADO Y TRATAMIENTO ENZIMÁTICO	103
IV.3.2.1.a. Tostado.....	104
IV.3.2.1.b. Tratamiento enzimático con alfa-amilasa.....	104
IV.3.2.2. Desfitinización de las papillas infantiles	105
IV.3.2.2.a. Optimización del tratamiento enzimático.....	105
IV.3.2.2.b. Desfitinización de las papillas infantiles.....	106
IV.3.3. ESTUDIO 3	107
IV.3.3.1. BIOACCESIBILIDAD MINERAL DE LAS PAPILLAS INFANTILES	107
IV.3.3.1.a. Muestras.....	107
IV.3.3.1.b Determinación de la bioaccesibilidad de hierro, calcio y zinc	108
IV.3.3.1.b.1. Fracción soluble de mineral.....	109
IV.3.3.1.b.2. Fracción dializable de mineral.....	110
IV.3.4. ESTUDIO 4	111
IV.3.4.1. CULTIVOS CELULARES	111
IV.3.4.1.a. Lugar de trabajo.....	111
IV.3.4.1.b. Línea celular Caco-2.....	111
IV.3.4.1.b.1. Mantenimiento en cultivo de la línea celular.....	112
IV.3.4.1.b.2. Subcultivo de las células.....	112
IV.3.4.1.b.3. Recuento y viabilidad celular.....	113
IV.3.4.1.b.3.1. Ensayo de viabilidad-proliferación celular. Ensayo MTT.....	114
IV.3.4.1.b.4. Evaluación de la integridad de la monocapa celular: TEER y permeabilidad aparente (Prueba del rojo fenol).....	114
IV.3.4.1.b.4.1. Resistencia eléctrica transepitelial (TEER).....	115
IV.3.4.1.b.4.2. Permeabilidad aparente. Prueba del rojo fenol.....	116
IV.3.4.2. ESTUDIO DE LA DISPONIBILIDAD DE HIERRO, CALCIO Y CINCO EMPLEANDO LA LÍNEA CELULAR CACO-2	118
IV.3.4.2.1. Ensayos de captación. Frascos de 75 cm²	118
IV.3.4.2.1.a. Disoluciones patrón (Ca, Fe y Zn).....	118
IV.3.4.2.1.b. Muestras.....	120
IV.3.4.2.1.b.1. Captación de Ca, Fe y Zn. Disponibilidad mineral	122
IV.3.4.2.2. Estudio de la captación, retención y transporte. Pocillos bicamerales	124
IV.3.4.2.2.a. Evaluación de la toxicidad de las papillas infantiles sobre la monocapa celular.	125
IV.3.4.2.2.b. Determinación de la disponibilidad de hierro, calcio y cinc. Captación, retención y transporte.	127
IV.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	128
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	130
V.1. ESTUDIO 1	130
V.1.1. CONTENIDO EN INOSITOLES FOSFATO DE PAPILLAS INFANTILES Y DE SUS MATERIAS PRIMAS	130
V.1.1.1. Validación del método analítico.....	130
V.1.1.2. Contenido en inositoles fosfato.....	130
V.1.1.2.a. Materias primas.....	131
V.1.1.2.b. Papillas infantiles.....	133

V.1.2. CONTENIDO MINERAL (Fe, Ca Y Zn) Y COCIENTES MOLARES FITATO : Fe, Ca y Zn EN LAS PAPILLAS INFANTILES	133
V.2. ESTUDIO 2	136
V.2.1. EFECTO DEL PROCESADO EN LABORATORIO EN EL CONTENIDO DE INOSITOLES FOSFATO DE LAS PAPILLAS INFANTILES	136
V.2.1.1. Tostado y tratamiento alfa-amilasa de las harinas de cereales y papillas infantiles.....	136
V.2.1.1.a. Tostado.....	137
V.2.2.1.b. Tratamiento enzimático: Alfa-amilasa.....	139
V.2.2. Desfitinización de las papillas infantiles	144
V.2.2.1. Optimización del tratamiento enzimático con fitasa.....	145
V.2.2.2. Adición de fitasa de <i>A. oryzae</i> sobre las papillas infantiles.....	146
V.3. ESTUDIO 3	147
V.3.1. DIGESTIÓN “IN VITRO” DE LAS PAPILLAS INFANTILES. EFECTO DE LA DESFITINIZACIÓN Y DE LA ADICIÓN DE FÓRMULA INFANTIL. DETERMINACIÓN DEL MINERAL SOLUBLE Y DIALIZABLE	147
V.3.1.1. Fracción soluble	147
V.3.1.1.a. Hierro.....	147
V.3.1.1.b. Calcio.....	150
V.3.1.1.c. Cinc.....	151
V.3.1.2. Fracción dializable	153
V.3.1.2.a. Hierro.....	153
V.3.1.2.b. Calcio.....	158
V.3.1.2.c. Cinc.....	161
V.3.1.3. Efecto de la interacción de la desfitinización y de la adición de fórmula infantil sobre la solubilidad y diálisis mineral.....	164
V.3.1.4. Mineral disponible en cada toma realizada por el niño (200 mL).....	165
V.4. ESTUDIO 4	167
V.4.1. CULTIVOS CELULARES. DISPONIBILIDAD MINERAL	167
V.4.1.1. Crecimiento y diferenciación celular.....	167
V.4.1.2. Curva de crecimiento.....	167
V.4.1.3. Viabilidad celular. Ensayo MTT.....	168
V.4.1.4. Evaluación de la integridad de la monocapa celular: TEER y rojo fenol.....	169
V.4.1.4.a. Resistencia eléctrica transepitelial (TEER).....	169
V.4.1.4.b. Prueba del rojo fenol. Permeabilidad aparente.....	171
V.4.2. BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO, CALCIO Y CINC EN CÉLULAS CACO-2	172
V.4.2.1. Ensayos de captación. Frascos de 75 cm²	172
V.4.2.1.a. Disoluciones patrón de hierro, calcio y cinc.....	172
V.4.2.1.b. Papillas infantiles. Ensayos de captación.....	178
V.4.2.1.b.1. Papillas elaboradas con agua.....	178
V.4.2.1.b.1.1. Hierro.....	178
V.4.2.1.b.1.2. Calcio.....	179
V.4.2.1.b.1.3. Cinc.....	180
V.4.2.1.b.2. Papillas infantiles elaboradas con fórmula de continuación.....	185
V.4.2.1.b.2.1. Hierro.....	185
V.4.2.1.b.2.2. Calcio.....	186
V.4.2.1.b.2.3. Cinc.....	186
V.4.2.1.c. Efecto de la interacción de la desfitinización y de la adición de fórmula infantil sobre la captación mineral.....	191
V.4.2.1.2. Correlación entre la solubilidad, diálisis y captación de hierro, calcio y cinc	193

V.4.1.2. Biodisponibilidad mineral. Ensayos de captación, retención y transporte de hierro, calcio y cinc	195
V.4.1.2.a. Evaluación de la toxicidad de las papillas infantiles sobre la monocapa celular: Resistencia eléctrica transepitelial (TEER).....	195
V.4.1.2.a.1. TEER en muestras sin tratamiento con fitasa.....	195
V.4.1.2.a.2. TEER en muestras con tratamiento con fitasa.....	197
V.4.1.2.b. Captación, retención y transporte de hierro, calcio y cinc.....	198
V.4.1.2.b.1. Hierro.....	198
V.4.1.2.b.2. Calcio.....	199
V.4.1.2.b.3. Cinc.....	201
V.4.1.2.1. Correlación entre la solubilidad, captación, retención y transporte de hierro, calcio y cinc.....	205
V.5. Papillas infantiles ¿desfitinizadas o no?, ¿mezcladas con agua o con fórmula infantil?	207
VI. CONCLUSIONES	214
VII. RESUMEN	216
IX. SUMMARY	219
X. EXTENDED SUMMARY	222
XI. BIBLIOGRAFÍA	286

INDICE DE TABLAS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1 Composición química aproximada de los granos de cereales (por 100 g).....	15
Tabla 2 Recomendaciones diarias de minerales en los tres primeros años de vida.....	22
Tabla 3. Contenidos en ácido fítico de algunos vegetales.....	37

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 4. Harinas empleadas en la elaboración de cada una de las papillas infantiles.....	88
Tabla 5. Contenidos de Fe, Ca y Zn en el patrón de referencia BCR-189.....	99
Tabla 6. Condiciones instrumentales establecidas para la determinación de los minerales estudiados (Ca, Fe y Zn) por AAS.....	101
Tabla 7. Concentraciones utilizadas para la elaboración de la recta patrón de Fe, Ca y Zn, ecuaciones de las rectas de calibrado y coeficientes de linealidad (R^2) de cada una de ellas.....	101
Tabla 8. Muestras empleadas en el estudio de la disponibilidad mineral.....	107
Tabla 9. Concentraciones finales de las disoluciones patrón de Fe, Ca y Zn.....	119
Tabla 10. Muestras empleadas en el estudio de la disponibilidad mineral con células Caco-2.....	121
Tabla 11. Condiciones instrumentales para la determinación de calcio, hierro y cinc por EAA-llama.....	122

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 12. Resultados de la validación del método analítico de HPLC empleado en este estudio.....	130
Tabla 13. Niveles de inositolos fosfato (mg/100 g) en las materias primas seleccionadas para la elaboración de las papillas infantiles empleadas en este estudio.....	131
Tabla 14. Niveles de inositolos fosfato (mg/100 g) en las papillas infantiles empleadas en este estudio.....	133
Tabla 15. Contenido en Fe, Ca y Zn de las papillas infantiles y leche de continuación.....	134
Tabla 16. Cocientes molares (IP_5+IP_6):hierro, calcio y cinc de las papillas infantiles.....	135
Tabla 17. Efecto del tostado en el contenido de los inositolos hexafosfato (mg/100 g) de las materias primas seleccionadas para la elaboración de las papillas infantiles empleadas en este estudio.....	138
Tabla 18. Efecto del tostado en el contenido de los inositolos pentafosfato (mg/100 g) de las materias primas seleccionadas para la elaboración de las papillas infantiles empleadas en este estudio.....	139
Tabla 19. Efecto de la adición de alfa-amilasa en el contenido de inositolos fosfato (mg/100 g) de las materias primas tostadas.....	140
Tabla 20. Contenido en inositol pentafosfato (mg/100 g) de las mezclas de cereales de las papillas infantiles tras los procesos de tostado y con alfa-amilasa en laboratorio.....	142
Tabla 21. Contenido en inositol hexafosfato (mg/100 g) de las mezclas de cereales de las papillas infantiles tras los procesos de tostado y con alfa-amilasa en laboratorio.....	143
Tabla 22. ANOVA multifactorial para el efecto de la desfitinización, reconstitución, así como de la interacción entre ambas sobre los porcentajes de solubilidad y dialización de hierro, calcio y cinc en las papillas infantiles empleadas en este estudio (valores de p).....	166

Tabla 23. Mineral disponible (mg) en cada toma realizada por el niño (200 ml) de papillas infantiles mezcladas con fórmula láctea de continuación.....	167
Tabla 24. Resistencia (Ω .cm ²) de las células Caco-2.....	171
Tabla 25. Prueba del rojo fenol (RF)	172
Tabla 26. Captación y disponibilidad de hierro por las células Caco-2 a partir de distintas concentraciones de soluciones patrón de FeCl ₃ .6H ₂ O.....	176
Tabla 27. Captación y disponibilidad de calcio por las células Caco-2 a partir de distintas concentraciones de soluciones patrón de CaCl ₂	177
Tabla 28. Captación y disponibilidad de cinc por las células Caco-2 a partir de distintas concentraciones de soluciones patrón de ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	178
Tabla 29. Captación y disponibilidad de hierro por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con agua.....	183
Tabla 30. Captación y disponibilidad de calcio por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con agua.....	184
Tabla 31. Captación y disponibilidad de cinc por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con agua.....	185
Tabla 32. Captación y disponibilidad de hierro por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con fórmula de continuación.....	189
Tabla 33. Captación y disponibilidad de calcio por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con fórmula de continuación.....	190
Tabla 34. Captación y disponibilidad de cinc por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con fórmula de continuación.....	191
Tabla 35. ANOVA de dos vías para la disponibilidad de hierro, calcio y cinc a partir de la captación mineral en las células Caco-2 de las papillas infantiles empleadas en este estudio	193
Tabla 36. Análisis de correlación entre la solubilidad, diálisis y captación de Fe, Ca y Zn.....	195
Tabla 37. Hierro: Retención, transporte y captación en células Caco-2 a partir de papillas infantiles desfitinizadas o no, reconstituidas con agua.....	202
Tabla 38. Calcio: Retención, transporte y captación en células Caco-2 a partir de papillas infantiles desfitinizadas o no, reconstituidas con agua.....	203
Tabla 39. Cinc: Retención, transporte y captación en células Caco-2 a partir de papillas infantiles desfitinizadas o no, reconstituidas con agua.....	204
Tabla 40. Análisis de correlación entre la solubilidad, retención, transporte y captación de Fe, Ca y Zn.....	209
Tabla 41. Códigos empleados para cada muestra en la representación gráfica del análisis de conglomerados.....	211
Tabla 42. Centros de conglomerados finales para la dialización mineral de las papillas infantiles	211
Tabla 43. Centros de conglomerados finales para la solubilidad y captación mineral de las papillas infantiles.....	213
Tabla 44. Centros de conglomerados finales para la solubilidad, captación y transporte mineral de las papillas infantiles.....	214

INDICE DE FIGURAS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Mecanismo de absorción intestinal de hierro.....	26
Figura 2. Mecanismo de absorción intestinal del calcio.....	30
Figura 3. Mecanismo de absorción intestinal del cinc.....	32
Figura 4. Estructura del myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis (dihidrógenofosfato).....	36
Figura 5. Posibles interacciones del ácido fitico con minerales, elementos traza, proteínas y almidón.....	46
Figura 6. Corte longitudinal del intestino delgado.	50
Figura 7. Corte longitudinal de vellosidades intestinales.....	51
Figura 8. Célula del epitelio intestinal.....	51
Figura 9. Caco-2. Microscopio electrónico.	66

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 10. Representación gráfica del diseño experimental del presente estudio de investigación.....	91
Figura 11. Recta de calibrado para la determinación del ácido fitico.....	94
Figura 12. Perfil cromatográfico de un hidrolizado de fitato de sodio.....	95
Figura 13. Procedimiento de extracción de los inositoles fosfato.....	98
Figura 14. Diagrama de flujo de elaboración de las papillas infantiles.....	103
Figura 15. Representación de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial.....	115
Figura 16. Medida de la TEER.....	116

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 17. Perfil cromatográfico de la harina de avena para la determinación de inositoles fosfato.....	132
Figura 18. Degradación de ácido fitico mediante la acción de las fitasas procedentes de <i>A. niger</i> (Tª 55°C) y <i>A. oryzae</i> (Tª 55°C) sobre el ácido fitico en diferentes condiciones de pH. Cada punto representa el valor medio de tres determinaciones tomadas tras 20 min de incubación.....	145
Figura 19. Porcentaje de solubilidad del hierro en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil.....	149
Figura 20. Porcentaje de solubilidad del calcio en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil.....	151
Figura 21. Porcentaje de solubilidad del cinc en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil.....	153
Figura 22. Porcentaje de dialización del hierro en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil.....	158
Figura 23. Porcentaje de dialización del calcio en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil.....	161
Figura 24. Porcentaje de dialización del cinc en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil.....	164
Figura 25. Diferentes fases en el crecimiento de las células Caco-2. A) 4º día de siembra, B) 16º día de siembra. C) curva de crecimiento.....	169
Figura 26. Ensayo MTT.....	170
Figura 27. Formación progresiva de uniones funcionalmente estrechas durante la diferenciación de las células Caco-2 (21 días).	173
Figura 28. Valores de la TEER en células Caco-2 tratadas en su polo apical con las fracciones solubles procedentes de la digestión <i>in vitro</i> de papillas infantiles.....	197

Figura 29. Valores de la TEER en células Caco-2 obtenidos durante el proceso de captación y transporte de minerales a partir de digeridos de papillas infantiles desfitinizadas.....	198
Figura 30. Papillas Ocho cereales miel, Multicereales, Crema de arroz y Cereales sin gluten. Porcentajes de captación y transporte de minerales.....	205
Figura 31. Representación gráfica de los tres conglomerados obtenidos mediante el análisis de Cluster para la dialización mineral de las papillas infantiles, así como de las muestras que pertenecen a cada uno de ellos.....	212
Figura 32. Representación gráfica de los tres conglomerados obtenidos mediante el análisis de Cluster para la solubilidad y captación mineral de las papillas infantiles, así como de las muestras que pertenecen a cada uno de ellos.....	213
Figura 33. Representación gráfica de los tres conglomerados obtenidos mediante el análisis de Cluster para la solubilidad, captación y transporte mineral de las papillas infantiles, así como de las muestras que pertenecen a cada uno de ellos.....	215

ABREVIATURAS

%	Porcentaje	HEPES	1-ácido piperazinetanosulfónico 4-(2-hidroxietil) sal monosódica
W	Ohmio	HPIC	High performance ionic chromatography
µg	Microgramos	Kcal	Kilocaloría
µm	Micrómetros	KDa	KiloDalton
µm³	Micrómetros cúbicos	Kg	Kilogramo
AAS	Atomic absorption spectroscopy	L	Litro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	LaCl₃	Cloruro de lantano
AOAC	Association of Official Analytical Chemistry	Mg	Magnesio
ARN	Ácido Ribonucleico	µg	microgramo
ATP	Adenosin Trifosfato	mbar	milibar
BSS	Balanced Salt Solution	mg	Miligramo
°C	Grados centígrados	µL	Microlitro
Ca	Calcio	MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
CaCl₂	Cloruro de calcio anhidro	min	Minuto
CDR	Cantidad Diaria Recomendada	mL	Mililitro
CE	Comunidad Europea	µM	Micromolar
Cu	Cobre	mm	Milímetros
Da	Dalton	mM	Milimolar
DMSO	Dimetilsulfóxido	Mn	Manganeso
DRI	Dietary Reference Intake	mOsm	Miliosmoles
EAA	Espectrofotometría de Absorción Atómica	MTT	Bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
EAR	Estimated Average Requirements	Na	Sodio
EC	Enzyme Commission	NaHCO₃	Bicarbonato sódico
ECACC	European Collection of Cell Cultures	Na₂EDTA	Etilendiaminotetraacetato -sódico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	NaOH	Hidróxido sódico
E-MEM	Eagle minimum essential medium	nm	Nanómetros
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato	NRC	National Research Council
ESPAGAN	European Society of Gastroenterology and Nutrition	OPS	Organización Panamericana de la salud
FAO	Food and Agriculture Organization	p	Nivel de significación estadístico
Fe⁺²	Hierro ferroso	Papp	Permeabilidad aparente
Fe⁺³	Hierro férrico	PBS	Phosphate buffer saline
FeCl₃ 6H₂O	Cloruro férrico hexa hidratado	ppm	Partes por millón
FTU	Unidad fitasa	r	Coe ficiente de correlación
FOS	Fructooligosacáridos	r²	Coeficiente de regresión lineal
g	Gramo	RDR	Requerimiento dietético recomendado
H₂SO₄	Ácido sulfúrico	rpm	Revoluciones por minuto
Hb	Hemoglobina	s	Segundo
HCl	Ácido clorhídrico	SA	Sociedad Anónima
HNO₃	Ácido nítrico	SAX	Strong Anion Exchanger
		Se	Selenio

SEDCA	Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación
T^a	Temperatura
Tf	Transferrina
TEER	Transepithelial electrical resistance
UNICEF	United Nations Children's Fund
WHO	World Health Organization
Zn⁺²	Zinc
ZnSO₄·7H₂O	Sulfato de cinc heptahidratado

I. INTRODUCCIÓN

Durante la infancia y la adolescencia, la dieta influye en gran manera, no sólo sobre la salud inmediata de los individuos sino también sobre la salud de éstos en la edad adulta. Un adecuado aporte de minerales a estas edades es necesario, ya que una deficiencia de los mismos, puede con frecuencia suponer la aparición de enfermedades y de graves alteraciones del desarrollo. Durante estas etapas de la vida, en las que se produce un rápido crecimiento corporal, y la demanda de nutrientes es mayor, se hace necesario optimizar la absorción de los mismos (Favier, 1993). La leche humana es el alimento ideal durante los cuatro o seis primeros meses de vida, ya que cubre todas las necesidades nutritivas del lactante.

En un gran número de países en vías de desarrollo, los copos de cereales son introducidos en la alimentación infantil antes de los cuatro meses de edad. Esta práctica suele asociarse al desarrollo de enfermedades carenciales, fundamentalmente debidas a deficiencias en hierro (WHO, 2001; UNICEF, 2003). El ácido fítico es el principal antinutriente presente en los cereales. Se sabe que se halla presente a altas concentraciones en granos de cereales y en legumbres (1-2 %), y puede inhibir de forma significativa la absorción de minerales mediante la formación de complejos insolubles con minerales de interés nutricional, como el hierro, el calcio y el cinc (Hurrell *et al.*, 1992), impidiendo su absorción. Durante el procesado y almacenamiento de los alimentos, el inositol hexafosfato o ácido fítico, puede ser parcialmente desfosforilado dando lugar a inosoles con un menor número de fosfatos y que presentan una menor capacidad quelante de minerales (Chen, 2004).

La presencia de factores antinutricionales en los alimentos que pueden interferir en la disponibilidad mineral justifica el interés por el estudio de cómo influyen los factores dietéticos en la captación y transporte de minerales. Adquiere por ello una gran importancia el estudio de la influencia que ejerce el ácido fítico sobre la disponibilidad mineral, para lo cual se han desarrollado métodos *in vitro* que se basan en la simulación de la digestión gastrointestinal y posterior estimación de la proporción de nutriente ingerido que se

transforma en forma soluble en el tracto gastrointestinal midiendo la fracción que dializa a través de una membrana de cierto tamaño de poro y expresando los resultados como porcentaje de mineral dializable (Sebastiá *et al.*, 2001). En los métodos *in vitro* de determinación de la biodisponibilidad mineral se tiende actualmente a emplear la línea celular Caco-2 debido a su gran similitud con los enterocitos humanos maduros, como etapa siguiente a la simulación de la digestión gastrointestinal (Glahn *et al.*, 1998).

El desarrollo de estrategias en la industria alimentaria que permitan incrementar la disponibilidad mineral está adquiriendo una gran importancia. Aunque se ha comprobado que procesos como la molienda, la germinación o la fermentación de las semillas de cereales se han comprobado que reducen los niveles de ácido fítico, la adición de fitasa exógena permitiría obtener productos con un mejor valor nutricional, beneficiosos para la salud y que mantengan intactas sus propiedades sensoriales. Estos alimentos podrían ser catalogados como alimentos funcionales.

II. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo han sido:

1.-Identificar y cuantificar los inositoles fosfato presentes en las papillas infantiles a base de cereales y en sus materias primas

2.-Estudiar el efecto del procesado tecnológico de las papillas infantiles (tostado y tratamiento con alfa-amilasa) sobre el contenido de inositoles fosfato, y estimar la disponibilidad de hierro, calcio y cinc en las papillas comerciales mediante el cálculo de las razones molares inositoles fosfato/mineral.

3.-Optimizar la adición de fitasa exógena durante el procesado de las papillas infantiles estudiando las condiciones óptimas de la actuación de la enzima con el fin de conseguir la desfitinización total de las mismas.

4.-Estimar la biodisponibilidad mineral *in vitro* de papillas infantiles a base de cereales, mediante una digestión gastrointestinal simulada (realizando ensayos de solubilidad y diálisis), estudiando la influencia que ejerce sobre la misma la desfitinización y/o la adición de una fórmula de continuación para su reconstitución.

5.-Estudiar el efecto que ejerce la desfitinización y/o la adición de fórmula de continuación a las papillas infantiles sobre la biodisponibilidad mineral *in vitro* empleando la línea celular Caco-2

III.1 ALIMENTACIÓN INFANTIL

III.1.1 INTRODUCCIÓN

Los cereales, por sus características nutritivas constituyen un producto básico en la alimentación de la población y son generalmente el primer alimento sólido que se incorpora en la dieta del niño. Los cereales son empleados como dieta complementaria a la lactancia materna a partir del 4^o-6^o mes ya que suministra nutrientes esenciales, especialmente hidratos de carbono, proteínas, minerales y vitaminas (particularmente tiamina). Además son alimentos con un bajo contenido en grasa pero ricos en ácidos grasos esenciales (Febles *et al.*, 2001).

Además, la administración de una dieta complementaria al niño, estimula la función gastrointestinal y favorece el establecimiento de buenos hábitos alimenticios. Por otro lado, los cereales están comúnmente recomendados como comienzo de una dieta complementaria ya que presentan un elevado contenido de energía (80 kcal/100 g) (Febles *et al.*, 2001). Los cereales y sus derivados son pobres en calcio, aunque son ricos en potasio y en fósforo. La composición química aproximada de los granos de cereales se muestra en la Tabla 1 (FAO, 2001; García y Guerra, 2005).

Tabla 1. Composición química aproximada de los granos de cereales (por 100 g)

	Mijo	Maíz	Trigo	Cebada	Centeno	Sorgo	Arroz	Avena
Humedad (g)	13,3	12,0	14,0	11,7	15,0	14,0	11,8	8,9
Proteínas (g)	5,8	8,7	12,7	10,6	8,2	8,3	6,4	12,4
Carbohidratos digeribles (g)	66,3	62,4	77,7	56,1	58,9	59,3	74,3	60,1
Fibra dietética (g)	8,5	11,0	12,6	17,3	14,6	13,8	3,5	10,3
Lípidos (g)	4,6	4,3	2,2	1,6	1,5	3,1	2,4	6,4
Calcio (mg)	17	15	36	50	64	28	10	55
Hierro (mg)	39	-	3,6	6	4,6	10	0,8	-
Cinc (mg)	2,5	2,5	2,4	3,3	1,3	1,4	0,2	4,5

Con respecto a las vitaminas, las que se presentan en mayor proporción son las del grupo B (B₁, B₂, B₃ y ácido fólico). Los cereales son en general pobres en vitamina C, que además se degrada fácilmente durante el almacenamiento y la cocción.

La introducción de los cereales como alimentación complementaria y las características propias del recién nacido que limitan el manejo de ciertos nutrientes, hacen necesario la investigación sobre la alimentación más adecuada en estas edades (Splett y Story, 1991).

Durante la infancia y la adolescencia, la dieta influye en gran manera, no sólo sobre la salud inmediata de los individuos sino también sobre la salud de éstos en la edad adulta. Un adecuado aporte de minerales a estas edades es necesario, ya que una deficiencia de los mismos, puede con frecuencia suponer la aparición de enfermedades y de graves alteraciones del desarrollo. Durante estas etapas de la vida, en las que se produce un rápido crecimiento corporal, y la demanda de nutrientes es mayor, se hace necesario optimizar la absorción de los mismos (Favier, 1993). La leche humana es el alimento ideal durante los cuatro o seis primeros meses de vida, ya que cubre todas las necesidades nutritivas del lactante. Al mismo tiempo, la lactancia materna ha demostrado tener un carácter protector frente a infecciones gastrointestinales, respiratorias y urinarias (Pisacane *et al.*, 1992). Durante el período de los cuatro a seis meses de edad, se comienzan a introducir en los niños los alimentos sólidos a fin de suplementar la leche materna o las fórmulas infantiles (Bosscher *et al.*, 2001). A partir del cuarto mes de vida existe un mayor riesgo de desarrollar deficiencias en hierro como consecuencia de la disminución que se produce en los depósitos orgánicos de este mineral, así como del incremento en las necesidades debido al rápido crecimiento de los tejidos que se produce durante este periodo (Febles, 2001).

El tipo de alimentación complementaria que se suministra a los niños depende de distintos factores como las tradiciones o la disponibilidad del alimento, variando por tanto de un modo importante entre los distintos países. Muchos niños reciben como primer alimento sólido los cereales, tanto en países en desarrollo como en países industrializados. El gluten, proteína presente en algunos cereales, no debe ser introducido en la dieta de los

niños antes del sexto mes de vida a fin de prevenir posibles alergias (ESPAGAN, 1982), por lo que en general los alimentos infantiles a base de cereales están elaborados con arroz o maíz. Se sabe que los cereales son pobres en los aminoácidos esenciales triptófano y lisina, por lo que para mejorar el valor nutricional de estos alimentos se combinan normalmente con leche (Egli, 2001).

En un gran número de países en vías de desarrollo, los copos de cereales son introducidos en la alimentación infantil antes de los cuatro meses de edad, esta práctica suele asociarse al desarrollo de enfermedades carenciales, fundamentalmente debidas a deficiencias en hierro (WHO, 2001; UNICEF, 2003). La alimentación complementaria suministrada durante la infancia en estos países, consiste fundamentalmente en preparados a base de maíz, sorgo o mijo. La presencia de importantes niveles de factores antinutricionales, como el ácido fítico, en estos cereales, compromete un correcto balance mineral en estos niños (Polycarpe Kayodé *et al.*, 2007).

En los países industrializados, se añaden frecuentemente fórmulas de continuación o leche de vaca a los alimentos infantiles elaborados a base de cereales. Sin embargo en los países en desarrollo es más frecuente la adición de leguminosas en combinación con los cereales. Las leguminosas son en general pobres en metionina; su combinación con los cereales permite la obtención de adecuado balance proteico.

Para la fabricación comercial de los alimentos infantiles en la Unión Europea, la Directiva 96/5/EC (1996) de las Comunidades Europeas sobre alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles, regula la composición esencial de esos productos así como la adición de vitaminas, minerales y elementos traza. Niveles máximos para el contenido en proteína y grasa (relativa al contenido en energía) y niveles mínimos de calidad de la proteína se incluyen en esta Directiva. El Codex Alimentarius para este mismo tipo de alimentos define los ingredientes, el límite mínimo de contenido en proteína así como su calidad, los aditivos permitidos, y las normas de envasado y etiquetado de estos alimentos (FAO/WHO, 1994). Una Directiva europea aprobada el 5 de diciembre de 2006, incorpora modificaciones y mejoras sobre la Directiva 96/5/EC y codifica, en el ámbito de la Unión

Europea, la regulación sobre alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.

III.1.2. COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS INFANTILES.

III.1.2.1. Reglamentación. Clasificación.

En la actualidad existen en el mercado una gran variedad de productos destinados a la población lactante e infantil. Garantizar su calidad nutricional y su seguridad pasa por el cumplimiento de la normativa en relación con este tipo de productos. A fin de cumplir las exigencias nutritivas de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad, la Unión Europea emitió la Directiva 96/5/CE, de la Comisión, de 16 de febrero, modificada posteriormente por las Directivas 98/36/CE, de 2 de junio y la Directiva 99/39/CE, de 6 de mayo. Los productos a los que se refieren estas disposiciones son “productos alimenticios destinados a una alimentación especial, que satisfagan las necesidades específicas de los lactantes y los niños de corta edad en buen estado de salud, destinados a los lactantes durante el período de destete y a los niños de corta edad, como complemento de su dieta y/o para su progresiva adaptación a los alimentos normales”. Los cereales son el primer alimento en introducirse en la alimentación complementaria. Estas disposiciones han sido incorporadas al ordenamiento jurídico español mediante una reglamentación técnico sanitaria (RTS) específica, adoptada a través del RD 490/1998, de 27 de marzo, modificada posteriormente mediante el RD 1445/2000, de 31 de julio, respectivamente.

Los “alimentos elaborados a base de cereales” se dividen en cuatro categorías:

-Cereales simples reconstituidos o que deben reconstituirse con leche u otro líquido alimenticio adecuado.

-Cereales con adición de otro alimento rico en proteínas reconstituidos o que deben reconstituirse con agua u otro líquido que no contenga proteínas.

-Pastas que deben cocer en agua hirviendo o en otros líquidos apropiados antes de su consumo.

-Bizcochos y galletas que pueden consumirse directamente o, una vez pulverizados, con adición de agua, leche u otro líquido adecuado.

Los criterios de composición de estos alimentos están detallados en los anexos I y II de la RTS, describiendo los contenidos mínimos y máximos para los distintos nutrientes y para las relaciones entre ellos. Se establecen criterios de composición específicos para cada tipo de producto, así como un listado positivo de las sustancias nutricionales que pueden utilizarse para su enriquecimiento.

La Directiva de 5 de diciembre de 2006, clarifica la situación legal de las dos principales categorías de alimentos destinados a lactantes (menos de 12 meses) y de niños de corta edad (entre uno y tres años). De esta forma, los productos alimenticios que regula son los alimentos elaborados a base de cereales y los alimentos infantiles distintos de los alimentos elaborados a base de cereales. El ámbito de aplicación de esta Directiva para los alimentos a base de cereales se extiende a las mismas subcategorías que las detalladas en la Directiva 99/39/CE, de 6 de mayo y que se han especificado anteriormente.

En relación con el etiquetado de estos alimentos, se expresa la obligatoriedad de expresar la edad del lactante o niño de corta edad a partir de la cual pueden ser consumidos, que ha de ser como mínimo de cuatro meses. Asimismo, se hará mención de la presencia o ausencia de gluten cuando la edad indicada para el consumo del producto sea inferior a seis meses. Deberá indicar igualmente el valor energético disponible expresado en KJ y Kcal, y el contenido de proteínas, hidratos de carbono y lípidos expresados en forma numérica por cada 100 g o 100 mL de producto. Se señala la importancia de ajustarse a las instrucciones sobre la correcta preparación del producto, y en caso necesario, figurarán en la etiqueta. La Directiva permite declaraciones referentes a estos productos que no estén expresamente prohibidas de conformidad a las normas aplicables a todos los productos alimenticios, siempre y cuando se tengan en cuenta, cuando proceda, los criterios de composición

especificados en la misma; así como menciones facultativas sobre la cantidad media de nutrientes e información sobre determinadas vitaminas y minerales.

III.1.2.2. Características y composición nutricional

III.1.2.2.a. *Viscosidad y contenido energético*

Los alimentos infantiles se presentan generalmente para ser ingeridos con una consistencia semisólida. La viscosidad y la densidad energética son factores de una gran importancia a tener en cuenta a fin de asegurar una adecuada ingesta energética en los niños. Los requerimientos energéticos en el niño dependen de la edad, de la frecuencia de ingesta y de la cantidad de leche materna consumida (Egli, 2001). Los alimentos elaborados a base de cereales tienen elevado contenido en almidón, lo cual resulta en que sean alimentos con una elevada viscosidad. En los países en desarrollo, es frecuente la preparación de estos alimentos diluyéndolos con agua a fin de disminuir su viscosidad, reduciéndose por tanto su densidad en nutrientes y energía.

El modo más eficiente de reducir la viscosidad, sin disminuir la energía ni la densidad de nutrientes, es la adición de amilasa (WHO, 1998).

III.1.2.2.b. *Proteína y grasa*

Los requerimientos de proteína son aproximadamente tres veces superiores (por kilogramo de peso) durante los primeros meses de vida que durante la etapa adulta. Los requerimientos de aminoácidos esenciales son también elevados durante esta etapa, y son por tanto difíciles de cubrir con proteínas de bajo valor biológico (Egli, 2001). Las grasas proporcionan ácidos grasos esenciales, vitaminas liposolubles, y son una importante fuente de energía. La ingesta diaria de grasa debe suponer un 30-45% de la ingesta diaria en los niños menores de dos años (FAO, 1998).

III.1.2.2.c. *Fibra dietética*

Un nivel máximo de un 5% de fibra cruda en alimentos infantiles ha sido sugerido por la FAO (1985). Los alimentos infantiles que se encuentran en el mercado presentan en general bajos niveles de fibra dietética. No se han encontrado diferencias en la ingesta de nutrientes y energía cuando a niños sanos se les suministra dietas de alto o bajo contenido en fibra dietética (Davidsson *et al.*, 1997).

III.1.2.2.d. *Micronutrientes*

Los micronutrientes más importantes en la alimentación infantil son el hierro, cinc, calcio entre los minerales y la vitamina A (FAO; 1998). Los niños utilizan los depósitos de hierro presentes en el nacimiento junto a las pequeñas cantidades que proporciona la leche materna para el crecimiento y la síntesis de glóbulos rojos. Por lo tanto, los depósitos de hierro presentes disminuyen, incrementándose el riesgo de aparición de deficiencia en hierro después de los seis meses de edad en caso de que la alimentación complementaria no suministre la cantidad adecuada de hierro o éste no presente la suficiente disponibilidad (Dallmann, 1992). En los países industrializados, los alimentos infantiles empleados son frecuentemente enriquecidos con hierro, mientras que en los países en desarrollo, estos alimentos suelen presentar bajos niveles o baja disponibilidad de hierro. La situación que presentan el calcio y el cinc es similar. Los alimentos de origen animal tienen elevados niveles de cinc (carne) y de calcio (leche y productos lácteos). Las necesidades de vitamina A son difíciles de cubrir ya que el retinol no está presente en vegetales y el β -caroteno no está presente o lo está a niveles muy bajos en la mayoría de cereales y legumbres.

III.2. NECESIDADES NUTRICIONALES DE LOS MINERALES

El organismo humano contiene aproximadamente un 4% de minerales que deben ser aportados por la dieta (Linder, 1988). Las necesidades de elementos minerales durante el primer año de vida son muy importantes ya que juegan un papel esencial en la mineralización ósea y el desarrollo físico y mental. Es necesario establecer los

requerimientos nutricionales del niño para evitar las enfermedades que derivan de una insuficiencia mineral, tanto a corto plazo como en la edad adulta. En la Tabla 2 se pueden observar las recomendaciones diarias recomendadas (RDR) de los distintos minerales en los primeros tres años de vida, según NRC (1991).

Tabla 2. Recomendaciones diarias de minerales en los tres primeros años de vida

MINERALES	EDAD		
	0-6 meses	6-12 meses	1-3 años
Calcio	400	600	800
Fósforo	300	500	800
Magnesio	40	60	90
Hierro	6	10	10
Cinc	5	5	10
Yodo	40	50	70
Selenio	10	15	20
Cobre	0,4-0,6	0,6-0,7	0,7-1
Manganeso	0,3-0,6	0,6-1	1-1,5

Ca, P, Mg, Fe, Zn, I, Cu, Mn (mg/día); Se (µg/día)

Hierro: La leche humana y la de vaca tienen un contenido entre 0,01-0,05 mg/100 mL. Ambas permiten cubrir las necesidades del recién nacido y lactante sano en las primeras ocho semanas de vida. A partir del tercer mes el niño necesita aproximadamente 1 mg/kg/día, y puesto que el cociente de absorción del Fe es de 7-15%, las fórmulas utilizadas para la alimentación de los lactantes a partir del tercer mes deben estar enriquecidas con hierro, recomendándose una concentración igual o superior a 1 mg/100 kcal, sin que la ingesta total exceda los 15 mg/día (Hernández Rodríguez, 1999).

Calcio: La dosis diaria recomendada de calcio para niños de entre 0-12 meses, se ha establecido en 210-270 mg/día. El calcio debe estar en forma soluble para poder ser absorbido en el tracto intestinal, y debe estar en forma ionizada como Ca^{2+} , o bien ligado a moléculas orgánicas antes de atravesar la pared intestinal. La leche materna aporta alrededor de 300 mg de calcio al día, de los que se absorbe el 75%. Los expertos en nutrición

infantil hacen las siguientes recomendaciones en relación con el aporte de calcio en la dieta: 50 mg de Ca/100 kcal, que es aproximadamente el contenido de calcio en la leche materna (FAO/OMS, 1987) o 60-75 mg/100 kcal (ESPGAN, 1982).

Cinc: Se estima que los requerimientos de cinc durante los primeros cuatro meses de edad son de 230 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. Los requerimientos de cinc descienden progresivamente con la edad; entre los 4 y los 6 meses se estiman en 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, y en 93 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ desde el sexto mes hasta el primer año de vida.

Los principales componentes de la alimentación complementaria son los cereales, vegetales y legumbres, debido a que son una importante fuente de proteínas, minerales y vitaminas, no obstante este tipo de alimentos se caracterizan también por presentar elevados niveles de sustancias antinutrientes (Hurrell, 2003).

III.3. ABSORCIÓN Y METABOLISMO DE HIERRO, CALCIO Y CINCO

III.3.1. Hierro

En un individuo normal, las necesidades diarias de hierro son muy bajas en comparación con el hierro circulante, por lo que sólo se absorbe una pequeña proporción del total ingerido. Esta proporción varía de acuerdo con la cantidad y el tipo de hierro presente en los alimentos, el estado de los depósitos corporales del mineral, las necesidades, la actividad eritropoyética y una serie de factores luminales e intraluminales que interfieren o facilitan la absorción (Reddy *et al.*, 2006).

La absorción depende en primer lugar del tipo de compuesto de hierro presente en la dieta, en dependencia de lo cual van a existir dos formas diferentes de absorción: la del hierro hemo y la del hierro inorgánico (Amaro y Cámara, 2004).

III.3.1.a. *Absorción de hierro inorgánico*

El hierro inorgánico por acción del ácido clorhídrico del estómago pasa a su forma reducida, hierro ferroso (Fe^{2+}), que es la forma química soluble capaz de atravesar la membrana de la mucosa intestinal.

Algunas sustancias como el ácido ascórbico, ciertos aminoácidos y azúcares pueden formar quelatos de hierro de bajo peso molecular que facilitan la absorción intestinal de este (Derman *et al.*, 1980).

Aunque el hierro puede absorberse a lo largo de todo el intestino, su absorción es más eficiente en el duodeno y la parte alta del yeyuno. La membrana de la mucosa intestinal tiene la facilidad de atrapar el hierro y permitir su paso al interior de la célula, debido a la existencia de un receptor específico en la membrana del borde en cepillo. La apotransferrina del citosol contribuye a aumentar la velocidad y eficiencia de la absorción de hierro (Hallberg *et al.*, 1989).

En el interior del citosol, la ceruloplasmina (endoxidasa I) oxida el hierro ferroso a férrico para que sea captado por la apotransferrina que se transforma en transferrina. El hierro que excede la capacidad de transporte intracelular es depositado como ferritina, de la cual una parte puede ser posteriormente liberada a la circulación (Glahn, 1998).

III.3.1.b. *Absorción de hierro hemo*

Este tipo de hierro atraviesa la membrana celular como una metaloporfirina intacta, una vez que las proteasas endoluminales o de la membrana del enterocito hidrolizan la globina. Los productos de esta degradación son importantes para el mantenimiento del hemo en estado soluble, con lo cual garantizan su disponibilidad para la absorción. En el citosol la hemoxigenasa libera el hierro de la estructura tetrapirrólica y pasa a la sangre como hierro inorgánico, aunque una pequeña parte del hemo puede ser transferido directamente a la sangre portal (Engle-Stone *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2006).

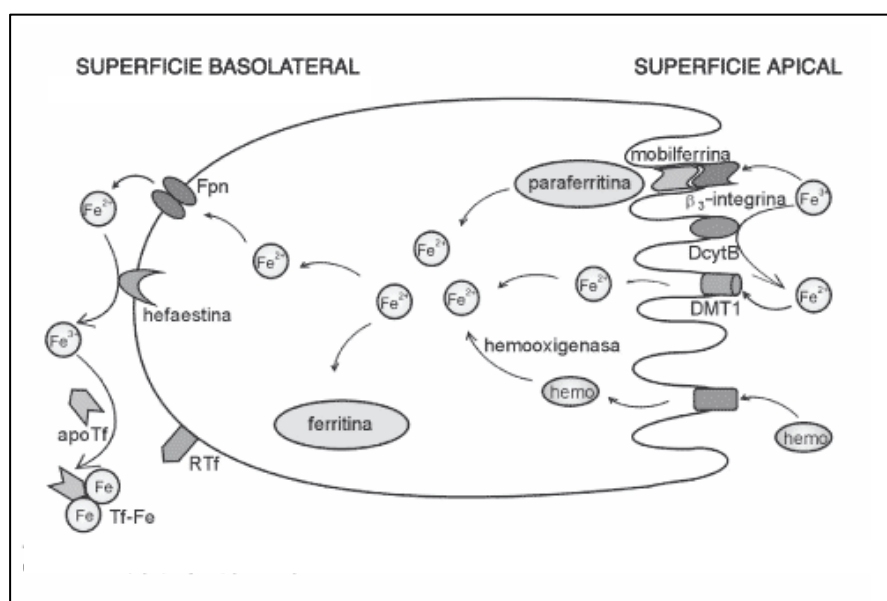
Aunque el hierro hemínico representa una pequeña proporción del hierro total de la dieta, su absorción es mucho mayor (20-30 %) y está menos afectada por los componentes de

ésta. No obstante, al igual que la absorción del hierro inorgánico, la absorción del hemo es favorecida por la presencia de carne en la dieta, posiblemente por la contribución de ciertos aminoácidos y péptidos liberados de la digestión a mantener solubles, y por lo tanto, disponibles para la absorción, ambas formas de hierro dietético. Sin embargo, el ácido ascórbico tiene poco efecto sobre la absorción del hemo, producto de la menor disponibilidad de enlaces de coordinación de este tipo de hierro. Por su parte el calcio disminuye la absorción de ambos tipos de hierro por interferir en la transferencia del metal a partir de la célula mucosa, no así en su entrada a ésta (Perales *et al*, 2006).

La circulación del hierro entre los compartimientos de depósito y utilización constituye un ciclo muy eficiente y prácticamente cerrado. Dado que sólo una pequeña proporción del metal es excretada, la necesidad diaria de incorporación de hierro en un individuo es muy baja. Por lo tanto, sólo una pequeña proporción del total del metal ingerido es absorbida (aproximadamente el 10%) (Hallberg *et al*, 1989). Aunque el hierro puede ser absorbido a lo largo de todo el intestino, este proceso es más eficiente en el duodeno. El hierro dietético se encuentra principalmente en estado férrico o como hierro hémico, mientras que el incorporado a través de productos farmacológicos usualmente está presente como sal ferrosa. El Fe^{3+} es insoluble en soluciones con pH mayor a 3, por lo que, en el estómago, se forman complejos solubles del metal que aumentan su disponibilidad para ser absorbido en el duodeno (Glahn *et al.*, 2000). Por otra parte, en el lumen del intestino se forman cantidades variables de iones ferrosos como consecuencia de la reducción del hierro férrico por agentes dietéticos (por ejemplo, ácido ascórbico). En consecuencia, ambos iones (ferroso y férrico) pueden presentarse ante las células intestinales. Los diferentes mecanismos descritos para la absorción de hierro, esquematizados en la Figura 1 (Pérez *et al.*, 2005) se resumen a continuación:

Los iones férricos pueden ser absorbidos vía una proteína de membrana miembro de la familia de las integrinas, la β_3 -integrina. Luego, son transferidos a la proteína chaperona mobilferrina. La absorción de los iones ferrosos es facilitada por el transportador de metales divalentes DMT1 (divalent metal transporter), también conocido como DCT1 (*divalent cation transporter*), o Nramp2 (*natural-resistance-associated macrophage protein 2*). Por otra parte, la proteína DcytB (*duodenal cytochrome b*), presente en la superficie apical del enterocito, reduce

los iones férricos dietarios, los cuales pueden entonces ser incorporados también vía DMT1 (Pérez *et al.*, 2005). La importancia de esta última proteína en la absorción intestinal de hierro ha sido demostrada en estudios genéticos en ratas Belgrade portadoras de una mutación en el locus DMT1 (Mackenzie y Garrick, 2005). Estos animales exhiben anemia microcítica e hipocrómica severa debido a un defecto en la absorción intestinal de hierro así como también en la captación y utilización del metal en los tejidos periféricos, incluyendo los precursores eritroides. El hemo es liberado de mioglobina y hemoglobina como consecuencia de la digestión proteolítica llevada a cabo por enzimas pancreáticas. Posteriormente, es incorporado por las células absortivas del intestino delgado como una metaloporfirina intacta. El proceso de transporte es mediado por una proteína específica localizada en la cara apical de la membrana del enterocito. Dentro de la célula, el hemo es degradado por la hemooxigenasa, liberándose de esta manera el hierro inorgánico de la estructura tetrapirrólica.



Tf: transferrina, RTf: receptor transferrina, DMT 1 (transportador de metales divalentes), DcytB (Citocromo b duodenal), Fpn: ferroportina (proteína exportadora de hierro).

Figura 1. Mecanismo de absorción intestinal de hierro (Pérez *et al.*, 2005)

Una vez en el interior del enterocito, el metal absorbido a través de cualquiera de las vías descritas es convertido a su estado ferroso, paso que es realizado por un gran complejo proteico citoplasmático llamado paraferritina. El mismo incluye proteínas como β_3 -integrina,

mobilferrina, flavin monooxigenasa y b₂-microglobulina y utiliza una cadena de transporte de electrones con energía derivada de NADPH para llevar a cabo la reducción del hierro absorbido (Pérez *et al.*, 2005). Posteriormente, los iones ferrosos pueden ser almacenados en la ferritina o alcanzar la membrana basolateral del enterocito donde son conducidos por la proteína transportadora transmembrana ferroportina (Fpn), también llamada Ireg1 (*iron-regulated transporter 1*) o MTP1 (*metal transporter protein 1*) (Thomas y Oates, 2005). La proteína de membrana hefaestina o la ceruloplasmina plasmática promueven la oxidación del hierro facilitando de esta manera su incorporación a la apotransferrina *circulante*. Debido a que no existe una vía fisiológica para la excreción de este metal esencial, su absorción a nivel duodenal está cuidadosamente regulada para mantener un equilibrio entre la incorporación y la pérdida corporal. La membrana basolateral del enterocito expresa receptores para Tf que permiten la entrada del hierro transportado por esta proteína. El metal incorporado en este proceso «informa» a la célula sobre el estatus férrico del organismo, induciendo la regulación negativa de su captación vía DMT1 e integrina-mobilferrina (Andrews, 2005). Sin embargo, parece que el transportador basolateral Fpn sería el principal punto de regulación de la absorción de hierro dietario en respuesta a los requerimientos sistémicos, mientras que la regulación del transporte apical serviría de mecanismo de seguridad. La hepcidina, un pequeño péptido antimicrobiano producido por el hígado, se perfila como la principal responsable de esta regulación. De acuerdo con este modelo, la producción hepática de hepcidina estaría regulada por el grado de saturación de la Tf y el nivel de receptores para esta proteína a nivel hepático (RTf y RTf2), de modo que cuando la relación Tf-diférrica/RTf aumenta, se induce la secreción de hepcidina. La unión de esta hormona proteica a la Fpn induce la internalización y posterior degradación de la proteína transportadora. Como consecuencia de la disminución de la exportación de hierro, se produce la inhibición de su adquisición por parte de la Tf plasmática y el aumento de la concentración del metal en el enterocito que, a su vez, conduciría a una inhibición de su transporte apical. Por el contrario, cuando la relación Tf-diférrica/RTf disminuye, cesa la producción hepática de hepcidina y se restaura la absorción de hierro (Ganz, 2003). La regulación post-traducciona l de la Fpn por hepcidina completa un círculo homeostático: el hierro regula la secreción de hepcidina, la cual a su vez, controla la concentración de Fpn en la superficie basolateral de los enterocitos (Steele *et al.*, 2005).

III.3.1.c. Factores que afectan la absorción de hierro

La absorción del hierro no hemo está ampliamente influenciada por factores dietéticos y por los depósitos de hierro del individuo. La mayor incidencia de las deficiencias en hierro sucede en los niños y mujeres en edad fértil. El enterocito desempeña un papel central en la regulación de la absorción de hierro, debido a que los niveles intracelulares adquiridos durante su formación determinan la cantidad del mineral que entra en la célula (Amaro y Cámara, 2004). El hierro del enterocito ingresa a la circulación de acuerdo con las necesidades, y el resto permanece en su interior hasta su descamación. De este modo, las células mucosas protegen al organismo contra la sobrecarga de hierro proveniente de los alimentos, al almacenar el exceso del mineral como ferritina, que es posteriormente excretada durante el recambio celular normal (Gangloff *et al.*, 1996).

La absorción de hierro puede ser reajustada dentro de ciertos límites para cubrir los requerimientos de este metal. De este modo, condiciones como la deficiencia de hierro, la anemia y la hipoxia, conllevan un aumento en la absorción y capacidad de transporte, aunque es importante destacar que el incremento en la absorción de hierro hemo es de menor proporción, debido posiblemente a que la superficie absorptiva de la célula intestinal no reconoce al hemo como hierro, por lo que el incremento de su absorción se deberá solamente a la pérdida de la saturación de los receptores dentro de la célula y en las membranas basolaterales (Favier, 1993). La absorción del hierro puede ser también afectada por una serie de factores intraluminales como el quilo gástrico, el tiempo de tránsito acelerado y el síndrome de malabsorción. Además de estos factores, existen sustancias que pueden favorecer o inhibir la absorción. Así por ejemplo, el hierro hemo proveniente de las carnes y los pescados es más fácil de absorber que el hierro inorgánico de los vegetales, los que en muchos casos, contienen concentraciones más elevadas del metal. Sin embargo, la adición de pequeñas porciones de carnes o pescados puede aumentar la absorción del hierro presente en los vegetales, fundamentalmente por su contenido de aminoácidos. Existen además otras sustancias que favorecen la absorción de hierro, como son los agentes reductores, especialmente el ácido ascórbico (Davidsson, 2003).

III.3.2. Calcio

El calcio se absorbe fundamentalmente en el duodeno y yeyuno. La capacidad de absorción viene condicionada por la biodisponibilidad del calcio dietético (reducida en presencia de fitatos y oxalatos) y por la propia cantidad de calcio ingerido. Un escaso porcentaje se absorbe por difusión simple, paracelular y no saturable, y la mayor parte mediante un proceso de absorción transcelular fisiológicamente regulado por la vitamina D, que estimula su paso mediante acciones genómicas (síntesis de proteínas transportadoras) como no genómicas (Weaver *et al*, 1991). En circunstancias normales se absorbe aproximadamente un 30% del calcio dietético. Las dietas pobres en calcio, el déficit de vitamina D y la falta de respuesta intestinal a la misma (exceso de glucocorticoides o de hormona tiroidea o los síndromes de malabsorción) son las causas más frecuentes del déficit de absorción de calcio (Massheimer *et al* 1994). Una disminución en la capacidad de absorción de calcio en el intestino en humanos es frecuente y contribuye a la aparición de un balance negativo de hierro y a pérdidas óseas (Forsell *et al*, 2006). La captación de mineral del fluido intestinal requiere (Figura 2): entrada de calcio al enterocito a través del borde en cepillo por gradiente electroquímico; transporte a través del citoplasma del enterocito mediado por proteínas ligadoras de calcio como la calbindina (CaBP), extrusión a través de la membrana basolateral mediante transporte activo contra gradiente electroquímico mediado por una bomba de calcio dependiente de ATP y un intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (Forsell *et al*, 2006).

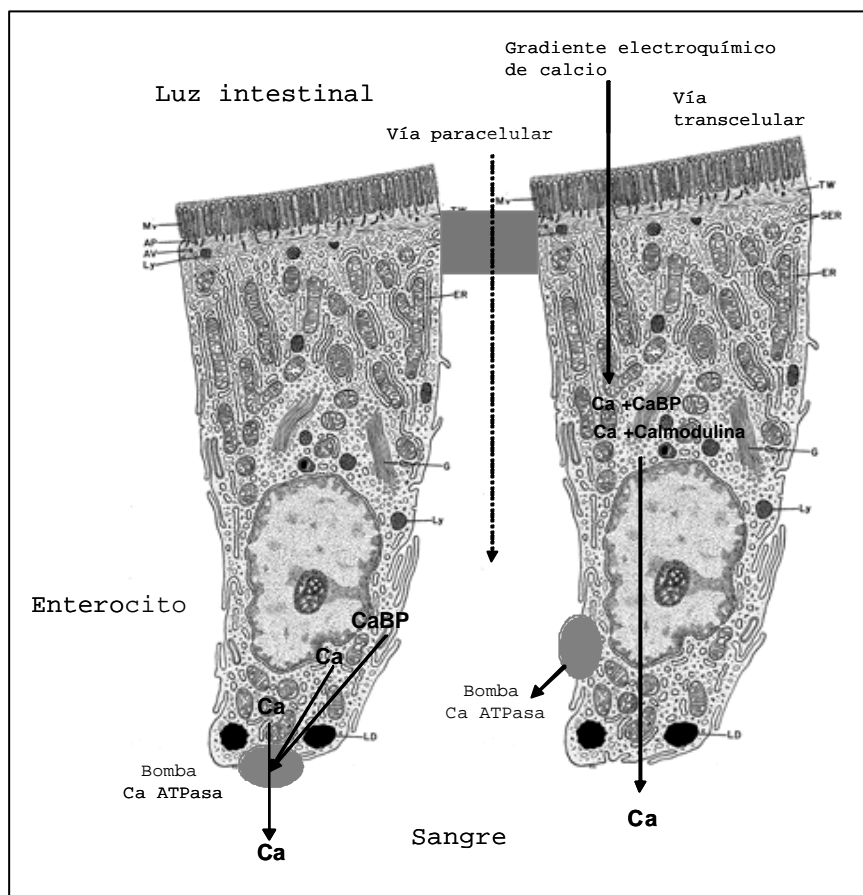


Figura 2. Mecanismo de absorción intestinal del calcio (Forsell *et al.*, 2006)

Una adecuada ingesta de calcio durante el primer año de vida es necesaria para un adecuado crecimiento y desarrollo, previniendo de este modo la aparición de raquitismo. La bioaccesibilidad del calcio, y por tanto su biodisponibilidad dependen de su solubilidad en el interior de la luz intestinal, la cual depende en gran medida de la composición del alimento del que procede (Bosscher *et al.*, 2001 b). La solubilidad del calcio (bioaccesibilidad) en la luz intestinal es el primer paso para definir su biodisponibilidad. El calcio debe estar en forma soluble, normalmente ionizado (Ca^{+2}) o bien ligado a una molécula orgánica soluble para poder atravesar la pared intestinal (Perales *et al.*, 2005).

El estudio de la disponibilidad del calcio en humanos sería el método ideal, no obstante se hace frecuentemente inviable ya que requiere el empleo de muestras grandes de población, durante un largo período de tiempo, así como un elevado coste. Esto ha llevado a un uso cada vez más creciente de modelos *in vitro* que nos permitan estudiar la disponibilidad mineral de los alimentos.

III.3.3. Cinc

La esencialidad del cinc en humanos fue demostrada por Prasad *et al.* (1963) basándose en observaciones sobre adolescentes con deficiencia en cinc que presentaban hipogonadismo y enanismo.

El cinc forma parte de numerosos enzimas como la superóxido dismutasa, alcohol deshidrogenasa, así como de la ADN y ARN polimerasa. El cinc es necesario para el metabolismo de los ácidos nucleicos, de modo que su deficiencia produce una reducción en el crecimiento. Su deficiencia también se encuentra asociada a una reducción en la respuesta inmune, lesiones cutáneas y distintas alteraciones en el metabolismo celular (Rimbach *et al.* 1996).

La absorción y excreción de cinc están controladas por mecanismos homeostáticos no muy bien conocidos. Sin embargo se sabe que cuando la ingesta de cinc es pequeña, la absorción intestinal aumenta notablemente mientras que se reducen las pérdidas de este elemento por orina y tracto gastrointestinal.

La absorción de cinc es similar a la del calcio y tiene lugar mediante dos mecanismos: un mecanismo saturable mediado por transportadores, que funciona más eficientemente cuando las concentraciones de cinc en la luz intestinal son bajas, y un mecanismo de difusión pasiva que depende de las concentraciones del metal. Como el cinc se encuentra por lo general unido a aminoácidos y pequeños péptidos, los iones tienen que ser liberados en las proximidades de las vellosidades para que puedan ser absorbidos (Fredlund *et al.*, 2006).

En el hombre se conocen al menos 14 transportadores de cinc que regulan la entrada y salida de este elemento en las células, agrupadas en dos familias: ZnT y Zip. Estas proteínas parecen tener funciones opuestas: los transportadores ZnT reducen el Zn intracelular favoreciendo su salida de la célula o almacenándolo en vesículas intracelulares promoviendo la entrada del cinc extracelular o su liberación desde las vesículas almacén (Liuzzi y Cousins, 2004).

Una vez en el interior de la célula, el cinc se une a metaloproteínas (Figura 3) y otras proteínas del citoplasma celular. Las metaloproteínas transportan el cinc hasta el extremo basolateral de los enterocitos para su paso a la sangre. La absorción digestiva del cinc depende de varios factores, en particular de su concentración en la dieta y de sustancias que interfieren en su absorción. Los fitatos y dietas ricas en fibra secuestran el cinc, impidiendo su absorción digestiva. El cobre y el cadmio utilizan los mismos transportadores compitiendo con el cinc y reduciendo su absorción. Elevadas concentraciones de calcio también reducen la absorción de cinc. Por el contrario, las dietas ricas en proteínas facilitan la absorción debido a que muchos aminoácidos y pequeños péptidos se unen al cinc favoreciendo su penetración al enterocito (Liuzzi y Cousins, 2004).

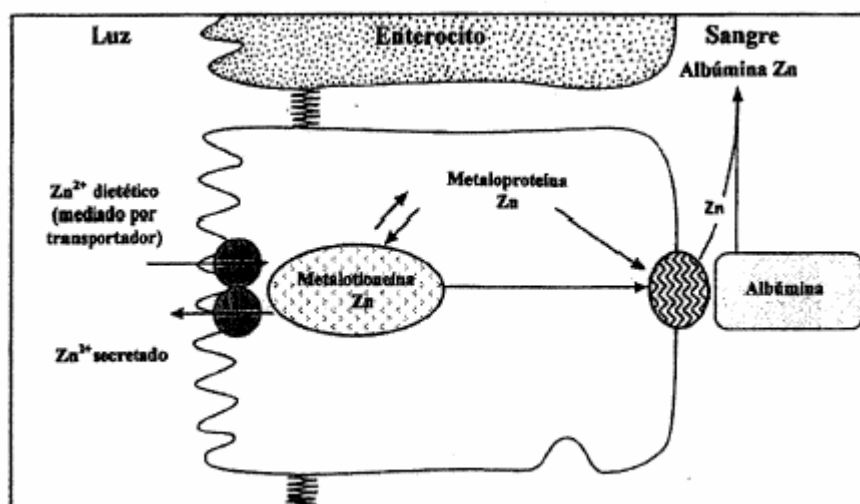


Figura 3. Mecanismo de absorción intestinal del cinc (Viadel, 2002).

III.4. ANTINUTRIENTES

En muchos de los alimentos que consumimos existen de forma natural una serie de sustancias capaces de disminuir e incluso impedir la absorción y utilización por nuestro organismo de determinados nutrientes (Mitjavila, 1990). De este modo alimentos tan básicos en la dieta humana como son los alimentos de origen vegetal, presentan muchas de dichas sustancias. Teniendo en cuenta los nutrientes sobre los que actúan, se pueden considerar tres tipos de antinutrientes (SEDCA, 2006):

> Sustancias que afectan a las proteínas

> Antivitaminas

> Sustancias que dificultan la absorción de determinados minerales, entre los que destacan:

-El ácido oxálico, que se encuentra en verduras y hortalizas (espinacas, remolacha, apio), frutas (fresa, frambuesa), cacao, té.

-El ácido fítico, presente en los cereales y algunas legumbres, y que es desarrollado ampliamente en este trabajo.

III.4.1. ÁCIDO FÍTICO

III.4.1.1. Recuerdo histórico

El descubrimiento de la molécula de ácido fítico data de 1855-1856, cuando Hartig aisló pequeñas partículas desprovistas de almidón en semillas de algunas plantas. En 1872, Pfeffer caracterizó estas partículas más ampliamente comprobando que eran partículas de superficie lisa, forma esférica, libres de nitrógeno y sugirió que eran una combinación de fósforo y carbohidratos.

III.4.1.2. Características generales

El ácido fítico es el principal antinutriente presente en los cereales. Se sabe que se halla presente a altas concentraciones en granos de cereales y en legumbres (1-2 %), y puede inhibir de forma significativa la absorción de minerales mediante la formación de complejos insolubles con minerales de interés nutricional, como el hierro no hemo, el calcio y el cinc (Hurrell *et al.*, 1992), impidiendo su absorción y alterándose de este modo la homeostasis mineral. Asociado a esto, pueden aparecer problemas en la salud tan importantes como alteraciones en el crecimiento de los niños, anemia, disfunciones reproductivas, cáncer, enfermedades cardíacas o alteraciones inmunológicas. Los seis grupos fosfato en la molécula de ácido fítico, le otorgan una elevada capacidad quelante de cationes divalentes.

Bajo las condiciones de pH intestinal, se forman quelatos insolubles, que impiden la absorción de los minerales a nivel digestivo en el hombre y los animales. Distintos estudios han comprobado que el ácido fítico también produce una disminución en la digestibilidad de lípidos, proteínas y almidón (Frías, 2003).

Sin embargo, el consumo de ácido fítico no sólo tiene efectos negativos sobre la salud. Se sabe que también tiene gran capacidad de inhibir la formación de radicales hidroxilo catalizada por hierro al unirse al hierro libre y bloquear de este modo la reacción. Existen algunos estudios que relacionan el consumo de ácido fítico en la dieta con una disminución en la incidencia de algunos tipos de cáncer como el de colon o mama. De hecho, estudios epidemiológicos muestran una baja incidencia de cáncer en poblaciones con dieta eminentemente vegetariana (Chen *et al.*, 2005; Key *et al.*, 2006). Los cereales son una importante fuente de proteínas, vitaminas y minerales, y contribuyen a cubrir las necesidades nutricionales de la población en general fundamentalmente de los países en desarrollo (FAO, 1987). Desafortunadamente, la mayoría de ellos contienen un importante antinutriente, el ácido fítico, que es un elemento indeseable porque puede producir deficiencias en minerales; afectando fundamentalmente a grupos de alto riesgo, tales como niños, mujeres en embarazo y lactancia, y ancianos (Davies, 1979). Los fitatos han sido intensamente estudiados especialmente en los últimos años, ya que se ha extendido el uso de enzimas en alimentación animal a fin de disminuir el contenido en ácido fítico en los piensos (Frías *et al.*, 2003).

La capacidad que el organismo humano presenta para degradar dicho ácido fítico es insuficiente (Nelson, 1967; Erdman, 1979); lo que provoca interferencias en la absorción de minerales esenciales derivado del consumo de estos alimentos, adquiriendo el fitato el carácter de antinutriente, y pudiéndose desencadenar, si existe un desequilibrio alimentario los procesos patológicos descritos anteriormente.

Debido a esto, es de una gran importancia el tratamiento de los alimentos a fin de destruir los fitatos que impiden una adecuada absorción de minerales por parte del organismo, aumentando así la biodisponibilidad de los mismos. El empleo de métodos

enzimáticos es altamente efectivo a este fin, adquiriendo un importante papel en la prevención de numerosas enfermedades derivadas de una inadecuada nutrición mineral. Se sabe que la enzima fitasa es capaz de degradar el ácido fítico (IP_6) a sus productos de hidrólisis mediante rotura del enlace ester, reduciéndose el número de fosfatos y quedando IP_5 , IP_4 , IP_3 y posiblemente inositoles di y monofosfato (IP_2 e IP_1). De ellos, el IP_5 e IP_4 tienen capacidad de producir efecto negativo en la biodisponibilidad mineral (Sandberg y col., 1999, Porres y col., 2001). Los alimentos infantiles elaborados a partir de harinas procedentes de cereales pueden presentar compromiso en la biodisponibilidad de determinados minerales, por ello, es de gran importancia tratar de establecer los tratamientos tecnológicos necesarios para que la utilización de estos nutrientes esenciales sea la máxima en una etapa de la vida como es la infancia en la que las enfermedades carenciales pueden suponer secuelas para toda la vida.

III.4.1.3. Estructura y nomenclatura

Anderson (1914) propuso la primera estructura de la molécula de ácido fítico comprobada y aceptada actualmente. El ácido fítico consiste en un anillo de inositol esterificado con seis grupos de ácido fosfórico. Dependiendo de la posición de éstos en el anillo (axial o ecuatorial) podemos encontrar nueve isómeros distintos. En las plantas se ha aislado el *myo*-inositol, también llamado ácido fítico y cuya estructura química se muestra en la Figura 4.

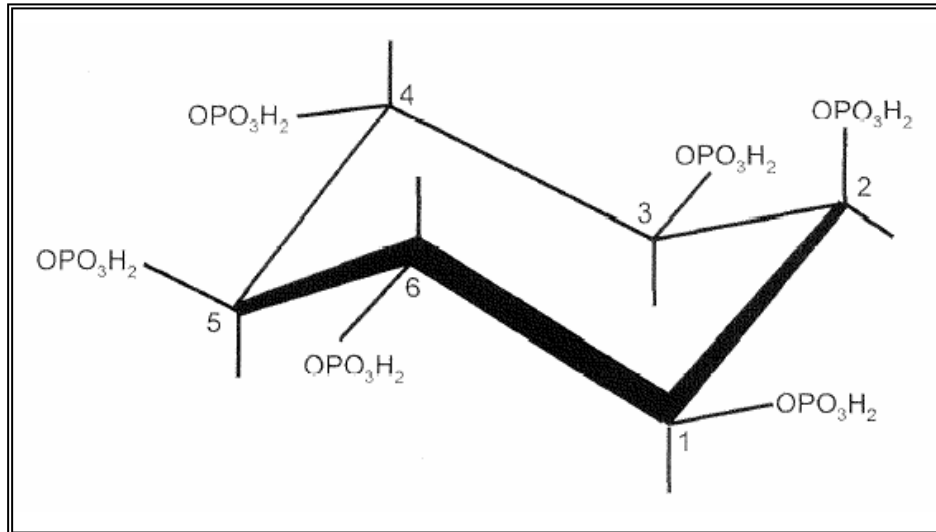


Figura 4. Estructura del myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis (dihidrógenofosfato) (FAO, 1998)

III.4.1.4. Ácido fítico en las plantas

El ácido fítico es en las plantas el mayor depósito de fósforo de que éstas disponen, ya que del fósforo total presente en las plantas, un 60-90% se encuentra en forma de fitato (Cherian, 1980). Es sintetizado a partir de glucosa 6-P, y se localiza en los granos y semillas de cereales, legumbres y oleaginosas; encontrándose también en el polen, tubérculos, frutas y otros vegetales (McCance y Widdowson, 1935). En este sentido, el contenido en ácido fítico de las plantas, está altamente correlacionado con el contenido total de fósforo, por lo que Lolas *et al.* (1976) propusieron que el contenido en ácido fítico podría ser estimado mediante la determinación del fósforo total. No obstante, actualmente la determinación del contenido en ácido fítico a través de la determinación del contenido en fósforo no es del todo aceptable.

Las variaciones en el contenido de ácido fítico que se producen como consecuencia de las condiciones, localización y año de cultivo, aplicación de fertilizantes y variedad del cultivo se ha comprobado en distintos cereales y legumbres (Raboy *et al.* 1991; Feil y Fossati, 1997). En la Tabla 3, se muestra el contenido en ácido fítico de cereales, semillas de leguminosas, nueces, semillas de oleaginosas y vegetales obtenidos en diferentes estudios (Egli, 2001).

Tabla 3. Contenidos en ácido fitico de algunos vegetales

Muestra	Contenido en ácido fitico (g/100 g)	Referencia
Granos de cereales		
Cebada	0,8 1,0 1,0	Lolas <i>et al.</i> 1976 Bartnik y Szafranska 1987
Maiz	1,0 1,1 0,3	O'Dell <i>et al.</i> 1972 Boland <i>et al.</i> 1975 Hurrell <i>et al.</i> , 2002
Maiz blanco	0,8	Hurrell <i>et al.</i> , 2003
Maiz amarillo	0,7	Marfo <i>et al.</i> 1990 Marfo <i>et al.</i> 1990
Mijo	0,8 1,0 0,8	Torelm y Bruce 1982 Simwemba <i>et al.</i> 1984 Khokhar <i>et al.</i> 1994
Avena	0,9 1,1	Lolas <i>et al.</i> 1976 Bartnik y Szafranska 1987
Arroz	0,9 0,5 0,2	O'Dell <i>et al.</i> 1972 Marfo <i>et al.</i> 1990 Hurrell <i>et al.</i> , 2002
Arroz pulido	0,3	Khokhar <i>et al.</i> 1994
Centeno	0,9 0,9	Fretzdorff y Weipert 1986 Bartnik y Szafranska 1987
Sorgo	1,1 0,9	O'Dell <i>et al.</i> 1972 Makokha <i>et al.</i> , 2002
Sorgo rojo	0,9	Marfo <i>et al.</i> , 1990
Trigo	1,3 1,3 1,0 0,9 0,3	O'Dell <i>et al.</i> , 1972 de Boland <i>et al.</i> , 1975 Lolas <i>et al.</i> , 1976 Khokhar <i>et al.</i> , 1994 Hurrell <i>et al.</i> , 2002
Salvado de trigo	4,2	Graf y Dintzis 1982
Granos de pseudocereales		
Amaranto	1,6	Becker <i>et al.</i> , 1981
Trigo sarraceno	0,8	Torelm y Bruce 1982
Quinoa	0,7	Valencia <i>et al.</i> , 1999
Semillas de leguminosas		
Alfalfa	0,8	Torelm y Bruce 1982
Alubias	0,6 1,8	Burbano <i>et al.</i> 1995 Mañez <i>et al.</i> , 2002
Alubia negra	1,1 1,2	Tabekhia y Luh 1980 Davies y Warrington 1986
Habas	1,0 0,7	Eskin y Wiebe 1983 Burbano <i>et al.</i> 1995
Habas granos	0,8	Lolas y Markakis 1975
Frijol	0,9	Davis y Warrington 1986
Frijol rojo	1,3 1,2	Lolas y Markakis 1975 Tabekhia y Luh 1980
Frijol azul	1,3	Lolas y Markakis 1975
Frijol rosa	0,5	Tabekhia y Luh 1980
Frijol mexicano	0,7	Lolas y Markakis 1975
Frijol blanco pequeño	0,6	Lolas y Markakis 1975
Frijol blanco	1,1 1,0	Davis 1981 Torelm y Bruce 1982
Garbanzo	0,6	Gad <i>et al.</i> 1982

	0,6	Davis y Warrington 1986
	0,4	Harland <i>et al.</i> 1988
	1,0	Khokhar <i>et al.</i> 1994
	0,5	Burbano <i>et al.</i> 1995
Garbanzo blanco	0,7	Sharma y Khetarpaul 1995
Garbanzo marrón	1,2	Khan <i>et al.</i> 1988
	0,8	Khan <i>et al.</i> 1988
Lenteja	0,8	Davis 1981
	0,5	Gad <i>et al.</i> 1982
	0,5	Davis y Warrington 1986
	0,8	Harland <i>et al.</i> 1988
	1,0	Khokhar <i>et al.</i> 1994
	0,3	Burbano <i>et al.</i> 1995
Altramuz	0,3	Gad <i>et al.</i> 1982
	1,1	Kirby y Nelson 1988
	0,6	Burbano <i>et al.</i> 1995
Guisante	0,8	Gad <i>et al.</i> 1982
	0,8	Beal y Mehta 1985
	1,0	Harland y Oberleas 1987
	0,4	Urbano <i>et al.</i> , 2003
Semillas de soja	1,3	Lolas <i>et al.</i> 1976
	1,5	Torelm y Bruce 1982
	1,1	Ologhobo y Fetuga 1984
	0,8	Sutardi y Buckle 1985
	2,2	Khokhar <i>et al.</i> 1994
	1,3	Horner <i>et al.</i> , 2005
Nueces y semillas de oleaginosas		
Almendras	1,3	Harland y Oberleas 1987
Anacardos	2,0	Harland y Oberleas 1987
Nueces	2,5	Venkatachalan y Sathe 2006.
Semilla de sésamo	1,7	Harland y Oberleas 1987
Semilla de colza	4,0-4,8	Uppstrom y Svensson 1980
Semilla de girasol	1,7	Harland y Oberleas 1987
Vegetales		
Brocoli	0,16	Harland y Oberleas 1987
Oliva (verde)	0,01	Harland y Oberleas 1987

III.4.1.5. Ácido fítico en los animales

En 1941, Rapoport *et al.* (1941), informó de la presencia de un inositol fosfato en la sangre de pollo con propiedades similares al ácido fítico. No obstante, con posterioridad se comprobó que no existe ácido fítico como tal en los animales, sólo en la ameba *Dictyostelium discoideum* se ha determinado su presencia, comprobándose también la presencia de *myo*-inositol penta y hexakisfosfato en el cerebro de mamíferos donde son sintetizados, lo cual sugiere que el ácido fítico no es una molécula exclusiva de plantas, sino también de organismos unicelulares y determinados animales (Egli, 2001).

III.4.1.6. Métodos de determinación del ácido fítico

III. 4.1.6.a. Introducción

La elección del método de determinación del ácido fítico, debe realizarse dependiendo del tipo de muestra con que se trabaja (granos de cereales, semillas de leguminosas, alimentos procesados, contenido intestinal, tejidos biológicos), la información que queremos obtener (determinación cualitativa o cuantitativa, contenido total en ácido fítico, determinados inositoles fosfato o alguno de sus isómeros) y disponibilidad de equipos. El ácido fítico no presenta un espectro de absorción característico, por lo que no puede ser fácilmente identificado mediante reactivos colorimétricos específicos, su determinación se hace difícil.

Los métodos de determinación del ácido fítico se pueden dividir en cualitativos y cuantitativos.

III. 4.1.6.b. Métodos cualitativos

Oberleas y Harland (1986) llevaron a cabo una revisión de los métodos cualitativos de separación e identificación de los inositoles fosfato. En ésta, destacan la cromatografía en papel, la electroforesis o el empleo del microscopio de luz polarizada.

III. 4.1.6.c. Métodos cuantitativos

Los métodos cuantitativos de determinación del ácido fítico son los más empleados. Latta y Eskin (1980) emplearon a este fin un método basado en la precipitación de las sales insolubles del ácido fítico, el cual, debido a su sencillez y a su bajo coste se sigue empleando actualmente en algunos laboratorios. No obstante, este método en relación a otros como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Sandberg y Ahderinne, 1986) o la resonancia magnética nuclear (NMR) (Frolich *et al.*, 1986) va perdiendo trascendencia progresivamente.

El método oficial de la AOAC (986.11) (1997) permite cuantificar indirectamente IP₆ mediante determinación espectrofotométrica del fósforo inorgánico presente. No obstante este método no nos permite distinguir IP₆ de otros inosoles de un menor número de fosfatos. Distintos métodos, basados principalmente en la cromatografía, se llevan a cabo para separar y cuantificar los diferentes inosoles fosfato. El descubrimiento (Berridge e Irving, 1989) de la importante función fisiológica que realiza el inositol 1,4,5-trifosfato como segundo mensajero celular movilizándolo el calcio presente en el retículo endoplásmico, ha despertado un mayor interés en el estudio de los distintos inosoles fosfato.

III. 4.1.6.c.1. *Precipitación*

Este método está basado en la precipitación del ácido fítico como una sal insoluble, en su mayoría en forma de fitato férrico mediante la adición de cloruro férrico. Thompson y Erdman (1982) destacaron que los métodos basados en la determinación del hierro en el precipitado no son recomendables ya que estos autores encontraron variaciones en la determinación del ratio Fe:P del fitato férrico en las semillas de soja. No obstante, el ratio de Fe:P de 4:6 es generalmente asumido (cuatro átomos de hierro por molécula de ácido fítico). En 1999, Velickovic *et al.*, desarrollaron un método de precipitación basado en el de Thompson y Erdman pero que precisaba menos cantidad de muestra. Otros estudios más recientes (Duskova *et al.*, 2001; Akaniwor y Okechukwu, 2004) también emplean el método de la precipitación con cloruro férrico para la determinación del ácido fítico mediante la determinación del hierro precipitado y posterior cálculo del ácido fítico presente. Se han empleado otros métodos de determinación del ácido fítico mediante colorimetría (Frühbeck *et al.*, 1995; Sotelo *et al.*, 2002).

III. 4.1.6.c.2. *Cromatografía*

HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia)

Mediante HPLC la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria gracias a la utilización de una presión muy elevada para forzar el paso del

disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Skoog *et al.*, 2001).

La cromatografía líquida de alta eficacia es un método rápido, preciso y simple para medir la cantidad de ácido fítico presente en un alimento. En 1989, Lehrfeld, con el objetivo de resolver los problemas planteados hasta el momento en la determinación de ácido fítico mediante HPLC, desarrolló un método de extracción y determinación de ácido fítico e inositoles de un menor número de fosfatos consistente en la utilización de resinas de intercambio aniónico para concentrar y purificar el ácido fítico e isómeros para su posterior determinación mediante HPLC, empleando para ello un detector de índice de refracción. Este método permite identificar no solo el ácido fítico sino también otros inositoles fosfato, permite diferenciar claramente en el cromatograma entre el solvente y el analito y permite realizar el experimento en un solo día demostrando ser uno de los más eficaces y precisos.

Anteriores aplicaciones del HPLC para la determinación del ácido fítico han empleado columnas de sílice de fase reversa (C18 y detectores de índice de refracción) solucionando problemas planteados hasta entonces. De este modo, Lee y Abendroth (1983) reconocieron un problema en la detección de ácido fítico mediante HPLC por el cual, el frente generado por el solvente coincidía con el pico producido por el inositol hexafosfato ocultando por tanto esta molécula. Sandberg y Ahderinne (1986) demostraron que IP₃, IP₄, IP₅ e IP₆ podrían separarse ajustando el pH a un valor de 4,3; frente al método oficial de Oberleas y Harland (1986) que no permitía detectar los isómeros de inositol hexafosfato.

HPIC Cromatografía de intercambio iónico

Este método, en comparación a los que emplean la precipitación revisados anteriormente, resultan en la detección unas mayores concentraciones de ácido fítico (Ellis y Morris, 1982). En 1986, la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) adoptó como método (AOAC Official method 986.11 phytate in foods; Harland y Oberleas, 1986) la cromatografía de intercambio iónico. Talamond *et al.*, (1998) propusieron un método rápido y sensible para la determinación del ácido fítico basado en una técnica de separación mediante una columna de intercambio aniónico y un detector de la conductividad.

La aplicación de un gradiente de intercambio iónico seguido de precipitación permite la separación de los distintos inositolos fosfato y demuestra la sobreestimación en la determinación del contenido en ácido fítico determinada mediante el método de la precipitación (Phillippy *et al.*, 1988). Diferentes autores (Talamond *et al.*, 1998; López *et al.*, 2000; Greiner, 2004) han empleado en sus estudios la HPIC para la determinación del ácido fítico en alimentos.

III.5. INFLUENCIA DEL PROCESADO INDUSTRIAL DE LOS ALIMENTOS SOBRE EL ÁCIDO FÍTICO.

III.5.1. Introducción

Siendo la infancia un periodo de la vida en el que existe elevado riesgo de padecer deficiencias nutricionales, fundamentalmente de minerales como el hierro o el cinc; adquiere una gran importancia el suministro de alimentos que proporcionen las cantidades adecuadas de todos los nutrientes necesarios (Hurrell, 2004). Por ello, es necesario el tratamiento tecnológico de los alimentos infantiles a fin de enriquecer los mismos con determinados nutrientes, añadir compuestos que favorezcan la absorción mineral, o bien aplicar un determinado procesado tecnológico sobre los alimentos infantiles para eliminar determinadas sustancias antinutrientes presentes naturalmente en las materias primas utilizadas, fundamentalmente cereales, y que ocasionan una disminución en la absorción mineral.

Uno de los principales antinutrientes que produce una disminución en la absorción de los minerales presentes en los alimentos infantiles es el ácido fítico o inositol hexafosfato. Para disminuir su efecto se recurre a dos tratamientos, tales como son la extracción del ácido fítico presente, o la degradación del mismo mediante tratamiento enzimático exógeno (Hurrell, 2004).

Debido a que los quelatos o complejos que se forman entre el ácido fítico y los cationes multivalentes son insolubles y por lo tanto no se absorben, y a que el organismo

humano tiene una limitada capacidad para hidrolizar los enlaces éster que se forman entre los grupos fosfato y el anillo de ciclohexano, es fácil predecir que existe una elevada posibilidad de que una dieta con un elevado contenido en ácido fítico, produzca una deficiencia en la absorción de minerales (Febles *et al*, 2001).

Durante el procesado y almacenamiento de los alimentos, el inositol hexafosfato o ácido fítico, puede ser parcialmente desfosforilado dando lugar a inositoles con un menor número de fosfatos e incluso a inositol libre (Chen, 2004). Por tanto, los alimentos procesados pueden contener una mezcla de isómeros de inositoles fosfato en número variable, pudiendo interactuar con otros componentes del alimento. Los isómeros resultantes de la hidrólisis del ácido fítico, presentan una capacidad parcial de quelar minerales (Fredlund *et al*, 2003). Algunos isómeros del inositol fosfato como IP₃ e IP₄ presentan funciones fisiológicas como mensajeros intracelulares, efectos antiinflamatorios y prevención de complicaciones derivadas de la diabetes. La posición de los grupos fosfato en el anillo de inositol es de gran importancia en sus propiedades fisiológicas. Estudios de biodisponibilidad han demostrado que IP₃ e IP₄ por separado no son capaces de inhibir la absorción mineral (Chen, 2004). Cuando están presentes en una mezcla de inositoles fosfato, IP₃ e IP₄ pueden actuar favoreciendo la acción negativa de otros inositoles de mayor número de fosfatos. Adquiere por tanto una especial importancia el desarrollo de métodos para la separación y determinación de los diferentes isómeros de inositoles fosfato en los alimentos.

Durante el proceso de la digestión, la germinación, almacenamiento o la fermentación de las semillas, se produce la hidrólisis enzimática del ácido fítico debido a la activación de las fitasas endógenas. Esto induce la aparición de inositoles de bajo número de fosfatos, tales como inositol pentafosfato, inositol tetrafosfato, inositol trifosfato, inositol difosfato e inositol monofosfato.

De ellos, los inositoles penta y tetrafosfato, tienen capacidad de producir efecto negativo en la biodisponibilidad mineral (Sandberg *et al*, 1999, Porres *et al*, 2001). El ácido fítico es el más potente inhibidor procedente de la dieta de la absorción de minerales, distintos estudios han demostrado que ejerce acción inhibitoria de la absorción de hierro

(Hallberg *et al.*, 1989), zinc (Nävert *et al.*, 1985), calcio (Weaver *et al.*, 1991), magnesio (Bohn *et al.*, 2004), manganeso (Davidsson *et al.*, 1995), mientras que no ha demostrado ejercer acción inhibitoria sobre la absorción del cobre (Turnlund *et al.*, 1985). La mayor importancia en la salud pública recae en la acción inhibitoria que ejerce el ácido fítico sobre el hierro y el cinc (Hurrell, 2004). Mientras que diversos estudios, han comprobado que los inositoles con un bajo número de fosfatos, tales como IP₃ e IP₄, juegan un importante papel como segundos mensajeros y como mediadores de la respuesta celular.

Los cereales y legumbres suelen ser procesados antes de su consumo humano con el fin de aumentar su digestibilidad. Los métodos de procesado más comunes incluyen tratamientos térmicos, como el cocinado, autoclavado, cocinado, remojo, germinación y fermentación. Estos procesos pueden modificar el contenido en ácido fítico mediante degradación enzimática y/o no enzimática (Egli, 2001).

III.5.2. Tratamiento térmico

III.5.2.1. Cocinado casero

En general la pérdida de ácido fítico durante el cocinado no es muy importante. Marfo *et al.*, (1990) encontraron que el cocinado del maíz, arroz, sorgo y semillas de soja redujo el contenido en ácido fítico entre un 16-31%, produciéndose también un descenso (10,2%) en el contenido de ácido fítico de garbanzos (Nestares *et al.*, 1999). En el maíz, tras el cocinado se produjo un descenso en el contenido de ácido fítico de un 17,4% (Bressani *et al.*, 2004).

III.5.2.2. Autoclavado

Estudios desarrollados por De Boland *et al.*, (1975) estudiaron el efecto del autoclavado sobre el contenido de ácido fítico de granos o semillas y comprobaron que no se producía una excesiva pérdida (menor del 10%). No obstante, en 1989 Hussain *et al.*, describieron un descenso de un 16-64% en el contenido de ácido fítico en garbanzos tras el

mismo procesado. Este tratamiento también produjo un descenso en el contenido de ácido fítico en judías (*Phaseolus vulgaris* L.) según recoge Díaz-Batalla *et al.*, (2006).

III.5.3. Maceración y germinación

Durante la germinación, las semillas utilizan el fósforo liberado a partir de la degradación del ácido fítico que contienen. Kayode *et al.*, (2006 a) observaron un descenso en el contenido de ácido fítico en la harina de sorgo como consecuencia de la germinación. No obstante, Khokar y Chauhan, (1986) observaron que durante los dos primeros días de germinación se produce una pequeña degradación del ácido fítico, no sucediendo su degradación completa hasta después del 5º día. La extracción acuosa, especialmente mediante el empleo de ácidos diluidos, puede resultar efectiva como método de eliminación del ácido fítico en harinas de leguminosas. La mayor desventaja de este procedimiento es que también se eliminan cantidades considerables de minerales y de vitaminas hidrosolubles (Hurrell, 2004). El macerado de la avena incrementa la absorción de hierro consecuencia de la degradación del ácido fítico (Larsson *et al.*, 1996). En este sentido, Perlas y Gibson, (2005) observaron que en el arroz y el maíz, tras su macerado, se producía un incremento en la disponibilidad del Fe, Ca y Zn.

III.5.4. Fermentación

La fermentación láctica (*Lactobacillus plantarum*), al producir un descenso en el valor de pH como consecuencia de la producción bacteriana de ácidos, principalmente láctico, produce un ambiente óptimo para la activación de la fitasa endógena presente en los cereales, produciéndose de forma paralela la formación de compuestos solubles de Fe y ácidos orgánicos (Bering *et al.*, 2006). La fermentación durante la elaboración del pan produce un descenso en el contenido de ácido fítico de las harinas de cereales (Nayini y Markakis, 1983; Fretzdorff y Brümmer, 1992; Larsson *et al.*, 1996).

III.6. INFLUENCIA DEL ÁCIDO FÍTICO EN LA DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES

El ácido fítico puede interactuar con diferentes componentes de los alimentos. En la Figura 5 se muestra la posible interacción con minerales y elementos traza, proteínas y almidón.

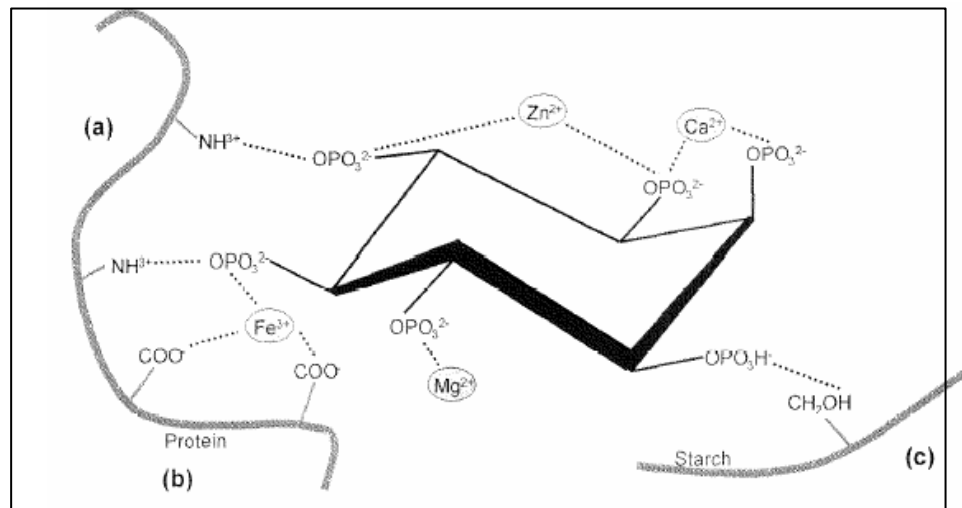


Figura 5. Posibles interacciones del ácido fítico con minerales, elementos traza, proteínas y almidón (Egli, 2001).

III.6.1. Interacción con proteínas y almidón

El ácido fítico interfiere en la digestibilidad y disponibilidad de las proteínas, y su efecto depende de las características del complejo ácido fítico-proteína formado, el cuál varía en función del tipo de proteína, del pH y de la temperatura. Existen discordancias en los resultados obtenidos sobre la interacción entre el ácido fítico y las proteínas, éstas podrían estar debidas a la distinta naturaleza de las proteínas presentes en los alimentos (Carnovale *et al.*, 1988), mientras que otros autores han atribuido este efecto negativo a la capacidad que presenta el ácido fítico de inhibir enzimas digestivas con actividad proteolítica (Deshpande y Damodaran, 1989). Esta actividad parece estar debida a las condiciones de pH ácido que necesita la pepsina para actuar, se forman uniones electrostáticas entre el ácido fítico y la pepsina, habiéndose observado igualmente, que a pH 3 el ácido fítico forma complejos insolubles con la tripsina (Martínez *et al.*, 2002).

Algunos estudios (Pérez-Llamas *et al.*, 2001) han observado que las fórmulas infantiles elaboradas con proteína animal presentan una mayor dialización del cinc que las elaboradas exclusivamente con proteína vegetal. No obstante, Lönnerdal *et al.*, (1984) describieron como la adición de fitatos a una fórmula preparada con leche de vaca en una concentración similar en proteína a la encontrada en una fórmula de soja, reducía la absorción de cinc a un nivel similar al encontrado en la fórmula de soja. Otros autores (Nogueira *et al.*, 2004) han comprobado que las fórmulas infantiles cuya fuente de proteína es la caseína y/o proteínas del suero de la leche presentan unos ratio (Ca:Fe) y (Fe: vitamina C) que permiten una adecuada dialización del hierro.

El ácido fítico actúa sobre la digestibilidad del almidón disminuyéndola, produciendo un lento incremento de los niveles de glucosa en sangre a partir de alimentos que contienen ácido fítico (Thompson, 1988), lo cual se debe a la unión que se produce entre el ácido fítico y el almidón, a su unión con la amilasa, uniéndose al calcio que es necesario para su actividad enzimática, o bien al almidón, modificando así su grado de gelatinización o su accesibilidad para las enzimas digestivas. Además influye en la respuesta sanguínea a la glucosa por producir retardo del vaciado gástrico (Martínez *et al.*, 2002).

III.6.2. Interacción con minerales y elementos traza

Varios factores alimentarios han sido descritos como inhibidores de la absorción de elementos traza. Entre los más importantes se encuentra el ácido fítico (Martínez *et al.*, 2006). La estabilidad de los complejos formados entre el ácido fítico y los minerales y elementos traza depende del pH, de la relación molar ácido fítico-mineral y del mineral en si mismo.

Desde el punto de vista nutricional, adquiere una gran importancia el estudio de la influencia del ácido fítico sobre minerales de la dieta. En general, los complejos formados por tres a seis iones metálicos por cada molécula de ácido fítico son insolubles, mientras que los formados por uno o dos iones metálicos son solubles. Sin embargo, estos últimos sólo están presentes a elevados cocientes molares fítico-mineral. En relación equimolar, el ácido fítico

liga más de un ión metálico por molécula, de esto se deduce que, a elevados cocientes (ácido fítico : iones metálicos) se forman complejos insolubles.

Existen pocos estudios en la literatura consultada que investiguen la relación entre los niveles de ácido fítico y la absorción de hierro en humanos (Hallberg, 1989; Hurrell, 1992, 2004). Según éstos, la degradación del ácido fítico adquiere una gran importancia nutricional ya que ha demostrado que una disminución de sus niveles en el alimento, incrementa la disponibilidad de minerales esenciales en la alimentación. Se ha comprobado que la degradación del ácido fítico, es tecnológicamente posible y que mejora de un modo significativo la absorción de minerales por el organismo, lo cual cobra una particular importancia durante la infancia. Una alternativa a la degradación del ácido fítico, y que es empleada en la industria alimentaria, es la adición de determinados compuestos que tienen la capacidad de unirse al hierro produciendo la reducción del hierro en estado férrico al estado ferroso (el cual presenta una menor capacidad de unirse al ácido fítico). El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la vitamina C, han demostrado tener la capacidad de incrementar la absorción del hierro en alimentos ricos en ácido fítico (Hurrell, 2004).

III.7. OTROS EFECTOS DEL ÁCIDO FÍTICO EN EL ORGANISMO

III.7.1. Efecto antitumoral

Distintos estudios, han demostrado que el ácido fítico es también un potente agente antioxidante y anticarcinógeno (Thompson, 1993; Vucenik *et al.*, 1995; Zhou y Erdman, 1995; Alabaster *et al.*, 1996; Harland *et al.*, 1999); proponiéndose el ácido fítico como un agente capaz de inhibir la aparición de cáncer de colon. De esta manera se establece una gran controversia sobre la necesidad o no de su eliminación en los alimentos.

Su mecanismo de acción antioxidante, aunque no está completamente aclarado, se basa en su capacidad de inhibir la formación de radicales hidroxilo, ya que es capaz de quelar el hierro libre y bloquear por tanto el lugar de coordinación del mismo (Park *et al.*, 2005). Se ha comprobado que el ácido fítico ejerce una acción anticarcinógena a nivel del

colon y en tumores mamarios en ratas (Vucenik *et al.*, 1995). No obstante es preciso realizar los estudios en modelos humanos previos a realizar cualquier recomendación sobre ingestas de ácido fítico a este fin (Zhou y Erdman, 1995).

III.7.2. Enfermedades cardiovasculares

Una dieta rica en ácido fítico, puede reducir los niveles de colesterol en sangre (Egli, 2001). Por otra parte, la capacidad quelante del hierro y supresora de la formación de radicales libres supone también un efecto protector del corazón. No obstante, hasta ahora los estudios a este respecto no han sido realizados en humanos.

III.7.3. Cálculos renales

Estudios epidemiológicos muestran una mayor incidencia de aparición de cálculos renales en dietas ricas en fibra y ácido fítico (Zhou y Erdman, 1995). No obstante, estudios *in vitro* han comprobado que la presencia de un alto contenido de inositolos fosfato en orina procedentes de una mayor ingesta de ácido fítico en la dieta, pueden inhibir la formación de cálculos renales (Egli, 2001).

III.8. ABSORCIÓN DE NUTRIENTES EN LA MUCOSA INTESTINAL

III.8.1. Introducción

Es de gran importancia el estudio de la biodisponibilidad mineral de los alimentos infantiles, ya que estos son frecuentemente la única fuente de estos nutrientes para unas edades en la que una correcta alimentación adquiere un papel fundamental. Aunque el modo ideal de realizar este tipo de estudios sería emplear modelos humanos, su aplicación se hace realmente difícil debido a la imposibilidad de emplear una población lo suficientemente grande y un tiempo lo suficientemente largo que nos permitan obtener resultados satisfactorios. Por otro lado, el empleo de animales de experimentación, se ha visto que no constituye un modelo óptimo reflejo de la absorción intestinal en humanos (García *et al.*, 1996). Como alternativa a los estudios *in vivo* de la biodisponibilidad mineral, se han propuesto los modelos *in vitro*, que consisten en la simulación de la digestión

gastrointestinal, para a continuación, estimar la cantidad de elemento mineral que se solubiliza o se dializa a través de una membrana de un determinado tamaño de poro (Jovaní *et al.*, 2001), estos ensayos *in vitro* pueden ser mejorados si se incorpora la línea celular Caco-2 procedente de carcinoma de colon humano. Dicha línea celular se está empleando cada vez más como modelo *in vitro* de absorción intestinal en humanos (Lu *et al.*, 1996).

III.8.1. Absorción y transporte de nutrientes en la mucosa intestinal

III.8.1.1. Absorción

La mucosa del intestino delgado está formada por una serie de pliegues llamados válvulas conniventes que se extienden de forma circular en la superficie de la mucosa, y están especialmente desarrollados a nivel de duodeno y yeyuno (Figura 6).

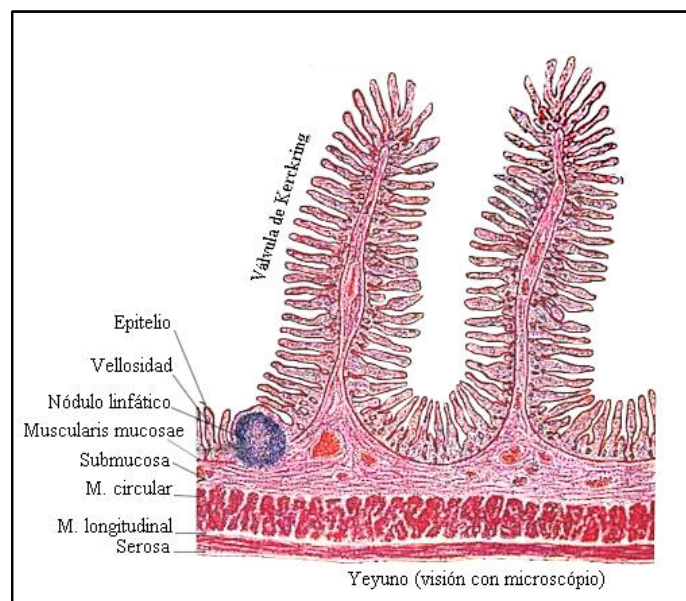


Figura 6. Corte longitudinal del intestino delgado (Guyton y Hall, 2001).

Recubriendo superficie del intestino delgado, se encuentran las vellosidades intestinales que incrementan el área de absorción. Cada vellosidad es una proyección en forma de dedo (Figura 7) de 0,5-1 μm de longitud. Cada vellosidad intestinal contiene una red de capilares y un vaso linfático y se encuentra recubierta de células epiteliales, fundamentalmente de enterocitos con función de absorción de nutrientes (Guyton y Hall, 2001).

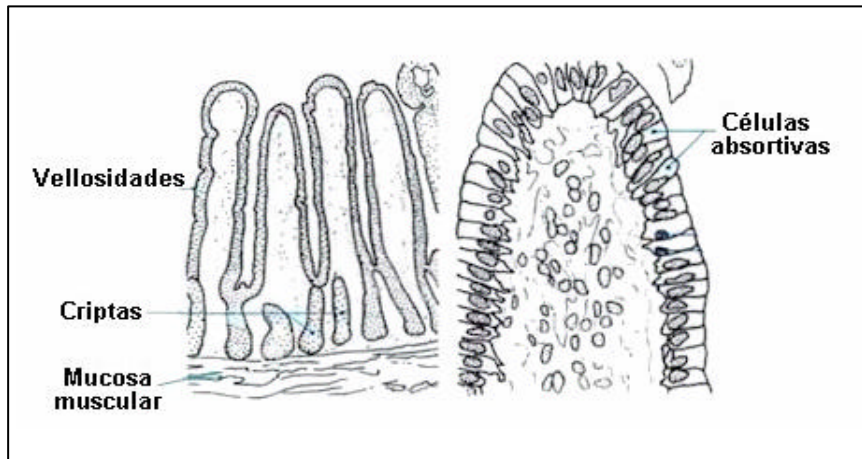


Figura 7. Corte longitudinal de vellosidades intestinales (Guyton y Hall, 2001).

Los resultados son células polarizadas (Figura 8) que poseen en su polo apical un borde en cepillo formado por microvellosidades que se proyectan hacia la luz intestinal y están recubiertos por una capa formada por azúcares unidos a las proteínas de la membrana, llamada glucocáliz y que interviene en numerosos procesos celulares (Pappenheimer y Michel, 2003). La membrana basolateral del enterocito posee proteínas transportadoras de iones específicos y con actividad ATPasa. Las membranas apical y basolateral del enterocito contienen diferentes proteínas transportadoras, de este modo la entrada y salida de solutos se localizan en polos opuestos de la célula.

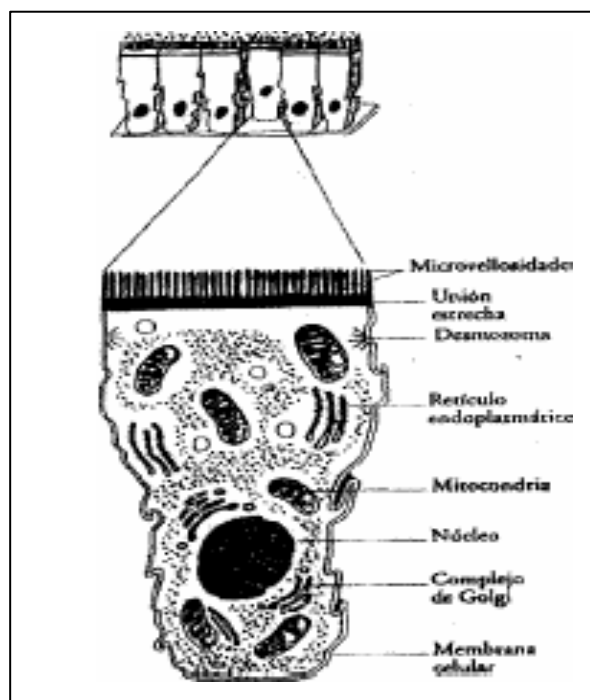


Figura 8. Célula del epitelio intestinal (Pappenheimer y Michel, 2003).

Las válvulas conniventes, vellosidades y microvellosidades, determinan un incremento en la superficie de absorción de la mucosa intestinal. El borde en cepillo del enterocito presenta enzimas que desdoblan macromoléculas procedentes del alimento a moléculas más pequeñas, facilitando así su absorción.

Las células del epitelio intestinal presentan uniones estrechas entre ellas, haciendo del epitelio una barrera defensiva frente a la penetración de microorganismos. Estas uniones también impiden que las proteínas de transporte naturalmente presentes en las membranas apical y basolateral del enterocito migren, cumpliendo así una función importante en el mantenimiento de la polaridad funcional del enterocito (Viadel, 2002).

Los nutrientes, una vez han alcanzado la luz intestinal, pasan al intersticio celular y posteriormente a la sangre o linfa mediante mecanismos de ósmosis, difusión pasiva, difusión facilitada, transporte activo o de endo- o exocitosis (estos últimos sobre todo en la etapa perinatal) (Guyton y Hall, 2001).

III.8.1.2. *Transporte*

El transporte de nutrientes a través del epitelio intestinal se puede llevar a cabo por dos vías:

III.8.1.2.a. *Ruta paracelular*

La ruta paracelular, es la que se lleva a cabo a través de los complejos de unión. Es la vía principal de absorción de agua, de iones y de moléculas polares de bajo peso molecular.

III.8.1.2.b. *Ruta transcelular*

La ruta transcelular, a través del enterocito. Los nutrientes ingresan a éste a través del borde en cepillo de la membrana apical y se desplazan por el interior del enterocito hasta la membrana basolateral. Por esta ruta, los nutrientes que pasan son algunos iones (a través de canales específicos), y moléculas liposolubles (Pappenheimer y Michel, 2003).

La presencia en la membrana basolateral del enterocito de transportadores específicos, permite el paso de moléculas por un mecanismo de difusión facilitada, ya que son moléculas que precisan la mediación de una proteína transportadora. La presencia en la membrana basolateral del enterocito de diversas proteínas con actividad ATPasa transportadoras de iones específicos, hacen posible la absorción por mecanismos de transporte activo, en contra de un gradiente. La absorción del nutriente en este caso cesa si no hay energía disponible o si el transportador se satura. La absorción de nutrientes mediante la ruta transcelular es un mecanismo complejo y específico. La formación de uniones intercelulares y la medida de parámetros eléctricos concuerdan con los fenómenos de diferenciación y polarización celular (Ramond *et al.*, 1985; García *et al.*, 1996).

III.9. BIODISPONIBILIDAD MINERAL

III.9.1. Introducción

Es de gran importancia el estudio de la biodisponibilidad mineral de los alimentos infantiles, ya que estos son frecuentemente la única fuente de estos nutrientes para unas edades en la que una correcta alimentación adquiere un papel fundamental. Aunque el modo ideal de realizar este tipo de estudios sería emplear modelos humanos, su aplicación se hace realmente difícil debido a la imposibilidad de emplear una población lo suficientemente grande y un tiempo lo suficientemente largo que nos permitan obtener resultados satisfactorios. Por otro lado, el empleo de animales de experimentación, no constituye siempre un modelo óptimo reflejo de la absorción intestinal en humanos (García *et al.*, 1996). Como alternativa a los estudios *in vivo* de la biodisponibilidad mineral, se han propuesto los modelos *in vitro*, que consisten en la simulación de la digestión gastrointestinal para, a continuación, estimar la cantidad de elemento mineral que se solubiliza o se dializa a través de una membrana de un determinado tamaño de poro (Jovaní *et al.*, 2001 b). Estos ensayos *in vitro* pueden ser mejorados si se incorpora la línea celular Caco-2 procedente de carcinoma de colon humano. Dicha línea celular se está empleando cada vez más como modelo *in vitro* de absorción intestinal en humanos (Lu *et al.*, 1996).

Se han dado muchas definiciones de biodisponibilidad mineral, no obstante hemos considerado más completa la dada por Schlemmer (1995) y que la define como la medida de la capacidad del hombre y de los animales, o la efectividad por la cual los nutrientes, en una forma química determinada, son liberados de los alimentos en presencia de ciertos componentes dietéticos. Incluye además la absorción intestinal y el transporte de nutrientes a los órganos y células, donde finalmente cumplen su función biológica. No todo el nutriente que se ingiere en un alimento es utilizado por nuestro organismo, mientras que aquella fracción de nutriente no utilizada, es eliminada. Debido a esto, adquiere una gran importancia conocer qué fracción de nutriente es realmente utilizada por nuestro organismo, es decir, la fracción de nutriente que es biodisponible en condiciones fisiológicas. La biodisponibilidad mineral, se ve afectada tanto por factores dietéticos como por la condición fisiológica de la persona (OPS, 2002).

Los métodos *in vitro* propuestos para estudiar la disponibilidad mineral se basan en la simulación de la digestión gastrointestinal y posterior estimación de la proporción de nutriente ingerido que se transforma en forma soluble en el tracto gastrointestinal, midiendo la fracción que dializa a través de una membrana de cierto tamaño de poro, y expresando los resultados como porcentaje de mineral dializable (Sebastiá *et al.*, 2001). No obstante, en estudios de este tipo se han observado diferencias en el porcentaje de diálisis de un mismo elemento entre fórmulas infantiles de una misma clase (Jovaní *et al.*, 2000). Desde el punto de vista de diálisis mineral, el procesado industrial ofrece en general ventajas, ya que incrementa la cantidad de mineral dializado con respecto a los productos no tratados tecnológicamente (Sebastiá *et al.*, 2001).

Como etapa previa a la estimación de la biodisponibilidad de los elementos minerales en humanos, los métodos de digestión *in vitro* son de gran utilidad. Estos métodos pueden constituir una buena alternativa para conocer la acción que ejercen determinados factores dietéticos sobre la biodisponibilidad mineral. Además son más rápidos, de un menor coste y con una mejor reproducibilidad que los estudios *in vivo*. Se basan generalmente en simular las digestiones gástrica e intestinal y permiten estimar la fracción de elemento soluble o dializable, que teóricamente es captada por las células de la mucosa intestinal (Gangloff *et al.*,

1996 b). Tras el proceso de digestión se pueden determinar bien la fracción soluble o bien la fracción dializable de la muestra. En la fracción soluble obtenida tras el proceso de digestión, solo se puede obtener información sobre la primera etapa del proceso de disponibilidad.

En los métodos *in vitro* de determinación de la biodisponibilidad mineral se tiende actualmente a emplear la línea celular Caco-2. La simulación de la digestión gastrointestinal seguida del empleo de la línea celular Caco-2 se ha empleado en este trabajo para estimar la biodisponibilidad mineral.

La biodisponibilidad de un nutriente, depende de los procesos de digestión de los alimentos, absorción del nutriente y disponibilidad del mismo para las funciones metabólicas (Schümann *et al.*, 1994). Siendo por tanto el resultado de tres etapas:

- 1- la digestibilidad y la solubilidad del elemento mineral en el tracto gastrointestinal
- 2- la absorción y transporte a la circulación
- 3- la incorporación del elemento mineral a una entidad funcional (Fairweather-Tait *et al.*, 1996; Wienk *et al.*, 1999)

Existen un gran número de factores que influyen de una u otra forma sobre la biodisponibilidad mineral. Entre los más importantes, se encuentran los factores dietéticos, los cuales son determinantes principalmente sobre la etapa 1 de las vistas anteriormente, y que incluyen variables tales como el aporte total del elemento en la dieta, la forma química en que este se encuentre, su solubilidad, así como las interacciones con otros elementos presentes. Sobre las etapas 2 y 3, influyen factores como la edad del individuo, factores fisiológicos como el embarazo o la lactancia, el estado nutricional, determinadas situaciones patológicas, la flora intestinal así como la capacidad individual de adaptación a los aportes de nutrientes (Barberá y Farré, 1992).

III.9.2. Biodisponibilidad del hierro

Muchos estudios *in vivo* e *in vitro* se han llevado a cabo sobre la influencia que ejerce el ácido fítico en la absorción de hierro, debiéndose el primero de ellos a McCance *et al.* (1943). Se sabe que la ingesta crónica de alcalinos, fosfatos, fitatos y taninos ejerce una acción inhibitoria sobre la absorción de hierro (Lestienne *et al.*, 2005 b). Se ha determinado igualmente que en presencia de té la absorción de este mineral disminuye hasta el 60 % mientras que en la de café la absorción se reduce hasta el 40 % (Hurrell *et al.*, 1999; Pinggera, 2004).

Por su parte los fitatos (hexafosfatos de inositol) que se localizan en la fibra del arroz, el trigo y el maíz, y la lignina de las paredes de las células vegetales, constituyen potentes inhibidores de la absorción de hierro, debido a la formación de quelatos insolubles. En este sentido, se ha calculado que de 5 a 10 mg de fitatos pueden reducir la absorción del hierro no hemo a la mitad, lo que puede ser evitado por el consumo de pequeñas cantidades de carne y vitamina C que impiden la formación de estos quelatos, provocando un aumento de la absorción aún en presencia de inhibidores (Engle-Stone *et al.*, 2005). El contenido de sustancias favorecedoras e inhibitorias de la absorción va a determinar la biodisponibilidad del hierro presente en la dieta. Sin embargo, durante la infancia, y debido a que los cereales junto a las fórmulas lácteas componen una gran parte de la dieta, por su elevado nivel energético (80 kcal/100 g), se hace particularmente importante la prevención de posibles carencias de minerales que podría ocasionar la presencia de una dieta rica en cereales y por tanto en ácido fítico (Berseth *et al.*, 2004; Lind *et al.*, 2004).

La tasa de absorción de hierro se ve afectada por una serie de factores que pueden actuar simultáneamente y algunos están interrelacionados entre sí. Así por ejemplo, la absorción de hierro aumenta con la disminución de las reservas corporales del mineral, el aumento de la actividad eritropoyética, la anemia o la hipoxemia, e inversamente, disminuye en presencia de la inflamación, proceso que contribuye a la anemia de los procesos crónicos (Skikne, 1998; Allen, 2001).

La absorción de hierro ocurre casi exclusivamente en el duodeno y sigue una secuencia de pasos que incluyen la reducción del hierro de los alimentos de su estado férrico a ferroso, la internalización apical del mineral, el almacenamiento intracelular o el tráfico transcelular y la liberación basolateral (Haro, 2006).

El conocimiento de los mecanismos que regulan la absorción de hierro permite determinar el valor nutricional de los alimentos y la forma de mejorar su biodisponibilidad, pero también permite seleccionar apropiadamente los compuestos de hierro mejores y más seguros que respeten el papel regulador que la mucosa intestinal ejerce sobre la absorción de hierro. El primer paso del proceso de absorción es la reducción del hierro férrico a su estado ferroso, lo cual ocurre por la actividad ferrireductasa del citocromo b duodenal al nivel del borde en cepillo del enterocito. Una vez en estado ferroso, el hierro es transportado a través de la membrana plasmática al interior celular por el DMT 1. Dentro del enterocito, el mineral puede tener 2 destinos: ser almacenado como ferritina y excretado en las heces cuando se produce la descamación de los enterocitos senescentes, o puede ser transferido a través de la membrana basolateral al plasma a través de la ferroportina, proceso en el que se requiere la actividad ferrooxidasa de la hefastina. La expresión de cada uno de los genes involucrados en estos pasos está sujeta a regulación, y los cambios en su expresión han sido examinados en diferentes condiciones clínicas; entre las que la mejor caracterizada es la anemia por deficiencia de hierro, en la que se ha observado la elevación de los niveles de ARNm y de proteínas del DMT 1, del citocromo b duodenal y de la ferroportina.

En el enterocito duodenal el Fe^{3+} de la dieta es reducido a Fe^{2+} por la óxido- reductasa férrica citocromo b duodenal (itbD), internalizado por el transportador de metales divalentes (DMT1), oxidado por la hefastina y liberado a la circulación por la ferroportina (Fpn). En los macrófagos, el hierro liberado en la lisis de los eritrocitos senescentes es almacenado como ferritina u oxidado y exportado a la circulación a través de la ferroportina. El hepatocito toma el hierro de la circulación como hierro libre o unido a la transferrina a través de los receptores de transferrina (TfR1 y TfR2). El TfR2 sirve como sensor del hierro circulante unido a la transferrina y modula la expresión de la hepcidina. La expresión de la hepcidina es también modulada por la hemojuvelina (HJV), que es una proteína descubierta recientemente y que está vinculada al metabolismo del hierro. La hepcidina es secretada a la

circulación donde disminuye la liberación del hierro mediada por la ferroportina en los enterocitos, macrófagos y hepatocitos (Fleming y Bacon, 2005).

Una vez liberado a la circulación, el hierro se une con la transferrina y es transportado a los sitios de utilización y almacenamiento.

III.9.2.1. Captación celular de hierro

La captación de hierro por las células intestinales se encuentra influenciada por los niveles de hierro presentes en las células (Yeung *et al.*, 2005). Alvarez Hernández *et al.*, (1991) comprobaron que la captación de Fe (en estados ferroso y férrico) por células Caco-2 se redujo significativamente cuando las células habían sido mantenidas en un medio de cultivo enriquecido en hierro. De un modo similar, otros autores (Gangloff *et al.*, 1996 a) comprobaron que un incremento en los niveles de ferritina de las células Caco-2 se relaciona con una disminución en la captación de hierro en estado ferroso, no observándose esta circunstancia para el hierro en estado férrico. Estos resultados sugieren que la captación de hierro, particularmente en su estado ferroso por células Caco-2 está inversamente relacionada con los niveles de hierro presentes. Es importante resaltar que en numerosos estudios se ha observado que la captación de hierro en forma ferrosa por las células es notablemente superior a la observada para el ión férrico (Davidsson, 2003; Salovaara *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2006).

Se sabe que la captación de hierro en células Caco-2 depende de la cantidad de hierro disponible bajo las condiciones del cultivo celular. En soluciones patrón con diferentes agentes quelantes Álvarez-Hernández *et al.*, (1991) mostraron que la adición de hierro (500 nM) a la monocapa de células incubadas con tres niveles diferentes de hierro (<0.1, 1.1 y 65 µM) resultan en una disminución de la captación de hierro en el medio de cultivo con menor concentración de mineral. Sobre estudios *in vivo* realizados sobre humanos (Cook *et al.*, 1991), se observó que todos los suplementos de calcio empleados interfirieron en la absorción de los suplementos de hierro cuando se tomaron con los alimentos.

El receptor de la transferrina, que está presente en todos los tejidos y células y que regula la captación de hierro de acuerdo con sus necesidades, es una glicoproteína

constituida por 2 subunidades, cada una de 90 kDa de peso molecular, unidas por un puente disulfuro. Cada subunidad posee un lugar de unión para la transferrina. Se ha observado la presencia de moléculas de receptor circulando en el plasma sanguíneo, que son incapaces de unir transferrina, puesto que carecen de sus porciones transmembranosa y citosólica; a estos receptores se les conoce como receptor soluble. No obstante su incapacidad de unir transferrina, se ha encontrado una relación directa entre la concentración de receptor circulante y el grado de eritropoyesis, así en la deficiencia de hierro hay un aumento de la concentración de receptores solubles. El receptor de transferrina desempeña un papel fundamental en el suministro de hierro a la célula, puesto que la afinidad del receptor por el complejo hierro-transferrina al pH ligeramente alcalino de la sangre, depende de la carga de hierro de la proteína. La afinidad máxima se alcanza cuando la transferrina está en su forma diférrica (Hoefkens *et al.*, 1996).

El complejo hierro-transferrina-receptor es internalizado en la célula a través de un proceso de endocitosis. El cambio del pH ligeramente alcalino al pH ácido del endosoma provoca un cambio en la estabilidad del complejo que ocasiona la disociación espontánea de los átomos de hierro; por su parte, la transferrina se mantiene unida al receptor hasta que un nuevo cambio de pH, en sentido contrario, al nivel de la membrana, provoca la ruptura del complejo y la consiguiente liberación de la transferrina que queda nuevamente disponible para la captación y transporte del hierro circulante (Lieu *et al.* 2001).

La liberación dentro de la célula del hierro unida a la transferrina es secuencial. La primera molécula es liberada por el pH ácido del citosol, mientras la segunda requiere ATP para su liberación.

III.9.2.2. *Transporte de hierro*

El hierro es transportado por la transferrina, que es una glicoproteína de aproximadamente 80 kDa de peso molecular, sintetizada en el hígado, que posee 2 dominios homólogos de unión para el hierro férrico (Fe^{3+}). Esta proteína toma el hierro liberado por los macrófagos producto de la destrucción de los glóbulos rojos o el procedente de la mucosa intestinal, se ocupa de transportarlo y hacerlo disponible a todos los tejidos que lo requieren.

Se le denomina apotransferrina a la proteína que no contiene hierro, transferrina monoférrica cuando contiene un átomo de hierro y diférrica cuando contiene 2 átomos. Cuando todos los sitios de transporte están ocupados se habla de transferrina saturada y se corresponde con alrededor de 1,41 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de transferrina. En condiciones fisiológicas, la concentración de transferrina excede la capacidad de unión necesaria, por lo que alrededor de dos tercios de los sitios de unión están desocupados. En el caso de que toda la transferrina esté saturada, el hierro que se absorbe no es fijado y se deposita en el hígado.

La vida media normal de la molécula de transferrina es de 8 a 10 días, aunque el hierro que transporta tiene un ciclo más rápido, con un recambio de 60 a 90 minutos como promedio. Del total de hierro transportado por la transferrina, entre el 70 y el 90 % es captado por las células eritropoyéticas y el resto es captado por los tejidos para la síntesis de citocromos, mioglobina, peroxidasas y otras enzimas y proteínas que lo requieren como cofactor.

III.9.2.3. Reservas de hierro en el organismo

El exceso de hierro se deposita intracelularmente como ferritina y hemosiderina, fundamentalmente en el sistema retículo endotelial del bazo, el hígado y la médula ósea. Cada molécula de ferritina puede contener hasta 4500 átomos de hierro, aunque normalmente tiene alrededor de 2500, almacenados como cristales de hidróxido fosfato férrico $[(\text{FeOOH})_3 \cdot \text{FeO} \cdot \text{PO}_3\text{H}_2]$ (Bauminger *et al.*, 2006).

La molécula de apoferritina es un heteropolímero de 24 subunidades de 2 tipos diferentes: L y H, con un peso molecular de 20 kDa cada una, formadas por 4 cadenas helicoidales. Las variaciones en el contenido de subunidades que componen la molécula determinan la existencia de diferentes isoferritinas, las que se dividen en dos grandes grupos: isoferritinas ácidas (ricas en cadenas H) localizadas en el corazón, los glóbulos rojos, los linfocitos y los monocitos, y las isoferritinas básicas (ricas en cadenas L) predominantes en el hígado, el bazo, la placenta y los granulocitos (Arosio *et al.*, 1976).

La función fundamental de la ferritina es garantizar el depósito intracelular de hierro para su posterior utilización en la síntesis de las proteínas y enzimas. Este proceso implica la

unión del hierro dentro de los canales de la cubierta proteica, seguido por la entrada y formación de un núcleo de hierro en el centro de la molécula. Una vez formado un pequeño núcleo de hierro sobre su superficie, puede ocurrir la oxidación de los restantes átomos del metal a medida que se incorporan (Haro, 2006).

Tanto el depósito de hierro como su liberación a la circulación son muy rápidos, e interviene en este último proceso el flavinmononucleótido. El hierro es liberado en forma ferrosa y convertido en férrico por la ceruloplasmina plasmática, para que sea captado por la transferrina que lo transporta y distribuye al resto del organismo. La hemosiderina está químicamente emparentada con la ferritina, de la que se diferencia por su insolubilidad en agua. Aunque ambas proteínas son inmunológicamente idénticas, la hemosiderina contiene un porcentaje mayor de hierro (30%) y en la microscopia se observa como agregados de moléculas de ferritina con una conformación diferente de los cristales de hierro (O'Connell *et al.*, 1988). El volumen de las reservas de hierro es muy variable, pero generalmente se considera que un hombre adulto normal tiene entre 500 y 1500 mg y una mujer entre 300 y 1000 mg, aunque estos valores dependen en gran medida del estado nutricional del individuo (Bodemann *et al.*, 1984).

III.9.2.4. *Regulación de la captación y almacenamiento de hierro*

La vía fundamental de captación celular de hierro por los tejidos es la unión y subsecuente internalización de la transferrina cargada con hierro por su receptor. La cantidad de hierro que penetra a la célula por esta vía está relacionada con el número de receptores de transferrina presentes en la superficie celular. Una vez dentro, el hierro es utilizado para sus múltiples funciones o almacenado en forma de ferritina o hemosiderina. Por lo tanto, cuando las necesidades de hierro de la célula aumentan, se produce un incremento en la síntesis de receptores de transferrina y, en el caso contrario, cuando hay un exceso de hierro, ocurre un aumento de la síntesis de ferritina. Esto se logra mediante un estricto sistema de control al nivel postranscripcional (Hoefkens *et al.*, 1996).

Tanto la expresión del receptor de transferrina como de la ferritina son reguladas en función de la disponibilidad y demanda de hierro para asegurar la homeostasia celular. En esta regulación está implicada una proteína citosólica de aproximadamente 98 kDa de peso

molecular, altamente conservada a lo largo de la evolución, conocida como factor regulador de hierro (IRF) o proteína de unión al elemento de respuesta al hierro (IRE-BP) (Bidlack, 2002).

III.9.3. Biodisponibilidad del calcio

Se sabe que una adecuada ingesta de calcio es de una gran importancia para un correcto desarrollo del esqueleto, siendo igualmente beneficioso para otros sistemas orgánicos (Heaney, 2006). El empleo de métodos *in vitro* para el estudio de la disponibilidad del calcio constituye una buena alternativa al empleo de métodos *in vivo*. Los métodos *in vitro* consisten en la simulación de la digestión gastrointestinal seguida de la determinación de la cantidad de calcio que es soluble en el lumen intestinal tras el proceso de digestión o de cuanto calcio dializa a través de una membrana de un cierto tamaño de poro. La solubilidad y la dializabilidad, pueden ser utilizadas para establecer la tendencia de la biodisponibilidad del calcio (Perales *et al*, 2005). Estos métodos pueden ser mejorados incorporando la línea celular Caco-2 procedente de carcinoma de colon humano.

El ácido fítico puede interactuar con la absorción del calcio y producir una reducción en la misma. La aparición de raquitismo y osteomalacia en poblaciones que consumen pan sin fermentar, se atribuye a los altos niveles de ácido fítico en la dieta (Zhou y Erdman, 1995). Morris y Ellis (1985) establecieron que un ratio ácido fítico:calcio $>0,2$ puede causar una deficiencia de calcio en humanos.

Ma *et al.* (2005) tras estudiar en semillas de soja y en granos de cereales el impacto que el ácido fítico ejerce sobre la disponibilidad del calcio, observaron que esta disminuía de forma considerable. Fredlund *et al.* (2006) encontraron en los panecillos de trigo un efecto inhibitorio en la retención del calcio dosis dependiente de la cantidad de ácido fítico. No obstante, existen pocos estudios (Roig *et al*, 1999 b; Jovaní *et al*, 2001 a; Etcheverry *et al*; 2004 b; Perales *et al*, 2005) sobre el efecto que ejercen los factores de la dieta sobre la captación de calcio en alimentos infantiles, y ninguno de ellos incluye una medida del transporte. Otros autores (Augspurger y Baker, 2004), concluyen que la incorporación de fitasa a la dieta puede ser una método eficaz de mejorar la utilización del calcio.

III.9.4. Biodisponibilidad del cinc

Los alimentos infantiles en general, no se suelen suplementar con cinc, proviniendo este de un modo natural de sus ingredientes. No obstante, su disponibilidad puede verse disminuida por el suplemento que se hace de hierro y calcio, que pueden interferir en la absorción del cinc (Bosscher *et al.*, 2001 c). Se sabe que existe un efecto sinérgico entre el contenido en fitato y altos niveles en calcio de los alimentos con la absorción de cinc, de modo que el ratio molar (fitato x calcio)/cinc es utilizado frecuentemente como indicador de la disponibilidad del cinc (Bosscher *et al.*, 2001 b). Se sabe que la presencia de proteínas en la dieta tiene un efecto positivo en la absorción del cinc, si bien depende del tipo de proteína de la dieta, de modo que la caseína ejerce un leve efecto inhibitor sobre dicha absorción si se compara con otras fuentes proteicas. Asimismo, la proteína de soja intensifica la absorción del cinc (Viadel, 2002). También ejercen acción positiva sobre la absorción del cinc azúcares como la lactosa y la glucosa, aminoácidos como histidina y metionina, EDTA y ácidos orgánicos como láctico, cítrico y málico. También es importante conocer por otra parte que el cinc en dosis elevadas altera la absorción de hierro como sulfato ferroso, que es la forma en la que habitualmente se encuentra suplementando los alimentos (Lönnerdal, 2000).

La disponibilidad del cinc es en general más elevada cuando procede de alimentos de origen animal que cuando procede de alimentos de origen vegetal, de modo que la absorción de cinc en humanos varía de una forma considerable (5-50%) dependiendo de la composición de la dieta (Fairweather-Tait y Hurrell, 1996).

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha incluido el ratio fitato:cinc como criterio para categorizar dietas de acuerdo con la disponibilidad de su contenido en cinc (FAO/WHO, 1994).

En base a datos recogidos de estudios llevados a cabo en animales, Ellis *et al.*, (1987) ratios molares de ácido fítico:cinc de >10:1 y calcio x ácido fítico:cinc >200:1 en rangos de concentración mM. En general, se sabe que el ratio molar (fitato:Zn) >1,5 puede inhibir la disponibilidad del cinc en niños recién nacidos; a partir del sexto mes de vida, este ratio se

incrementa hasta un valor de 8 (Bosscher *et al.*, 2001 a). Los resultados de varios estudios realizados en humanos y que investigan la influencia del ácido fítico sobre la absorción de cinc se reseñan a continuación.

Turnlund *et al.*, (1984) señalaron que el ácido fítico reducía la absorción de cinc en un 50%. Lönnnerdal *et al.*, (1984) encontraron que el ácido fítico en una fórmula a base de soja ejercía un efecto negativo sobre la absorción del cinc disminuyéndola en un 16-31%. Nävert *et al.*, (1985) demostraron un incremento del doble en la absorción de cinc a partir de pan con su contenido en ácido fítico parcialmente degradado, mediante el empleo de isótopos radiactivos. Sandström *et al.*, (1987) encontraron un incremento en la absorción de cinc en diferentes cereales tras reducir su contenido en ácido fítico determinado mediante isótopos radiactivos. La absorción de cinc, determinada mediante isótopos radiactivos, a partir de productos procedentes de la avena se incrementó en un 18% tras la reducción del contenido en ácido fítico mediante el malteado de los mismos (Larsson *et al.*, 1996). Couzy *et al.*, (1998) estudiaron como en individuos adultos, el ácido fítico en la leche de soja disminuye en gran medida la absorción de cinc. Hotz *et al.*, (2001 a) demostraron que una reducción del contenido de ácido fítico en el maíz tras un tratamiento casero, incrementó la disponibilidad del cinc en un 24-33%. Ma *et al.*, (2005) tras analizar la disponibilidad del cinc en semillas de soja y granos de cereales comprobó que el ácido fítico afecta negativamente a la disponibilidad del cinc. Mediante estudios realizados en humanos con panecillos de trigo (Fredlund *et al.*, 2006), demostraron que el efecto inhibitorio que ejerce el ácido fítico sobre la absorción de cinc es dosis dependiente.

III.9.5. Métodos *in vitro* para la determinación de la biodisponibilidad mineral

La biodisponibilidad mineral de los alimentos se determina preferentemente por métodos *in vivo*, no obstante, estos métodos son complicados de llevar a cabo y ofrecen resultados variables. De otra parte, los experimentos *in vitro* son simples, baratos, rápidos, y ofrecen una menor variabilidad en los resultados. Éstos últimos son por lo tanto cada vez más utilizados en la determinación de la disponibilidad mineral (Luten *et al.*, 1996; Bosscher *et al.*, 2002).

Miller *et al.*, (1981) utilizaron la dialización del hierro simulando las condiciones del estómago e intestino delgado como un índice de su disponibilidad. Otros autores (Bosscher *et al.*, 2001 b; De Souza-Nogueira *et al.*, 2004; Cámara *et al.*, 2005), confirmaron la existencia de una prometedora relación entre la diálisis *in vitro* de un mineral y su disponibilidad *in vivo*. Numerosos autores han comprobado la utilidad del empleo de la línea celular Caco-2 en combinación con la simulación de una digestión gastrointestinal para estudiar la biodisponibilidad mineral (García *et al.*, 1996; Glahn *et al.*, 2000; Jovaní *et al.*, 2001 a; Fairweather-Tait *et al.*, 2005; Perales *et al.*, 2005; 2006).

III.10. LÍNEA CELULAR CACO-2: ESTUDIO “IN VITRO” DE LA CAPTACIÓN Y TRANSPORTE MINERAL EN EL EPITELIO INTESTINAL

Para estudiar la absorción de nutrientes a nivel intestinal, se emplean modelos experimentales mediante el cultivo de enterocitos humanos. El estudio de la captación de nutrientes puede llevarse a cabo mediante el empleo de enterocitos cultivados sobre soportes sólidos. Para el estudio del transporte de nutrientes, los enterocitos se mantienen sobre soportes microporosos. A este fin se emplean las células Caco-2 debido a su gran similitud con los enterocitos humanos maduros. Actualmente se emplean de un modo normalizado para el estudio de la biodisponibilidad mineral (Álvarez-Hernández *et al.*, 1991; Han *et al.*, 1994) combinado con una digestión *in vitro* previa de los alimentos (Glahn *et al.*, 1998). Las células Caco-2 en cultivo, crecen adheridas a un sustrato formando una monocapa, cuando éstas alcanzan la confluencia, se diferencian espontáneamente adquiriendo las características morfofuncionales del enterocito maduro (Herold *et al.*, 1994).

Durante la formación de la monocapa, si se observan las células Caco-2 a microscopio electrónico, se aprecia en las primeras etapas de crecimiento que la unión entre células, así como la formación de microvellosidades son mínimas. Posteriormente, en la fase de proliferación se observa que alrededor de un 80% de las células presentan borde en cepillo; mientras que en la fase estacionaria de crecimiento, las uniones entre células son más evidentes y todas las células han desarrollado borde en cepillo (Viadel, 2002). Cuando las células Caco-2 están diferenciadas, presentan en condiciones normales, las características

propias de los enterocitos maduros (Figura 9), tales como células polarizadas, uniones estrechas intercelulares, formación de domas, buen desarrollo de la membrana del borde en cepillo, de la actividad enzimática característica tal como sacarasa-isomaltasa, fosfatasa alcalina, lactasa y aminopeptidasa (Ismail, 1999); mientras que la membrana basolateral está asociada a actividad ATP-asa dependiente de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, así como a receptores hormonales (Viadel, 2002).

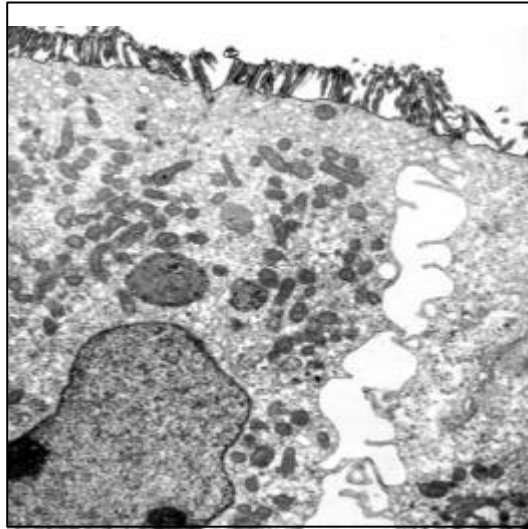


Figura 9. Caco-2. Microscopio electrónico.

No obstante, la utilización de este modelo para el estudio de la captación y transporte de nutrientes a nivel intestinal también presenta inconvenientes (Ekmekcioglu *et al.* 1999). Esta línea celular, al proceder de carcinoma de colon humano, puede presentar un metabolismo diferente al esperado y mostrar una mayor resistencia transepitelial. Además, no presentan capacidad de producir mucina y tiene una baja tasa de transporte de nutrientes en relación a los enterocitos normales. Probablemente, estas limitaciones con respecto a las condiciones *in vivo* se deben a una menor superficie de transporte si se compara con el intestino, la presencia en el mismo de diferentes especies celulares y la ausencia de regulación endocrina. Sin embargo, se le considera un modelo válido debido a las condiciones ya estandarizadas de los experimentos y a los resultados reproducibles, por lo que su empleo es cada vez más frecuente (Gangloff *et al.*, 1996; Glahn *et al.*, 2000).

III.10.1. Captación y transporte de hierro, calcio y cinc en células Caco-2

En los estudios que se han realizado hasta ahora sobre disponibilidad mineral empleando la línea celular Caco-2 se han empleado disoluciones patrón o bien alimentos “problema”, necesitando en este último caso la digestión *in vitro* de las muestras previamente al estudio.

III.10.1.1. Disoluciones patrón

III.10.1.1.a. Hierro

El hierro es un nutriente esencial, sin embargo, en estado libre puede ser perjudicial para las células debido a que forma especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden causar estrés oxidativo sobre las mismas (Zödl *et al.*, 2005). Distintos autores (Glahn *et al.*, 1998; Zerounian y Linder, 2002) han señalado que estados deficitarios en hierro, incrementan su captación en células Caco-2. De este modo, se ha comprobado que en el empleo de distintas concentraciones de Fe en el medio de cultivo empleado para las Caco-2, la captación del mismo se incrementa en estados de deficiencia de hierro en las células. Así, Tapia *et al.*, (1996); Crichton *et al.*, (2002); Morgan *et al.*, (2002); Zhu *et al.*, (2006) también comprobaron la relación inversa que existe entre el contenido de hierro intracelular y la captación del mismo.

La captación de hierro por las células Caco-2 depende del estado de oxidación del mismo, de este modo el Fe⁺² se capta y transporta mejor que el Fe⁺³ (Álvarez Hernández *et al.*, (1991); Wortley *et al.*, (2005)), y se ha comprobado que la mayor captación se produce a partir de Fe (+2)-Ascorbato. En la membrana del borde en cepillo de las células Caco-2 se encuentra presente una ferrireductasa dependiente de NADH y NADPH que reduce el Fe (+3) a Fe (+2) y que favorece por tanto la absorción del hierro, esta enzima es responsable del 70-80% de la captación del hierro (Ekmekcioglu *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000).

En el estudio de la captación y transporte de hierro por las células Caco-2, es importante diferenciar entre el hierro que ha sido captado por las células y el que no se ha

unido a las mismas, para lo cual se utilizan batofenantrolina sulfónica y ditionito sódico y EDTA, que se unen al hierro que queda en la superficie celular. Se sabe que las células Caco-2 transportan el hierro desde el polo apical hasta el polo basal en un proceso que responde a la valencia que presenta el hierro, así como a los niveles de éste en las células (Álvarez Hernández *et al*, 1991). Se ha propuesto la existencia de dos mecanismos simultáneos para explicar el mecanismo de absorción del hierro de las células Caco-2 (Halleux y Schneider, 1994): un mecanismo de transporte no específico y un mecanismo más selectivo que depende de la valencia del hierro.

Un modelo *in vitro* de disponibilidad mineral que no requiera el marcado radioactivo de los alimentos, podría suponer una doble ventaja, ya que tendría un menor coste y una mayor facilidad de uso que los modelos que emplean isótopos radioactivos para la determinación de la disponibilidad mineral. Para el caso del hierro, que es almacenado en las células Caco-2 como ferritina, la estimación de la ésta (Glahn *et al.*, 1998; 2000; Etcheverry *et al.*, 2005) sería una medida del hierro disponible, ya que éste induciría la formación de una mayor cantidad de ferritina frente al hierro menos disponible del alimento (Gangloff *et al.*, 1996 a). De ser así, la formación de depósitos de ferritina, podría utilizarse como un indicador de la captación de hierro por las células, eliminando por tanto la necesidad de marcar con isótopos radioactivos el hierro en los ensayos de disponibilidad. Los niveles de ferritina intracelular incrementan al aumentar la concentración de hierro intracelular (20-200 μM). El contenido de hierro en el interior de las células Caco-2 (ferritina) depende también de la forma en que se adiciona el hierro a la monocapa celular. De este modo, cuando la adición de hierro se efectúa a partir de suero bovino fetal no se observa incremento significativo en la ferritina intracelular, por lo que Gangloff *et al.*, (1996 b) y Tallkvist *et al.*, (2000) indicaron que el hierro procedente de suero bovino fetal no es muy disponible, mientras que la adición de hierro inorgánico se relaciona positivamente con el contenido de hierro intracelular. Es por tanto importante el conocimiento de si la formación de depósitos de ferritina en las células se puede utilizar como medida de la disponibilidad del hierro, en base a esto, Glahn *et al.*, (1998), encontraron que la formación de ferritina es un indicador altamente sensible a la captación de hierro por las células Caco-2, y por tanto como se puede emplear como medida de la disponibilidad mineral; este método también elimina la

necesidad de marcar radioactivamente el alimento para determinar la disponibilidad mineral, y es por otro lado un método barato y una interesante alternativa a otros métodos de medida de la disponibilidad mineral. No obstante, no todo el hierro que se incorpora al medio apical es transportado al basolateral, lo que pone de manifiesto que la absorción del hierro está regulada por factores intracelulares. Arredondo *et al.*, (1997) afirman que un incremento del hierro intracelular (hasta 130 μM) induce un incremento en la formación de ferritina, la cual puede mantener la regulación de la absorción de hierro. Otro método de medida de la disponibilidad del hierro, es el empleo de isótopos estables para medir la eficacia de absorción de nutrientes específicos en humanos. Este método consiste en la incorporación de isótopos estables de hierro a los glóbulos rojos, y es considerado la única vía directa de medida de la absorción y disponibilidad de hierro (Kastenmayer *et al.*, 1994).

III.10.1.1.b. Calcio

In vivo, el transporte de calcio, sucede fundamentalmente por vía paracelular, aunque también sucede por la vía transcelular (Ekmekcioglu *et al.*, 1999; Jewell *et al.*, 2005). La ruta paracelular es un mecanismo de difusión y es función de la integridad de la monocapa. La ruta transcelular del calcio es función de la concentración de calcio y del tiempo de incubación, observándose una respuesta lineal cuando se expresan los resultados en función del tiempo, y no lineal cuando se hace en función de la concentración de calcio adicionada (0,75-15 mM) (Giuliano *et al.*, 1991). El mecanismo de transporte activo del calcio se encuentra controlado por la vitamina D₃. De este modo, la presencia de 1 alfa, 25-(OH)₂-D₃ a una concentración 10⁻⁸ M incrementa unas 2.3 veces (de 1.2 a 1.8 mmol/min.pocillo) el transporte de calcio 7.5 mM. El efecto producido es función de la concentración de vitamina D. La ruta paracelular es independiente de la vitamina D₃.

Las células Caco-2 son la única línea celular humana que se ha demostrado que posee un receptor de vitamina D en el estado diferenciado. Giuliano *et al.*, (1991) y Fleet *et al.*, (1996) comprobaron que varios análogos de esta vitamina (1 alfa, 25-(OH)₂-D₃) pueden estimular de un modo significativo el transporte transepitelial de calcio en células Caco-2.

III.10.1.1.c. *Cinc*

Los estudios de la captación y transporte de cinc en las células Caco-2 no son muy numerosos, y la mayoría están referidos a la influencia que ejercen distintos componentes de los alimentos sobre dichos procesos.

Es sabido que la síntesis de metalotioneína por las células Caco-2 se encuentra directamente relacionada con los niveles intracelulares de cinc, no observándose ningún incremento en la síntesis de metalotioneína en ausencia de cinc. Un aumento de la concentración de cinc en el medio de cultivo (0-200 μM) provoca un incremento (5-50%) en la síntesis de metalotioneína. La síntesis de la metalotioneína es de gran importancia ya que regula el estado corporal del cinc. En presencia de elevadas concentraciones de cinc, se activa el mecanismo de transporte del mismo y aumenta la acumulación de metalotioneínas (Viadel, 2002).

Ford (2004), realizando estudios de transporte de cinc en células Caco-2, indicó la existencia de mecanismos saturables y no saturables a una concentración de cinc de 200 μM . Por ejemplo, se sabe que la mayor parte de la absorción de cinc sucede en el tramo proximal del intestino, lo cual se debe probablemente a los mayores niveles de cinc que presentan las células epiteliales del intestino a este nivel. Finley *et al.*, (1995) comprobaron que en presencia de suero bovino fetal en el medio de cultivo el cual contiene algunos ligandos de cinc, el transporte de éste en dirección apical-basolateral no presenta cinética de saturación. La captación de cinc a través de la cara basolateral se satura bajo las mismas condiciones, sugiriendo una mayor afinidad por el cinc de los transportadores existentes en esta cara que por los ligandos de cinc presentes en el suero. Estos autores encontraron también que el flujo de transporte de cinc endógeno sucede de un modo diferente en las membranas apical y basolateral.

En condiciones de reducción de la ingesta de cinc en la dieta, se observa un incremento en la absorción del mismo, hecho que coincide con la estimulación que se observa en el flujo transepitelial de cinc en las células Caco-2 en presencia de una

concentración 5 μM con respecto a 25 μM (Reeves *et al.*, 2001). A concentraciones 20 μM de cinc se observa que la captación de cinc por las células Caco-2 es función del tiempo de incubación, y es máxima a los 50 minutos de exposición, no considerándose adecuados tiempos superiores de exposición. En el intervalo de concentración (0-200 μM) el incremento observado en la captación de cinc no es lineal (Viadel, 2002).

En células Caco-2, Finley *et al.*, (1995) estudiaron la influencia de diferentes concentraciones de cinc (1-200 μM) en su captación y transporte. Observando que la captación en la membrana basolateral es saturable, mientras que el desplazamiento de la membrana apical a la basolateral y viceversa, y la captación de cinc en la membrana apical no presentan cinética de saturación; para concentraciones de cinc de 200 a 1200 μM , estos autores observaron un incremento lineal en la captación y el transporte de cinc.

III.10.2. Alimentos

El estudio de la captación y transporte de hierro, calcio y cinc a partir de alimentos empleando la línea celular Caco-2, precisa de la simulación de una digestión gastrointestinal a fin de obtener la fracción soluble que se adicionará a la monocapa celular.

III.10.2.1. Digestión “in vitro”

Los modelos de digestión *in vitro* simulan las condiciones de digestión gastrointestinal que suceden en el organismo. Este modelo, junto al empleo de la línea celular Caco-2 constituye una importante herramienta para investigar la disponibilidad mineral a partir de distintas matrices de los alimentos (Gangloff *et al.*, 1996 b; Glahn, 1998; Ekmekcioglu *et al.*, 1999, Glahn *et al.*, 2000; Yeung *et al.*, 2005). La disponibilidad es un concepto que incluye la digestión, absorción e incorporación del nutriente a los procesos metabólicos (Bosscher *et al.*, 2001 c).

Los métodos *in vitro* que estudian la biodisponibilidad constituyen una buena alternativa a los métodos *in vivo*, y están basados generalmente en la simulación de la

digestión gastrointestinal seguida de la determinación del mineral que se ha solubilizado, que es equivalente a la cantidad de mineral que se encuentra disponible para la absorción (bioaccesible) y que constituye la primera etapa en el estudio de la absorción mineral (Perales *et al.*, 2005; Pynaert *et al.*, 2006). La cantidad de elemento solubilizado o dializado, puede ser utilizado como una medida de la biodisponibilidad mineral (Jovaní *et al.*, 2001 b). Este método se ve complementado con el empleo de la línea celular Caco-2, ya que nos permite conocer el mineral absorbido (captado y transportado). Como modelos de digestión *in vitro* también se emplea una membrana de cierto tamaño de poro a través de la cual dializa mineral a partir de la fracción soluble de la digestión, el conocimiento de la cantidad de mineral dializado es útil como medida de la disponibilidad del mineral, no obstante se ha observado que no existe una relación directa entre el mineral solubilizado, dializado y el captado y transportado por las células Caco-2, lo cual da una mayor importancia al empleo conjunto de una digestión *in vitro* y la línea celular Caco-2 para el estudio de la disponibilidad mineral (Ekmekcioglu *et al.*, 1999; Perales *et al.*, 2005).

La simulación de la digestión *in vitro*, supone en primer lugar el desarrollo de una fase gástrica, que varía de 1 a 2 horas y se desarrolla a 37°C y pH 2 en agitación en presencia de pepsina; seguida de una fase de digestión intestinal a 37°C durante 2 horas a pH 5.5 en agitación con pancreatina y sales biliares. Previamente a su adición a la monocapa, el digerido se centrifuga y las enzimas proteolíticas empleadas en la digestión gastrointestinal deberán ser inactivadas a fin de no producir alteración en la monocapa, para lo cual se recogen en la bibliografía tres métodos:

- adición de suero bovino fetal (1%) (Ekmekcioglu *et al.*, 2002)
- tratamiento térmico (Navarro *et al.*, 2000)
- diálisis (Gangloff *et al.*, 1996 b)

El sobrenadante obtenido, debe tener un valor de pH final entre 6,4 y 6,7 y una osmolalidad entre 270 y 310 mOsm/kg para no dañar la monocapa (Jovaní *et al.*, 2001; Perales *et al.*, 2005).

III.10.2.2. *Influencia de otros factores dietéticos en la captación y transporte de hierro, calcio y cinc en Caco-2*

La presencia de factores antinutricionales en los alimentos que pueden interferir en la disponibilidad mineral justifica el interés por el estudio de la influencia de factores dietéticos en la captación y transporte de minerales.

En los granos de cereales y leguminosas, el ácido fítico (IP_6), que está presente en grandes concentraciones y se une a los minerales presentes formando con ellos complejos insolubles (Hurrell *et al.*, 1992). La influencia del IP_6 e inositoles de un menor número de fosfatos fue estudiada por Han *et al.*, (1994) en células Caco-2, observándose que se produce una disminución en la captación de hierro de un 30-50%. Estos mismos autores, sobre células Caco-2 sembradas en soportes semipermeables comprobaron que el transporte de hierro es lineal durante las 5 primeras horas de incubación, así como que el grado de inhibición en el transporte de hierro, que es directamente proporcional al número de fosfatos de los inositoles presentes. De modo que en presencia de ácido fítico (IP_6) prácticamente no se transporta hierro. Comprobaron igualmente que la adición de ácido ascórbico a la dieta, aumenta la captación y el transporte de hierro en células Caco-2 por reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} .

Los resultados de distintos estudios llevados a cabo a fin de conocer la influencia de los inositoles fosfato sobre la disponibilidad mineral, ofrecen resultados contradictorios. Lönnerdal *et al.*, (1989), Sandberg *et al.*, (1989) y Sandström & Sandberg (1992) encontraron que los inositoles fosfato con menos de cinco grupos fosfato no tienen efecto alguno sobre la absorción de Fe, Ca y Zn; mientras que Han *et al.* (1994) concluyeron que tanto inositol trifosfato (IP_3) como inositol tetrafosfato (IP_4) sí ejercen un efecto negativo sobre la absorción de minerales empleando la línea celular Caco-2. No obstante, otros autores (Skoglund *et al.*, 1999) han observado que tras dos horas de incubación, los isómeros de IP_3 e IP_4 no afectan significativamente a la absorción del hierro, mientras que 4 horas de incubación provocaron una disminución de un 18% en la absorción de este mineral. Observaron igualmente que los inositoles tri, tetra, penta y hexafosfato no ejercen efecto inhibitorio sobre la disponibilidad mineral. No obstante, estos resultados difieren de los descritos por Han *et al.*, (1994); que

concluyeron que los inositoles tri-, tetra-, penta- y hexafosfato ejercen acción inhibitoria sobre la absorción de minerales.

Una razón que justifique estos resultados contradictorios puede ser que en los estudios llevados a cabo por Skoglund *et al.*, (1999) se trabajó con los isómeros purificados de IP₃ e IP₄, mientras que en el estudio desarrollado por Han *et al.*, (1994) se empleó una mezcla de isómeros de estos inositoles. Además, hay que tener en cuenta que según Hawkins *et al.*, (1993) los diferentes isómeros de inositoles fosfato son capaces de unir el catión de hierro con distinta fuerza, de modo que la posición 1, 2, 3 (ecuatorial-axial-ecuatorial) trifosfato del inositol, es la orientación que establece más fuertes enlaces de unión con el hierro.

Diversos estudios (Han *et al.*, 1994; Sandberg *et al.*, 1999) sobre el efecto de los inositoles fosfato sobre la disponibilidad del hierro, han demostrado que un cociente molar 10:1 ((IP₃ + IP₄): Fe) produce una disminución en la absorción de hierro, mientras que valores más bajos no producen tal efecto. Skoglund *et al.*, (1999) observaron inhibiciones en la absorción de hierro a un cociente molar de 20:1, para el inositol tetrafosfato; mientras que para el inositol trifosfato, no encontraron efecto sobre la disponibilidad mineral utilizando cocientes superiores a 40:1.

Por otra parte, el ácido tánico, un compuesto fenólico presente en algunos vegetales actúa inhibiendo la captación del hierro no hemo en un 97.5% en células Caco-2 a un ratio 1:1 o menor (Glahn *et al.*, 2002; Engle-Stone *et al.*, 2005). Además, se ha comprobado cómo influyen en la disponibilidad del hierro el β-caroteno y la vitamina A (García-Casal *et al.*, 2000), para ésta última empleando cultivos celulares. No se observaron importantes cambios en la captación de hierro; mientras que el β-caroteno si la favorece, contrarrestando incluso concentraciones de ácido fítico superiores a 48 μmol/L. La quercetina y astragalina, flavonoides presentes en algunos vegetales, han demostrado un efecto inhibitorio sobre la absorción de hierro empleando para su estudio la línea celular Caco-2 (Hu *et al.*, 2006). Estudios de biodisponibilidad de hierro realizados empleando la línea celular Caco-2 han comprobado que péptidos específicos de bajo peso molecular presentes en la leche humana favorecen la absorción de hierro extrínseco procedente de otros alimentos de la dieta (Serfass

y Reddy, 2003). El ácido ascórbico favorece la captación de hierro debido probablemente al descenso que produce en los valores de pH, los cuales favorecen la formación de hierro más soluble (Hallberg *et al.*, 1989). En cantidades relativamente altas, a una razón molar ácido ascórbico:hierro igual o mayor a 2:1, el ácido ascórbico puede aumentar la absorción de hierro de dos a tres veces (Zhu *et al.*, 2006). Otros autores (Derman *et al.* 1980), señalaron que la absorción de hierro de alimentos a base de cereales mejora significativamente tras la adición de ácido ascórbico con un cociente molar en relación al hierro superior a 0,9:1. Este efecto de la vitamina C se debe a que convierte el hierro férrico a su forma ferrosa, que es de más fácil absorción (OPS, 2002).

Debon y Tester, (2001) estudiaron el efecto que ejercen determinados polisacáridos clasificados como fibra soluble sobre la absorción de minerales, demostrando que las pectinas, carragenatos y gomas tienen gran capacidad de quelar cationes. Van Dyck *et al.*, (1996) estudiaron la reducción que se produce en la diálisis del hierro procedente de un alimento, concluyendo que se relaciona con un incremento en la presencia de salvado de trigo rico en fibra. No obstante el papel inhibitorio que ejerce la fibra sobre la absorción de minerales, no es del todo concluyente (Amaro y Cámara, 2004).

Numerosos estudios (Reddy *et al.*, 2006; Engelmann *et al.*, 1998; Amaro *et al.*, 2004; Engle-Stone *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2006) reflejan el efecto favorecedor que ejerce la ingesta de carne en la dieta sobre la absorción de minerales. Este efecto se observa fundamentalmente de hierro tanto en su forma hemo como no hemo. Este efecto se denomina “meat factor” y parece estar debido a distintos componentes de las fibras musculares, tales como la meromiosina pesada que es rica en grupos sulfhidrilo, que actúan reduciendo el Fe (III).

Al contrario de lo que sucede con las proteínas de la carne, otras proteínas presentes en los alimentos perjudican la absorción mineral. En este sentido, la caseína de la leche inhibe la absorción de hierro. Este efecto parece ser debido a que los residuos fosforilados de aminoácidos de la caseína actúan ligando cationes divalentes y trivalentes mediante enlaces

iónicos (Amaro y Cámara, 2004). Hansen *et al.*, (1997) comprobaron este mismo efecto para el calcio y el cinc y Teucher *et al.*, (2006) para el calcio.

Los fructo-oligosacáridos (FOS), ampliamente presentes en la dieta, y que son fermentados durante la digestión a nivel del colon, producen una acción favorecedora sobre el crecimiento de bifidobacterias a nivel intestinal (Bosscher *et al.*, 2003). Sobre la disponibilidad mineral, los FOS ejercen una acción positiva sobre la absorción de hierro, calcio y magnesio (Ohta *et al.*, 1995). Esta acción podría estar debida a la formación de ácidos orgánicos durante la fermentación de los FOS, lo cual favorece la solubilización de los complejos formados entre el ácido fítico y los minerales; o bien al estímulo que producen en el crecimiento de la flora a nivel del colon y el subsiguiente incremento en la producción de fitasa endógena (Amaro y Cámara, 2004).

Estudios más recientes (Cotter y Cashman, 2005; Jewell *et al.*, 2005) han investigado la influencia o no de determinadas moléculas sobre la absorción del calcio, comprobando por ejemplo que en las células Caco-2 ésta no se ve afectada por elevadas concentraciones de (genisteína y daidzeína) dos moléculas presentes en las semillas de soja. Este hecho adquiere gran importancia en mujeres menopaúsicas debido a su acción estrogénica. Por otro lado, el transporte transcelular y el paracelular de calcio se incrementan significativamente ($p < 0.001$) en presencia de CLA (ácido linoleico conjugado).

Kennefick y Cashman (2000), estudiaron el efecto inhibitorio de la fibra de cereales sobre la captación y transporte del calcio por las células Caco-2. Estudiaron de igual modo el efecto de la desfitinización de la fibra, encontrando que es el ácido fítico el principal inhibidor de la captación y transporte de calcio en células Caco-2. También se ha comprobado (Perales *et al.*, 2005) que la adición de zumos de frutas a fórmulas infantiles a base de leche y cereales, favorece el transporte y captación del calcio, debido fundamentalmente a la presencia de ácidos orgánicos como málico o láctico, que se unen al calcio formando complejos solubles. Mas recientemente Gilman y Cashman (2006), comprobaron que la presencia de bacterias prebióticas produce un aumento en la captación de calcio por las células Caco-2, mientras que no ejercen actividad sobre el transporte.

Por otro lado, se ha estudiado la influencia de diferentes componentes de los alimentos sobre la captación y transporte de cinc en las células Caco-2. Así, Raffaniello *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 2000 y Talkvist *et al.*, 2000 estudiaron respectivamente el efecto de ligandos del cinc de bajo peso molecular (histidina, cisteína, prolina) sobre la captación de cinc, el efecto que producen los fosfopéptidos de caseína en la absorción de cinc y el efecto de la adición de hierro al medio de cultivo sobre la absorción de cinc en células Caco-2. Comprobando que la presencia de dichos ligandos, la caseína de la leche, así como la adición de hierro ejercen efecto negativo sobre la disponibilidad de cinc en células Caco-2.

Otros trabajos han estudiado la influencia de otros componentes de los alimentos sobre la disponibilidad *in vitro* del cinc, así Glahn *et al.*, 2002 y posteriormente Lestienne *et al.*, 2005 b, comprobaron el efecto negativo que ejercen sobre ésta la fibra, los fitatos y los taninos. Asimismo, el enriquecimiento de la leche de vaca con calcio produce un efecto negativo en la absorción del cinc (Perales *et al.*, 2006).

III.11. ESTRATEGIAS EMPLEADAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA PARA MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD MINERAL EN LOS CEREALES INFANTILES

Las estrategias más frecuentes empleadas para reducir la incidencia de malnutrición por déficit mineral son el empleo de suplementos farmacéuticos, el enriquecimiento de los alimentos, una dieta más variada, y el tratamiento de enfermedades (Maberly *et al.*, 1994). Por distintos motivos, ninguno de ellos ha resultado del todo eficaz. Una alternativa interesante, sería incrementar el nivel total de micronutrientes en las partes comestibles del alimento, al tiempo que se incrementa la concentración de componentes que favorezcan su captación y/o disminuyendo el contenido en componentes que inhiben su absorción mediante el empleo de variedades de la planta o mediante el empleo de la ingeniería genética (Greiner y Konietzny, 2006).

El establecimiento de un programa para enriquecer los alimentos debe tener en cuenta una serie de factores, tales como el tipo de alimento que vehicula el nutriente, así como el tipo de compuesto que se añade al alimento. Es necesario desarrollar nuevas

estrategias que incrementen la ingesta diaria de minerales biodisponibles. En el caso del hierro, se están produciendo alimentos infantiles enriquecidos con compuestos de hierro hidrosolubles, como el sulfato ferroso, y a veces incorporan en paralelo ácido ascórbico para aumentar su absorción. No obstante, estos cereales presentan con frecuencia alteraciones en sus características organolépticas como aparición de rancidez y cambios en el color y en el aroma, que aparecen durante el almacenamiento y/o procesado de los alimentos. Otros compuestos, como el hierro elemental en polvo y el pirofosfato férrico son frecuentemente utilizados para enriquecer los alimentos a base de cereales. El fumarato ferroso, que es escasamente soluble en agua aunque soluble en ácidos débiles como el jugo gástrico, apenas producen modificaciones en las características organolépticas del alimento durante su almacenamiento y tiene una biodisponibilidad similar al sulfato ferroso en individuos adultos sanos (Davidsson, 2003). El fumarato ferroso es significativamente más disponible que el pirofosfato férrico cuando es añadido a los cereales infantiles.

Se sabe que el Na_2EDTA aumenta la absorción de hierro de dos a tres veces, siempre que el hierro proceda de fuentes fácilmente solubles en agua (por ejemplo, sulfato ferroso) (Hurrell *et al.*, 2000). Si la dieta presenta bajos niveles de inhibidores de la absorción, el efecto estimulante del Na_2EDTA tiene poca importancia, si por el contrario el régimen alimentario es rico en inhibidores de la absorción, el Na_2EDTA incrementa considerablemente su disponibilidad. La adición de Na_2EDTA alcanzando un cociente molar de EDTA:hierro entre 0.5:1 a 1:1 puede mejorar la absorción de hierro de los alimentos enriquecidos con sulfato ferroso (OPS, 2002).

El enriquecimiento en calcio de los alimentos infantiles no se encuentra exento de problemas. Es necesario tener en cuenta factores como la solubilidad de la sal de calcio y del ratio calcio:fósforo. El incremento en los contenidos de calcio y fósforo en fórmulas infantiles se asocia a veces a la alteración de las sales empleadas en la disolución, como la aparición de precipitados (Kaup, 1998). Para evitarlo, en lugar de utilizar sales de calcio de baja solubilidad como fosfato o carbonato de calcio, se tiende a emplear componentes más solubles como el gluconato o lactato de calcio. Recientemente, se han obtenido variedades de

maíz, cebada, arroz y soja con un bajo contenido en fitatos, demostrándose su mayor capacidad para ofrecer una mayor disponibilidad de hierro, calcio y cinc (Raboy, 2002).

Durante el procesado de los alimentos en la industria alimentaria, la separación física de las partes de la semilla más ricas en fitatos, consiguen un importante descenso en su contenido que produciría una mejora en la disponibilidad mineral. No obstante, es importante destacar que niveles bajos en fitatos van en general acompañados de un descenso en los niveles de otros nutrientes que son eliminados al mismo tiempo que se eliminan partes de la semilla ricas en fitatos, o bien son destruidos al aplicar elevadas temperaturas necesarias para eliminar el ácido fítico mediante métodos no enzimáticos. Sin embargo, la degradación del ácido fítico mediante métodos enzimáticos, sucede bajo condiciones suaves y por tanto no afecta a otros componentes del alimento (Greiner y Konietzny, 2006). Un aumento en los niveles de fitasa en las semillas de los cereales, contribuye a una mejora en la disponibilidad mineral debido a la reducción que se produce en los niveles de fitato durante el procesado de alimentos y en el estómago durante la digestión. Además, la degradación del fitato durante el procesado de los alimentos, puede ser mejorada mediante la adición de fitasa exógena o bien ajustando las condiciones óptimas de actividad de las fitasas.

Estudios realizados sobre individuos ileostomizados (Agte *et al.*, 2005) han demostrado que gran parte del ácido fítico presente en cereales (con actividad fitásica endógena), era hidrolizado durante su paso por el estómago e intestino delgado, pero esto no sucedía cuando los cereales tenían inactivada la actividad fitasa endógena. No obstante, las consecuencias de la hidrólisis intestinal del fitato por fitasa procedente de la dieta sobre la absorción del hierro no hemo no es del todo conocida. Distintos estudios (Sandberg *et al.*, 1987; Sandberg y Andersson, 1988), sugieren que existe una actividad fitasa insignificante a nivel digestivo en seres humanos; no obstante las fitasas endógenas de los cereales producen al activarse a nivel digestivo, la degradación del ácido fítico (Sandberg *et al.*, 1996).

Para la extracción o eliminación del ácido fítico, se emplean métodos físicos tales como la molienda o triturado del cereal aunque el remojo y la germinación de las semillas, así como los procesos de fermentación han demostrado ser un método más eficaz en la

eliminación de los fitatos presentes. El fundamento de los procesos anteriores se basa en la activación de las fitasas endógenas, produciéndose por tanto una degradación de su contenido en ácido fítico. A fin de optimizar en el procesado de los alimentos la degradación del ácido fítico, es de gran importancia conocer las condiciones óptimas de actividad del enzima, teniendo en cuenta que estas condiciones dependen del tipo de cereal con el que se está trabajando. La mayoría de las fitasas procedentes de cereales presentan un pH óptimo entre 4.5-5.6, mientras que las procedentes de leguminosas, presentan un pH óptimo a valores de 7 o superiores (Sandberg y Andlid, 2002).

La degradación del ácido fítico en el salvado de trigo como consecuencia de la acción de la fitasa endógena consigue reducir casi completamente su efecto inhibitorio sobre la absorción de hierro, demostrando por tanto que el ácido fítico es el principal inhibidor de la absorción del hierro en este tipo de fibra (Hallberg *et al*, 1987).

No obstante se ha comprobado que el método más sencillo y eficaz de conseguir la eliminación del ácido fítico, es la adición de fitasa exógena, siendo las fitasas procedentes de hongos del género *Aspergillus* las más frecuentemente utilizadas (Hurrell, 2004). El empleo de estas enzimas de origen microbiano durante el procesado de los alimentos, puede ser en un futuro cercano factible de emplearse en la industria alimentaria (Sandberg y Andlid, 2002).

La degradación del ácido fítico mediante la adición de fitasa microbiana en la soja incrementó la absorción de hierro en adultos a los que se les suministró la soja en forma de fórmula líquida (Hurrell *et al*. 1992). Hallberg *et al*. (1989) observaron un efecto del ácido fítico dosis dependiente sobre la absorción de hierro cuando el ácido fítico se añadía en distintas cantidades (7-890 mg) a panecillos de trigo desfitinizados. Para lograr un incremento significativo en la absorción de hierro, su contenido en ácido fítico debe ser reducido a un 0,03% en aislados de proteína de soja (Hurrell *et al*. 1992).

Durante la degradación enzimática del ácido fítico, se forman distintos isómeros de inositol fosfato, dependiendo del origen de la fitasa empleada. Se sabe, que algunos de estos

isómeros ejercen una importante función en el organismo, ya que son antiinflamatorios, o bien actúan como segundos mensajeros celulares (Sirén *et al*, 1991; Streb *et al*, 1983), aunque estudios más recientes tratan igualmente de demostrar que el inositol pentafofato (IP₅) e inositol tetrafofato (IP₄), ejercen también cierta acción inhibitoria de la absorción de minerales por el organismo. Los métodos de procesado industrial utilizados habitualmente consiguen reducir los niveles de ácido fitico mediante la activación de la fitasa endógena de los cereales. Sin embargo, el modo más frecuente de eliminar el IP₆ es la adición de fitasa exógena, producida principalmente por bacterias o levaduras (Denstadli *et al*, 2006).

III. 11.1. FITASAS

III.11.1.1. Introducción

Las fosfatasas son enzimas que catalizan la rotura del enlace éster fosfórico. No obstante, estas enzimas no son capaces de hidrolizar este tipo de enlace en la molécula de ácido fitico. Para producir la hidrólisis del ácido fitico es necesaria la presencia de unas enzimas con actividad fosfohidrolasa llamadas fitasas. Estas enzimas hidrolizan el ácido fitico a derivados de inositol fosfato con un menor número de fosfatos, incluso a inositol libre. Las fitasas se encuentran de forma común en la naturaleza, pudiendo ser de origen microbiano, vegetal o animal. Varias de estas fitasas han sido clonadas y caracterizadas genéticamente (Tijkens *et al*, 2001). Las fitasas (mio-inositol hexafofato hidrolasas) son fosfomonoesterasas capaces de hidrolizar ácido fitico (mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6 hexakisfofato) para producir ortofosfato inorgánico y una serie de ésteres fosfóricos menores (inositol penta a monofosfato como productos intermediarios) y finalmente para liberar el mio-inositol. Dos fitasas están reconocidas por el IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry) (1976): 3-fitasa (EC 3.1.3.8) y 6-fitasa (EC 3.1.3.26), comenzando la defosforilación del mio-inositol en las posiciones 3 y 6 respectivamente. La 3-fitasa se encuentra en animales y microorganismos mientras la 6-fitasa está presente en las plantas, ambas enzimas presentan diferente actividad. Existen evidencias de que las fitasas pueden incrementar significativamente, la

utilización de fósforo fítico (Yi *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 1997; Denbow *et al.*, 1998, Pan *et al.*, 1998; Maenz *et al.*, 1999).

III.11.1.2. Tipos de fitasas

Existen diferentes criterios para la clasificación de las fitasas:

Basándonos en su pH óptimo, las fitasas se pueden clasificar en fitasas ácidas y alcalinas. Además, si se tiene en cuenta la posición del carbono del anillo de mio-inositol en la molécula de fitato por el que la fitasa comienza el proceso de desfosforilación, se clasifican en 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) y 5-fitasa (E.C. 3.1.3.72) (Greiner y Konietzny, 2006).

No obstante el criterio más importante para clasificar las fitasas es por su origen (Kerovuo, 2000). Según éste, las fitasas pueden proceder de plantas, de microorganismos, o ser producidas a nivel intestinal por los animales. La mayoría de los componentes alimenticios de origen vegetal tienen actividad fitásica intrínseca variable. La actividad fitasa se mide en unidades fitasa, que se definen como la cantidad de fitasa que libera 1 μmol de fosfato inorgánico a partir de una disolución 1 mM de fitato de sodio por minuto a un pH de 5.5 y T^a de 37 °C. Así, la actividad fitásica en ingredientes comunes, expresada en U/kg, es alta para el trigo (1200), centeno (2700) y triticale (1100), mediana para la cebada (580) y más baja para el arroz (120), maíz (12), sorgo (24), soja (31) y avena (42) (Eeckhout, 1994). Por esta razón, es importante verificar si es necesario incorporar fitasas microbianas, o si el mismo resultado pudiera ser logrado mezclando ingredientes vegetales que tengan un alto contenido de fitasas. En este sentido, Pointillart, (1991) utilizando cerdos alimentados con dietas maíz-soja, con y sin incorporación de una fuente rica en fitasas, como el salvado de centeno, sin adición de fósforo inorgánico, observó deficiencias de fósforo sólo en los animales alimentados con la dieta sin salvado de centeno. Asimismo, el fósforo absorbido fue mayor en la dieta con fitasas (centeno) en comparación a la dieta control (55 vs 36%), al igual que la retención (50 vs 36%) del elemento.

En los granos de cereales y oleaginosas la actividad fitásica, expresada como porcentaje de la actividad total, se encuentra principalmente en la aleurona (39.5%) y en el endospermo (34.1%), la actividad restante se ubica en el escutelo (15.3%), testa (4.8%), germen (2.9%) y capas epidérmicas (1.9%).

Entre las fitasas procedentes de microorganismos se encuentran aquellas procedentes de hongos (especies de *Aspergillus sp*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), y bacterias (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*). Las fitasas obtenidas de hongos del género *Aspergillus sp* siguen un cierto orden para la hidrólisis de la molécula de fitato, es decir, después de ser liberado el grupo fosfato de la posición 3, continúa en el siguiente orden, 4, 5, 6 y 2 (Venekamp *et al.*, 1995). Las enzimas presentan actividad óptima a dos valores de pH diferentes, 2,5 y 5,5, siendo 40% menos efectiva en el primer caso. Este hecho tiene gran importancia debido a que la mayor absorción de fósforo ocurre en las proximidades del intestino delgado, donde el pH de 5.5 es óptimo para que la fitasa actúe hidrolizando los fosfatos, siendo primero necesario que la enzima se active en el medio ácido del estómago (pH 2,5) (Power y Khon, 1993). La fitasa producida por el *Aspergillus ficuumm*, es una glicoproteína purificada, con una actividad enzimática que varía con la temperatura y cambios de pH. La temperatura óptima de la enzima se encuentra entre 60 a 70°C. Así, temperaturas de 68°C, durante 10 minutos, provocan pérdidas del 60% de actividad del enzima (Nasi, 1990). Las enzimas obtenidas del *Aspergillus niger* son termoestables, su actividad es de un mínimo de 5000 FTU/g y presentan un pH óptimo de actividad a los valores 2 y 5.5 (Nasi, 1990).

Las variaciones que se producen en el tracto digestivo afectan a la eficacia de las enzimas. Se han realizado estudios *in vivo* sobre pollos y cerdos para determinar la eficacia relativa de la fitasa de origen vegetal y microbiana encontrándose que las fitasas de los cereales son 40% menos efectivas que la fitasa microbiana (Frapin y Nys, 1995). Este potencial más elevado de la fitasa microbiana para liberar fósforo disponible para pollo de engorde también fue confirmado por Oloofs *et al.* (1998). Recientes estudios han demostrado que, al agregar la enzima fitasa a la dieta de aves y cerdos se puede aumentar la cantidad de fósforo disponible al animal, lo cual debe de permitir a los productores poder reducir de 0.1 a 0.12%

la cantidad de fósforo inorgánico. De esta manera se reduce la cantidad de fósforo en el estiércol y por consiguiente la contaminación ambiental (Simons *et al.*, 1992).

La actividad fitásica en animales fue demostrada por primera vez en ratas a nivel intestinal (Bitar y Reinhold, 1972). Posteriormente, se comprobó que la actividad fitásica está presente en la mucosa del duodeno de cerdos, conejos, becerros y pollos bajo la forma de meso-inositol-hexafosfato fosfohidrolasa. La hidrólisis del fitato puede suceder en el tracto gastrointestinal en algún tramo anterior a donde sucede la absorción de nutrientes, por lo que podría modificarla. Distintos estudios han demostrado que el 60% del fitato procedente del salvado de trigo crudo es hidrolizado durante su paso por el estómago e intestino delgado; esto no sucede en el salvado de trigo sometido a un tratamiento térmico que inactiva la fitasa endógena (Sandberg *et al.*, 1996). Estos estudios sugieren que la presencia de fitasa endógena es esencial para producir la hidrólisis del ácido fítico, ya que la actividad de la fitasa presente a nivel digestivo parece ser insignificante.

La actividad de la fitasa está afectada por factores genéticos y nutricionales. Así, existen diferencias en la habilidad de utilizar fósforo fítico entre especies y entre razas. Se ha demostrado mayor actividad de la fitasa en la rata que en el conejo y utilidades de fósforo fítico de 7, 37 y 44% en aves, cerdos y ratas respectivamente (Kerovuo, 2000). En aves, las gallinas ponedoras tuvieron una mayor retención de fósforo fítico que los pollos de engorde con dietas deficientes del elemento (Edwards *et al.*, 1983), indicando que existe efecto de la edad sobre la actividad de la enzima. De forma similar, los pollos jóvenes tienen una capacidad muy limitada para hidrolizar fitatos, que aumenta con el incremento de la edad. Lo anterior indica que los fitatos son hidrolizados en el tracto intestinal por las fitasas de las células de la mucosa pero también por las enzimas presentes en la microflora (Wise, 1983) y que las diferencias entre especies o edades pueden resultar de la actividad fitásica bacteriana. Sin embargo, existen controversias con relación a si la fitasa es una enzima independiente o si su actividad se atribuye a una fosfatasa alcalina, ya que, al igual que las fitasas, la fosfatasa alcalina hidroliza también ácido fítico. Además, la actividad de ambas enzimas tienen similar distribución subcelular, son dependientes de Mg o Zn, tienen el mismo pH óptimo y son modificadas por la presencia de la vitamina D₃ o por bajos niveles de fósforo en la dieta

(Kerovuo, 2000). Las fitasas son extremadamente débiles, expresando su máxima actividad pH que varían entre 5.0 y 7.5, por lo que, los bajos valores de pH presentes en el estómago (pH 2-3) limitan su actividad. No obstante, se ha demostrado alguna actividad de la enzima un pH menor de 3.0, por lo que hay una ruptura considerable de la molécula de fitato de la dieta, en el buche de los pollos y en el estómago de los no rumiantes, antes de que la secreción gástrica reduzca el pH de la ingesta a un nivel demasiado bajo como para interrumpir la actividad enzimática (Simons *et al.*, 1992). Además, la enzima tiende a ser fuertemente inhibida por exceso de sustrato (fitato) y producto (fósforo inorgánico), y por altas temperaturas (Power y Khon, 1993).

Más recientemente, Pointillart (1994) purificó una proteína de la mucosa intestinal de ratas que mostró actividad de fitasa y fosfatasa, pero con propiedades diferentes, sugiriendo la presencia de dos sitios activos diferentes en una misma enzima. Sin embargo, la actividad de ambas enzimas difieren en su magnitud, es decir, la fosfatasa alcalina tiene mayor actividad que la fitasa, 50-200 veces en cerdos (Pointillart, 1994), 50-100 veces en aves y cerca de 1000 veces en humanos, estas evidencias soportan la hipótesis de que la fitasa y la fosfatasa alcalina son enzimas independientes (Bitar y Reinhold, 1972). La rata posee una fuerte actividad fitásica, en el orden de 30 mgU/mg de proteína de la mucosa del intestino, mientras que, en las aves la actividad de la enzima es mínima.

La aplicación de fitasa puede encontrar una interesante aplicación durante el procesamiento de los alimentos para obtener productos con un mejor valor nutricional, beneficiosos para la salud y que mantengan intactas sus propiedades sensoriales (alimentos funcionales). Mediante la adición de fitasa a las harinas de cereales crudas durante su procesamiento industrial, el fitato es degradado hasta inositoles con un bajo número de fosfatos. Por lo tanto, se hace posible la producción de estos alimentos con un reducido contenido en fitatos, favoreciendo por tanto la absorción de minerales a nivel intestinal, así como con un mayor contenido en inositoles de bajo número de fosfatos que poseen efectos beneficiosos para la salud (Greiner *et al.*, 2000).

III.12. NORMATIVA SOBRE LA UTILIZACIÓN DE FITASA Y SU EMPLEO EN NUTRICIÓN HUMANA

El uso de fitasa está actualmente autorizado para alimentación animal. El uso del preparado enzimático de 6-fitasa producido por *Aspergillus oryzae* (DSM 14223) fue autorizado para los pollos de engorde, las gallinas ponedoras, los pavos de engorde, los lechones, los cerdos de engorde y las cerdas por el Reglamento (CE) nº 255/2005 de la Comisión Europea. Se han presentado nuevos datos en apoyo a una solicitud para ampliar la autorización del uso de este preparado enzimático a los salmónidos. El empleo de fitasas en nutrición animal tiene como objetivo reducir la excreción de fósforo. No obstante, y aunque actualmente no está autorizado el uso de fitasas exógenas en nutrición humana, se han realizado numerosos estudios sobre la adición de fitasa en alimentos empleados en nutrición humana a nivel experimental. Anno *et al.*, (1985) eliminaron los fitatos presentes en leche de soja mediante la adición de fitasa de trigo. Simell *et al.*, (1989) obtuvieron un preparado de proteína de soja libre de fitatos tras la aplicación de la 3-fitasa A (EC 3.1.3.8) produciéndose un incremento en la solubilidad a bajo valor de pH (pH 3) comparado con el mismo preparado con presencia de fitatos. Sandberg y Svanberg, (1991) estudiaron los efectos de la adición de fitasa procedente del trigo sobre cereales empleados en nutrición humana. La adición de fitasa procedente de *Aspergillus niger* en harina de trigo incrementó la absorción de hierro en humanos (Sandberg *et al.*, 1996). Davidsson *et al.*, (1997) aplicaron 3-fitasa sobre cereales infantiles a fin de reducir su contenido en ácido fítico. La misma fitasa, fue empleada por Hurrell *et al.*, (2003) para desfitinizar alimentos complementarios a base de cereales realizando para ello estudios *in vivo* en humanos. Davidsson *et al.*, (2004) estudiaron la aplicación de fitasa de *Aspergillus niger* sobre fórmulas infantiles elaboradas con soja. La aplicación de esta misma enzima, fue investigada por Urbano *et al.*, (2003) sobre harina de guisantes. Zyla *et al.*, (2005) realizaron estudios de adición de 3-fitasa durante la elaboración del pan a partir de harina de trigo.

Se puede afirmar por tanto, que el procesado industrial de alimentos destinados a alimentación humana podría ser un posible campo de aplicación de las fitasas exógenas (Haefner *et al.*, 2005; Greiner y Konietzny, 2006). Aunque algunos métodos de procesado

industrial de alimentos empleados actualmente consiguen reducir de un modo considerable el contenido en ácido fítico (Rehms y Barz, 1995), el empleo de una fitasa exógena podría resultar más efectivo, ya que según Hurrell *et al.*, (2003) la aplicación de esta enzima durante la elaboración de alimentos complementarios a base de arroz, trigo, maíz, avena, sorgo y una mezcla de harinas de soja y trigo consiguió degradar completamente el ácido fítico presente. En este sentido, estudios más recientes (Brinch-Pedersen *et al.*, 2006) apuntan igualmente a los posibles beneficios de la aplicación de una fitasa exógena sobre alimentos de uso humano a fin de incrementar su disponibilidad mineral. La biotecnología aplicada a la obtención de fitasa que se emplea actualmente en producción animal podría ser utilizada el día de mañana en el procesado de alimentos de consumo humano, y obtener de este modo alimentos con una mejora en su biodisponibilidad mineral y presencia de isómeros de inositol fosfato con propiedades beneficiosas para la salud (Sandberg y Andlid, 2002). No obstante es necesario el desarrollo de más estudios antes de aceptar la fitasa como aditivo en alimentos destinados a nutrición humana.

IV.MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. MUESTRAS

IV.1.1. Descripción

En la primera parte de este estudio se han empleado seis papillas infantiles siendo su denominación comercial: “Ocho cereales miel”, “Cereales sin gluten”, “Crema de arroz”, “Trigo”, “Multicereales” y “Guisantes y zanahorias ecológicos”, así como las distintas harinas de cereales y otros vegetales utilizadas en la elaboración de las mismas: trigo (*Triticum aestivum*), avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*), mijo (*Panicum miliceum*), arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*), guisantes (*Pisum sativum*) y zanahorias (*Daucus carota*). Las harinas utilizadas para la elaboración de cada una de las papillas infantiles, se muestran en la Tabla 4. Todas las muestras fueron facilitadas por la empresa Hero España S.A. (Alcantarilla, Murcia).

Las papillas “Trigo” y “Guisantes y zanahorias ecológicos” fueron eliminadas del estudio en las últimas etapas, debido a su cese en la producción industrial.

Tabla 4. Harinas empleadas en la elaboración de cada una de las papillas infantiles

HARINAS	PAPILLAS INFANTILES
Mijo, centeno, cebada, trigo, arroz, sorgo, maíz, avena	8 cereales miel
Mijo, centeno, cebada, trigo, arroz, sorgo, maíz, avena	Multicereales
Arroz, harina de maíz, tapioca	Cereales sin gluten
Arroz	Crema de arroz
Trigo	Trigo
Zanahorias ecológicas, guisantes ecológicos, arroz ecológico, maíz ecológico	Guisantes y zanahorias ecológica

IV.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en cinco etapas consecutivas que quedan resumidas en la Figura 10, con el fin de profundizar en el contenido en fitatos de las papillas y harinas empleadas en alimentación infantil, y proponer y optimizar un método enzimático (tratamiento con fitasa exógena) que elimine por completo dicho antinutriente. Asimismo, se pretendió verificar si la desfitinización de las papillas infantiles supone una mejora en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad del hierro, calcio y cinc aportados por dichos alimentos, ya que si es así, la utilización de esta enzima, contribuiría a la mejora del estado nutricional de estos micronutrientes en una etapa tan crucial del desarrollo.

La primera etapa (Estudio 1) consistió en la identificación y posterior cuantificación de cada uno de los inositoles fosfato, (IP₆ y derivados, presentes en las papillas infantiles y en las materias primas, harinas de cereales y vegetales, que las componen), mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Lehrfeld, 1989; 1994). El método fue optimizado y validado para su empleo en nuestro laboratorio mediante el estudio de los parámetros de exactitud, precisión, rango y linealidad. Se analizó el contenido mineral de las muestras mediante espectrofotometría de absorción atómica y posteriormente se calcularon los distintos cocientes molares fitato:hierro, fitato:calcio y fitato:zinc, con el fin de estimar la biodisponibilidad de dichos minerales en cada una de las papillas infantiles.

En la segunda etapa (Estudio 2) se procedió a la preparación, en nuestro laboratorio, de cada una de las papillas comerciales siguiendo la formulación del fabricante. Sobre las distintas mezclas obtenidas se realizó el tostado a 120°C en una estufa de aire forzado durante 30 minutos, y posterior tratamiento con alfa-amilasa, siguiendo las condiciones de pH, tiempo y temperatura aplicadas en la industria. Se procedió a la identificación y cuantificación de los inositoles fosfato presentes en las muestras tras el tostado y tras el tratamiento con alfa-amilasa, mediante HPLC con el fin de comprobar las modificaciones en dichos compuestos durante el procesado. Se aplicó a las papillas un tratamiento enzimático con fitasa exógena procedente de *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.1.3.26). Esta enzima fue aplicada tras la optimización del tratamiento enzimático, mediante diferentes ensayos que

combinaban distintas condiciones de pH, tiempo y temperatura sobre fitasas procedentes de dos especies de *Aspergillus* (*niger* y *oryzae*), con el fin de eliminar la totalidad de los inositolos fosfato presentes bajo las condiciones que se aplican en el procesado industrial de las papillas infantiles, y de esta manera contribuir al incremento de la biodisponibilidad mineral.

En la tercera etapa (Estudio 3) se procedió al estudio *in vitro* de la bioaccesibilidad mineral de las muestras (papillas comerciales y papillas desfitinizadas) mezcladas con agua o con fórmula infantil de continuación. Se siguió el método empleado por Miller *et al.*, (1981) con modificaciones introducidas por Bosscher *et al.*, (2001 b) y por Jovaní *et al.*, (2001 a) que simula la digestión gastrointestinal de las muestras previamente a la obtención de las fracciones tanto soluble como dializable del hierro calcio y zinc. De esta manera se pretendía comprobar en paralelo si al reconstituir las papillas con fórmula infantil se modifica la bioaccesibilidad de los minerales.

La cuarta etapa (Estudio 4) consistió en la investigación de la biodisponibilidad mineral de las papillas infantiles reconstituidas con agua o con fórmula infantil de continuación) mediante el empleo de la línea celular Caco-2, estudiando la captación, retención y transporte de hierro, calcio y cinc a través de dicha monocapa celular con el fin de comprobar posibles diferencias en dichos parámetros, debidos a la eliminación de los fitatos y a la matriz del alimento tras su reconstitución con agua o fórmula infantil.

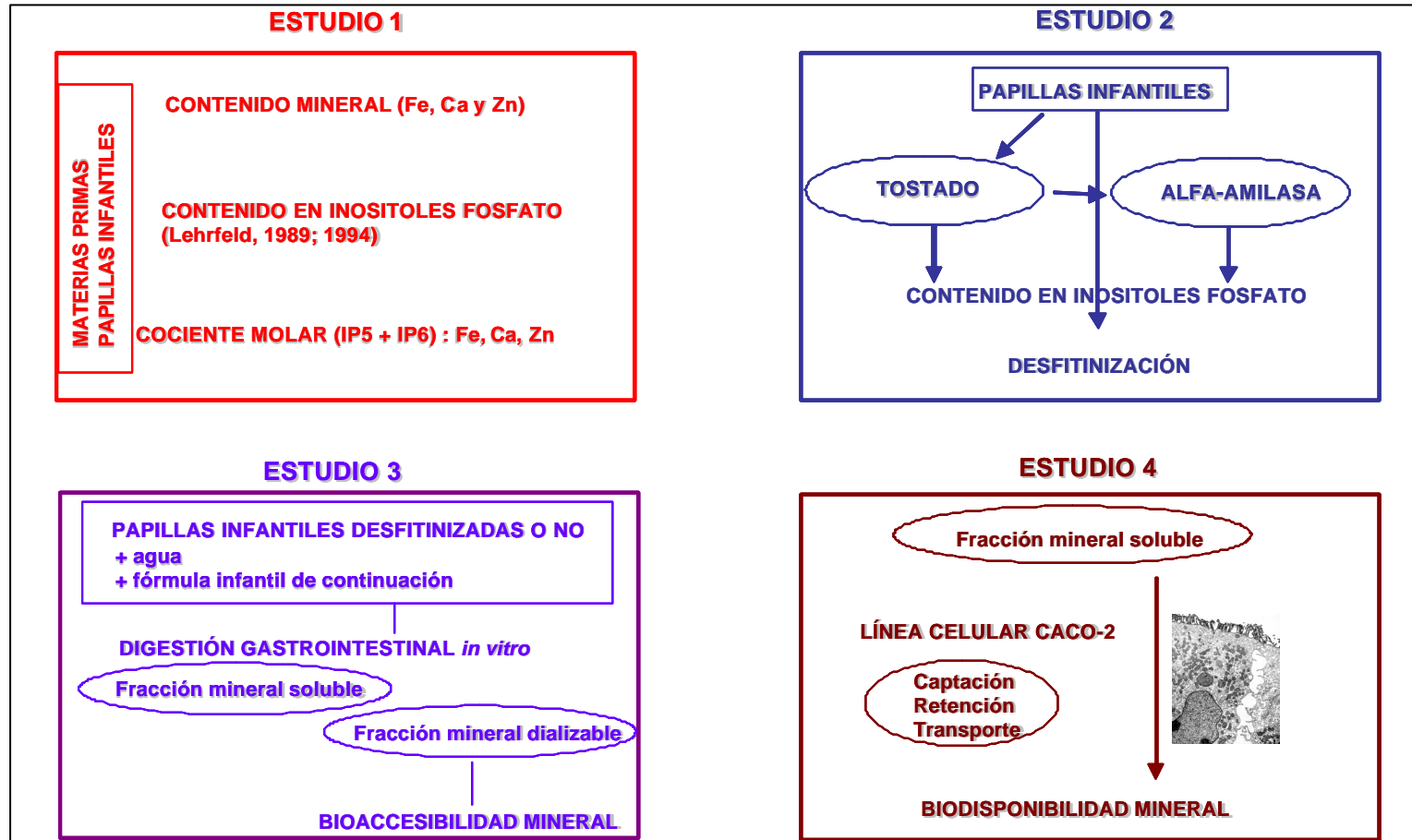


Figura 10. Representación gráfica del diseño experimental del presente estudio de investigación

IV.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANALÍTICA

IV.3.1. ESTUDIO 1

IV.3.1.1. Determinación de ácido fítico e inosítoles fosfato

IV.3.1.1.a. Validación del método analítico

En primer lugar se llevó a cabo la validación del método analítico. Según la Norma ISO/IEC 17025:1999, la validación de un método es la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto. La validación de un método se realiza para asegurar que una metodología analítica es segura, específica, reproducible y robusta en el rango específico en que se analizará el analito.

La validación de métodos analíticos implica determinar los siguientes parámetros:

1. Exactitud
2. Precisión
3. Rango
4. Linealidad: Límite de detección y Límite de cuantificación

1- La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor de referencia aceptado. Se emplea un material de referencia certificado y se mide como la diferencia entre la media de las determinaciones y el valor verdadero con un intervalo de confianza. El resultado se expresa como:

$$\text{Exactitud} = ((\text{Valor de referencia} - \text{Valor obtenido}) / \text{Valor de referencia}) \times 100$$

Con el valor obtenido calculamos el porcentaje de recuperación que debe estar entre 90–110%.

2. La precisión es el grado de concordancia entre el resultado de mediciones obtenidas independientemente bajo condiciones establecidas. Se realizarán medidas múltiples de una muestra por el mismo analista y bajo las mismas condiciones analíticas.

Se acepta como válido un coeficiente de variación igual o inferior al 20%. En este concepto, se incluyen la *especificidad*, el *límite de detección* y el *límite de cuantificación*.

-*Especificidad*, es la posibilidad de ensayar el analito de forma inequívoca en presencia de componentes que se espera que estén presentes. Esto debería incluir impurezas, degradantes, matrices, etc. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual se puede compensar con el soporte de otro(s) procedimiento(s) analíticos.

-*Límite de detección*. Es la mínima concentración de analito en la muestra que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar.

-*Límite de cuantificación*. El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptable bajo determinadas condiciones experimentales. Generalmente equivale a 10 veces la desviación estándar del blanco + media del blanco.

3. El rango es el intervalo entre los niveles de analito superior e inferior en el que se ha demostrado que se pueden determinar con precisión, exactitud y linealidad. El rango se expresa en las mismas unidades que los resultados obtenidos por el método.

4. La linealidad de un método analítico es la relación entre la concentración de analito y la respuesta del método, obedeciendo a la ley de Beer. Está limitado por dos puntos, el *límite de cuantificación* y el *límite de linealidad*. Es dependiente de los compuestos analizados y del detector que se utiliza. Se emplea como medida de los resultados el coeficiente de correlación cuando este sea mayor de 0.995 (Figura 11).

IV.3.1.1.b. Patrones

Se prepararon cinco patrones de ácido fítico (Phytic acid, sal dodecasódica, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) para determinar la linealidad del método, éstos se reconstituyeron en agua desionizada para obtener las siguientes concentraciones: 0.1, 0.5, 1, 2 y 3 mg/mL.

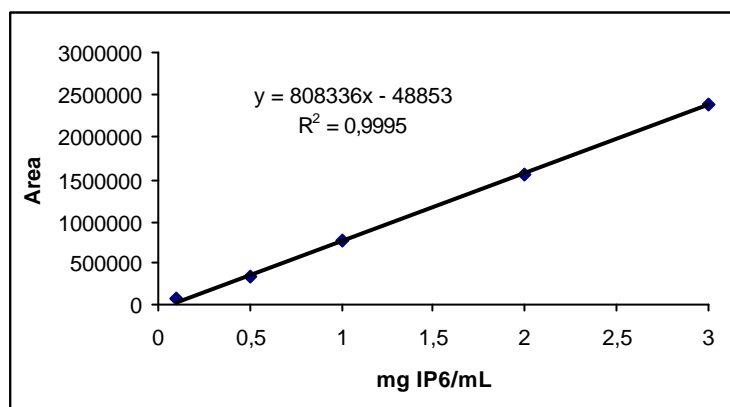


Figura 11. Recta de calibrado para la determinación del ácido fítico

IV.3.1.1.c. Inositoles fosfato

A fin de identificar en el cromatograma los inositoles (hexa-, penta-, tetra- y trifosfato), se preparó un hidrolizado a partir de 1,5 mg de fitato de sodio (patrón certificado de sal dodecasódica, Sigma-Aldrich) que fueron disueltos en 100 ml de HCl 0,5 M y mantenidos a reflujo durante 7 horas a 70 °C en circuito cerrado (Sandberg *et al.*, 1996).

El hidrolizado obtenido, fue llevado a sequedad mediante rotavapor a 40° C. El contenido resultante de la evaporación fue redisoluto en 10 ml de agua desionizada. 10 µL de esta disolución fueron inyectados en el HPLC. El cromatograma resultante mostró, tal como se presenta en la Figura 12, cuatro picos a distintos tiempos de retención correspondiendo a inositol trifosfato (4,56 minutos), inositol tetrafosfato (5,66 minutos), inositol pentafosfato (7,01 minutos) e inositol hexafosfato (9,29 minutos).

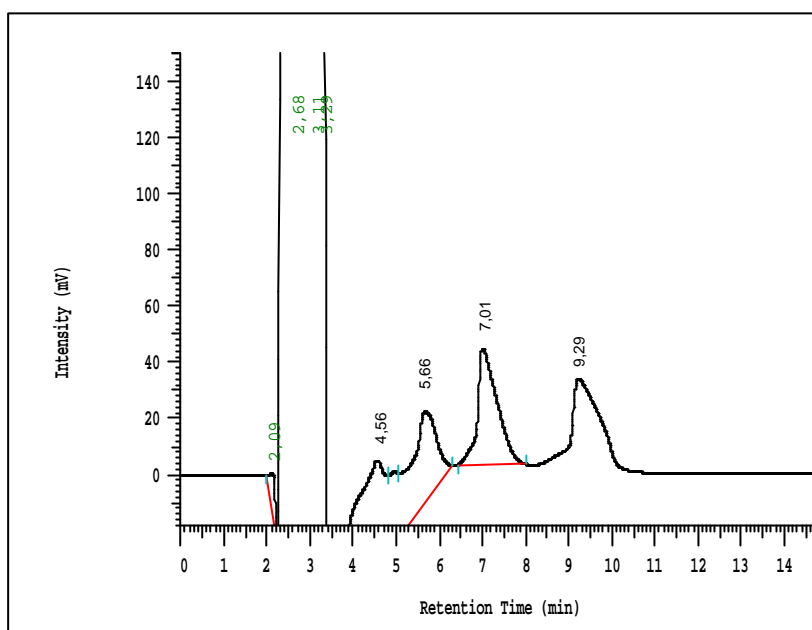


Figura 12. Perfil cromatográfico de un hidrolizado de fitato de sodio

Tras observar los tiempos de retención obtenidos para cada inositol fosfato, el cromatograma para las muestras se estableció en 15 minutos. Los tiempos de retención y el área de los picos obtenidos en el cromatograma, nos permitieron caracterizar y cuantificar los inositoles fosfato presentes en la muestra.

IV.3.1.1.d. *Harinas de cereales y papillas infantiles*

La identificación y cuantificación de los inositoles fosfato en las muestras empleadas en este estudio se realizó siguiendo el método descrito por Lehrfeld (1989) y modificado posteriormente por este mismo autor (1994).

Reactivos utilizados

- Metanol para cromatografía en fase líquida, Lichrosolv (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Acido fórmico 98-100% (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Hidróxido de tetrabutilamonio, lot 121K3480, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Acido clorhídrico 30% Suprapur (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Acido sulfúrico 95-97% (Merck, Darmstadt, Alemania)

-Acido fítico, sal dodecasódica (10-15% agua), nº cat 27,432-1 (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, USA)

-Agua destilada-desionizada

Material y equipos utilizados

-Balanza de precisión (Ohaus Explorer, Suiza)

-Columnas de resina de intercambio aniónico (SAX) 500 mg Supelco, Bellefonte, USA)

-Filtros de nylon, Whatman, Ø 25 mm, (0,45 µm) (Clifton, NJ, USA)

-Solvac Filter Holder Polypropilene, Gelman Laboratory (Michigan)

-Cromatógrafo (HPLC) Merck Hitachi LaChrom RI Detector, dotado de:

-Horno L-7350 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

-Detector de índice de refracción L-7490 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

-Bomba L-7100 (Hitachi LTD. Tokyo, Japan)

-Interfase D-7000 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

-Colector de vacío (50-75 mmHg)

-pH metro micro pH 2000 (Crison, Barcelona, España)

-Rotavapor RE 111 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza)

-Termostato de inmersión (SBS mod BT-25, Mindelheim, Alemania)

-Bomba de vacío (Leybold-Heraeus Inc. PA, USA)

-Centrífuga Eppendorf (5804R, AG Hamburg, Alemania)

-Jeringa Hamilton 710 (Bonaduz, Suiza)

-Columna Lichrocart 250-4, RP-18 (5 µm) (Merck, Darmstadt, Alemania)

Procedimiento

0,5 g de harina o de papilla infantil fueron sometidas a agitación con 10 mL HCl 0,5 N durante dos horas. A continuación, fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 20 minutos, siendo el sobrenadante (aproximadamente 5 mL) recogido y almacenado en congelación a -18°C durante una noche. A continuación, y tras descongelarlas a temperatura ambiente, la

disolución fue de nuevo centrifugada a 10000 rpm durante 5 minutos, de nuevo decantada, y filtrada a través de filtros de polipropileno con un diámetro de poro de 0,45 micrómetros a fin de retener impurezas. A continuación, el volumen obtenido tras la filtración, fue redisolto hasta un volumen final de 25 mL con agua bidestilada desionizada. La disolución obtenida se hizo pasar en condiciones de baja presión (2,5 pulgadas Hg) por columnas de intercambio aniónico SAX de 3 mL de capacidad, previamente lavadas con 10 mL de HCl 0,05 N cada una.

Los inositoles fosfato de la muestra fueron extraídos de la resina de los cartuchos SAX utilizando 2 mL de HCl 2 N, y recogidos posteriormente en matraces de rotavapor, siendo desecado el extracto bajo condiciones de vacío a 40°C de manera completa. A continuación fueron redisolto en 1 ml de agua desionizada y 15 microlitros de hidróxido de tetrabutilamonio. El volumen obtenido, fue centrifugado a 10000 rpm durante 5 minutos, y 20 µl del sobrenadante se inyectaron en el HPLC.

En la Figura 13, se muestra de manera esquemática el proceso llevado a cabo para la extracción del ácido fítico e inositoles fosfato en harinas y papillas infantiles para su posterior identificación y cuantificación mediante HPLC.

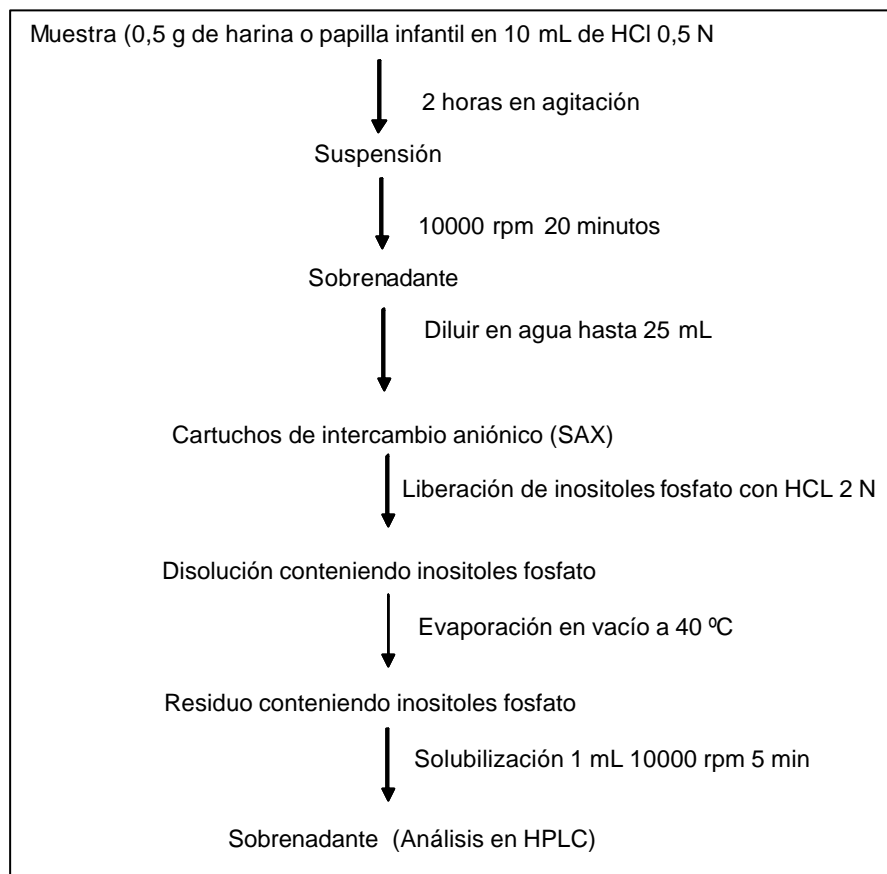


Figura 13. Procedimiento de extracción de los inositol fosfato (Lehrfeld, 1989; 1994)

Como fase móvil, se empleó metanol, ácido fórmico 0.035 M y OH-tetrabutilamonio 40% (Fluka), en la siguiente proporción 56:44:1, ajustándose el pH a 4.3 mediante el empleo de ácido sulfúrico al 72%. La dilución fue filtrada a través de filtros de membrana de nylon de 0.45 micrómetros de diámetro de poro. Las condiciones de trabajo del HPLC fueron: temperatura del horno 35°C, flujo de 0,8 mL/min, presión de 180 mbar, y el volumen de inyección fue de 20 µL.

IV.3.1.2. Determinación de la composición mineral en Ca, Fe y Zn de las papillas infantiles, y de sus materias primas

La determinación de minerales (Ca, Fe y Zn) se realizó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), siguiendo el método 985.35 de la A.O.A.C. (1999). Para evaluar la exactitud de dicho método, se empleó como muestra de referencia (Certified Reference

materials (CRM)) Wholemeal flour BCR 189, con contenidos certificados de los tres elementos evaluados en este estudio:

Se pesó 0.5 g del patrón certificado por triplicado. Los contenidos de hierro, calcio y cinc, se determinaron por espectrometría de absorción atómica previa destrucción de la materia orgánica. Asimismo se determinó la exactitud de la medida mediante el método de recuperación (Fernández Serret *et al.*, 2002), obteniéndose para cada mineral los resultados que se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Contenidos de Fe, Ca y Zn en el patrón de referencia BCR-189

Muestra certificada	Elemento	Valor certificado (mg/kg)	Valor hallado (mg/kg)	% recuperación
BCR-189	Hierro	68.3	66.9	98
	Calcio	520	517	99,4
	Cinc	56.5	54.6	96,6

Reactivos utilizados

- Acido clorhídrico fumante 37% p/v (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Acido nítrico 65% PA-ISO (Panreac Química S.A., Barcelona, España)
- Agua destilada-desionizada
- Cloruro de lantano (pureza 99,99%) (Fluka, Buchs, Suiza)
- Soluciones stock-patrón de 1000 mg/L (Fluka, Buchs, Suiza)
 - Calcio (nº cat 21058)
 - Hierro (nº cat 44903)
 - Cinc (nº cat 96457)

Material y equipo utilizados

- Balanza de precisión (Ohaus Explorer, Suiza)

- Crisoles de porcelana C-4 KPM (Berlín, Alemania)
- Espectrofotómetro de absorción atómica modelo 3100 (Perkin-Elmer, Norwalk, U.S.A)
- Estufa de desecación de aire forzado, modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- Horno mufla modelo L3/S (Naberthem. Bremen, Alemania)
- Matraces aforados de 50 y 100 mL de capacidad (Pobel. Madrid, España)
- Placa calefactora (P-Selecta. Barcelona, España)

Limpieza del material de laboratorio

El material de vidrio y porcelana utilizado en la determinación de minerales fue sumergido durante 12 horas en ácido nítrico 10% para arrastrar cualquier impureza que pudiese quedar adherida al material, y posteriormente enjuagado abundantemente con agua destilada-desionizada.

Procedimiento

Los minerales se determinaron a partir de las cenizas obtenidas tras la incineración de las papillas comerciales en horno mufla a 525°C durante 12 horas. Estas cenizas fueron disueltas añadiendo 2 mL de HNO₃ 65% y 5 mL de HCl 37% a los crisoles de porcelana, agitando suavemente con la aplicación de calor hasta su total evaporación. Posteriormente se añadió un volumen igual de cada ácido, evaporándolo a continuación hasta la mitad del mismo con el fin de disolver las cenizas en su totalidad. La solución obtenida fue llevada a un matraz aforado de 50 mL, al cual se le adicionaron los volúmenes de lavado del crisol, enrasando finalmente con agua desionizada. Para evitar interferencias con otros elementos (fosfatos), en la determinación de calcio se adicionó cloruro de lantano (LaCl₃) al 0,1% (p/v) tanto a las muestras como a los patrones. Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante del espectrofotómetro de absorción atómica empleado, especificándose las condiciones instrumentales en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones instrumentales establecidas para la determinación de los minerales estudiados (Fe, Ca y Zn) por AAS

Elemento mineral	Longitud de onda (nm)	Apertura de rendija (nm)	Sensibilidad de chequeo (mg/L)
Fe	248,3	0,2	5,0
Ca	422,7	0,7	4,0
Zn	213,9	0,2	1,0

Las concentraciones de los patrones utilizados para elaborar la recta de calibrado de cada uno de los elementos minerales estudiados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones utilizadas para la elaboración de la recta patrón de Fe, Ca y Zn, ecuaciones de las rectas de calibrado y coeficientes de linealidad (R^2) de cada una de ellas

Concentración (ppm)	Elemento		
	Fe	Ca	Zn
0.1			*
0.2			*
0.3			*
0.5			*
1	*	*	*
2	*	*	
3	*	*	
4	*	*	
5	*	*	
Ecuación de la recta ¹	$y=2.86 \cdot 10^{-3}+4.76 \cdot 10^{-2}x$	$y=2.67 \cdot 10^{-3}+5.24 \cdot 10^{-2}x$	$y=3.58 \cdot 10^{-3}+0.18 \cdot 10^{-2}x$
R^2	$R^2=0.998$	$R^2=0.999$	$R^2=0.999$

* Concentraciones utilizadas para la recta patrón de cada elemento. Definición de las variables dependiente e independiente de la ecuación de la recta; **y**: concentración del elemento, **x** absorbancia

IV.3.1.2..a. Razones molares fitato:mineral (Fe, Ca, Zn)

El cálculo del cociente molar que existe entre el fitato y el mineral presentes en un alimento se emplea como índice de la biodisponibilidad de este (Morris y Ellis, 1989). Consideramos como fitato a la suma de los contenidos en inositol pentafosfato e inositol hexafosfato (IP_5+IP_6) (Dintzis *et al.*, 1992; Valencia *et al.*, 1999; Welch *et al.*, 1999). La razón o cociente molar se calcula relacionando los moles de fitato presentes en el alimento con el número de moles de mineral.

IV.3.2. ESTUDIO 2

IV.3.2.1. PROCESADO DE LAS PAPILLAS INFANTILES: TOSTADO Y TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

Tal como se muestra en la Figura 14, el tostado y el tratamiento alfa-amilasa de las harinas de cereales son una etapa común en la elaboración industrial de la mayoría de las papillas infantiles.

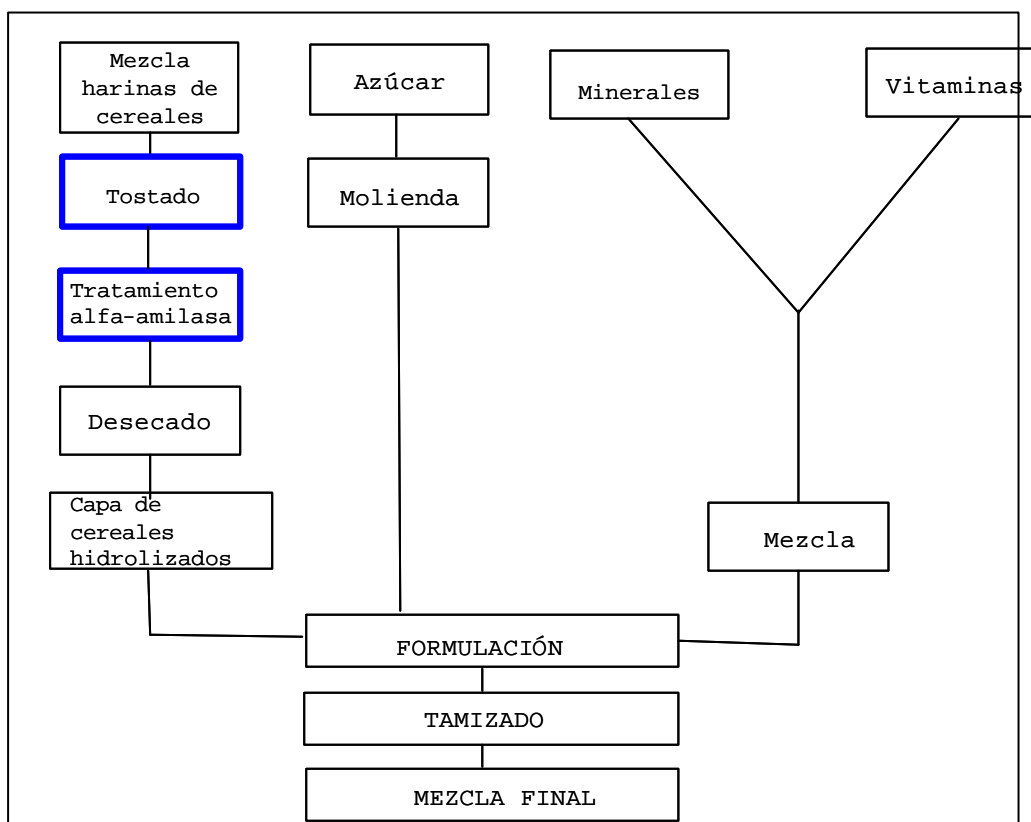


Figura 14. Diagrama de flujo de elaboración de las papillas infantiles

En este estudio, hemos reproducido en el laboratorio ambos tratamientos a fin de poder caracterizar el efecto que cada etapa del proceso ejerce de un modo individual sobre el contenido en inositolos fosfato, tanto sobre las harinas de cereales individualmente como en sus mezclas.

Reactivos utilizados

- Alfa-amilasa de saliva humana EC. 3.2.1.1, cat. A1031 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Agua desionizada

Material y equipos utilizados

- Estufa de aire forzado modelo 201 (P>Selecta Barcelona, España)
- pH metro micro pH 2000 (Crison, Barcelona, España)
- Homogenizador Omni-mixer, mod 17106. (Omni, Waterbury, CT.USA)

Procedimiento

IV.3.2.1.a. *Tostado*

En primer lugar, cada harina de cereal fue tostada individualmente en una estufa de aire forzado a 120°C durante 30 minutos. Posteriormente se analizó su contenido en inositoles fosfato por HPLC (Lehrfeld, 1994) tal como se describe en el apartado IV.3.1.1.d.

IV.3.2.1.b. *Tratamiento enzimático con alfa-amilasa*

Para la aplicación del tratamiento enzimático con alfa-amilasa, 150 g de cada harina previamente tostada fueron disueltos en 310 g de agua desionizada (siguiendo las recomendaciones del fabricante para esta etapa). A continuación se añadió alfa-amilasa (700 mg/kg de harina) y la mezcla se mantuvo en incubación durante 20 minutos a 55°C y pH 5,5 y en agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción enzimática se detuvo sumergiendo la muestra en agua a 98°C durante 10 minutos. A continuación, el homogenizado obtenido se extendió sobre una superficie no adherente en capa fina y se mantuvo en estufa a 90°C hasta la evaporación completa de la humedad de la muestra. Una vez desecada, se introdujo en un homogenizador y se trituró hasta la obtención de harina con un tamaño de partícula similar al de las papillas comerciales. Finalmente se analizó el

contenido en inositoles fosfato de las muestras mediante HPLC (Lehrfeld, 1994) tal como se describe en el apartado IV.3.1.1.d.

IV.3.2.2. Desfitinización de las papillas infantiles

IV.3.2.2.a. Optimización del tratamiento enzimático

A fin de optimizar el tratamiento enzimático de dos fitasas de distintos orígenes (*Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*), se estudió la influencia del pH sobre la degradación del IP₆ de las papillas infantiles.

Reactivos utilizados

-Sal dodecasódica del ácido fitico, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA

-Fitasa procedente de *Aspergillus niger*, Natuphos® 5000 G (EC 3.1.3.8) 5000 FTU/g, BASF AG, Ludwigshafen, Alemania

-Fitasa procedente de *Aspergillus oryzae*. Sternzym phytase 2.5 (EC 3.1.3.26) 2500 FTU/g, Stern-Enzym GmbH&Co, KG. Ahrensburg, Alemania

Procedimiento

Se preparó una disolución (1.5 mmol/L) de fitato de sodio para estudiar el efecto del tratamiento enzimático producido por cada tipo de fitasa sobre el patrón de IP₆. A continuación se añadió a la disolución la fitasa microbiana procedente de *Aspergillus niger* (5000 FTU/g) o de *Aspergillus oryzae* (2500 FTU/g). Se llevó a cabo la incubación de la disolución durante veinte minutos a la temperatura óptima (55 °C) para ambos enzimas (Kerovuoto, 2000; Simon e Igbasan, 2002). Se ensayaron distintos valores de pH (10.6, 9.8, 9.5, 8.9, 8.1, 7.5, 5.5, 5) para la fitasa de *A. niger* y 10.9, 9.9, 8.9, 7.2, 6.6, 6 y 5.5 para la fitasa de *A. oryzae*, a fin de determinar el valor de pH en el que se produce la degradación completa del ácido fitico tras 20 minutos de incubación.

III.3.2.2.b. *Desfitinización de las papillas infantiles*

A fin de eliminar los inositoles fosfato presentes en las papillas infantiles, se sometió a la mezcla de la papilla preparada con agua destilada en la proporción recomendada por el fabricante (40 g de papilla en 460 mL de agua) a un tratamiento enzimático con fitasa procedente de *Aspergillus oryzae* (2500 FTU/g) a una dosis de 0.01 g/100 mL, ya que con esta concentración obtuvimos el 100% de degradación del ácido fítico bajo nuestras condiciones de trabajo (Tª 55°C, pH 5.5 y 20 minutos) en agitación constante. Transcurrido este tiempo, se inactivó el enzima sumergiendo la muestra en agua a 98°C durante 10 minutos. La papilla fue entonces desecada a 120°C a fin de eliminar su contenido en humedad, y una vez desecada la pasta fue triturada a fin de obtener partículas de tamaño muy pequeño. Finalmente se analizó su contenido en inositoles fosfato mediante HPLC (Lehrfeld, 1989; 1994) tal y como se detalla en el apartado IV.3.1.1.d.

IV.3.3. ESTUDIO 3

IV.3.3.1. BIOACCESIBILIDAD MINERAL DE LAS PAPILLAS INFANTILES

IV.3.3.1.a. Muestras

Las muestras empleadas en esta etapa del estudio fueron las papillas comerciales y las papillas desfitinizadas reconstituidas siguiendo la proporción indicada por el fabricante con agua desionizada o con leche de continuación (Tabla 8). De esta manera se pretende realizar una primera aproximación a la disponibilidad del hierro, calcio y zinc de estos alimentos infantiles comprobando tanto el efecto del tratamiento enzimático como la adición de la leche de continuación, que es probablemente la que con más frecuencia se emplea para reconstituirlas.

Tabla 8. Muestras empleadas en el estudio de la disponibilidad mineral

Papillas comerciales	Papillas desfitinizadas
Ocho cereales miel + agua	Ocho cereales miel + agua
Crema de arroz + agua	Crema de arroz + agua
Multicereales + agua	Multicereales + agua
Cereales sin gluten + agua	Cereales sin gluten + agua
Trigo + agua	Trigo + agua
Ocho cereales miel + FC	Ocho cereales miel + FC
Crema de arroz + FC	Crema de arroz + FC
Multicereales + FC	Multicereales + FC
Cereales sin gluten + FC	Cereales sin gluten + FC
Trigo + FC	Trigo + FC

FC= fórmula de continuación

La fórmula infantil de continuación (Hero España S.A.) se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante (210 mL de agua desionizada y 33 g de fórmula infantil de continuación).

IV.3.3.1.b. Determinación de la bioaccesibilidad de hierro, calcio y zinc.

El método utilizado fue el descrito por Miller *et al.*, (1981), que se basa en la simulación de la digestión gástrica e intestinal de las muestras mediante tratamiento enzimático *in vitro*, con modificaciones introducidas por Bosscher *et al.*, (2001 b) y Jovaní *et al.*, (2001) en las que se reducen las concentraciones de enzimas digestivas utilizadas para simular las condiciones gastrointestinales presentes en las primeras etapas de la vida. Para determinar la bioaccesibilidad se emplean dos técnicas con una primera etapa en común consistente en el tratamiento enzimático de la muestra con enzimas gástricas e intestinales, para posteriormente, analizar la fracción soluble de cada mineral que quedaría en la muestra tras su centrifugación; o bien, la fracción dializable o proporción de mineral que atravesaría una membrana de diálisis con un diámetro de poro de más de 12.000 Da.

Reactivos utilizados

- Pepsina de mucosa gástrica porcina EC 3.4.23.1 de mucosa gástrica porcina, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Pancreatina de páncreas porcino EC 232-468-9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Sales biliares (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Ácido clorhídrico 30% (Merck KGA, Darmstadt, Alemania)
- Sodio hidrógeno carbonato (NaHCO_3) SO0131 (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España)

Material y equipos utilizados

- pH metro micro pH 2000 (Crison, Barcelona, España)
- Baño termostático con agitación modelo Unitronic 320 OR (P-Selecta, Madrid, España)
- Membranas de diálisis, diámetro poro de 12000-14000 Da Dia. Inf. 36/32"-28.6 mm, 30 m (Medicell Int. LTD, Inglaterra)
- Tubos de centrifuga Beckman de 50 mL

-Centrífuga Eppendorf 5804R (AG Hamburg, Alemania)

Procedimiento

-Digestión gástrica

Se pesaron 20 g de papilla infantil y se mezclaron con 100 mL de agua bidestilada-desionizada o fórmula de continuación hasta obtener una papilla homogénea. A continuación se midió el pH de la mezcla y se ajustó a un valor de pH 4 (pH gástrico en niños menores de 6 meses de edad) empleando HCl 6 N (Bosscher *et al.*, 2001 b). Posteriormente se añadió a la muestra 0,02 g de pepsina /g de muestra, preparada previamente (0,125 g de pepsina en 6 mL de HCl 0,1 N). La muestra fue entonces incubada en un baño a 37°C en agitación durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, el proceso de digestión gástrica fue detenido sumergiendo la muestra durante 10 minutos en un baño de hielo.

-Digestión intestinal

El pH del digerido procedente de la etapa anterior se ajustó a 5,0 mediante la adición de NaHCO₃ 1M. A continuación se añadieron 0.005 g de pancreatina y 0.03 g de sales biliares/g de muestra a partir de una disolución preparada en la siguiente proporción: 0.05 g de pancreatina y 0.310 g de sales biliares en 12,5 mL de NaHCO₃ 0,1 M. La muestra fue a continuación incubada durante 2 horas a 37°C en agitación. Finalizado este período se detuvo la reacción enzimática sumergiendo la muestra en un baño de hielo durante 10 minutos, el pH fue ajustado a un valor de 7 mediante la adición de NaOH 0.5 M.

IV.3.3.1.b.1. *Fracción soluble de mineral*

Una vez finalizada la digestión intestinal, se tomaron alícuotas de 20 g de homogenizado se llevaron a tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugaron a 3500 g durante 1 hora a 4°C. Previa incineración de la muestra, se midió el contenido en hierro,

calcio y cinc del sobrenadante siguiendo el método descrito en el apartado III.2 de este trabajo.

Los porcentajes de mineral soluble se calcularon según Pyanert *et al.*, (2006):

$$\text{Mineral soluble (\%)} = (\text{Mineral soluble (mg/100 g)} / \text{Mineral total (mg/100 g)}) \times 100$$

IV.3.3.1.b.2. *Fracción dializable de mineral*

La digestión gástrica para la obtención de la fracción de mineral dializado se realizó del mismo modo al descrito en el apartado VI.1.a. La digestión intestinal incluye una etapa de diálisis. Para ello, se tomaron alícuotas de 20 g de digerido procedente de la etapa de digestión gástrica, y se introdujeron las bolsas de diálisis, mantenidas previamente durante 12 horas en agua desionizada a 4°C, conteniendo 50 ml de agua bidestilada desionizada y NaHCO₃ en cantidad equivalente a la acidez titulable, calculada mediante el número de equivalentes de NaOH 0.5 N necesarios para obtener un pH de 7.5.

$$\text{g NaHCO}_3 = (2 \times \text{ml NaOH 0.5 N} \times 84) / 1000$$

La incubación se prolongó durante 30 minutos más, se midió el pH y se comprobó que se mantenía en un valor de 5.0. Transcurrido este tiempo, se le adicionó 0.001 g de pancreatina y 0.006 g de sales biliares/ g de alícuota a partir de 0.05 g de pancreatina y 0,310 g de sales biliares en 12,5 mL de NaHCO₃ y los frascos se llevaron a incubación durante 2 horas en agitación a 37°C. Finalizado el proceso, se extrajeron las bolsas de diálisis conteniendo el dializado, se lavaron con agua destilada-desionizada y se determinó el pH de su contenido, cuantificando el hierro, calcio y cinc de los dializados obtenidos mediante aspiración directa por espectrofotometría de absorción atómica.

Los porcentajes de mineral dializado se calcularon según Cámara *et al.* (2005). El *porcentaje de mineral dializado* se calcula como $100 \times D/C$, donde D es la cantidad de mineral presente en el dializado, y C es el mineral presente en la muestra.

IV.3.4. ESTUDIO 4

IV.3.4.1. CULTIVOS CELULARES

IV.3.4.1.a. Lugar de trabajo

Todos los ensayos realizados para este trabajo, se llevaron a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos del S.A.C.E. (Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales) de la Universidad de Murcia. Este laboratorio consta de cabinas de flujo laminar de dirección vertical.

Previamente al inicio del trabajo con la línea celular Caco-2, la cabina fue preparada unos 30 minutos antes a fin de conseguir un ambiente de trabajo estéril, encendiendo la lámpara de luz U. V., y apagándola unos 15 minutos antes de comenzar, dejando sólo en funcionamiento el ventilador de la campana a fin de eliminar los contaminantes del material de trabajo introducido y de la zona de trabajo, donde sólo deberá introducirse el material necesario y de uso inmediato.

IV.3.4.1.b. Línea celular Caco-2

Las células Caco-2 utilizadas en este estudio procedían de la European Collection of Cell Cultures (ECACC; número 86010202, Salisbury, UK).

Reactivos utilizados

-E-MEM (Eagle minimum essential medium; Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, USA)

-Solución de tripsina-EDTA (0,25 mg/mL)

-Azul tripán, CI 23850 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

-Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) (Sigma, St Louis, MO, USA)

-Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)

Material y equipos

-Cámara de recuento Neubauer, Boeco (Neubauer, Hamburgo, Alemania)

-Lector de placas Labsystem multiskan MCC/340 microplate reader (Termo Electrón Corporation, Barcelona, España)

Las células se recibieron congeladas en N₂ líquido (-196°C) en criotubos de 1.5 mL de capacidad en el número 10 de pase, conteniendo 1 mL de medio de cultivo E-MEM con un 10 % de suero bovino fetal inactivado (v/v) y 250 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector.

Para descongelar las células, el criotubo fue llevado a un baño a 37 °C, y una vez descongelado su contenido, se llevó su contenido a un frasco de 75 cm² añadiéndose 5 mL de medio de cultivo E-MEM enriquecido con un 10% de suero bovino fetal, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de glutamina, 1% de antibióticos (penicilina-estreptomina), incubando a 37°C, con un flujo del 5% de CO₂ y 95% aire, en condiciones de humedad constante.

La pauta de trabajo que se ha seguido en este estudio para el mantenimiento de la línea celular, incluye:

IV.3.4.1.b.1. Mantenimiento en cultivo de la línea celular

El cultivo celular se mantuvo en el frasco, realizando el cambio del medio de cultivo en días alternos, hasta que las células alcanzaron un 70-80% de la confluencia (estado de subconfluencia). En este punto, se realizó un subcultivo de las mismas, aumentando con ello un número de pase.

IV.3.4.1.b.2. Subcultivo de las células

El subcultivo consistió en separar las células adheridas a la superficie de los frascos de 75 cm², realizando una suspensión de las mismas, mediante la adición de 3 ml de tripsina

0.25%, incubándolas a 37°C durante 3-4 minutos para transferirlas posteriormente a nuevos frascos de cultivo. Tras la actuación de la tripsina, se añadieron 3 mL de medio de cultivo al frasco a fin de inactivar la enzima. Las células fueron entonces resuspendidas y la suspensión transferida a un tubo de 15 mL de capacidad. Su contenido fue centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante aspirado y eliminado, obteniéndose un precipitado de células que fue resuspendido cuidadosamente en 3 mL de medio de cultivo hasta obtener una suspensión celular homogénea. Las células de este estudio fueron sometidas a diferentes pases o subcultivos, y fueron empleadas en los números de pase (28-55). Briske-Anderson *et al.*, (1996) propusieron que el intervalo de pase óptimo se encuentra en el intervalo 28-65, ya que han adquirido las características morfológicas y fisiológicas del enterocito maduro.

IV.3.4.1.b.3. *Recuento y viabilidad celular*

Para conocer el número de células que están presentes en el cultivo, se procedió al recuento de las mismas utilizando una cámara de Neubauer o hemocitómetro. Para ello, se tomaron 100 µL de la suspensión celular y se transfirieron a la cámara de Neubauer. Se contó el número de células en 0.1 mm³ de suspensión celular, ya que la altura entre la cámara y el cubreobjetos es de 0.1 mm. Hay que tener en cuenta que el resultado del recuento es el número de células presentes, no haciendo distinción entre células vivas y muertas.

Para conocer el número de células vivas presentes en el cultivo, se aplicó colorante azul tripán a la suspensión celular (1:1), la mezcla se resuspendió cuidadosamente a fin de obtener una suspensión homogénea y se procedió a la carga de la cámara de Neubauer, teniendo en cuenta que las células no viables son capaces de captar este colorante, mientras que las células vivas no se tiñen debido a que mantienen completamente la integridad de su membrana.

El porcentaje de células vivas se relaciona con la viabilidad del cultivo mediante la siguiente expresión:

$$\text{Viabilidad del cultivo} = (\text{Células no teñidas} / \text{Células totales}) \times 100$$

IV.3.4.1.b.3.1. *Ensayo de viabilidad-proliferación celular. Ensayo MTT*

El método del MTT, es un ensayo colorimétrico cuantitativo que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Éste método se basa en la capacidad que presenta la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células eucariotas vivas para convertir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) que es de color amarillo y actúa de sustrato, en un producto azul oscuro (formazano), lo cual se traduce en un incremento en los valores de absorbancia de la muestra. Existe una gran correlación entre el número de células viables y la cantidad de MTT metabolizado.

En nuestro estudio se siguió el protocolo descrito por Mosmann (1983). Se preparó una disolución de MTT a una concentración de 5 mg/mL en medio de cultivo sin rojo fenol. Las células fueron sembradas a una densidad de 5000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Transcurridas 24, 48, 72 y 96 horas de incubación, el medio de cultivo se sustituyó por 200 µL de E-MEM libre de suero y 50 µL de solución de MTT (5 mg/mL) que fueron añadidos a cada pocillo. Transcurridas 4 horas de incubación, el medio fue retirado, y se añadieron 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a fin de solubilizar el formazano. La placa fue leída empleando un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm.

IV.3.4.1.b.4. *Evaluación de la integridad de la monocapa celular: TEER y permeabilidad aparente (Prueba del rojo fenol).*

Reactivos utilizados

- Rojo fenol ref. P 5530 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO., USA)
- PBS: 8 g (NaCl), 0,2 g (H₂KPO₄), 0,2 g (HKPO₄) disueltos en 1000 mL de agua destilada-desionizada
- NaOH 0,1 N (Panreac Química S.A., Barcelona, España)

Material y equipos

- Placas de seis pocillos, cat nº 3506 (Costar Europe, Badhoevedorp, Holanda)

-Filtros semipermeables de policarbonato. Área = 4,4 cm², 0,4 µm de tamaño de poro, cat nº 3412 (Costar Europe, Badhoevedorp, Holanda)

-Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Visible U-2000 (Hitachi Ltd. Tokio, Japón)

-Micropolímetro Millicell ERS (Millipore Co., Bedford, MA, USA)

IV.3.4.1.b.4.1. Resistencia eléctrica transepitelial (TEER)

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER), es un indicador de la confluencia celular y de la integridad de la monocapa, así como de la formación de uniones estrechas entre las células, también se emplea para controlar si las células se encuentran polarizadas midiendo la resistencia entre el compartimiento apical y el basolateral de los pocillos bicamerales, ya que esta aumenta cuando el cultivo en monocapa se encuentra polarizado (Lu *et al.*, 1996; Guillén Gómez, 2006). Su valor se determinó con un micropolímetro, que mide el potencial de membrana y la resistencia de las células epiteliales en cultivo (Figura 15 y Figura 16).

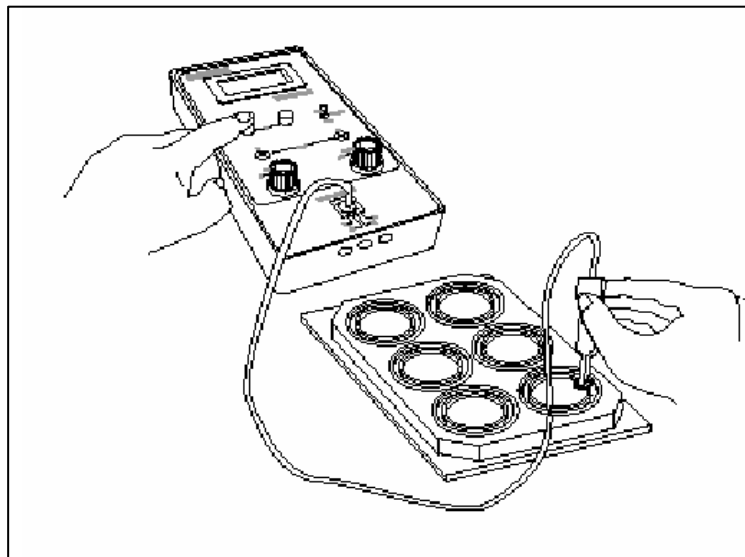


Figura 15. Representación de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER)

Las células empleadas en los ensayos se encontraban en el número de pase 30-33. Se sembraron 50000 células/cm² en los filtros de policarbonato insertos en las placas de seis pocillos, a los tres días postsiembra las células alcanzaron el estado de confluencia,

diferenciándose aproximadamente a los 16-18 días postsiembra. En la cámara basal y en la apical se depositaron 2 mL de E-MEM. El medio de cultivo se renovó a partir del 4º día postsiembra a fin de garantizar la adherencia de las células a la membrana, posteriormente se renovó cada dos días. La resistencia eléctrica transepitelial, se midió previamente a la renovación del medio comenzándose a determinar el 7º día postsiembra. La placa de pocillos se mantuvo durante las medidas sobre una placa calefactora a 37°C.

La TEER se calculó multiplicando el valor obtenido por el micropolímetro por el área de la monocapa celular, a este valor se le resta el valor del blanco obtenido de la medida de la TEER en las membranas sin células. Las unidades en que se expresa el valor obtenido es $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

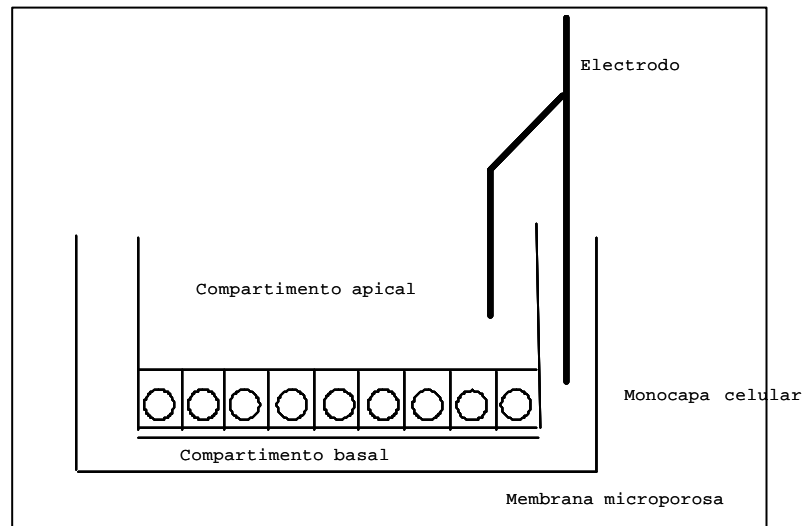


Figura 16. Medida de la TEER

IV.3.4.1.b.4.2. Permeabilidad aparente. Prueba del rojo fenol

El paso de determinados compuestos, como el rojo fenol, a través de la monocapa, se emplea para evaluar la integridad de la misma (Viadel, 2002). El rojo fenol tiene una masa molecular de 354 Da.

Se preparó una disolución madre 1 mM de rojo fenol en agua destilada-desionizada, manteniéndose a 4°C. Se lavaron con PBS los filtros conteniendo las monocapas de células en el número 28-55 de pase por lo menos tres veces a fin de eliminar completamente cualquier

resto de medio de cultivo, ya que este contiene rojo fenol como indicador de pH. A continuación se añadió 1 mL de disolución de rojo fenol 1mM en la cámara apical, añadiendo el mismo volumen de PBS en la cámara basolateral. La placa se llevó a un baño a 37°C y se incubó durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se recogió el contenido de la cámara basolateral.

Para la medida del contenido de rojo fenol en la cámara basolateral, se tomó un volumen de 900 µl de ésta y se le añadieron 100 µL de NaOH 0.1 N. Como blanco se tomaron 900 µl de PBS y 100 µl de NaOH. Mientras se llevaba a cabo la incubación de las muestras a 37°C con un flujo del 5% de CO₂ y 95% aire, se prepararon las disoluciones patrón de rojo fenol con las siguientes concentraciones:

40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 µM, se midió la absorbancia de los patrones y las muestras en espectrofotómetro de absorción molecular a 560 nm de longitud de onda frente al agua bidestilada, tanto para la curva patrón como para las muestras. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

A partir de los valores obtenidos, se calculó la permeabilidad aparente del rojo fenol que nos informa sobre el desarrollo de uniones intercelulares estrechas (Ranaldi *et al.*, 2003), para ello se empleó la siguiente ecuación:

$$V \text{ (cm}^3\text{)}/A \text{ (cm}^2\text{)}=dC/dt\text{(s)} \times C_0$$

Donde V es el volumen de la cámara basolateral, A es el área del filtro (cm²), t es el tiempo (s), C es la concentración de rojo fenol en la cámara basolateral a tiempo t y C₀ es la concentración de rojo fenol en la cámara apical a t=0.

IV.3.4.1. ESTUDIO DE LA DISPONIBILIDAD DE HIERRO, CALCIO Y CINC EMPLEANDO LA LÍNEA CELULAR CACO-2

IV.3.4.2.1. Ensayos de captación. Frascos de 75 cm².

Se llevaron a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Viadel (2002).

IV.3.4.2.1.a. Disoluciones patrón

Reactivos

-Cloruro de calcio anhidro (CaCl₂) CA 0192 (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España)

-Cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃·6H₂O) HI0336 (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España)

-Ácido clorhídrico (HCl) 30% (Suprapur Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

-Ácido nitrilotriacético extrapuro AC 1606 (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España)

-Sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O) ACS, C10207 (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España)

-Citrato sódico (C₆H₅O₇Na₃·2H₂O) (GMBH&Co Riedel-de Häen, Seelze, Alemania)

-Cloruro sódico (NaCl) (Merck KGA Darmstadt, Alemania)

-Cloruro potásico (KCl) (Merck KGA Darmstadt, Alemania)

-Cloruro de lantano hidrato (LaCl₃) (Fluka Chemie GmbH, Austria)

-Sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄), MA0080 (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España)

-1-ácido piperazinetanosulfónico 4(2-hidroxietil) sal monosódica (HEPES), H7006 (100 g) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA)

-D(+)-Glucosa monohidrato (Merck KGA Darmstadt, Alemania)

-Sodio dodecilsulfato (SDS) (Merck, Darmstadt, Alemania)

Materiales y equipos

-Frascos 75 cm² de poliestireno, 83.1811.002 (Sarstedt, Inc., NC, USA)

-Crisoles de porcelana C-4 (KPM, Berlín, Alemania)

- Estufa (Incubador)
- Espectrofotómetro de absorción atómica mod. 3100 (Perkin-Elmer, Norwalk, U.S.A)
- Horno mufla, mod. S27 (Naberthem Bremen, Alemania)
- Micro-Osmómetro Automatic Type 13/13DR-Autocal (Roebing, Berlin, Alemania).
- Rascador de células, 25 cm (Sarstedt, Inc., NC, USA)

Las disoluciones patrón de cada mineral a estudiar se prepararon el mismo día en que se realizó el ensayo de captación con las muestras. Se emplearon las siguientes concentraciones para preparar las soluciones madre: 10 mM CaCl_2 para el calcio, 10 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 20 mM de ácido nitrilotriacético para el hierro y 10 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 20 mM citrato de sodio para el cinc, todas ellas en solución acuosa en HCl 1mM. A partir de estas soluciones se prepararon las distintas concentraciones de las curvas de calibración a utilizar en los ensayos de captación para cada uno de los minerales mediante la adición de distintos volúmenes de las soluciones madre de cada patrón en un tampón de captación empleado como blanco. Las concentraciones de cada mineral se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones finales de las disoluciones patrón de Fe, Ca y Zn

Fe (μM)	Ca (mM)	Zn (μM)
100	5	2
150	20	10
200	50	20

El tampón de captación se preparó en agua bidestilada-desionizada: NaCl 130 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, HEPES 50 mM, glucosa 5 mM. El pH se ajustó a 7,2 empleando HCl 30%. Los ensayos de captación con los patrones de hierro, calcio y cinc se realizaron en frascos de 75 cm² en los que se habían sembrado previamente las células Caco-2 a una densidad de 50000 células/cm². Los frascos fueron mantenidos a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa durante 21 días, período durante el cual el medio se renovó en días alternos.

Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo, la monocapa se lavó dos veces con PBS a 37°C, y se adicionaron 10 mL del tampón de captación al frasco empleado como control y 10 mL del tampón adicionado de la disolución patrón de las distintas concentraciones para cada uno de los minerales en cada frasco. Los frascos fueron incubados durante 1 hora en las mismas condiciones descritas anteriormente. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante fue retirado, y la monocapa se lavó dos veces con el tampón de captación a 4°C, a continuación se añadió 1 mL de SDS 2% para lisar las células, que fueron recogidas con la ayuda de un rascador.

Las células así obtenidas, se llevaron a crisoles de porcelana y se desecaron en placa calefactora, incinerándose durante 24 horas en horno-mufla a 450°C. La temperatura final se alcanzó mediante un incremento progresivo de la temperatura (50°C/minuto), y manteniendo cada incremento durante 4-5 minutos, siendo el tiempo total empleado hasta alcanzar 450°C de 30 minutos. Una vez transcurridas 24 horas, se dejaron enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se adicionó a continuación, a fin de blanquear las cenizas obtenidas, 1 mL de HNO₃ 65%, los crisoles fueron entonces llevados a sequedad en placa calefactora, introduciéndose de nuevo en la mufla a 450°C durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se adicionaron 2 mL de HCl fumante 37%, los crisoles se cubrieron con vidrios de reloj, y se llevaron a placa calefactora, durante cuatro horas. A continuación, se retiraron los vidrios de reloj, y se añadieron de nuevo 2 mL del mismo ácido manteniéndolos en placa calefactora hasta reducción del volumen a 1 mL final, este volumen fue completado hasta 7 mL con agua bidestilada desionizada, añadiendo cloruro de lantano (0.2%) a fin de eliminar interferencias con el fósforo. El contenido mineral de esta solución se midió por espectrofotometría de absorción atómica. El mineral captado por las células, se calculó mediante la diferencia entre el contenido mineral de las células adicionadas de disolución patrón y el de las células adicionadas de tampón de captación.

IV.3.4.2.1.b. *Muestras*

Las muestras empleadas se describen en la Tabla 10.

Tabla 10. Muestras empleadas en el estudio de la disponibilidad mineral con células Caco-2

Papillas comerciales	Papillas desfitinizadas
Ocho cereales miel + agua	Ocho cereales miel + agua
Crema de arroz + agua	Crema de arroz + agua
Multicereales + agua	Multicereales + agua
Cereales sin gluten + agua	Cereales sin gluten + agua
Ocho cereales miel + FC	Ocho cereales miel + FC
Crema de arroz + FC	Crema de arroz + FC
Multicereales + FC	Multicereales + FC
Cereales sin gluten + FC	Cereales sin gluten + FC

FC= fórmula de continuación

Las digestiones gástrica e intestinal de las muestras se llevaron a cabo del mismo modo al descrito en el apartado IV.3.3.1.b del presente trabajo.

Una vez finalizada la fase de digestión intestinal, el pH de la muestra se ajustó a 7.2 mediante la adición de NaOH 0,5 M. El digerido intestinal fue calentado a 100°C durante 7 minutos a fin de inactivar las proteasas que pueden dañar la monocapa celular. A continuación se tomaron alícuotas de 20 g, se transfirieron a tubos de policarbonato siendo centrifugadas a 4°C durante 1 hora a 3500 g.

El sobrenadante resultante fue recogido, añadiéndole glucosa y HEPES hasta una concentración final de 5 mM y 50 mM respectivamente, posteriormente el pH fue ajustado a 7.2-7.4 con HCl 30%. Antes de su adición a la monocapa, se ajustó también la osmolaridad de la fracción soluble añadiendo agua destilada desionizada hasta alcanzar un valor de 310 ± 10 mOsm/kg para no dañar la monocapa celular. Se escogió la fracción soluble procedente de la digestión de las muestras de papillas, y no se realizó el ensayo en la fracción dializada debido a que esta última presentaba unos niveles muy bajos de minerales, por lo que las fracciones captada y transportada podrían ofrecer valores no detectables.

Determinación de la osmolaridad y pH

Las disoluciones a adicionar a la monocapa celular deben tener un pH y una osmolaridad compatibles con el cultivo celular. La osmolaridad se define como la concentración osmolar expresada en osmoles por kg de disolución acuosa (1 mol de partículas del soluto/kg de solución acuosa). La osmolaridad determina la presión osmótica, su regulación está estrechamente relacionada con la concentración de sodio del líquido (Guyton *et al.*, 2001). La lectura de la osmolaridad de las muestras se realizó mediante un osmómetro previamente calibrado empleando agua bidestilada. Las muestras fueron previamente adicionadas de glucosa (5mM) y HEPES (50 mM).

IV.3.4.2.1.b.1. Captación de Fe, Ca y Zn. Disponibilidad mineral

Las monocapas celulares fueron recogidas e incineradas del mismo modo al descrito en el apartado III.8.1.1 de este trabajo. Los contenidos de Fe, Ca y Zn de las monocapas celulares se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica, bajo las condiciones que se especifican en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones instrumentales para la determinación de calcio, hierro y cinc por EAA-llama

	Ca	Fe	Zn
Longitud de onda (nm)	422,7	248,3	213,9
Rendija (nm)	0,7	0,2	0,7
Intensidad de corriente de la lámpara (mA)	10	30	15
Flujo de aspiración (mL/min)	4	4	4
Flujo de acetileno (L/min)	2,5	2	2,0
Flujo de aire (L/min)	15,5	15,5	15,5

Reactivos utilizados

-Ácido clorhídrico (HCl) 30% Suprapur (Merck, Darmstadt, Alemania)

- Ácido nítrico (HNO₃) Suprapur (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Agua bidestilada desionizada
- Cloruro de lantano hidrato (LaCl₃) (Fluka, Buchs Austria)
- Soluciones stock-patrón de 1000 mg/L (Fluka, Buchs, Suiza)
 - Calcio (nº cat 21058)
 - Hierro (nº cat 44903)
 - Cinc (nº cat 96457)
- Cloruro de calcio anhidro (CaCl₂) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Cloruro de magnesio anhidro (MgCl₂) (Merck, Darmstadt, Alemania)

Material y equipos utilizados

- Balanza de precisión (Ohaus Explorer, Switzerland)
- Crisoles de porcelana C-4 (KPM, Berlín, Alemania)
- Espectrómetro de absorción atómica modelo 3100 (Perkin-Elmer, Norwalk, U.S.A.)
- Estufa de desecación de aire forzado modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- Horno mufla modelo S27, Naberthem, (Bremen, Alemania)
- Matraces aforados de 50 y 100 mL de capacidad (Pobel, Madrid, España)
- Placa calefactora (P-Selecta, Barcelona, España)

Determinación de la disponibilidad

El porcentaje de mineral disponible, se calculó según el protocolo propuesto por Jovaní *et al.*, (2001) a partir de los datos de minerales obtenidos en nuestro estudio, del siguiente modo:

$$\% \text{ disponibilidad} = (a/b) \times 100$$

Donde “a” se obtiene a partir del contenido mineral de la monocapa celular incubada con la fracción mineral soluble resultante de la digestión de las papillas infantiles menos el

contenido mineral de la monocapa celular incubada con el tampón de captación, y “b” es la cantidad de mineral soluble añadido a la monocapa celular.

IV.3.4.2.2. Estudio de la captación, retención y transporte de minerales. Pocillos bicamerales.

Las digestiones gástrica e intestinal de las muestras se llevaron a cabo del mismo modo al descrito en el apartado IV.3.3.1.b de este trabajo, con algunas modificaciones (Aura, 2005).

Reactivos utilizados

- Pepsina de mucosa gástrica porcina EC 3.4.23.1 de mucosa gástrica porcina, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Pancreatina de páncreas porcino EC 232-468-9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Alfa-amilasa de saliva humana EC 3.2.1.1. (Type XIII-A:crude SIGMA A1031-1KU 085K7550 (34,7 mg sólido, 28,8 unidades/mg sólido) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania)
- Ácido morfolinoetanosulfónico (MES), cat. N° 29834.02 (Serva GMBH, Heidelberg, Alemania)

Material y equipos

- Centrífuga refrigerada Sigma 3-16K (SN 110179), rotor Sigma 19776H (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Alemania)
- Filtros semipermeables de policarbonato. Área = 4,4 cm², 0,4 µm de tamaño de poro (Costar Europe, Badhoevedorp, Holanda)
- Unidades de filtración Centricon Centrifugal Filter Device (30.000 MW cut-off), (Millipore Corporation Bedford, MA 01730, EEUU)
- Micro-Osmómetro Automatic Type 13/13DR-Autocal (Roebbling, Berlin, Alemania)

Se partió de 1 g de muestra, se añadió alfa-amilasa salivar, y no se añadieron sales biliares durante la fase de digestión intestinal. La alfa-amilasa fue añadida al homogenado a una concentración de 30 U, las proporciones de pepsina y pancreatina utilizadas fueron 0.4 mg pepsina/100 g de muestra y 5 mg de pancreatina/100 g de muestra.

Finalizada la fase de digestión intestinal, las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 30 minutos a 9400 rpm. El sobrenadante fue almacenado a -20°C. Se tomaron 2 mL del sobrenadante resultante de la centrifugación anterior y se llevaron a unidades de filtración Centricon (utilizadas para filtrar y concentrar muestras) a fin de retener las enzimas utilizadas en la digestión, en los que fueron centrifugados nuevamente a 4100 rpm durante 90 minutos. Se tomaron 2 mL del sobrenadante y se le añadieron 2 mL de agua y MES hasta una concentración final de 30 mM. Se ajustó el pH a valores fisiológicos (6.5-6.9) empleando para ello HCl 1 N, y se añadió agua bidestilada desionizada a fin de llevar la osmolaridad a un valor de 310 ± 10 mOsm/kg. Se diluyó la solución resultante a un volumen final de 6 mL con solución fisiológica de NaCl 120 mM pH 6,9 y finalmente se añadieron Ca^{+2} y Mg^{+2} hasta una concentración final de 1 mM a fin de mantener las uniones intercelulares en buen estado (Ferruzza *et al.*, 1999).

Las células fueron sembradas 21 días antes del ensayo sobre filtros semipermeables de policarbonato de 4.67 cm² de área y tamaño de poro 0.4 µm insertos en pocillos bicamerales a una densidad de 50.000 células/cm², colocándose 1 mL de medio de cultivo en la cámara apical y 2 mL en la cámara basolateral, renovando el medio cada dos días antes de iniciar los experimentos de biodisponibilidad.

IV.3.4.2.2.a. *Evaluación de la toxicidad de las papillas infantiles sobre la monocapa celular.*

A fin de estudiar los posibles efectos adversos que los componentes de las papillas infantiles o las enzimas digestivas presentes en los sobrenadantes obtenidos tras la digestión ejercen sobre la monocapa celular (Okada *et al.*, 2000), se evaluó la integridad de la misma, una vez alcanzada la diferenciación, previamente a los ensayos de disponibilidad mineral.

La medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) nos permite conocer de un modo temprano si estamos ante un caso de toxicidad subletal, que se traduce en una alteración de la integridad de la monocapa y un descenso del valor de la TEER. La resistencia eléctrica fue medida en ambos lados de la monocapa cada 30 minutos durante las 3 horas de incubación a 37°C de las muestras tratadas o no tratadas con fitasa. En cada ensayo se midió la TEER de la monocapa celular incubada con las enzimas empleadas en la digestión *in vitro* pero sin papilla infantil, en las mismas condiciones y esta medida se tomó como blanco. La resistencia eléctrica de los filtros sin células, se tomó conteniendo la cámara apical 1 mL de tampón de captación a pH 6, y la cámara basolateral 1 mL de solución salina BSS (Balanced Salt Solution) pH 7.4. El valor de TEER obtenido se expresa como $\Omega \cdot \text{cm}^2$ y resulta de restarle la lectura de resistencia obtenida al medir sobre el filtro semipermeable desprovisto de células y multiplicar el valor obtenido por la superficie de crecimiento. Los valores de TEER fueron comparados entre monocapas incubadas con los sobrenadantes resultantes de la digestión de las distintas muestras.

La medida de la TEER de la monocapa incubada con las muestras procedentes de la digestión se llevó a cabo del siguiente modo:

Se aspiró el medio de cultivo contenido en las cámaras apical y basolateral, y se lavaron dos veces con PBS (tampón fosfato salino, pH 7.2). A continuación se añadieron los sobrenadantes resultantes de la centrifugación en viales Centricon del digerido de las papillas infantiles (0.5 ml) y fueron incubadas durante tres horas, a los cuales se les añadió MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) hasta obtener una concentración final de 30 mM, se añadió agua hasta una osmolaridad final de 300 ± 10 mOsm/Kg, se ajustó el pH a 6 con HCl 1 N, y se añadieron Ca^{+2} y Mg^{+2} (PBS⁺⁺) hasta una concentración final de 1mM de ambos. En la cámara basolateral, se añadió 1 mL de BSS (pH 7.4).

IV.3.4.2.2.b. *Determinación de la disponibilidad de hierro, calcio y cinc. Captación, retención y transporte.*

Según los resultados obtenidos en los experimentos de control de la integridad de la monocapa, los experimentos de biodisponibilidad se llevaron a cabo durante tres horas a 37°C con 1 mL de muestra en la cámara apical resultante de la digestión de las papillas infantiles tras ajustar el pH a 6, la osmolaridad a 300 mOsm/Kg., MES 30 mM, Ca^{2+} 1mM y Mg^{2+} 1mM; y 1 mL de BSS pH 7.4 en la cámara basolateral. Se utilizó simultáneamente como blanco la incubación de la monocapa en las mismas condiciones pero sin el digerido de las papillas infantiles. Durante la incubación, se midió el valor de la TEER de cada filtro cada media hora, las monocapas con valores inferiores a 200 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ no se emplearon en el experimento.

Transcurridas tres horas de incubación, se tomaron los contenidos de las cámaras apical y basolateral para conocer el transporte mineral a través de la monocapa, se lavaron los filtros con PBS antes del raspado de la monocapa celular a fin de eliminar restos de medio de cultivo sobre la superficie, las células fueron entonces lisadas añadiendo 0.5 mL de agua desionizada.

A fin de estimar la biodisponibilidad de hierro, calcio y cinc, el contenido mineral fue determinado en la muestra inicial, en el digerido añadido en la cámara apical, en el blanco, en la monocapa celular y en el contenido de la cámara basolateral al final del proceso de transporte. Todas las medidas se realizaron por espectrometría de absorción atómica siguiendo el método 985.35 de la A.O.A.C. (1999).

El cálculo de la retención, captación y transporte se calculó según el protocolo de Perales *et al.* (2005). La diferencia entre el contenido de hierro, calcio o cinc de la monocapa celular incubada con la disolución preparada a partir del digerido de las papillas infantiles con o sin tratamiento con fitasa y el contenido mineral de la monocapa no expuesta (blanco) dan una estimación de la *retención* de mineral en la célula (μg). El *transporte* es estimado como la diferencia entre la cantidad de mineral en la cámara basolateral y en el buffer empleado como blanco.

Los porcentajes *de mineral retenido y transportado* se calcularon según la siguiente fórmula:

$\% \text{ retención} = 100 \times R/C$, donde R es el mineral retenido (μg mineral/pocillo) y C es el contenido de mineral presente en la cámara apical.

$\% \text{ transporte} = 100 \times T/C$, donde T es la diferencia entre el contenido mineral en la cámara basolateral y en el tampón empleado como blanco (μg mineral/pocillo) y C = contenido de mineral en la cámara apical. Debido a las diferencias existentes entre las distintas muestras en lo que se refiere a la presencia de mineral en la cámara apical, la eficiencia del transporte y la captación de mineral (retención + transporte) se han expresado como se indica a continuación:

$\% \text{ eficiencia en el transporte} = (\% \text{ solubilidad} \times \% \text{ transporte})/100$.

$\% \text{ eficiencia en la captación} = (\% \text{ solubilidad} \times \% \text{ captación})/100$.

IV.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las medidas de inositoles fosfato, fueron llevadas a cabo por quintuplicado, y los datos obtenidos se muestran como el valor medio de las mismas \pm la desviación estándar (DS). Para comprobar la existencia de diferencias entre las medias, se llevó a cabo la prueba t de Student con un nivel de significación del 95%. Los contenidos de hierro, calcio y cinc ofrecidos, son la media aritmética de cinco determinaciones \pm DS. Para estudiar el efecto del procesado (tostado y tratamiento con alfa-amilasa) sobre el contenido en inositoles fosfato de las papillas infantiles, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias debidas a los procesos aplicados se realizó un análisis de comparaciones múltiples por parejas utilizando las pruebas de Tukey y T3 de Dunnett.

Para determinar el efecto de la desfitinización y de la adición de fórmula infantil sobre la solubilidad y dialización mineral, se empleó un ANOVA y la prueba t de Student.

Para comprobar la existencia de diferencias en la captación mineral entre las papillas infantiles desfitinizadas o no y mezcladas con agua a con fórmula infantil, se aplicó la prueba t de Student. En ambos estudios de disponibilidad, se llevó a cabo también un ANOVA multifactorial para investigar el efecto de la desfitinización y de la adición de fórmula infantil así como el efecto de la interacción de ambas sobre la biodisponibilidad mineral. En los ensayos de retención, captación y transporte mineral se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA), empleando los tests de Tukey y T3 de Dunnett para determinar el efecto de la desfitinización sobre esas variables. Las diferencias fueron consideradas significativas para un valor de $p < 0.05$. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Además, se aplicó un análisis de correlación de Pearson entre las variables estudiadas (contenido mineral, porcentajes de solubilidad y diálisis, captación, retención y transporte) para determinar la existencia de correlaciones entre ellas, cuando $p < 0.05$.

Para poder seleccionar el tipo de papilla más idónea por su tratamiento (adición de fitasa) o reconstitución (agua o fórmula infantil) en cuanto a su disponibilidad mineral, se procedió al análisis de conglomerados o análisis cluster que tiene como objetivo lograr una clasificación o agrupamiento de las muestras en grupos homogéneos según el comportamiento de éstos en una serie de variables, que en nuestro caso fueron: los porcentajes de hierro, calcio y cinc dializados, y la solubilidad, captación, retención y transporte de hierro, calcio y cinc por las células Caco-2. Se consideraron significativos valores con un valor de $p < 0.05$.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL).

V.1. ESTUDIO 1

V.1.1. CONTENIDO EN INOSITOLES FOSFATO DE PAPILLAS INFANTILES Y DE SUS MATERIAS PRIMAS.

V.1.1.1 Validación del método analítico

Previamente al comienzo de la identificación y cuantificación de los inositoles fosfato de las muestras empleadas en este estudio, se procedió a la validación del método analítico desarrollado por Lehrfeld, (1989; 1994) y que se basa en la utilización de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Los resultados obtenidos en el proceso de validación del método, se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de la validación del método analítico de HPLC empleado en este estudio

% CV ¹	12-13%
Límite de detección	0.04 mg/mL
Límite de cuantificación	0.08 mg/mL
Rango	0.1-4 mg/mL
Coefficiente de correlación	0.998-1
% recuperación	90%

¹ % CV = Coeficiente de variación para la exactitud y la precisión

Como se observa en la Tabla 12, los resultados obtenidos en la validación del método analítico están incluidos en el rango de valores que se señala en el apartado III.1 del Material y Métodos de este trabajo para poder considerar válido un método analítico.

V.1.1.2. Contenido en inositoles fosfato

Los cereales son uno de los alimentos de elección en la alimentación complementaria en los primeros meses de vida. Poseen una alta densidad energética (80 Kcal/100g) y son una fuente importante de hidratos de carbono, proteínas, minerales y vitaminas (especialmente de tiamina). No obstante, en este grupo de población, el ácido fólico que contienen los

cereales puede ser especialmente problemático, debido a que los requerimientos minerales son críticos en esta etapa de la vida (Febles *et al.*, 2001). En la mayoría de los cereales, el fitato se concentra en la aleurona, y en menor proporción en el germen. Esto significa que durante la molienda, los niveles del antinutriente suelen disminuir, al igual que los contenidos en fibra, vitaminas y minerales (McKevith, 2004).

Los resultados de la identificación y cuantificación de los inositoles fosfato presentes en las muestras empleadas en este estudio (materias primas y papillas infantiles) se muestran a continuación y se expresan como mg/100 g de muestra.

V.1.1.2.a. Materias primas

En la Tabla 13 se muestran los contenidos en inositoles fosfato de las materias primas empleadas en la elaboración de las papillas infantiles utilizadas en este estudio, es decir, las harinas de cereales y otros vegetales.

Tabla 13. Niveles de inositoles fosfato (mg/100 g) en las materias primas seleccionadas para la elaboración de las papillas infantiles empleadas en este estudio

HARINA	<i>IP</i>₅	<i>IP</i>₆	<i>IP</i>₅+<i>IP</i>₆
Arroz	138.5 ± 13.3 ^c	328.5 ± 5.4 ^c	467.0
Trigo	ND	205.8 ± 5.7 ^c	205.8
Maíz	42.6 ± 0.52 ^e	410.3 ± 2.7 ^b	452.9
Centeno	ND	184.1 ± 9.9 ^d	184.1
Cebada	71.9 ± 18.5 ^d	521.9 ± 20.8 ^b	593.8
Sorgo	144.6 ± 3.6 ^c	1011.3 ± 32.9 ^a	1155.9
Mijo	160.4 ± 0.8 ^b	1099.4 ± 84.3 ^a	1259.8
Avena	184.2 ± 0.8 ^a	1119.6 ± 9.3 ^a	1303.8
Arroz ecológico	134.3 ± 0.2 ^c	488.5 ± 16.9 ^b	622.8
Maíz ecológico	ND	365.3 ± 25.9 ^c	365.3
Tapioca	ND	ND	ND
Guisante	ND	208.6 ± 16.4 ^c	208.6
Zanahoria	ND	ND	ND

ND: No detectado. Cada valor representa la media ± error típico (n=5). Letras distintas (a-d) como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna muestran diferencias significativas para p<0,05

Los cereales que presentaron un mayor contenido en inositolos totales (IP₅+IP₆) fueron la avena, el mijo y el sorgo con diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) en estos tres cereales con respecto al resto de materias primas empleadas. Observándose los valores más bajos en el centeno y en el trigo.

Como se puede observar en la Tabla 13, los mayores niveles de ácido fitico o inositol hexafosfato de las muestras estudiadas se presentaron en la avena (1119.6 mg/100 g), mijo (1099.4 mg/100 g) y sorgo (1011.3 mg/100 g). Estos valores son superiores a los encontrados por otros autores: Harland y Oberleas, (1987); Kasim y Edwards, (1998) para la avena, mijo; Harland y Oberleas, (1987), Ma *et al*, (2005), Kasim y Edwards (1998) para el sorgo; y Carlsson *et al*, (2001) para la avena. Estos mismos cereales presentaron también los mayores valores de inositol pentafofosfato (IP₅). Hemos detectado en algunos cereales analizados (maíz, sorgo, avena, trigo) niveles de inositol pentafofosfato superiores a los mencionados por otros autores (Kasim y Edwards, 1998). Mientras que en el trigo, centeno, tapioca, maíz ecológico y guisantes no se obtuvieron niveles detectables de IP₅. En ninguno de los cereales estudiados se detectaron inositolos de un número inferior a 5 grupos fosfato.

A modo de ejemplo, se muestra (Figura17) el cromatograma de la harina de avena. En él se pueden observar dos picos a distintos tiempos de retención, a los 6.53 minutos el pico se corresponde con inositol pentafofosfato, y a los 8.01 minutos, el pico se corresponde con inositol hexafosfato.

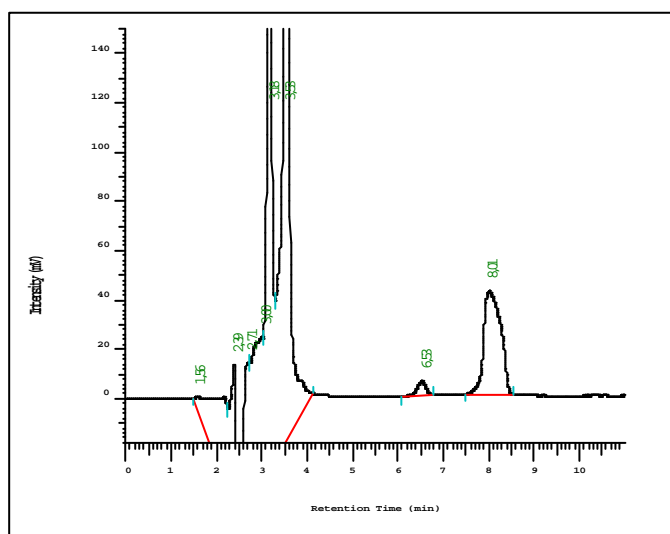


Figura 17. Perfil cromatográfico de la harina de avena para la determinación de inositolos fosfato

V.1.1.2.b. Papillas infantiles

En las papillas infantiles utilizadas en este estudio, tal y como se muestra en la Tabla 14 el mayor contenido en inositoles fosfato lo presentó la papilla de Guisantes y Zanahorias Ecológica, seguida de la papilla Ocho Cereales-miel. Distintos autores han estudiado los niveles de ácido fítico en harinas infantiles (Gibson *et al.*, 1998; Brooks y Lampi, 2001; Febles *et al.*, 2001; Lind *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006) observando niveles similares a los encontrados en las papillas infantiles empleadas en este estudio. No obstante, las variaciones encontradas están en función de los ingredientes empleados y de la proporción de los mismos en el producto final.

Tabla 14. Niveles de inositoles fosfato (mg/100 g) en las papillas infantiles empleadas en este estudio

PAPILLA	<i>IP</i>₅	<i>IP</i>₆	<i>IP</i>₅+<i>IP</i>₆
Guisantes-zanahorias ecológicos	157.8 ± 0.3 ^a	272.9 ± 4.2 ^a	430.7
Ocho cereales-miel	133.4 ± 0.9 ^b	186.2 ± 2.2 ^b	319.6
Trigo	137.9 ± 0.2 ^b	157.6 ± 10.2 ^b	295.5
Crema de arroz	59.8 ± 7.1 ^c	107.3 ± 20.4 ^c	167.1
Multicereales	43.5 ± 1.3 ^d	100 ± 9.3 ^c	143.5
Cereales sin gluten	131.9 ± 4.4 ^b	167.9 ± 12.5 ^b	299.8

Cada valor es la media ± error típico (n=5). Letras distintas (a-d) como superíndice de los valores medios dentro de la misma columna muestran diferencias significativas para p<0,05

Quizás es necesario remarcar que aun tratándose de harinas refinadas se observan niveles considerables de inositoles de elevado número de fosfatos en las papillas infantiles comerciales elaboradas a partir de estos ingredientes, que se consideran suficientes para poder comprometer la disponibilidad mineral lo cual implicaría la necesidad de incluir un tratamiento que produjese una mayor degradación de estos inositoles fosfato.

V.1.2. CONTENIDO MINERAL (Fe, Ca y Zn) Y COCIENTES MOLARES ENTRE EL ÁCIDO FÍTICO Y Fe, Ca, Zn EN LAS PAPILLAS INFANTILES

Los alimentos infantiles empleados en este estudio, están elaborados a base de cereales, y han sido enriquecidos en hierro y en calcio, a fin de cubrir buena parte de las necesidades diarias recomendadas durante la infancia (NRC, 1991; Ferguson *et al.*, 2006).

Los contenidos de Fe, Ca y Zn fueron determinados por espectrofotometría de absorción atómica, y se muestran en la Tabla 15. En ella podemos observar que, en las papillas infantiles elaboradas con cereales los niveles de Fe se encuentran dentro del rango 7.5-12 mg/100 g, los de Ca 137-386 mg/100 g y los de Zn 1-1.5 mg/100 g, y que aportan unas proporciones adecuadas de cada mineral para cubrir las necesidades dietéticas recomendadas en niños menores de seis meses (NRC, 1991) Los porcentajes de la cantidad diaria recomendada de Fe, Ca y Zn que aporta cada papilla, son también presentados en la Tabla 15.

Debido a que el calcio procedente de la leche materna es más biodisponible que el calcio procedente de fórmulas infantiles (58% y 38% respectivamente), la concentración de calcio presente en las fórmulas infantiles y leches de continuación es en general relativamente elevada (Bosscher *et al.*, 2003; Greer *et al.*, 2006), lo mismo sucede para el caso del hierro, ya que el procedente de la leche materna es de 12 a 22 veces más biodisponible que el presente en las fórmulas infantiles (Kaup, 1998).

Tabla 15. Contenido en Fe, Ca y Zn de las papillas infantiles y leche de continuación

PAPILLA	Fe (mg/100 g)	Ca (mg/100 g)	Zn (mg/100 g)
Guisantes-zanahorias ecológicos	10.5 ± 0.1 (175%)	386 ± 8.9 (96.5%)	1.2 ± 0.4 (24%)
Ocho cereales-miel	8.3 ± 0.4 (138.3%)	137.3 ± 5.6 (34.3%)	0.6 ± 0.3 (12%)
Trigo	12 ± 0.7 (200%)	280 ± 22.3 (70%)	0.7 ± 0.3 (14%)
Crema de arroz	8.8 ± 0.1 (147%)	283.1 ± 27.7 (70.8%)	1.2 ± 0.2 (24%)
Multicereales	8.7 ± 0.2 (145%)	174.4 ± 21.0 (43.6%)	1.5 ± 0.4 (30%)
Cereales sin gluten	7.5 ± 1 (125%)	154.4 ± 38.9 (38.6%)	1 ± 0.3 (20%)
Leche de continuación	9 ± 0.2 (150%)	600.0 ± 49.6 (150%)	4.7 ± 0.9 (94%)

Cada valor es la media de cinco determinaciones ± error típico

En la Tabla 16 se presentan los valores de los cocientes molares de los inositoles hexa- y pentafosfato en relación a los minerales estudiados en el presente trabajo para cada una de las papillas infantiles empleadas. Este cálculo establece una relación entre los contenidos en inositoles de elevado número de fosfatos, con el contenido en minerales de cada muestra y es empleado como predictor de la biodisponibilidad mineral (Perlas y Gibson, 2005).

Tabla 16. Cocientes molares (IP₅+IP₆):hierro, calcio y cinc de las papillas infantiles

PAPILLA	(IP₅+IP₆):Fe	(IP₅+IP₆):Ca	(IP₅+IP₆):Zn
Guisantes-zanahorias ecológicos	4.6	0.07	35
Ocho cereales-miel	3.8	0.16	53.1
Trigo	2.1	0.06	44.5
Crema de arroz	1.6	0.11	14.4
Multicereales	1.4	0.07	9.8
Cereales sin gluten	3.5	0.18	31.8

Los resultados obtenidos muestran que para el caso del hierro, todas las papillas infantiles presentaron un ratio molar igual o superior a 1,4. Hurrell, (2004), estableció que en los alimentos infantiles este cociente molar debe ser inferior a 0,4 para conseguir una adecuada absorción del hierro. Por lo tanto, en todas las muestras estudiadas la disponibilidad del hierro quedaría seriamente disminuida.

Para el calcio, en nuestras muestras, tal como se muestra en la Tabla 16, hemos obtenido valores del cociente molar inferiores a 0,2. Valores superiores a 0,24 comprometen la disponibilidad del calcio (Ma *et al*, 2005). Mientras que otros autores (Marounek *et al*, 2003) señalan valores inhibitorios de la absorción del calcio con cocientes más altos (3:1).

Los ratios molares encontrados para el ácido fítico:cinc en las muestras se presentan igualmente en la tabla 16. La papilla Multicereales, presenta el menor valor de este cociente (9,8:1); observándose el mayor valor en la papilla Ocho cereales-miel, con un ratio de 53,1:1. Según la bibliografía encontrada (Gibson y Hotz, 2000; Ma *et al*, 2005; Perlas y Gibson, 2005), valores de este ratio superiores a 15, o incluso superiores a 12 (Nititham *et al*, 1999) comprometen seriamente la disponibilidad del cinc, por lo que en todas las muestras estudiadas existe un compromiso en la disponibilidad del zinc con excepción de la papilla Multicereales. No obstante, estos valores son habituales en la alimentación complementaria elaborada a base de cereales, mientras que para aquellos alimentos elaborados únicamente con arroz se encuentran los niveles más bajos de este ratio, en torno a 15 (Gibson y Hotz, 2000).

V.2. ESTUDIO 2

V.2.1. EFECTO DEL PROCESADO EN LABORATORIO EN EL CONTENIDO DE INOSITOLES FOSFATO DE LAS PAPILLAS INFANTILES

Existen numerosos métodos para disminuir el contenido de fitato en los cereales que se basan en adecuar las condiciones para estimular la actividad de la enzima fitasa endógena, presente de forma natural en las semillas de cereales, oleaginosas y legumbres. Estos métodos incluyen la germinación, el remojo de los cereales o la fermentación (Hotz y Gibson, 2001 b). Muchos de estos procesos son utilizados de forma tradicional para la preparación de diversos tipos de alimentos destinados a la población de países en desarrollo donde los cereales son la base de la alimentación. Puesto que los cereales infantiles constituyen uno de los alimentos básicos durante el destete, es importante caracterizar los cambios que se producen en la concentración de inositoles fosfato durante su procesado, con el fin de mejorar la biodisponibilidad de los minerales presentes o añadidos en diferentes formas químicas.

El efecto del procesado tecnológico de las papillas infantiles se estudió mediante la aplicación en nuestro laboratorio de las fases de tostado y tratamiento enzimático con alfa-amilasa de las harinas infantiles y sus mezclas. Se reprodujeron estas fases del procesado (ver Figura 14 de Material y métodos de este trabajo) en las mismas condiciones de pH y de temperatura que se aplican en la empresa Hero España S.A. para la elaboración de estos productos.

V.2.1.1. Tostado y tratamiento alfa-amilasa de las harinas de cereales

Los inositoles penta- y hexafosfato suponen aproximadamente un 90% del contenido total en inositoles fosfato contenidos en los cereales crudos (Agte *et al*, 1999). Estas moléculas están relacionadas con una disminución en la absorción de minerales a nivel intestinal (Sandberg y Svanberg, 1991). Por lo tanto, la reducción en el contenido de IP₅ e IP₆ se considera deseable durante el procesado industrial de las papillas infantiles procedentes de

cereales, a fin de prevenir el efecto negativo que pueden ejercer sobre la disponibilidad mineral. Diferentes autores han estudiado el efecto del malteado (Larsson y Sandberg, 1991; Gahlawat y Sehgal, 1993; Trugo *et al.*, 1999), tostado o cocido (Gahlawat y Sehgal, 1993; Agte *et al.*, 1999; Hurrell *et al.*, 2002 b) y de la alfa amilasa (Matsubara *et al.*, 2004; Traoré *et al.*, 2004; Zorov *et al.*, 2005) sobre los cereales.

V.2.1.1.a. *Tostado*

En nuestro estudio hemos observado que tras el tostado de las harinas de cereales y de sus mezclas en el laboratorio, se produjo una importante degradación del contenido en ácido fítico (IP₆), así como un marcado incremento en el contenido de inositol pentafofato (IP₅) (Tabla 17) en la mayoría de las muestras analizadas con respecto a su contenido en las harinas crudas (p<0,05).

La degradación de IP₆ implica un proceso de desfosforilación que conduce a la aparición de distintos productos de hidrólisis como penta- (IP₅), tetra- (IP₄), tri- (IP₃), di- (IP₂) y monofosfato (IP₁) (Skoglund *et al.*, 1997). Los últimos cuatro isómeros poseen una menor capacidad quelante de minerales (Phyllippy *et al.*, 1988; Kozłowska *et al.*, 1996). El incremento en los niveles de IP₅ observado tras el tratamiento de tostado en el laboratorio tanto de las harinas de cereales individualmente, como de sus mezclas, nos indica que este tratamiento es insuficiente para lograr la degradación del IP₆ a isómeros de un menor número de fosfatos ya que ningún inositol con menos de cinco fosfatos fue detectado tras el tratamiento de tostado de las muestras.

Tabla 17. Efecto del tostado en el contenido de los inositoles hexafosfato (mg/100 g) de las materias primas seleccionadas para la elaboración de las papillas infantiles empleadas en este estudio

HARINA	HARINAS CRUDAS	HARINAS TOSTADAS	Disminución (%)
	IP ₆	IP ₆	
Arroz	328.5 ± 5.4 ^a	305.4 ± 4.4 ^b	7
Trigo	209.0 ± 1.5 ^a	48.3 ± 1.5 ^b	76.9
Maíz	410.3 ± 2.7 ^a	285.2 ± 3.7 ^b	30.5
Centeno	188.6 ± 6.3 ^a	84.1 ± 1.9 ^b	55.4
Cebada	639.0 ± 2.1 ^a	257.7 ± 9.0 ^b	59.7
Sorgo	1028.8 ± 12.9 ^a	612.6 ± 12.6 ^b	40.5
Mijo	1099.4 ± 8.3 ^a	603.8 ± 4.9 ^b	45.1
Avena	1119.6 ± 9.3 ^a	46.8 ± 1.9 ^b	95.8
Arroz ecológico	488,5±16,9 ^a	ND	-
Maíz ecológico	ND	ND	-
Tapioca	ND	ND	-
Guisantes	ND	ND	-
Zanahorias	ND	ND	-

Los valores se corresponden con la media ± la desviación típica (n=5). Todas las diferencias observadas entre las harinas crudas y tostadas fueron significativas (p<0.05) (a-b). ND: no detectado

Los contenidos en inositol pentafofosfato (IP₅) de las harinas de cereales, así como las modificaciones en su contenido tras el tostado, se presentan en la Tabla 18. En ella se puede observar que no se detectó IP₅ ni en harinas crudas ni en tostadas de trigo y centeno. El tostado incrementó significativamente (p<0,05) el contenido en IP₅ del maíz, sorgo, avena, mijo y arroz. Tras el tostado de las harinas de cebada y de arroz ecológico, no detectamos inositol pentafofosfato en las muestras estudiadas.

Tabla 18. Efecto del tostado en el contenido de los inositoles pentafosfato (mg/100 g) de las materias primas seleccionadas para la elaboración de las papillas infantiles empleadas en este estudio

HARINA	HARINAS CRUDAS	HARINAS TOSTADAS	INCREMENTO (%)
	IP ₅	IP ₅	
Arroz	138.5 ± 13.3 ^b	198.0 ± 1.8 ^a	43
Trigo	ND	ND	ND
Maíz	42.6 ± 0.5 ^b	199.2 ± 2.1 ^a	367.6
Centeno	ND	ND	ND
Cebada	82.6 ± 0.3 ^a	ND	ND
Sorgo	144.6 ± 3.6 ^b	225.5 ± 5.6 ^a	55.9
Mijo	160.4 ± 0.8 ^b	247.1 ± 3.6 ^a	54.1
Avena	184.2 ± 0.8 ^b	197.7 ± 1.7 ^a	7.3
Arroz ecológico	134.3 ± 0.2 ^a	ND	-
Maíz ecológico	ND	ND	-
Tapioca	ND	ND	-
Guisantes	ND	ND	-
Zanahorias	ND	ND	-

Los valores se corresponden con la media ± la desviación típica (n=5). Todas las diferencias observadas entre harina cruda y tostada fueron significativas (p<0.05) (a-b). ND: no detectado

Se sabe que la degradación de los inositoles fosfato en los cereales, puede tener lugar como consecuencia de la actividad de la fitasa endógena presente (Sandberg & Svangerg, 1991) y/o debido a la aplicación de un tratamiento térmico (Hurrell *et al*, 2002). Sin embargo, debido a que, las condiciones de aplicación del tratamiento térmico (120°C, 30 minutos) de tostado de las harinas de cereales no eran las óptimas para la actividad de la fitasa endógena, que se encuentra en torno a 55°C (Hurrell, 2004), podemos considerar que la degradación del IP₆ observada se debe en sí a la acción del calor. Agte *et al.*, (1999) pusieron igualmente de manifiesto que la degradación del fitato no ocurre únicamente por activación de las fitasas, sino también por la aplicación de elevada temperatura. De hecho, estos autores demostraron un incremento en la solubilidad de los minerales en semillas de leguminosas tras someterlas a un tratamiento de tostado.

V.2.1.1.b. Tratamiento enzimático: alfa-amilasa

Para una mejor caracterización del efecto del procesado industrial sobre los inositoles fosfato, hemos evaluado el efecto de la adición de alfa-amilasa a los cereales. La principal finalidad de la adición de esta enzima a los cereales infantiles es, facilitar la digestibilidad del almidón, ya que hidroliza éste a oligosacáridos. La aplicación de este tratamiento consigue

incrementar el dulzor de la papilla al tiempo que le otorga una mejor consistencia, haciéndola menos espesa. Por lo tanto, la aplicación de alfa-amilasa, incrementa la solubilidad de las harinas, permitiendo una mayor densidad energética de los cereales tratados y una mejora en sus características organolépticas (Pérez-Conesa *et al.*, 2002; Moursi *et al.*, 2003).

Las modificaciones en el contenido de inositoles fosfato tras la aplicación del tratamiento con alfa-amilasa de cada una de las harinas de cereales, se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Efecto de la adición de alfa-amilasa en el contenido de inositoles fosfato (mg/100 g) de las materias primas tostadas

HARINA	HARINAS TOSTADAS		HARINAS TOSTADAS+ALFA-AMILASA		
	IP ₆	IP ₅	IP ₆	IP ₅	IP ₄
Arroz	305.4 ± 4.4 ^a	198.0 ± 1.8 ^a	278 ± 3.1 ^b	200.4 ± 4.7 ^a	ND
Trigo	48.3 ± 1.5 ^a	ND	ND	ND	ND
Maíz	285.2 ± 3.7 ^a	199.2 ± 2.1 ^a	153.2 ± 2.8 ^b	14.3 ± 1.9 ^b	ND
Centeno	84.1 ± 1.9 ^a	ND	ND	ND	ND
Cebada	257.7 ± 9.0 ^a	ND	67.7 ± 4.9 ^b	71.6 ± 2.2 ^a	ND
Sorgo	612.6 ± 12.6 ^a	225.5 ± 5.6 ^b	599.2 ± 4.8 ^a	266.3 ± 5.8 ^a	ND
Mijo	603.8 ± 4.9 ^a	247.1 ± 3.6 ^b	446.6 ± 7.0 ^b	277.5 ± 3.8 ^a	204 ± 6.6
Avena	46.8 ± 1.9 ^a	197.7 ± 1.7 ^a	ND	ND	ND
Arroz ecológico	ND	ND	ND	ND	ND
Maíz ecológico	ND	ND	ND	ND	ND
Tapioca	ND	ND	ND	ND	ND
Guisantes	ND	ND	ND	ND	ND
Zanahorias	ND	ND	ND	ND	ND

Los valores se corresponden con la media ± la desviación típica (n=5). Letras distintas (a-b) como superíndice para cada inositol fosfato indica diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). ND: no detectado

La aplicación del tratamiento enzimático con alfa-amilasa sobre las harinas de cereales tostadas produjo, tal y como se observa en la Tabla 19, un descenso en el contenido de IP₆ en todas las muestras; no hubo niveles detectables de esta molécula tras el tratamiento enzimático en las harinas de centeno, trigo y avena tostadas. Del mismo modo, se observó un incremento en el contenido de inositol pentafofosfato tras el tratamiento enzimático con alfa-amilasa en las harinas de cebada, sorgo, mijo y arroz. Observamos la aparición de inositol tetrafosfato (IP₄) (204 mg/100 g) tras el tratamiento enzimático de la harina de mijo tostada. La disminución en el contenido de IP₆ observada tras el tratamiento enzimático podría ser debida a varios efectos tales como son, la disolución del fitato en agua ya que parte del

mismo es hidrosoluble (Perlas y Gibson, 2005) o bien por la activación de la fitasa endógena del cereal, ya que las condiciones aplicadas durante el tratamiento con alfa-amilasa son favorables para la actividad de la misma (Leenhardt *et al.*, 2005). Según los resultados obtenidos, existe una amplia variación en la degradación del fitato que depende del tipo de cereal. Según Traoré *et al.* (2004), también es influyente la variedad y el origen de las semillas de cereales, así como las condiciones de almacenamiento en la actividad de la fitasa endógena. Es importante seleccionar como materia prima de las papillas infantiles, aquellos cereales con un menor contenido en inositol fosfato tras el tratamiento enzimático, por lo que el sorgo y el mijo no deberían encontrarse en altas proporciones en las mezclas de cereales utilizadas para formular el producto final, ya que estos cereales poseen además una baja actividad de fitasa endógena (Eeckhout, 1994).

Tras el análisis de las harinas de forma individual, las mezclas de cereales según la receta del fabricante para cada una de las papillas infantiles, fueron tostadas y posteriormente sometidas a tratamiento enzimático, siguiendo el proceso detallado en la sección Material y Métodos de este trabajo.

Los contenidos en inositol pentafofato de las papillas infantiles tras el tostado se muestran en la Tabla 20 se puede observar que el tostado de la mezcla de cereales, produjo un incremento significativo ($p < 0,05$) en el contenido de inositol pentafofato en todas las mezclas analizadas, a excepción del trigo, en el que no se detectó IP_5 en ninguna de las etapas. El mayor incremento de esta molécula, aproximadamente en un 220%, se observó en la mezcla de guisantes y zanahorias ecológicos. Para el resto de las mezclas estudiadas, tal como se muestra en la tabla, el incremento en el contenido en IP_5 tras el tostado estuvo comprendido entre un 40% en la mezcla de la papilla Crema de arroz, y un 105% para la mezcla de Multicereales.

El efecto del tratamiento con alfa-amilasa sobre el contenido en inositol pentafofato (IP_5) de las harinas tostadas, se presenta igualmente en la Tabla 20. En ella se puede apreciar que este tratamiento ejerce un fuerte efecto de disminución sobre el contenido en IP_5 , ya que en cuatro de las seis muestras estudiadas (Ocho cereales miel, Trigo, Multicereales y Cereales

sin gluten) no se detectaron niveles de IP₅. Este hecho, podría estar debido a que una vez que la molécula de IP₆ es hidrolizada a IP₅, la molécula de IP₅ formada tiene una mayor probabilidad de ser hidrolizada que el IP₆ por dos motivos fundamentales. En primer lugar, la molécula de inositol pentafofato se encuentra en el grano de cereal situada más próxima a la fitasa endógena; y la segunda razón sería la mayor solubilidad que presenta la molécula de IP₅ debido a que la solubilidad de los inositoles fosfato incrementa conforme disminuye el número de grupos fosfato (Phillippy *et al.*, 1988).

En el caso de la mezcla de Guisantes y zanahorias ecológicos, su contenido disminuyó en un 66% después del tratamiento enzimático; mientras que en el caso de la mezcla de la papilla Crema de arroz, se observó un incremento en inositol pentafofato tras el tratamiento enzimático, aunque éste no fue significativo ($p < 0,05$).

Tabla 20. Contenido en inositol pentafofato (mg/100 g) de las mezclas de cereales de las papillas infantiles tras los procesos de tostado y con alfa-amilasa en laboratorio

PAPILLA INFANTIL	MEZCLA HARINAS INFANTILES CRUDAS	TRATAMIENTO APLICADO	
		TOSTADO	TOSTADO Y ALFA-AMILASA
Guisantes-zanahorias ecológicos	61.5 ± 0.9 ^c	198 ± 2.5 ^a	66 ± 3.3 ^b
Ocho cereales-miel	25.9 ± 0.9 ^b	49 ± 1 ^a	ND
Trigo	ND	ND	ND
Crema de arroz	138.5 ± 2.9 ^b	195.5 ± 2 ^a	197.9 ± 2.7 ^a
Multicereales	24.4 ± 1.3 ^b	50 ± 1.7 ^a	ND
Cereales sin gluten	110.7 ± 1.7 ^b	198.1 ± 1.8 ^a	ND

Los resultados se corresponden con la media y desviación típica (n=5). Diferentes letras (a-c) como superíndice en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tratamientos

En la tabla 21, se muestra el contenido en inositol hexafofato (IP₆) de cada mezcla de las papillas infantiles crudas, tostadas y tras el tratamiento enzimático con alfa-amilasa. Tal y como se puede observar, el contenido de IP₆ se redujo significativamente ($p < 0,05$) tras el tostado de las harinas. La disminución en el contenido de IP₆ que se produce tras el tostado ha sido observada por numerosos autores (Hussain *et al.*, 1989; Chitra, 1996) para distintos vegetales. Se produjeron descensos particularmente importantes en las mezclas de Trigo, Ocho cereales miel y Multicereales con pérdidas en torno al 50% de su contenido inicial. El

contenido de IP₆ se redujo en menor medida (aproximadamente un 25%) en las mezclas de Guisantes y zanahorias ecológicos, Cereales sin gluten y Crema de arroz.

También se muestra en la Tabla 21, el efecto del tratamiento con alfa-amilasa sobre el contenido en IP₆ de las papillas infantiles. Se produjo un marcado descenso ($p < 0,05$) en su contenido tras el tratamiento en todas las muestras estudiadas, de hecho, no se detectó IP₆ tras el tratamiento enzimático en las papillas de Trigo y Multicereales. Se observó un marcado descenso en los niveles de IP₆ en las mezclas de Guisantes y zanahorias ecológicos, Cereales sin gluten, Multicereales y Trigo, mientras que en la papilla Crema de arroz, el descenso no fue tan marcado.

Tabla 21. Contenido en inositol hexafosfato (mg/100 g) de las mezclas de cereales de las papillas infantiles tras los procesos de tostado y con alfa-amilasa en laboratorio

MEZCLA HARINAS INFANTILES	MEZCLA HARINAS INFANTILES CRUDAS	TRATAMIENTO APLICADO	
		TOSTADO	TOSTADO Y ALFA-AMILASA
Guisantes-zanahorias ecológicos	383.2 ± 5.8 ^a	292.2 ± 1.1 ^b	112 ± 9.9 ^c
Ocho cereales-miel	285.5 ± 3.9 ^a	112.9 ± 3.3 ^b	72 ± 6.6 ^c
Trigo	195.9 ± 2.8 ^a	45,4 ± 0.9 ^b	ND
Crema de arroz	328.5 ± 5.5 ^a	300.8 ± 5.1 ^b	274.5 ± 10.4 ^c
Multicereales	254.9 ± 2.8 ^a	126.8 ± 0.7 ^b	ND
Cereales sin gluten	324,4 ± 6.1 ^a	283.1 ± 7.1 ^b	116.2 ± 5.8 ^c

Los resultados se corresponden con la media y desviación típica (n=5). Diferentes letras (a-c) como superíndice en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tratamientos.

Es interesante destacar la actividad enzimática de alfa-amilasa, ya que juega un importante papel en la degradación de los fitatos durante la germinación de las semillas de los cereales, incrementándose de un modo natural su actividad y la de la fitasa durante esta etapa. Por este motivo, también se emplean en algunos países harinas germinadas para la elaboración de papillas infantiles, ya que así se hace posible la obtención de papillas con un mayor contenido en energía y densidad de nutrientes, al tiempo que con un menor ratio fitato:mineral (Hotz y Gibson, 2001 a). En este sentido, se podría afirmar que el empleo de alfa-amilasa puede ayudar a reducir el contenido en el contenido de ácido fítico en las harinas de cereales, debido más probablemente a un incremento en la fluidez de la papilla

(incrementándose la solubilidad de los inositoles fosfato), que a una acción directa de la alfa-amilasa sobre el fitato. Tal como se muestra en la Figura 15 del Material y Métodos de este trabajo, el procesado industrial de las harinas infantiles implica el tostado y la aplicación de alfa-amilasa sobre las mismas. Sin embargo, de los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que el procesado industrial no degrada la totalidad de los fitatos presentes en las materias primas, de tal modo que cantidades considerables de inositoles de elevado número de fosfatos continúan presentes en las papillas infantiles al final del proceso, por lo que la fitasa endógena de cada cereal empleado en la elaboración de las papillas infantiles, no degradaría de un modo suficiente los inositoles fosfato presentes. En este sentido, Cook *et al.*, (1997) y Cisse *et al.*, (1998) estudiaron el efecto del procesado sobre cereales destinados a alimento infantil, comprobando que la disponibilidad mineral de éstos al final del proceso incrementaba como consecuencia de la degradación de su contenido en ácido fítico, pero continuaba siendo insuficiente para cubrir los requerimientos de hierro a estas edades.

V.2.2. Desfitinización de las papillas infantiles

Según Hurrell (2004), la forma más eficaz para degradar completamente el ácido fítico, es la adición de una fitasa exógena. Esta estrategia se ha utilizado experimentalmente en fórmulas infantiles preparadas con soja (Davidsson *et al.*, 1994) y con guisantes (Davidsson *et al.*, 2001); y también en cereales infantiles (Hurrell *et al.*, 2003) utilizando fitasa de *Aspergillus niger*. De esta manera, se ha estudiado la eliminación del contenido de ácido fítico en las papillas infantiles mediante la adición de fitasa de origen exógeno. Previamente a la aplicación del tratamiento, se estudió del efecto de dos fitasas microbianas de distinto origen (*Aspergillus niger* y de *Aspergillus oryzae*) sobre una disolución patrón de ácido fítico, controlando las condiciones de pH y temperatura para intentar degradar al máximo dicho antinutriente.

Las fitasas disponibles en el mercado no contienen microorganismos vivos ni ADN, pero se suelen producir por organismos modificados genéticamente, por lo que su uso está regulado por normativas que difieren en función del país. No obstante, en producción

animal se emplean de manera habitual para disminuir el nivel de fosfatos en las heces (por razones medioambientales).

V.2.2.1. Optimización del tratamiento enzimático con fitasa

Tras la incubación durante veinte minutos de una disolución de fitato de sodio (1.5 mmol/L) con cada una de las enzimas a una T^a constante de 55°C se comprobó mediante HPLC que tal y como muestra la Figura 18, finalizado el período de incubación, que se producía la degradación completa del IP₆ en ambos casos en un rango de pH 5-6.2.

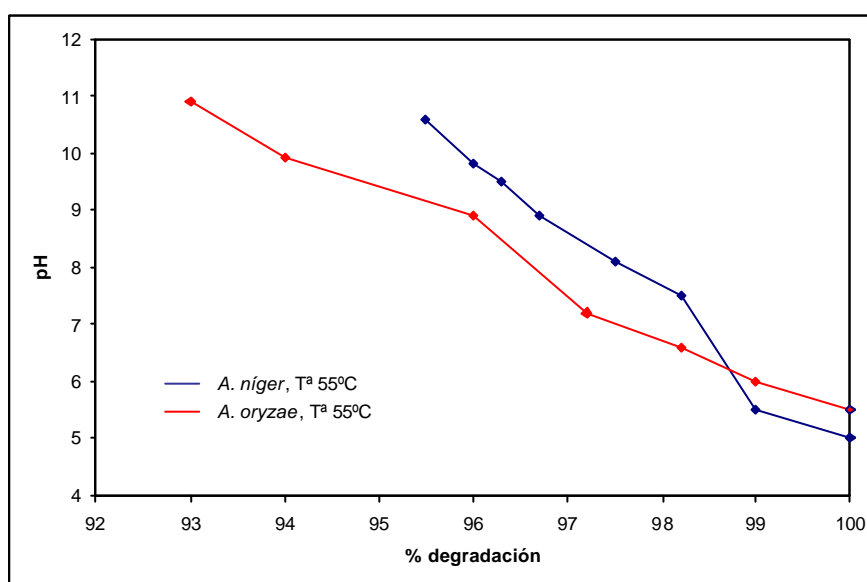


Figura 18. Degradación de ácido fitico mediante la acción de las fitasas procedentes de *A. niger* (T^a 55°C) y *A. oryzae* (T^a 55°C) sobre el ácido fitico en diferentes condiciones de pH. Cada punto representa el valor medio de tres determinaciones tomadas tras 20 min de incubación

Los resultados obtenidos nos muestran que la fitasa procedente de *Aspergillus oryzae* (2500 FTU/g), produjo una degradación del 99-100% del fitato dentro de un rango de pH comprendido entre 5-5.7 a 55°C. Mientras que la fitasa de *Aspergillus niger*, produjo la misma degradación dentro de un rango de pH de 5.5-6.2 a 55°C. Estos resultados, coinciden con los obtenidos por Sandberg *et al*, (1996) en el que se obtiene que el pH óptimo de actividad de la fitasa de *Aspergillus niger* es 6. Según estos resultados, decidimos emplear en nuestro estudio la fitasa procedente de *A. oryzae*, ya que sus condiciones de máxima actividad coincidían con las utilizadas en la elaboración de las papillas infantiles (pH 5.5 y T^o 55°C) durante la etapa

de aplicación de la alfa-amilasa. No obstante, según Brinch-Pedersen *et al.*, (2006) las fitasas procedentes del hongo del género *Aspergillus* degradan en general eficazmente el ácido fítico.

V.2.2.2. Adición de fitasa de *A. oryzae* sobre las papillas infantiles

La desfitinización de las papillas infantiles elaboradas a base de cereales empleando una fitasa exógena procedente de *Aspergillus* a fin de incrementar la biodisponibilidad mineral de las mismas, no ha sido ampliamente estudiada hasta el momento (Hurrell, 2004). En nuestro estudio, una vez optimizado el tratamiento enzimático mediante el empleo de una solución de fitato de sodio, se procedió a la aplicación de fitasa de *Aspergillus oryzae* (2500 FTU/g) sobre las papillas infantiles durante un período de 20 minutos, siguiendo el protocolo y dosis que se detallan en el apartado III.5.2 de la sección Material y métodos de este trabajo. Tras la aplicación del tratamiento, las muestras se desecaron, y trituraron procesándose a continuación para su análisis en HPLC según Lehrfeld (1989, 1994), (ver apartado III.1.3 de Material y Métodos), comprobándose la ausencia de inositolos fosfato en todas las muestras antes de su empleo en el estudio siguiente.

V.3. ESTUDIO 3

V.3.1. DIGESTIÓN “IN VITRO” DE LAS PAPILLAS INFANTILES. EFECTO DE LA DESFITINIZACIÓN Y DE LA ADICIÓN DE FÓRMULA INFANTIL. DETERMINACIÓN DEL MINERAL SOLUBLE Y DIALIZABLE

A partir de las papillas infantiles empleadas en este estudio y cuya composición mineral se detalla en la Tabla 15 del apartado V.II, se determinaron las fracciones minerales soluble y dializada a partir de la digestión *in vitro* de las muestras. Estos métodos son rápidos y fáciles para estimar en que medida los minerales de los alimentos podrían ser potencialmente absorbidos por el organismo, aunque no contemplan ningún aspecto fisiológico (Skibniewska *et al.*, 2002).

V.3.1.1. Fracción soluble

Las fracciones solubles (%) obtenidas tras la digestión *in vitro* de las muestras (papillas infantiles desfitinizadas o no y elaboradas con agua o con leche de continuación) se detallan a continuación para cada mineral estudiado.

V.3.1.1.a. Hierro

En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos para los porcentajes de solubilidad del hierro en las distintas muestras. En ella se puede observar que las papillas Multicereales, Crema de arroz, Cereales sin gluten y Trigo presentaron un mayor porcentaje de hierro soluble tras mezclarse con fórmula infantil con respecto a la elaborada con agua. Obviamente, la cantidad de hierro extra que es aportado por la fórmula infantil fue cuantificada previamente al cálculo del porcentaje de la fracción soluble, y creemos que su mayor solubilidad podría deberse a la distinta fuente de hierro utilizada para enriquecer las papillas elaboradas a base de cereales o la fórmula infantil, ya que en las primeras se emplea hierro elemental (reducido electrolíticamente) que es menos soluble que el hierro empleado en la leche de continuación (sulfato ferroso heptahidratado) (Kapsokefalou *et al.*, 2005). De nuestros resultados no podemos concluir que la presencia de ácido fítico ejerza influencia

sobre la solubilidad del hierro, estos resultados parecen estar de acuerdo con los obtenidos por Lestienne *et al.*, (2005) para la harina de mijo en la que una disminución del contenido en fitato no se tradujo en un incremento en la solubilidad del hierro, lo que indicaría el efecto inhibitorio de otros componentes de la fibra en la solubilidad. En el mismo sentido, Kayodé *et al.*, (2006 b) observaron que el porcentaje de solubilidad del hierro procedente de papillas infantiles a base de sorgo, no incrementó tras la degradación de su contenido en ácido fítico. Tal y como se observa en la Figura 19, en ningún caso el porcentaje de solubilidad alcanzó el 60%, observándose los valores más bajos (<20%) en la papilla Multicereales elaborada con agua tanto en la tratada enzimáticamente como en la no tratada. Cámara *et al.*, (2005) observaron valores de solubilidad del hierro más altos (16-97.9%) para el caso de menús escolares; mientras que Sahuquillo *et al.*, (2003) encontraron para tres leguminosas (garbanzo, judía y lenteja) valores de solubilidad inferiores a un 60.5%.

Las variaciones observadas en los valores obtenidos podrían estar probablemente debidas a los distintos alimentos de los que procede el mineral, al método de digestión *in vitro* empleado o la velocidad de centrifugación que ejerce una gran influencia sobre los minerales solubles (Sahuquillo *et al.*, 2003). Otros autores atribuyen las diferencias en los porcentajes de solubilidad del hierro a la aplicación de la digestión gastrointestinal *in vitro* a diferentes valores de pH. De este modo Kojima *et al.*, (1981) encontraron que en las judías, una digestión gástrica a pH 2 seguida de una digestión intestinal a pH 6 da lugar a porcentajes de hierro soluble más altos (25%) que los valores obtenidos por Kayodé *et al.*, (2006) para este mismo producto realizando la digestión gástrica a pH 3 y la intestinal a pH 5.

En nuestro caso, la digestión gástrica se desarrolló a pH 2 y la intestinal a pH 5, y se empleó menor concentración de enzimas digestivas siguiendo el protocolo de Bosscher *et al.*, (2001 b), lo cual podría justificar junto a los niveles de ácido fítico presentes, los menores porcentajes de solubilidad (<57%) del hierro encontrados en nuestro estudio con respecto a los valores obtenidos a partir de otros alimentos (Cámara *et al.*, 2005; Perales *et al.*, 2006).

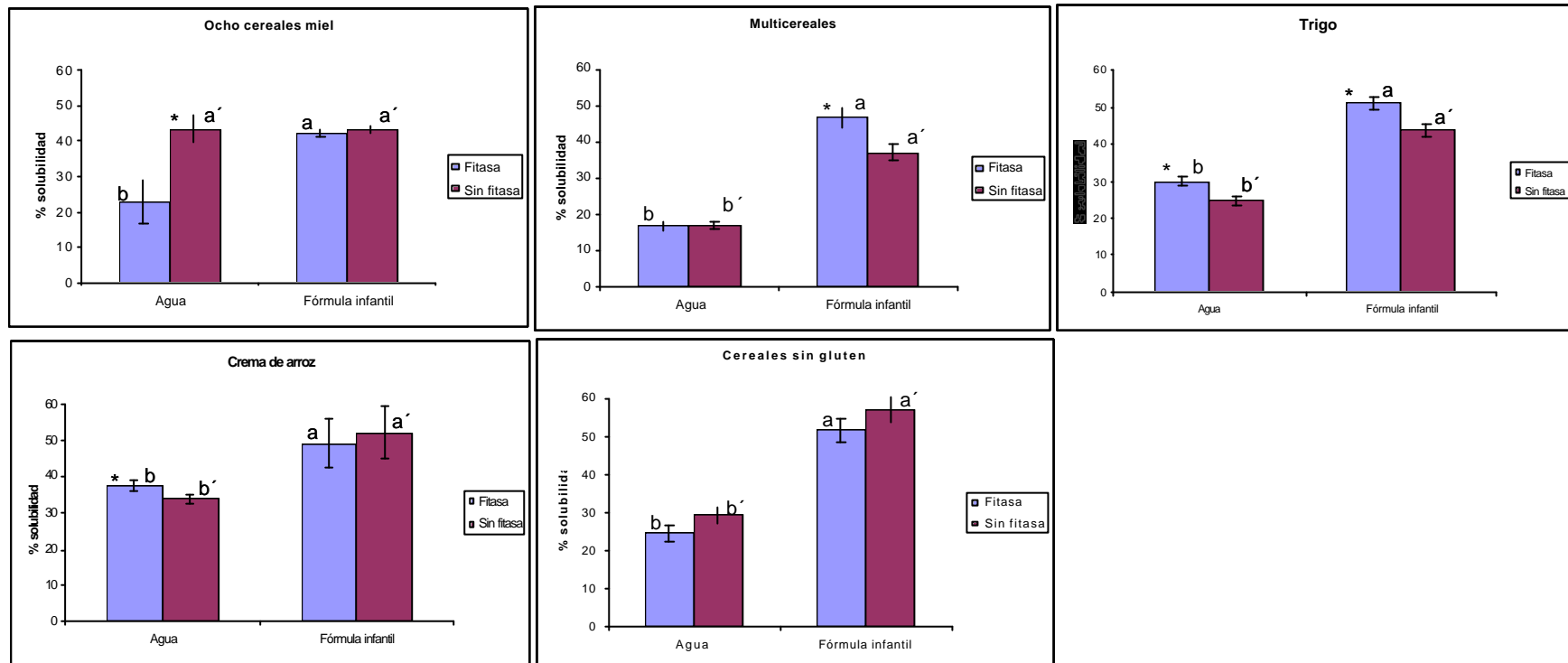


Figura 19. Porcentaje de solubilidad del hierro en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil

(a-b) y (a'-b') indican diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de hierro soluble de las papillas elaboradas y con agua o con fórmula tratadas con fitasa o no respectivamente. (*) indica diferencias estadísticamente significativas dentro de la papilla elaborada con agua o con fórmula infantil debidas al tratamiento con fitasa

V.3.1.1.b. Calcio

Los resultados obtenidos sobre el porcentaje de calcio soluble se muestran en la Figura 20. En ella podemos observar que en todas las papillas elaboradas con agua el calcio fue más soluble (22.9-85.6%) que en las papillas elaboradas con fórmula infantil (15.5-22.2%), siendo especialmente destacado el caso de la papilla Ocho cereales miel, en la que el calcio resultó ser cuatro veces más soluble en la papilla elaborada con agua frente a la elaborada con leche. Este hallazgo podría estar debido a la diferente forma química en que está presente el calcio en la fórmula infantil o en la papilla de cereales. De un modo similar a lo sucedido en el hierro, tras la desfitinización de la muestra no se observaron resultados que evidencien una modificación en la solubilidad del calcio. No obstante, la medida de la solubilidad no es indicativa de la disponibilidad del mineral, sino que tan solo ofrece una estimación relativa de la misma (Laparra *et al.*, 2005).

Los valores de solubilidad obtenidos en este estudio para las papillas elaboradas con agua, fueron superiores a los obtenidos por Sahuquillo *et al.*, (2003) para garbanzos, lentejas y judías (29.1-46.6%), siendo también superiores a los obtenidos por Roig *et al.*, (1999 a) (19.5%), empleando similares cantidades de enzimas en la digestión de fórmulas infantiles. Otros autores (Cámara *et al.*, 2005) que han estudiado la solubilidad de los minerales a partir de distintos menús escolares encontraron rangos de solubilidad del calcio entre 26-96%, o Perales *et al.*, (2005) a partir de distintos alimentos infantiles elaborados a base de frutas, cereales y leche obtuvieron valores de solubilidad del calcio entre 67.6-99.3%.

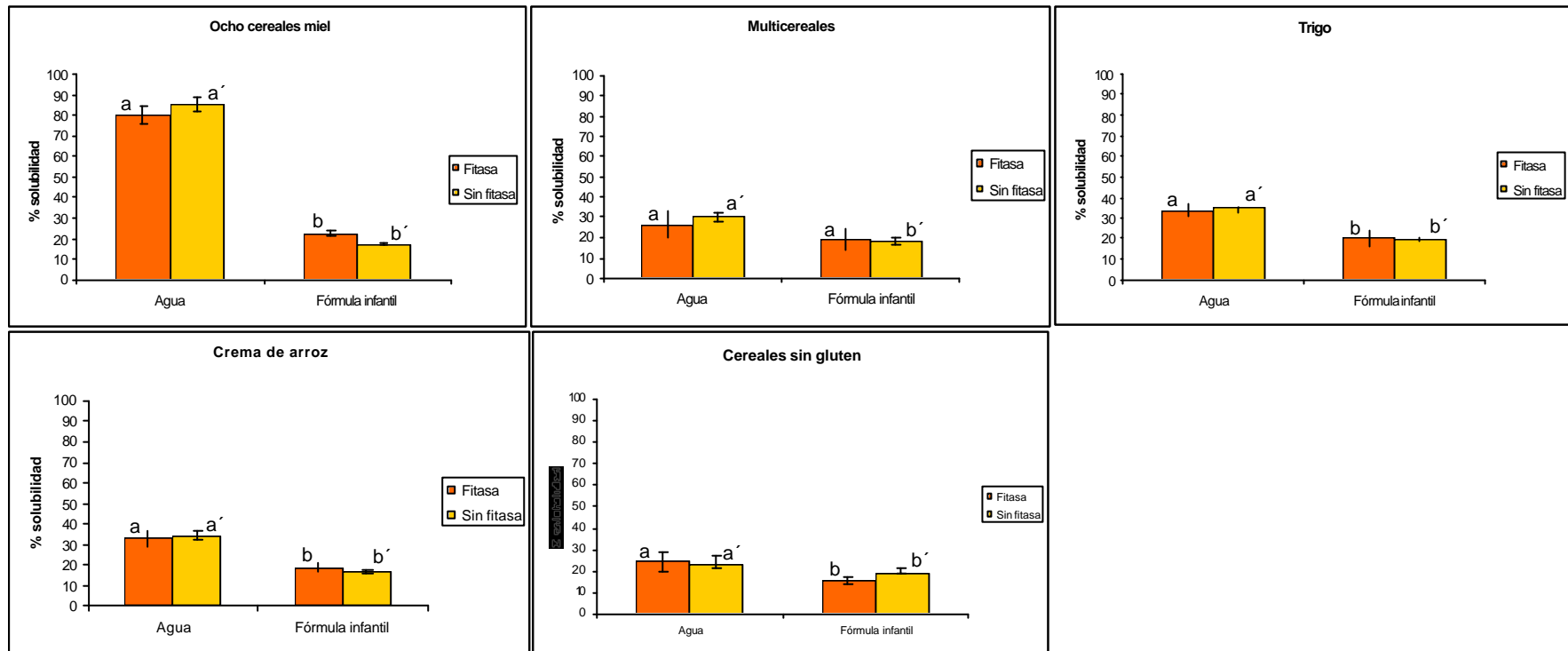


Figura 20. Porcentaje de solubilidad del calcio en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil

(a-b) y (a'-b') indican diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de calcio soluble de las papillas elaboradas con agua o con fórmula tratadas con fitasa o no respectivamente. (*) indica diferencias estadísticamente significativas dentro de la papilla elaborada con agua o con fórmula infantil debidas al tratamiento con fitasa

V.3.1.1.c. *Cinc*

Los resultados de la solubilidad del cinc de las muestras estudiadas, se muestran en la Figura 21. En ella podemos ver que del mismo modo a como sucede en el calcio, el porcentaje de mineral soluble a partir de las papillas elaboradas con agua fue mayor (29-50%) que en las papillas elaboradas con fórmula infantil (11.8-25%). No obstante, estos valores fueron superiores a los obtenidos por Bermejo *et al.*, (2002) para la leche materna y fórmulas infantiles empleando en la digestión gastrointestinal concentraciones de enzima similares a las empleadas en nuestro estudio.

En la papilla Crema de arroz se obtuvieron altos valores de solubilidad del cinc tanto en la papilla elaborada con agua (76.5-88.2%) como en la elaborada con fórmula (41.4-44.2%). No observamos del mismo modo a como sucede en el hierro y el calcio, que la desfitinización del producto se traduzca en un incremento en la solubilidad del cinc. De igual modo, estudios realizados sobre bebidas a base de sorgo con niveles de fitatos de aproximadamente 1 g/100 g, una disminución en el contenido en fitatos no se tradujo en un incremento en la solubilidad del cinc (Kayode *et al.*, 2006 a). Los valores de porcentaje de cinc soluble encontrados en la Papilla Ocho cereales miel, Multicereales, Cereales sin gluten y Trigo fueron similares a los encontrados por Kayodé *et al.*, (2006 b) para alimentos infantiles elaborados con sorgo y mezclados con agua (35-40%).

Los porcentajes de solubilidad del cinc obtenidos en otros estudios presentan una gran variabilidad, así Sahuquillo *et al.*, (2003) para legumbres obtuvieron valores dentro del rango 53.6-68.1%, y Cámara *et al.*, (2005) (35.7-92.3%) para distintos menús escolares.

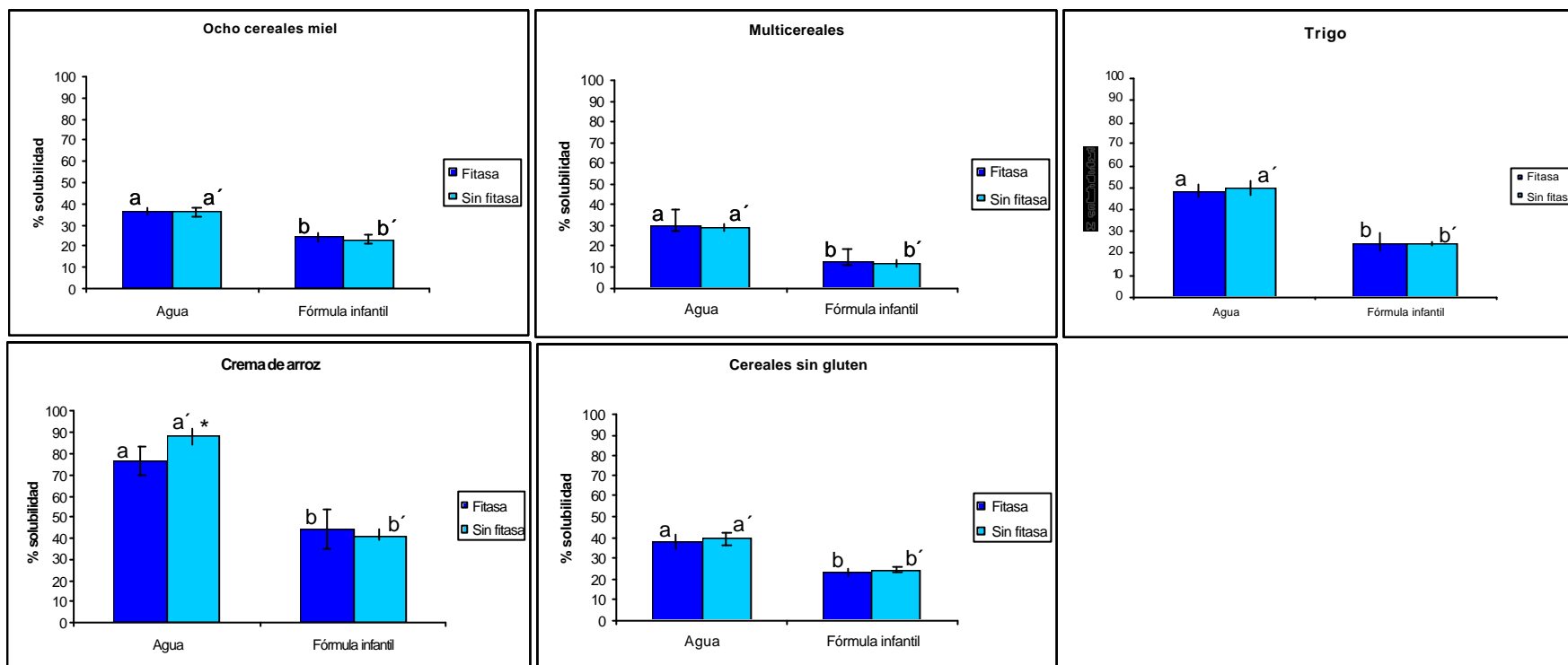


Figura 21. Porcentaje de solubilidad del cinc en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil

(a-b) y (a'-b') indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el porcentaje de cinc soluble de las papillas elaboradas con agua o con fórmula tratadas con fitasa o no respectivamente. (*) indica diferencias estadísticamente significativas dentro de la papilla elaborada con agua o con fórmula infantil debidas al tratamiento con fitasa

V.3.1.2. Fracción dializable

Las fracciones dializables (porcentaje de mineral dializado) obtenidas tras la digestión *in vitro* de las muestras (papillas infantiles desfitinizadas o no y elaboradas con agua o con leche de continuación) se detallan a continuación para cada mineral estudiado. En todos los casos, y como era de esperar, los porcentajes de dialización fueron inferiores a los de solubilidad, ya que solamente se contabilizan los elementos solubles capaces de atravesar la membrana de diálisis con el tamaño de poro seleccionado.

V.3.1.2.a. Hierro

Los resultados obtenidos referidos al hierro dializado de las muestras empleadas en este estudio, se presentan en la Figura 22. En ella se muestra el porcentaje de hierro dializado en las papillas elaboradas con agua o con leche de continuación, tanto en papillas desfitinizadas como en las que no han recibido tratamiento. Tal y como se aprecia en la gráfica, las papillas elaboradas con fórmula infantil presentaron un menor porcentaje de dialización de hierro frente a las mismas papillas elaboradas con agua, estos resultados confirman los datos obtenidos por Hurrell *et al.*, (1989) quienes encontraron que la caseína procedente de la leche de vaca actúa inhibiendo la disponibilidad del hierro y por De Souza Nogueira *et al.*, (2004) que comprobaron que el hierro se une a la caseína de la leche y forma complejos que disminuyen el porcentaje de dialización del mismo en fórmulas infantiles. La disminución del porcentaje de dialización del hierro observada en nuestro estudio de las papillas elaboradas con fórmula infantil frente a las elaboradas con agua coincidió en su tendencia aunque no fue tan destacado (50%) como el observado por Perales *et al.*, (2006) entre la leche y la leche enriquecida con calcio, atribuyéndose esta reducción a los mayores niveles de calcio incorporados con el enriquecimiento.

Las papillas comerciales empleadas en este estudio, presentaron unos considerables niveles de inositolos con alto número de fosfatos ($IP_5 + IP_6$) (0,32-0,14%) en la mayoría de ellas, los cuales presentan una mayor capacidad de quelar cationes divalentes disminuyendo su absorción (Sandberg y Svanberg, 1991; Lombardi-Boccia *et al.*, 1998; Lestienne *et al.*, 2005

a) por lo que los porcentajes de hierro dializado tanto en las papillas elaboradas con agua como en las elaboradas con fórmula infantil fueron del orden de 1.5-4.5%. Tal y como se muestra en la Figura 22, la papilla Ocho cereales miel elaborada con agua y con fórmula infantil tras la desfitinización presentó un mayor porcentaje de hierro dializado. Esta misma tendencia la mostraron la papilla Crema de arroz mezclada con agua y con fórmula infantil, Cereales sin gluten mezclada con agua, Multicereales mezclada con fórmula infantil, y la papilla Trigo mezclada con agua y con fórmula infantil. Al contrario de lo observado en la solubilidad del hierro, el porcentaje de dialización de este mineral en la mayoría de las muestras estudiadas fue mayor en las papillas elaboradas con agua que en las elaboradas con fórmula infantil, lo que indicaría que la dialización del hierro estaría afectada por distintos componentes de la fórmula infantil, tal y como indicaron Kapsokefalou *et al.*, (2005) para leches infantiles enriquecidas con distintas fuentes de hierro. Los mayores porcentajes de dialización del hierro se observaron en las papillas desfitinizadas y elaboradas con agua (Ocho cereales miel (4.6%), Crema de arroz (4.3%), Trigo (6.3%) con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a la misma papilla sin desfitinizar, lo que indicaría que el ácido fítico (Porres *et al.*, 2001; Hemalatha *et al.*, 2007) así como determinados componentes de la fórmula infantil utilizada, disminuyen la dialización del hierro. Además, cuatro de las cinco papillas estudiadas elaboradas con fórmula presentaron un incremento en el porcentaje de hierro dializado tras la desfitinización de las mismas (Hemalatha *et al.*, 2006) (1.8% en la Papilla Ocho cereales miel sin desfitinizar y 3.9% tras la eliminación de su contenido en ácido fítico, de 1.9 a 2.2% en la papilla Multicereales, de 1.8 a 2.1% en la Crema de arroz, y de 2.7% a 4.6% en la de Trigo), mientras que en la papilla Cereales sin gluten no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ambos tratamientos.

Los valores de hierro dializado obtenidos se pueden justificar en función del cociente molar $IP_5 + IP_6 / Fe$ que presentaban las muestras. Los valores más elevados para este cociente se obtuvieron para las papillas elaboradas con agua o fórmula infantil Ocho cereales miel y Cereales sin gluten sin desfitinizar (3.8:1 y 1.8:1 para Ocho cereales miel y 3.5:1 y 1.7:1 para Cereales sin gluten) respectivamente. Estas muestras presentaron los menores porcentajes de dialización del hierro (<2%) entre las muestras estudiadas. Datos similares obtuvieron

Lombardi-Boccia *et al.*, (1995) para la dialización del hierro a partir de judías, en donde se concluye que las fracciones de judías crudas más ricas en ácido fítico presentan un menor porcentaje de dialización (1.60-2.29%). No obstante, un menor ratio IP_5+IP_6/Fe (papilla Multicereales) no se reflejó en un incremento en la dialización del hierro. En relación a este hecho, Jovaní *et al.*, (2000) no encontraron una correlación positiva entre el contenido en ácido fítico y el porcentaje de dialización del Ca, Fe o Zn en fórmulas infantiles a base de soja y Viadel *et al.*, (2006) observaron que una reducción del contenido en IP_6 en distintas legumbres no se tradujo en un incremento de la dialización del hierro. Las variaciones obtenidas podrían ser debidas a la influencia de otros componentes del alimento en la disponibilidad mineral, en este sentido, Perlas y Gibson (2005) señalaron que otros componentes de la dieta como la fibra, y no solo el ácido fítico, afectan a la disponibilidad del hierro.

Por otra parte, existe una gran influencia en el porcentaje de mineral dializado y los valores de pH a los que se desarrolla la digestión gastrointestinal *in vitro*. La solubilidad del Fe, Ca y Zn disminuye conforme aumenta el pH (Wolters *et al.*, 1993). En nuestro estudio, no observamos importantes diferencias ($p < 0.05$) en el porcentaje de dialización de hierro entre las distintas muestras estudiadas, mientras que sí fueron significativas ($p < 0.05$) las diferencias entre los porcentajes de solubilidad de este mineral. Los bajos porcentajes de dialización de hierro obtenidos, no superiores a 6.5% se deberían a la presencia de antinutrientes de los cereales que afectan a la bioaccesibilidad del mismo. Resultados similares han sido observados por Bosscher *et al.*, (2002) para distintos ingredientes vegetales de alimentos infantiles. Los datos obtenidos por Cámara *et al.*, (2005) para los porcentajes de dialización del hierro a partir de distintos menús escolares presentaron, para alimentos no elaborados con carne, un rango de valores en los que se incluyen los datos obtenidos en nuestro trabajo. Los porcentajes de dialización del hierro obtenidos para las papillas elaboradas con agua y sin fitasa, fueron similares a los observados por Jovaní *et al.*, (2000) para fórmulas infantiles a base de soja (2-5%).

En la papilla Multicereales el porcentaje de dialización del hierro incrementó cuando ésta se elaboró con fórmula infantil tras el tratamiento con fitasa, mientras que sucedió al

contrario en la papilla elaborada con agua. Para la papilla Cereales sin gluten el hierro, incrementó en la papilla elaborada con agua, y del calcio incrementó en la elaborada con fórmula. En la papilla de Trigo, se observó que tanto cuando ésta fue elaborada con agua como con fórmula, se produjo un incremento en la dialización del hierro y del cinc. No obstante, los resultados en la mayoría de las muestras estudiadas, confirman el efecto inhibidor que ejerce la caseína de la leche sobre la dialización del hierro ya observada por otros autores (Hurrell *et al.*, 1989; Drago y Valencia, 2004).

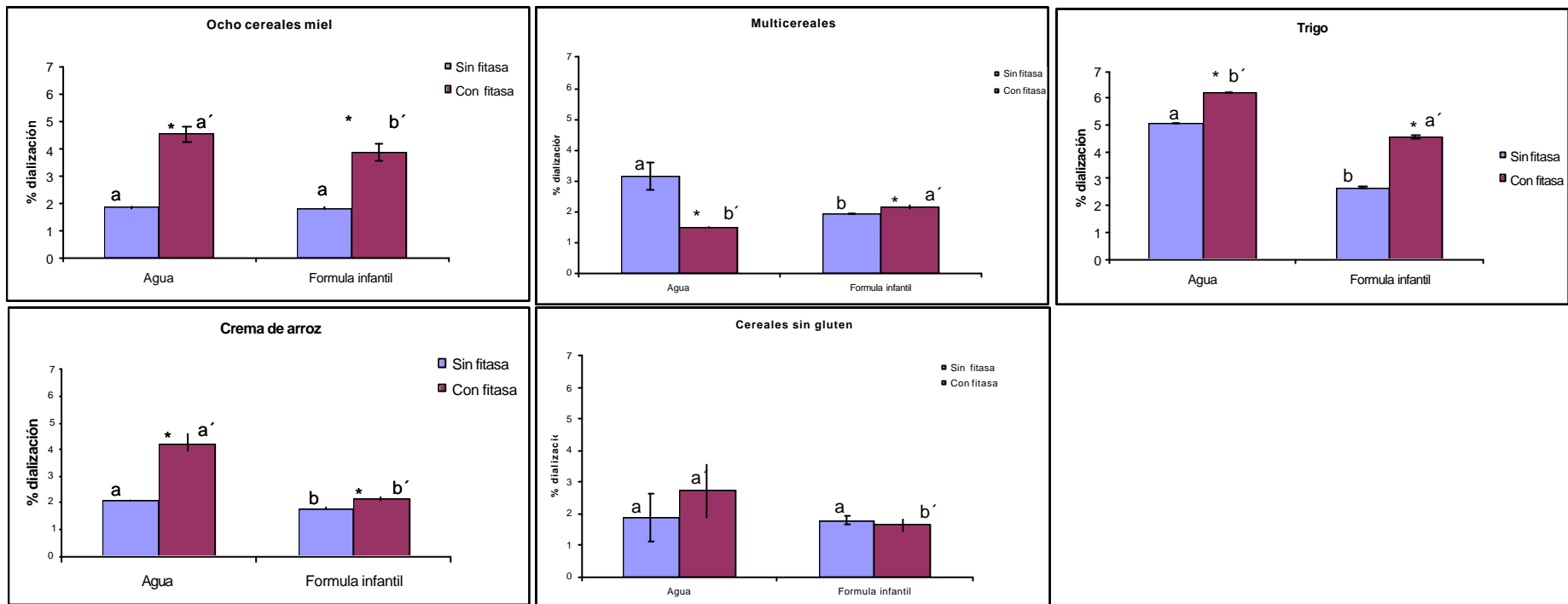


Figura 22. Porcentaje de dialización del hierro en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil.

(a-b) y (a'-b') indican diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de hierro dializado de las papillas elaboradas con agua y con fórmula tratadas con fitasa o no respectivamente. (*) indica diferencias estadísticamente significativas dentro de la papilla elaborada con agua o con fórmula infantil debidas al tratamiento con fitasa

V.3.1.2.b. Calcio

Tal y como se muestra en la Figura 23, los porcentajes de dialización del calcio fueron en todos los casos inferiores a un 3%. No obstante, observamos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en este porcentaje en todas las muestras elaboradas con fórmula infantil tratadas o no con fitasa, presentando mayores valores de dialización las papillas desfitinizadas con respecto a las no tratadas. Estos resultados indicarían el impacto negativo que ejerce el ácido fítico sobre la dialización del calcio, mencionado por Lönnerdal *et al.*, (1989), Jovaní *et al.*, (2000) y Kennefick y Cashman, (2000) entre otros. No obstante, no observamos esta tendencia en las mismas papillas reconstituidas con agua, lo cual podría ser debido a la influencia positiva que ejercen ciertos componentes de leche (lactosa, caseína) sobre la dialización del calcio (Hansen *et al.*, 1996; Drago y Valencia 2004; Perales *et al.*, 2005).

Por otra parte, el incremento en la dialización del calcio tras la desfitinización de las muestras en las papillas elaboradas con fórmula infantil, podría estar debida al desencadenamiento de la reacción de Maillard que da lugar a que la lactosa presente se transforme en lactulosa, la cual podría actuar favoreciendo la dialización del calcio. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Sarriá *et al.*, (2001) para fórmulas lácteas infantiles, aunque es necesario tener en cuenta que estos estudios fueron llevados a cabo en ratas. Las diferencias observadas entre la solubilidad y la dialización del calcio, coinciden con los resultados obtenidos por Perales *et al.*, (2005) y estarían justificadas según estos autores por las diferencias existentes en la metodología o las muestras utilizadas.

Las papillas Ocho cereales miel, Multicereales y Cereales sin gluten elaboradas con agua, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la dialización del calcio antes y después del tratamiento con fitasa. En este sentido, se sabe que razones molares fitato:calcio superiores a 0.24 comprometen la disponibilidad del calcio, no obstante, todas las muestras empleadas en este estudio, presentaron (ver Tabla 16 de este trabajo) valores inferiores a este cociente, lo cual podría explicar la ausencia de diferencias en la dialización del calcio entre las muestras desfitinizadas o no. Este hecho podría indicar que un tratamiento con fitasa de estos productos reconstituidos con agua sería innecesario para

aumentar la dialización del calcio, no obstante, no se observó lo mismo en las papillas reconstituidas con fórmula infantil, lo que podría indicar que el calcio presente en la fórmula si se ve influido negativamente por el ácido fítico a pesar de las bajas razones molares que presentaron estas papillas (inferiores a 0.04). Aunque la adición de fórmula de continuación a las papillas incrementa el contenido de calcio en los homogenados, observamos que en las papillas Ocho cereales miel, Multicereales y Cereales sin gluten, los porcentajes de calcio dializados fueron similares ($p < 0.05$) tras ser mezcladas con agua o con fórmula infantil. En este sentido, las papillas Ocho cereales miel, Multicereales y Trigo tratadas o no con fitasa, así como Crema de arroz y Cereales sin gluten tratadas con fitasa, el porcentaje de dialización del calcio incrementó con el contenido en calcio de las muestras, estos resultados están de acuerdo con Roig *et al.*, (1999) y Drago y Valencia (2004), según los cuales la concentración de calcio en la muestra influye en el porcentaje de dialización del mismo.

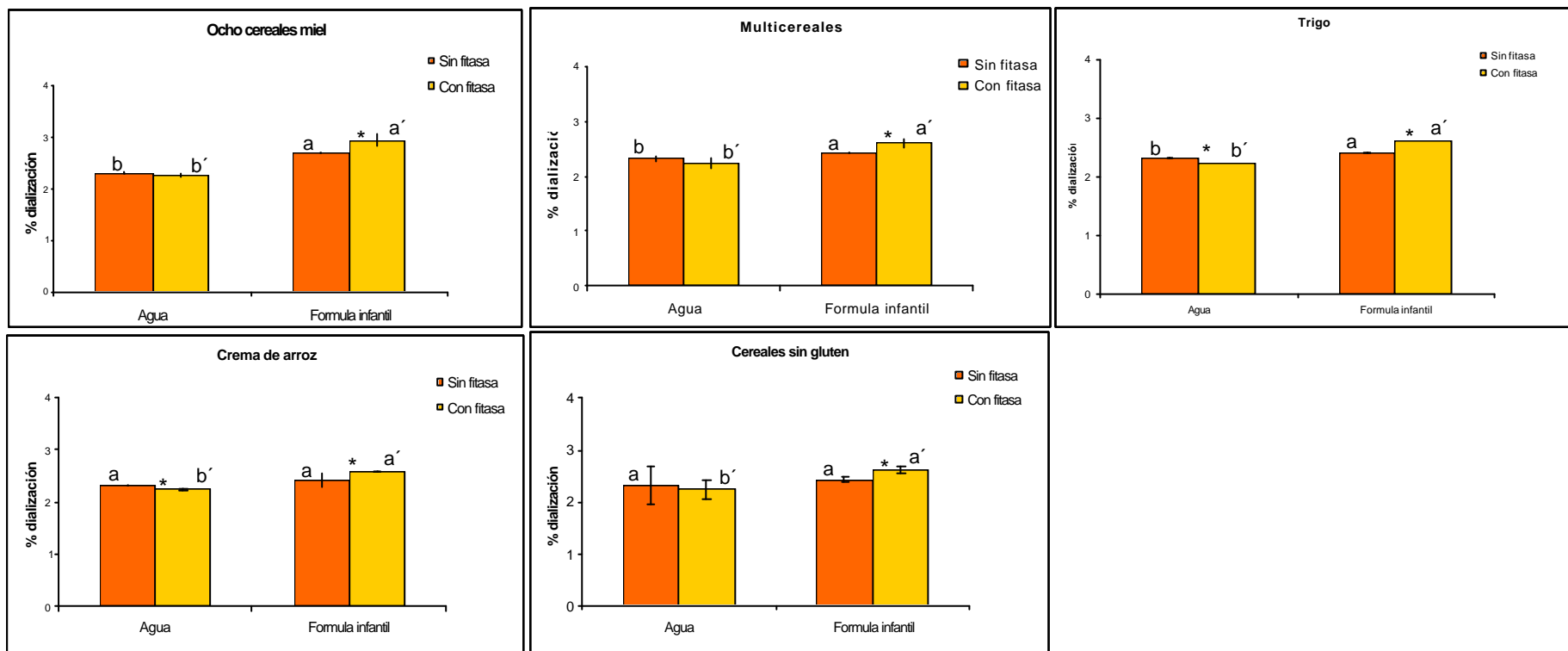


Figura 23. Porcentaje de dialización del calcio en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil

(a-b) y (a'-b') indican diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de calcio dializado de las papillas elaboradas con agua y con fórmula tratadas con fitasa o no respectivamente. (*) indica diferencias estadísticamente significativas dentro de la papilla elaborada con agua o con fórmula infantil debidas al tratamiento con fitasa

V.3.1.2.c. *Cinc*

Tal y como se muestra en la Figura 24, se observó un mayor porcentaje ($p < 0.05$) de dialización del cinc tras la desfitinización de las papillas Ocho cereales miel, Multicereales y Trigo elaboradas con agua, mientras que solo dos papillas (Ocho cereales miel y Trigo) elaboradas con fórmula infantil presentaron un aumento en la dialización del cinc con respecto a la muestra no tratada ($p < 0.05$). El incremento de este valor al eliminar el contenido en ácido fítico, se debe a la capacidad del antinutriente para unirse al cinc según han demostrado otros autores (Lombardi-Boccia *et al.*, 1998; Hemalatha *et al.*, 2007 b; Towo *et al.*, 2006).

En nuestro estudio observamos que un mayor porcentaje de cinc soluble no se tradujo en un incremento en la dialización del mismo, por lo que es importante tener en cuenta que no siempre se relacionan unos altos niveles de solubilidad con altos niveles de dialización, ya que el mineral a pesar de ser soluble, puede unirse a moléculas con un peso molecular superior al tamaño de poro de la membrana de diálisis utilizado en el análisis (Cámara *et al.*, 2005). En todos los casos, se produjo una mayor dialización del cinc en las papillas elaboradas con agua (9-23%) frente a las elaboradas con fórmula infantil (2-5.5%). De los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos concluir que componentes presentes en las fórmulas infantiles tales como la caseína interfieren en la dialización del cinc, según Lönnerdal *et al.*, (1984) y Drago y Valencia, (2004).

En la papilla de Trigo, se observó que tanto en la papilla elaborada con agua como en la elaborada con fórmula, se produjo un incremento en la dialización del cinc. Por otra parte, no observamos un incremento en el porcentaje de dialización del cinc en las papillas con un menor ratio $IP_5+IP_6:Zn$ (Crema de arroz y Multicereales).

A excepción de la papilla Cereales sin gluten se observó en general, un incremento en el porcentaje de dialización del cinc en las papillas desfitinizadas. Los porcentajes de dialización obtenidos a partir de las papillas elaboradas con agua fueron superiores a los obtenidos por otros autores para fórmulas infantiles empleando para ello concentraciones de

enzimas digestivas similares a las empleadas en nuestro estudio (Bosscher *et al.*, 2001 a). Los menores porcentajes de dialización observados en todas las muestras elaboradas con fórmula infantil frente a las elaboradas con agua, podrían estar debidos tal y como indicaron Sarriá *et al.*, (2001) a la presencia de componentes de naturaleza bipolar tales como emulsionantes empleados en la leche y podrían unirse a cationes reduciendo su dialización. Los porcentajes de dialización de cinc obtenidos en las papillas sin desfitinizar y elaboradas con agua, fueron similares a los obtenidos por Jovaní *et al.*, (2000) para fórmulas infantiles a base de soja (8-10%). Las papillas Trigo y Cereales sin gluten, presentaron niveles superiores (17-22%).

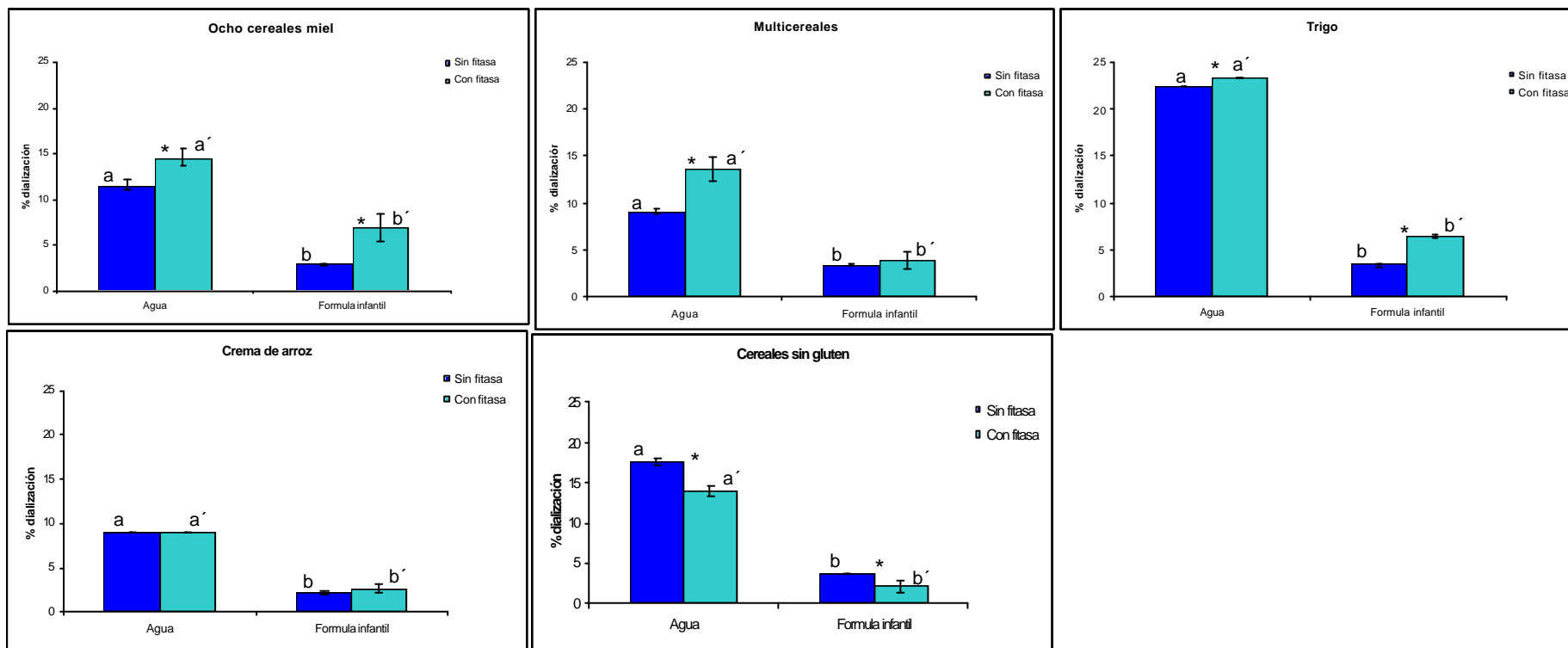


Figura 24. Porcentaje de dialización del cinc en las papillas infantiles desfitinizadas o no elaboradas con agua y con fórmula infantil

(a-b) y (a'-b') indican diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de cinc dializado de las papillas elaboradas con agua y con fórmula tratadas con fitasa o no respectivamente. (*) indica diferencias estadísticamente significativas dentro de la papilla elaborada con agua o con fórmula infantil debidas al tratamiento con fitasa

V.3.1.3. Efecto de la interacción de la desfitinización y de la adición de fórmula infantil sobre la solubilidad y diálisis mineral

Se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial para estudiar el efecto que sobre la solubilidad y diálisis mineral ejerce la interacción de la adición de una fitasa exógena y el modo de reconstitución de la papilla infantil (agua o fórmula infantil). En la Tabla 22 se muestran los niveles de significación ($p < 0.01$) para el efecto de la aplicación de fitasa, la adición de fórmula infantil o de la interacción de ambos sobre cada una de las variables estudiadas (porcentaje de solubilidad del hierro, calcio y cinc, así como los porcentajes de dialización del hierro, calcio y cinc) en cada papilla infantil. Los resultados obtenidos indican que sólo para el porcentaje de solubilidad del calcio de la papilla Ocho cereales miel, el porcentaje de dialización del calcio de las papillas Ocho cereales miel y Crema de arroz, y para el porcentaje de dialización del hierro de la papilla Multicereales, la interacción entre la adición de fitasa y el medio en que se reconstituye la papilla (con agua o fórmula infantil) fue significativa ($p < 0.01$) mientras que el efecto de uno de los dos factores por sí solo no ejercía efectos significativos sobre el porcentaje de dialización. El resto de variables en las que se observó una interacción significativa entre ambos factores fueron el porcentaje de solubilidad del hierro de la papilla Ocho cereales miel y de la papilla Multicereales, el porcentaje de dialización del hierro de las papillas Crema de arroz y Trigo, y el porcentaje de dialización del cinc de las papillas Trigo y Cereales sin gluten, pero en estos casos la aplicación de fitasa por sí sola y la forma de reconstitución de la papilla (agua o fórmula) por sí sola, ejercieron cambios significativos ($p < 0.01$) en las variables mencionadas. Es decir, la interacción entre la desfitinización y la adición de fórmula no ejerce en general efectos significativos sobre la disponibilidad mineral, siendo la adición de agua o de fórmula un factor determinante en la solubilidad y diálisis mineral. Este hecho se discute para cada mineral en los apartados V.V.1 (Fracción soluble) y V.V.2. (Fracción dializable) de esta sección.

Tabla 22. ANOVA multifactorial para el efecto de la desfitinización, reconstitución, así como de la interacción entre ambas sobre los porcentajes de solubilidad y dialización de hierro, calcio y cinc en las papillas infantiles empleadas en este estudio (valores de p)

	Solubilidad Fe (%)	Solubilidad Ca (%)	Solubilidad Zn (%)	Diálisis Fe (%)	Diálisis Ca (%)	Diálisis Zn (%)
Ocho Cereales miel						
Tratamiento enzimático	0.001	0.850	0.645	0.000	0.017	0.000
Reconstitución	0.002	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000
Interacción	0.002	0.009	0.645	0.016	0.003	0.436
Multicereales						
Tratamiento enzimático	0.004	0.538	0.774	0.001	0.000	0.037
Mezcla	0.000	0.007	0.000	0.042	0.000	0.000
Interacción	0.004	0.386	0.905	0.000	0.216	0.095
Crema de arroz						
Tratamiento enzimático	0.878	0.887	0.257	0.000	0.086	0.134
Mezcla	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Interacción	0.287	0.246	0.082	0.000	0.002	0.134
Trigo						
Tratamiento enzimático	0.000	0.940	0.879	0.000	0.610	0.000
Mezcla	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000
Interacción	0.276	0.900	0.548	0.000	0.701	0.001
Cereales sin gluten						
Tratamiento enzimático	0.010	0.480	0.413	0.360	0.668	0.000
Mezcla	0.000	0.002	0.000	0.123	0.094	0.000
Interacción	0.825	0.098	0.973	0.207	0.306	0.010

Nivel de significación: $p < 0.01$

V.3.1.4. Mineral disponible en cada toma realizada por el niño (200 mL)

El conocimiento de los nutrientes que componen la dieta normal del niño adquiere una gran importancia a fin de mejorar su estado nutricional y evitar deficiencias. En este sentido, se calcularon las cantidades de hierro, calcio y cinc que se encuentran disponibles a partir de las papillas empleadas en este estudio mezcladas con una fórmula de continuación

en las proporciones indicadas por el fabricante en cada toma (200 mL) que realiza el niño. Los valores obtenidos se indican en la Tabla 23 que se presenta a continuación.

Tabla 23. Mineral disponible (mg) en cada toma realizada por el niño (200 mL) de papillas infantiles mezcladas con fórmula láctea de continuación

	Papilla comercial			Papilla comercial desfitinizada		
	Fe	Ca	Zn	Fe	Ca	Zn
Ocho cereales miel	0,11	6,07	0,39	0,23	6,61	0,92
Multicereales	0,12	5,17	0,46	0,13	5,60	0,52
Trigo	0,20	7,75	0,47	0,34	7,52	0,86
Crema de arroz	0,11	7,50	0,31	0,13	8,24	0,37
Cereales sin gluten	0,10	5,60	0,52	0,11	6,10	0,29

Tal y como se muestra en la Tabla 23, en todos los casos excepto para el calcio en la papilla Trigo y el cinc en la papilla Cereales sin gluten, se incrementó la cantidad de mineral disponible tras la desfitinización de las papillas. En cada toma de papilla comercial (200 mL) el niño (0-6 meses) podrá disponer de aproximadamente 2,1%, 1,6% y 8,6% de las necesidades diarias recomendadas (RDR) de hierro, calcio y cinc respectivamente (NRC, 1991); mientras que a partir de las mismas papillas desfitinizadas el mineral disponible sería de 3,2%, 6,8% y 11,8% de las RDR. Podemos concluir en base a los resultados obtenidos, que la desfitinización de las papillas infantiles a base de cereales mejora en general la disponibilidad in vitro del Fe, Ca y Zn. No obstante, este valor depende del tipo de papilla estudiada.

V.4. ESTUDIO 4

V.4.1. CULTIVOS CELULARES. DISPONIBILIDAD MINERAL

V.4.1.1. Crecimiento y diferenciación celular

En este apartado se presentan los resultados obtenidos tras los ensayos realizados para estudiar el crecimiento, viabilidad, diferenciación celular e integridad de las monocapas celulares que fueron empleadas en los estudios de biodisponibilidad mineral. Estos ensayos consistieron en la elaboración de una curva de crecimiento, observación microscópica, prueba del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), prueba del rojo fenol y medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER).

V.4.1.2. Curva de crecimiento

Las células Caco-2, una vez descongeladas fueron sembradas en frascos de 75 cm² a una densidad de 50000 células/cm² (aproximadamente $1,2 \cdot 10^6$ células/frasco) y mantenidas en cultivo durante 21 días. Durante este período fueron observadas a microscopio (Figura 25), comprobando, durante los dos primeros días de cultivo la presencia de células muertas no adheridas al sustrato. A partir del tercer o cuarto día de cultivo se observó una fase de rápido crecimiento o fase exponencial (Figura 25 A), y transcurrida una semana postsiembra la monocapa celular se encontró totalmente desarrollada. A partir de los 13 días postsiembra, se observó una detención en el crecimiento y un aumento en la diferenciación de las células, que correspondería al período de la latencia (Figura 25 B). Teniendo en cuenta estas observaciones se elaboró una curva de crecimiento (Figura 25 C).

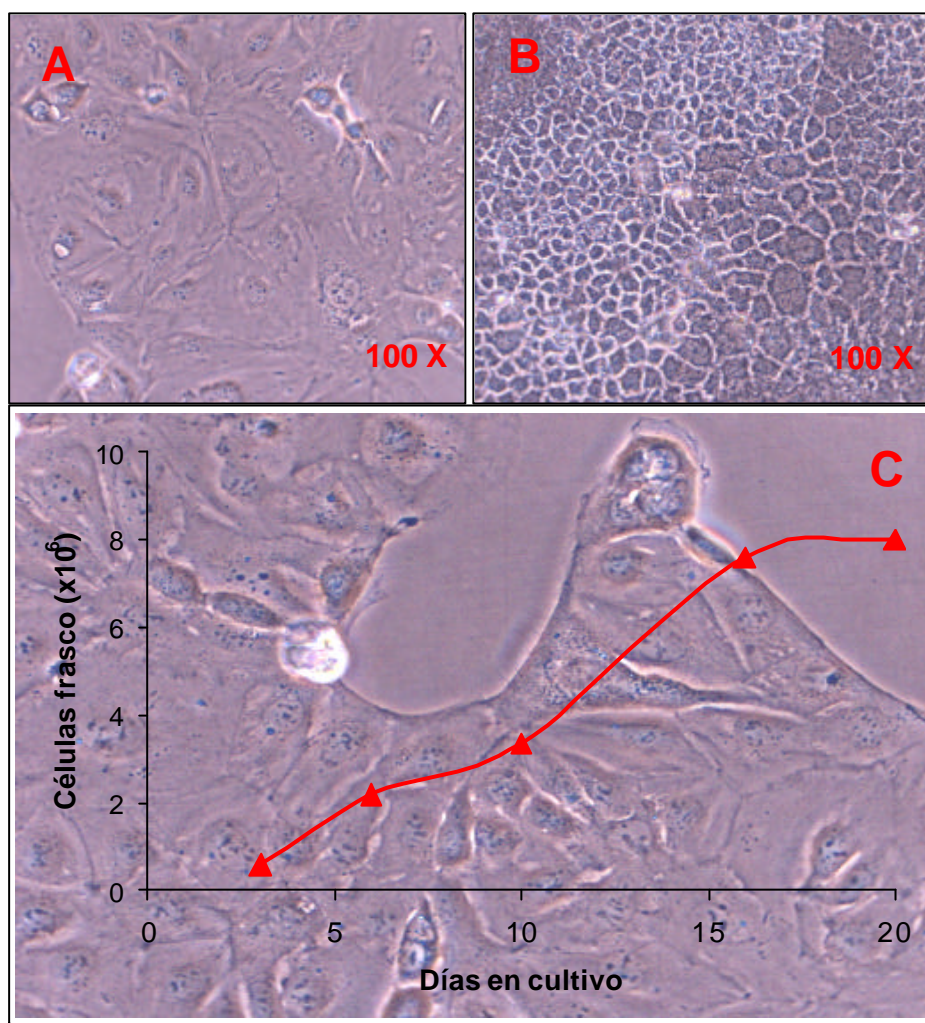


Figura 25. Diferentes fases en el crecimiento de las células Caco-2. A) 4º día de siembra, B) 16º día de siembra. C) curva de crecimiento

Durante la fase de crecimiento exponencial (día 3-13) se observó que el número de células se duplicaba pasando de algo menos de 4×10^6 a casi 8×10^6 células/frasco.

V.4.1.3. Viabilidad celular. Ensayo MTT

En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos en la prueba del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio. En ella se observa que a partir de los 30 minutos de incubación con dicho reactivo, se produce un incremento en los valores de absorbancia, lo cual se traduciría en un incremento en el metabolismo del MTT como consecuencia de una mayor viabilidad celular. Como se observa en la Figura 26, se puede apreciar una relación casi lineal entre los valores de absorbancia y el tiempo transcurrido.

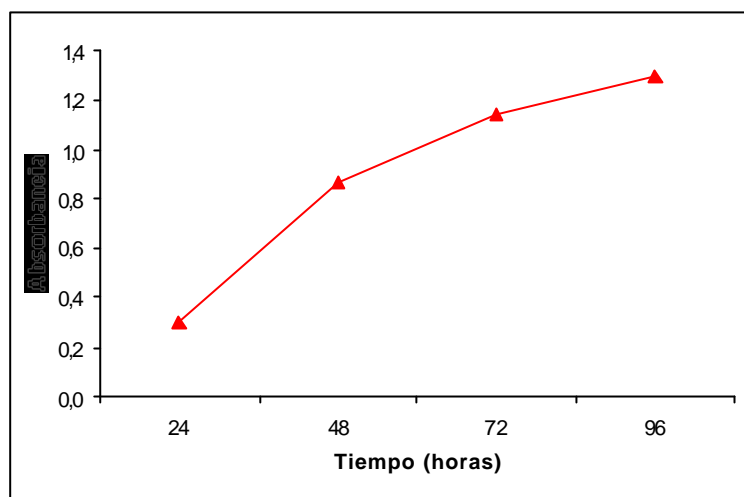


Figura 26. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

El incremento observado en los valores de absorbancia son consecuencia de un incremento de la producción de formazano a partir del MTT, y que supone un incremento en la viabilidad celular.

V.4.1.4. *Evaluación de la integridad de la monocapa celular: TEER y rojo fenol.*

V.4.1.4.a. *Resistencia eléctrica transepitelial (TEER)*

Transcurridos dos días de la siembra de las células en filtros de policarbonato insertos en pocillos bicamerales (50000 células/cm²) realizamos la primera medida de la TEER en cada pocillo. En nuestro estudio, tal y como se muestra en la Tabla 24, a partir del día 14 postsiembra se observaron valores de TEER superiores a 1600 Ω .cm², lo cual sería indicativo por si solo de que la monocapa está completamente formada (Mehran *et al.*, 1997).

Tabla 24. Resistencia eléctrica transepitelial (TEER) ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) de las células Caco-2

Días de siembra	Medio de cultivo (E-MEM) ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)
2	154.19 \pm 21
4	415.62 \pm 48.98
7	312.36 \pm 76.55
9	689.73 \pm 99.66
11	987.57 \pm 119.90
14	1900.34 \pm 117.76
17	1947.98 \pm 77.04
21	1938.91 \pm 106.12

Cada valor se corresponde con el valor medio \pm la desviación típica (n=4)

En la Tabla 24 se observa que la resistencia eléctrica transepitelial va incrementando conforme avanza el número de días de cultivo de las células a partir de la segunda semana postsiembra. Los mayores valores de TEER se obtuvieron entre los días 17 y 21 postsiembra, encontrándose durante estos días la monocapa celular en las mejores condiciones de integridad. En la bibliografía consultada, se recogen distintos valores considerados como óptimos en el cultivo celular, oscilando entre 180 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Tallkvist *et al.*, 2000), 200-250 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Álvarez Hernández *et al.*, 1991; Arredondo *et al.*, 1997), 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Lim *et al.*, 2006), 650 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Bovery *et al.*, 2004) y superiores a 1000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Mehran *et al.*, 1997).

No obstante en la mayoría de casos, se consideran óptimos los valores de TEER superiores a 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, por tanto en nuestro estudio y atendiendo sólo a este parámetro, a partir del día 9 postsiembra se podría considerar la monocapa celular formada, pero teniendo en cuenta otros parámetros como la curva de crecimiento, la prueba del rojo fenol (que se presenta a continuación) o la observación microscópica, en nuestro estudio no fue aconsejable realizar los ensayos antes del día 17 postsiembra.

V.4.1.4.b. Prueba del rojo fenol. Permeabilidad aparente

A fin de evaluar la integridad de la monocapa de las células del ensayo, se realizó la prueba del rojo fenol (RF) en la que se determina el paso transepitelial de esta molécula desde la cámara apical hasta la cámara basolateral. La prueba de determinación del RF se comenzó a realizar a partir del 8º día postsiembra. El resultado se expresa como el porcentaje de RF presente en el compartimiento basal tras el ensayo con respecto al contenido de RF que ha sido adicionado a la cámara apical. Conforme aumentan los días del cultivo, va disminuyendo el porcentaje de paso del rojo fenol desde la cámara apical a la basolateral, ya que los espacios intercelulares van disminuyendo y las uniones entre ellas se hacen más estrechas. Tal como se observa en los resultados (Figura 27), existe una relación inversa entre el valor de la TEER y el porcentaje de paso del rojo fenol a través de la monocapa conforme aumenta el número de días del cultivo.

Tabla 25. Prueba del rojo fenol (RF)

Días en cultivo	Longitud de onda (nm)	Concentración RF en cámara basolateral (μM)	Permeabilidad aparente (P_{app}) (cm/s)
7	0.2867	5.7490	$3,39 \cdot 10^{-4}$
11	0.2013	5.294	$3,13 \cdot 10^{-4}$
14	0.0472	1.798	$1,06 \cdot 10^{-4}$
17	0.0141	0.320	$1,89 \cdot 10^{-5}$
21	0.0140	0.290	$1,71 \cdot 10^{-5}$

Tal y como se observa en la Tabla 25, los valores de permeabilidad aparente (P_{app}) para el rojo fenol disminuyen del mismo modo a como lo hace la concentración de rojo fenol en la cámara basolateral, conforme aumenta el número de días de las células en cultivo, ya que este parámetro relaciona el paso del rojo fenol a través de la monocapa en función del tiempo. Estos resultados demuestran la formación de uniones estrechas entre las células, que hacen que la monocapa sea prácticamente impermeable al paso de determinadas sustancias a nivel intercelular.

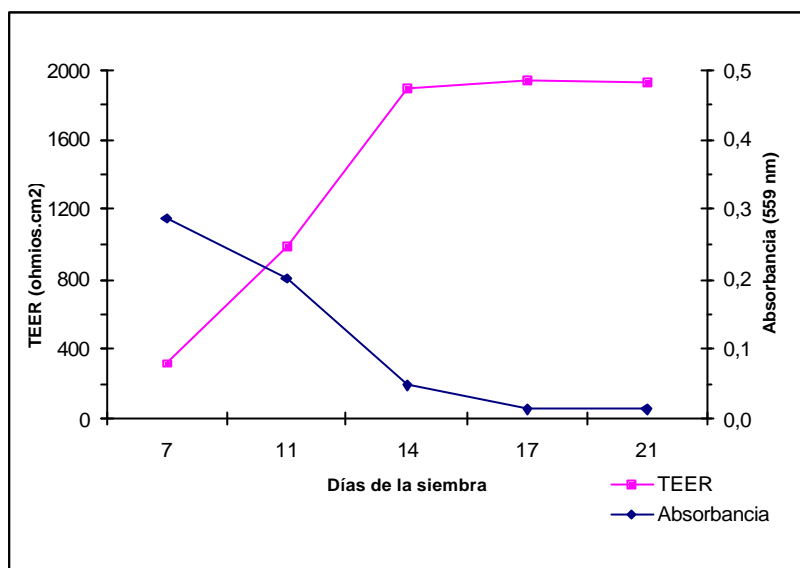


Figura 27. Formación progresiva de uniones funcionalmente estrechas durante la diferenciación de las células Caco-2 (21 días).

En base a los resultados obtenidos en las pruebas de la TEER y el rojo fenol, los experimentos de este estudio fueron llevados a cabo el día 21 postsiembra.

V.4.2. BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO, CALCIO Y CINCO EN CÉLULAS CACO-2

V.4.2.1. Ensayos de captación. Frascos de 75 cm².

V.4.2.1.a. Disoluciones patrón de hierro, calcio y cinc

Los intervalos de concentraciones de Fe, Ca y Zn empleados en los ensayos de captación a partir de disoluciones patrón incluyeron los contenidos promedio de estos minerales en la fracción soluble procedente de la digestión de los alimentos infantiles a adicionar en la monocapa de células Caco-2. Los resultados obtenidos para cada mineral se expresan por monocapa.

La concentración óptima de captación de hierro (Tabla 26) por las células Caco-2 fue de 100 μ M, observándose un importante descenso (14%) en la disponibilidad de hierro cuando la captación se ensayaba a partir de una disolución

150 μM , debido probablemente a que a estas concentraciones se produce la saturación de los depósitos celulares. Tal y como señalaron Álvarez Hernández *et al.*, (1991) se observa generalmente una disminución en la captación de hierro a partir de disoluciones patrón conforme incrementa la concentración de éste en el medio. No obstante, las concentraciones indicadas por estos autores (<0.1, 1.1 y 65 μM), fueron inferiores a las empleadas en nuestro estudio. Por otra parte, volvió a incrementarse la captación de hierro a una concentración de 200 μM , circunstancia para la cual no hemos encontrado una razón justificable. En este sentido, Gangloff *et al.*, (1996 a) no observaron esta tendencia cuando la captación de hierro por las células Caco-2 se realizaba a partir del ión férrico, no obstante, en nuestro caso la fuente de hierro fue $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Las diferencias e incongruencias encontradas podrían deberse a la ausencia de hepcidina (péptido que se expresa en los hepatocitos) en las células Caco-2, que juega un importante papel en la absorción intestinal de hierro. Así, su ausencia se traduciría en la falta de regulación de la captación del ión férrico, hecho ya observado por Yeung *et al.*, (2005).

Para el caso del calcio (Tabla 27), la concentración óptima de captación fue de 20 mM, observándose una baja disponibilidad mineral para todas las concentraciones empleadas, y siendo del orden del 0,02% cuando la disolución adicionada tenía una concentración de 50 mM. La disminución en la captación de calcio que se produce al incrementar la concentración de la disolución empleada (50 mM), pudo probablemente estar debida a la saturación de la ruta transcelular de transporte de calcio. En este sentido, Ekmekcioglu *et al.*, (1999) observaron un incremento curvilíneo del transporte de calcio en células Caco-2 a partir de disoluciones de calcio (no procedentes de digestión) (0-11 mM). No obstante algunos estudios sobre el transporte de calcio a través de las células Caco-2 (Ekmekcioglu *et al.*, 1999; Phillippy, 2006) señalan una gran variabilidad de resultados, así como la influencia de numerosos factores que influyen en la misma.

Para el caso del cinc (Tabla 28), aunque la concentración a la que se produjo la mayor captación fue de 20 μM , se observó la misma disponibilidad (0,14 %) para las

concentraciones de 10 y 20 μM , lo cual podría estar debido a que el Zn captado por las células a partir de la disolución 20 μM fue proporcionalmente menor al captado a partir de la disolución 10 μM , lo que podría ser atribuible igualmente a la saturación de las células Caco-2, ya que los mecanismos de absorción de cinc en el intestino son saturables, (Raffaniello *et al.*, 1992; Reeves *et al.*, 2001). No obstante, los niveles de cinc empleados en este estudio fueron inferiores a 20 μM , concentración a partir de la cual, según estos autores, se produciría una saturación de las células. En este sentido, (Oestreicher y Cousins, 1989) trabajando con concentraciones de cinc similares a las empleadas en nuestro estudio, observaron que la mayor captación de cinc en células intestinales se producía a concentraciones de 24 μM , observándose también que la unión del cinc a ligandos del suero bovino fetal empleado para enriquecer el medio de cultivo en que son mantenidas las células, puede interferir en su captación (Finley *et al.*, 1995). El conocimiento de estos datos es importante ya que nos permite conocer los niveles de minerales a los que se produce la máxima absorción intestinal con el fin de diseñar ensayos con alimentos concretos; en nuestro caso, las papillas infantiles.

Tabla 26. Captación y disponibilidad de hierro por las células Caco-2 a partir de distintas concentraciones de soluciones patrón de FeCl₃.6H₂O

Mineral añadido a la monocapa ^a (µg)	Concentración de mineral en la disolución (µM)	Volumen añadido a la monocapa (mL)	Blanco ^b (µg)	Ensayo de captación ^c (µg)	Mineral captado por las células ^d (µg)	Disponibilidad ^e (%)
55.84	100	10	4.2 ± 0.2	13.65 ± 0.21	9.45 ± 0.21	16.9 ± 0.2
83.76	150	10		6.7 ± 0.20	2.5 ± 0.20	2.98 ± 0.4
111.68	200	10		13.25 ± 0.03	9.05 ± 0.03	8.10 ± 0.16

^a Cantidad de mineral soluble añadido a la monocapa. ^b Blanco, monocapa celular incubada con el tampón de captación. ^c Ensayo de captación, monocapa celular incubada con las soluciones patrón. ^d Calculado como (c-b). ^e Calculado como (d/a)x100.

Tabla 27. Captación y disponibilidad de calcio por las células Caco-2 a partir de distintas concentraciones de soluciones patrón de CaCl_2

Mineral añadido a la monocapa ^a (mg)	Concentración de mineral en la disolución (mM)	Volumen añadido a la monocapa (mL)	Blanco ^b (μg)	Ensayo de captación ^c (μg)	Mineral captado por las células ^d (μg)	Disponibilidad ^e (%)
2	5	10	6.3 ± 0.26	5.3 ± 0.07	-	-
8	20	10		11.6 ± 0.16	5.3 ± 0.16	0.07 ± 0.01
20	50	10		10.9 ± 0.1	4.6 ± 0.1	0.02 ± 0.02

^a Cantidad de mineral soluble añadido a la monocapa. ^b Blanco, monocapa celular incubada con el tampón de captación. ^c Ensayo de captación, monocapa celular incubada con las soluciones patrón. ^d Calculado como (c-b). ^e Calculado como (d/a)x100.

Tabla 28. Captación y disponibilidad de cinc por las células Caco-2 a partir de distintas concentraciones de soluciones patrón de ZnSO₄·7H₂O

Mineral añadido a la monocapa ^a (µg)	Concentración de mineral en la disolución (µM)	Volumen añadido a la monocapa (mL)	Blanco ^b (µg)	Ensayo de captación ^c (µg)	Mineral captado por las células ^d (µg)	Disponibilidad ^e (%)
1.3	2	10	2 ± 0.4	2 ± 0.4	-	-
6.5	10	10		2.9 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.14 ± 0.08
13	20	10		3.8 ± 0.32	1.8 ± 0.3	0.14 ± 0.1

^a Cantidad de mineral soluble añadido a la monocapa. ^b Blanco, monocapa celular incubada con el tampón de captación. ^c Ensayo de captación, monocapa celular incubada con las soluciones patrón. ^d Calculado como (c-b). ^e Calculado como (d/a)×100.

V.4.2.1.b. *Papillas infantiles. Ensayos de captación.*

V.4.2.1.b.1. *Papillas infantiles elaboradas con agua*

Los resultados obtenidos en los ensayos de captación de minerales (hierro, calcio y cinc) a partir de las fracciones solubles obtenidas tras la digestión gastrointestinal de las papillas infantiles elaboradas con agua y tratadas o no con fitasa se presentan en las Tablas 29, 30 y 31 respectivamente.

V.4.2.1.b.1.1. *Hierro*

Entre los distintos tipos de papillas estudiadas, se produjo una gran variabilidad en las cantidades de hierro captadas por las células dentro de cada grupo (tratadas con fitasa o no tratadas) (Tabla 29). Numerosos estudios realizados en células Caco-2 atribuyen la variabilidad de resultados obtenidos habitualmente a factores tan distintos como el día de realización del experimento observada por Kloots *et al.*, (2004), en la captación de hierro por células Caco-2 a partir de harina de cereal, la composición de la dieta (Eklund *et al.*, 2003), la cantidad de enzimas empleadas en la digestión (Laparra *et al.*, 2005), o el pH (Salovaara *et al.*, 2003). En nuestro estudio se llevó a cabo el experimento simultáneamente para la papilla tratada enzimáticamente o no tratada a fin de evitar al máximo posibles variaciones. No obstante, dentro de la variabilidad observada en la captación entre las distintas papillas infantiles, tras el tratamiento enzimático, se produjo un importante incremento de la disponibilidad del hierro en tres de las cuatro muestras estudiadas con respecto a las papillas sin tratamiento. Estos resultados indicarían que los inositolos fosfato influyen negativamente en la captación y disponibilidad del hierro de las papillas infantiles en las células Caco-2. Los resultados observados en la captación del hierro de las papillas comerciales sin desfitinizar fueron superiores a los obtenidos por Jovaní *et al.*, (2004) para fórmulas infantiles, o los obtenidos por Pyanert *et al.*, (2006) para mijo, judías, cacahuets tostados o el puré de mango. No obstante, no hay referencias anteriores de estudios realizados en papillas infantiles. Los inositolos fosfato detectados en las muestras no desfitinizadas del presente estudio fueron IP₅ e IP₆, por lo que el efecto inhibitorio observado en la captación de hierro se debería a estos

inositoles y no a otros con un número de fosfatos inferior, tal y como indican los resultados observados por Han *et al.*, (1994) y Skoglund *et al.*, (1999) en estudios realizados empleando igualmente la línea celular Caco-2. La ausencia de valores de captación de hierro por las células en las papillas Multicereales y Cereales sin gluten sin tratamiento con fitasa, se debió probablemente a los elevados valores observados en sus respectivos blancos y a los bajos valores observados en los ensayos de captación con las muestras. Las papillas Ocho cereales miel y Crema de arroz sin desfitinizar mostraron distintos valores de disponibilidad de hierro ($p < 0.05$), probablemente relacionado con las distintas razones molares ($IP_5 + IP_6:Fe$) de cada una de ellas, 3.8:1 y 1.6:1 respectivamente, lo cual indicaría el efecto inhibitorio de los fitatos sobre la captación de hierro (Han *et al.*, 1994; Au y Reddy, 2000; Glahn *et al.*, 2002). Siendo particularmente destacable el incremento en la disponibilidad del hierro que se produjo en la papilla Ocho cereales miel desfitinizada con respecto a la misma sin tratamiento enzimático con fitasa (19.5% y 3.32% respectivamente).

V.4.2.1.b.1.2. Calcio

En la Tabla 30 se presentan los resultados obtenidos de la captación de calcio por células Caco-2 a partir de las papillas infantiles. Se observó que en todos los casos, tras la desfitinización de las papillas, se produjo un incremento en la disponibilidad del calcio con respecto a las papillas comerciales no desfitinizadas. Los resultados obtenidos fueron en todo caso inferiores a los obtenidos por Jovaní *et al.*, (2001 a) para fórmulas infantiles y por Perales *et al.*, (2005) para fórmulas infantiles con soja, mientras que fueron superiores a los obtenidos por Jovaní *et al.*, (2004) a partir de fórmulas infantiles elaboradas con leche en polvo en las cuales observaron un 0.27% de captación de calcio, mientras que nosotros observamos una disponibilidad entre 0.3-0.7% en las papillas comerciales y de un 0,65-2,3% para las papillas comerciales desfitinizadas. En nuestro estudio, y al contrario de lo observado por Perales *et al.*, (2006) un incremento en la cantidad de calcio soluble añadido a la monocapa, no se tradujo en un incremento en la captación del mismo. Otros estudios señalan que la solubilidad de un elemento no siempre se relaciona con un incremento en su disponibilidad (Eklund *et al.*, 2003).

Entre las papillas desfitinizadas o no, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la disponibilidad del calcio (Tabla 30), de modo que en las papillas en las que el fitato fue eliminado se observó un incremento en la captación de calcio. La papilla Cereales sin gluten no desfitinizada, presentó unos bajos niveles de captación de calcio (μg), debido probablemente al elevado ratio $(\text{IP}_5 + \text{IP}_6):\text{Ca} = (0.18:1)$, este hecho unido a los altos niveles de calcio encontrados en la monocapa celular empleada como blanco o control, podría justificar la presencia de valores negativos en la disponibilidad de calcio. En relación a estos datos, podemos afirmar que en las papillas infantiles a base de cereales, los inositolos fosfato (IP_5 e IP_6) actúan negativamente sobre la captación de calcio por las células Caco-2. Este efecto ha sido descrito por algunos autores (Han *et al.*, (1994); Kennefick y Cashman, (2000); Phillippy, 2006) observando un incremento en la absorción de calcio al reducir el contenido en ácido fitico. La papilla Multicereales mostró el mayor incremento del porcentaje de disponibilidad tras su desfitinización, pasando de valores de 0.7% a 2.3%.

V.4.2.1.b.1.1.3. *Cinc*

Los resultados obtenidos para la captación del cinc se muestran en la Tabla 31. Para todas las papillas estudiadas obtuvimos valores de captación de cinc más bajos que en las monocapas celulares empleadas como blanco, lo cual se tradujo en la incapacidad de calcular valores de biodisponibilidad. Estos resultados podrían indicar que la monocapa celular presenta por si sola, un elevado contenido en cinc, superior a la cantidad de cinc procedente del alimento y captada por las células. Resultados similares fueron obtenidos por Jovaní *et al.*, (2004) para fórmulas infantiles, y para soluciones patrón de cinc, en las que la monocapa celular capta menos cinc que la cantidad de este mineral medida en la monocapa sin muestra. En este sentido, Reeves *et al.*, (2001) pusieron de manifiesto que en las células Caco-2 existe un mecanismo de saturación en la captación de cinc, de modo que son incapaces de captar cinc desde el medio o lo hacen muy lentamente. No obstante, si nos detenemos en observar la cantidad del mineral captado por la monocapa (Ensayo de captación, Tabla 31) se pudo observar un incremento tras la desfitinización de las papillas infantiles, lo que confirmaría el efecto inhibitor que ejerce el ácido fitico sobre la disponibilidad el cinc (Han *et al.*, 1994; Hotz, 2005; Lestienne *et al.*, 2005 b). Este ensayo se mejoró notablemente en el

estudio de la biodisponibilidad mineral de las papillas infantiles llevado a cabo en este trabajo estudiando los parámetros de retención y transporte mineral en las células Caco-2.

Tabla 29. Captación y disponibilidad de hierro por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con agua

	Papilla infantil	Contenido de Fe en las papillas infantiles ($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de Fe soluble añadido a la monocapa ^a (μg)	Blanco ^b (μg)	Ensayo de captación ^c (μg)	Captación de hierro por las células ^d (μg)	Disponibilidad del hierro ^e (%)
Sin fitasa	Ocho cereales miel	83.41 \pm 3.1	36.7 \pm 1.9	1.85 \pm 0	3.07 \pm 0.35	1.22 \pm 0.35	3.32 \pm 0.11
	Multicereales	87.21 \pm 6.3	14 \pm 2.1	3.3 \pm 0.30	2.82 \pm 0.14	-	-
	Crema de arroz	87.50 \pm 2.7	28.9 \pm 0.7	1.71 \pm 0.30	2.87 \pm 0.13	1.16 \pm 0.13	4.01 \pm 0.23
	Cereales sin gluten	74.52 \pm 3.9	22.4 \pm 1.7	4.41 \pm 0.38	4.41 \pm 0	-	-
Con fitasa	Ocho cereales miel	83.41 \pm 3.1	19,2 \pm 0.7	1.85 \pm 0	5.6 \pm 0.14	3.75 \pm 0.14*	19.5 \pm 0.21*
	Multicereales	87.21 \pm 6.3	14 \pm 0.1	3.3 \pm 0.30	5.25 \pm 0.26	1.95 \pm 0.26*	13.93 \pm 0.8*
	Crema de arroz	87.50 \pm 2.7	31.5 \pm 1.0	1.71 \pm 0.30	2.73 \pm 0.11	1.02 \pm 0.11	3.24 \pm 0.14
	Cereales sin gluten	74.52 \pm 3.9	16.4 \pm 1.9	4.41 \pm 0.38	5.4 \pm 0.17	0.99 \pm 0.17*	6.04 \pm 0.09*

^a Cantidad de mineral soluble añadido a la monocapa. ^b Blanco, monocapa celular incubada con el tampón de captación. ^c Ensayo de captación, monocapa celular incubada con la fracción soluble. ^d Calculado como (c - b). ^e Calculado como (d/a)x100. (*) indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre la misma papilla desfitinizada o no.

Tabla 30. Captación y disponibilidad de calcio por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con agua

	Papilla infantil	Contenido de Ca en las papillas infantiles ($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de Ca soluble añadido a la monocapa ^a (μg)	Blanco ^b (μg)	Ensayo de captación ^c (μg)	Captación de calcio por las células ^d (μg)	Disponibilidad del calcio ^e (%)
Sin fitasa	Ocho cereales miel	1373 \pm 1.9	1153 \pm 11	2.9 \pm 0.6	8.24 \pm 0.8	5.34 \pm 0.8	0.46 \pm 0.03
	Multicereales	1744 \pm 3.1	505.8 \pm 8.1	2.8 \pm 0.4	6.36 \pm 1.0	3.56 \pm 1.0	0.70 \pm 0.07
	Crema de arroz	2831 \pm 8.6	962.5 \pm 12.1	10.45 \pm 1.1	13.25 \pm 2	2.8 \pm 2	0.3 \pm 0.03
	Cereales sin gluten	1544 \pm 9.4	355.1 \pm 8.4	11.9 \pm 1.0	5.38 \pm 0.9	-	-
Con fitasa	Ocho cereales miel	1373 \pm 1.9	1098.4 \pm 10.1	2.9 \pm 0.6	10.01 \pm 1.0	7.11 \pm 1.0	0.65 \pm 0.08*
	Multicereales	1744 \pm 3.1	436 \pm 9.1	2.8 \pm 0.4	12.88 \pm 1.1	10.08 \pm 1.1*	2.3 \pm 0.2*
	Crema de arroz	2831 \pm 8.6	905.9 \pm 11	10.45 \pm 1.1	16.64 \pm 1.6	6.19 \pm 1.6	0.68 \pm 0.03*
	Cereales sin gluten	1544 \pm 9.4	370.6 \pm 10.6	11.9 \pm 1.0	9.32 \pm 0.8	-	-

^a Cantidad de mineral soluble añadido a la monocapa. ^b Blanco, monocapa celular incubada con el tampón de captación. ^c Ensayo de captación, monocapa celular incubada con la fracción soluble. ^d Calculado como (c-b). ^e Calculado como (d/a)x100. (*) indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre la misma papilla desfitinizada o no.

Tabla 31. Captación y disponibilidad de cinc por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con agua

	Papilla infantil	Contenido de Zn en las papillas infantiles ($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de Zn soluble añadido a la monocapa ^a (μg)	Blanco ^b (μg)	Ensayo de captación ^c (μg)	Captación de cinc por las células ^d (μg)	Disponibilidad del cinc ^e (%)
Sin fitasa	Ocho cereales miel	6.1 ± 0.8	2.2 ± 0.09	3.85 ± 0.9	2.1 ± 0.4	-	-
	Multicereales	14.81 ± 2.3	4.29 ± 0.3	9.2 ± 0.14	1.6 ± 0.5	-	-
	Crema de arroz	11.70 ± 2.1	10.06 ± 0.09	6.3 ± 0.6	2.3 ± 0.7	-	-
	Cereales sin gluten	9.55 ± 1.8	3.72 ± 0.1	3.6 ± 0.5	1.9 ± 0.6	-	-
Con fitasa	Ocho cereales miel	6.1 ± 0.8	2.2 ± 0.1	3.85 ± 0.9	2.3 ± 0.3	-	-
	Multicereales	14.81 ± 2.3	4 ± 0.4	9.2 ± 0.14	2.4 ± 0.8	-	-
	Crema de arroz	11.70 ± 2.1	8.78 ± 0.06	6.3 ± 0.6	2.5 ± 0.9	-	-
	Cereales sin gluten	9.55 ± 1.8	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.5	2.4 ± 1	-	-

^a Cantidad de mineral soluble añadido a la monocapa. ^b Blanco, monocapa celular incubada con el tampón de captación. ^c Ensayo de captación, monocapa celular incubada con la fracción soluble. ^d Calculado como $(c-b)$. ^e Calculado como $(d/a) \times 100$.

V.4.2.1.b.2. *Papillas infantiles elaboradas con fórmula de continuación*

Los resultados obtenidos en los ensayos de captación de minerales a partir de las fracciones solubles resultantes de la digestión gastrointestinal de las papillas infantiles elaboradas con fórmula de continuación y tratadas o no con fitasa se presentan, para el hierro, calcio y cinc en las Tablas 32 , 33 y 34 respectivamente.

V.4.2.1.b.2.1. *Hierro*

En la Tabla 32 se observa que la disponibilidad mineral obtenida en todas las papillas comerciales elaboradas con fórmula de continuación y tras su desfitinización presentaron una menor disponibilidad de hierro con respecto a las mismas papillas elaboradas con agua (ver Tabla 29). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Hurrell *et al.*, (1989), Bosscher *et al.*, (2001 c) y Hurrell *et al.*, (2004), probablemente debido a la acción inhibitoria que ejerce la caseína de la leche sobre la disponibilidad del hierro. Pudimos observar al mismo tiempo, que se produjo un ligero incremento en la disponibilidad tras la desfitinización de las papillas elaboradas con leche de continuación con respecto a las mismas no tratadas con fitasa, aunque no en todas las papillas, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) tan solo en la papilla denominada Ocho cereales miel. Esta ausencia de diferencias, pudo probablemente estar debida a que los ratios ($IP_5 + IP_6:Fe$) observados en las papillas sin desfitinizar presentaron valores (ver Tabla 16) que no inhiben la disponibilidad del mineral (Hurrell, 2004).

En relación a lo anterior se puede concluir que en general, la mezcla de las papillas de cereales con fórmula de continuación incrementa la captación y la disponibilidad del hierro en el caso de papillas no desfitinizadas, mientras que la desfitinización de estas papillas no se traduce en un claro incremento de la disponibilidad de este mineral. La mayor disponibilidad se obtuvo a partir de papillas elaboradas con agua y desfitinizadas (3,24-19,5%) frente a las mismas papillas elaboradas con leche de continuación (3-10%). Algunos autores han observado el efecto inhibitorio que ejercen los componentes de la leche sobre la absorción de hierro (Hallberg *et al.*, 1992; Davidsson *et al.*, 1997). Sin embargo, Glahn y Van

Campen, (1997), observaron que la presencia de determinados aminoácidos como la cisteína, presente de un modo significativo en la leche, incrementan la captación de hierro en las células Caco-2.

V.4.2.1.b.2.2. Calcio

Tal y como se observa en la Tabla 33, encontramos, en general, una baja disponibilidad del calcio en todas las papillas elaboradas con leche de continuación tanto desfitinizadas como no desfitinizadas. La desfitinización de las mismas supuso en las papillas Crema de arroz y Cereales sin gluten un incremento en el porcentaje de disponibilidad del calcio con respecto a aquellas no desfitinizadas ($p < 0.05$). El efecto inhibitor que ejerce el ácido fítico sobre la captación de calcio en células Caco-2 fue observado en dos de las cuatro papillas elaboradas con fórmula infantil. Los resultados obtenidos en nuestro estudio son inferiores a los obtenidos por Perales *et al.*, (2005) para cereales infantiles mezclados con leche (1,9-22,5%). También observamos que apenas se produjeron diferencias en la solubilidad del calcio entre las papillas tratadas o no enzimáticamente, lo cual indicaría que no se forman quelatos insolubles entre el ácido fítico y el calcio. Existen datos (Weaver *et al.*, 1991; Pennington *et al.*, 1995) sobre el incremento que se produce en la absorción de calcio en humanos en presencia de leche a unos niveles de calcio de 101 mg/100 g. No obstante, en nuestro estudio la fórmula de continuación empleada presentaba unos niveles de calcio muy superiores (600 mg/100 g) y el estudio fue realizado sobre células Caco-2.

V.4.2.1.b.2.3. Cinc

Los resultados obtenidos para la captación de cinc (Tabla 34) de las papillas elaboradas con fórmula de continuación no mostraron ninguna diferencia con respecto a los resultados obtenidos para las mismas papillas elaboradas con agua. Pudimos observar que en todos los casos la captación de cinc por la monocapa fue inferior al contenido que presentaba la monocapa incubada sin muestra y empleada como blanco. Estos resultados nos impiden confirmar cualquier hallazgo, tales como la influencia negativa que según algunos

autores (Abraham *et al.*, 1990; Navarro *et al.*, 2000) ejercería la caseína de la leche sobre la disponibilidad de cinc en células Caco-2. No obstante, para tres de las papillas estudiadas (Multicereales, Crema de arroz y Cereales sin gluten) se observó una mayor captación de cinc (μg) por la monocapa en las papillas no desfitinizadas, en relación a los resultados obtenidos en las mismas papillas elaboradas con agua, podríamos indicar por tanto que la adición de la fórmula de continuación perjudicó la captación de cinc. En este sentido, Sändstrom, (2001) y Cámara y Amaro (2003) observaron que un exceso de calcio actúa negativamente sobre la captación de cinc, la presencia de un mayor contenido en calcio en las papillas mezcladas con fórmula de continuación empleadas en este estudio pudo por tanto, actuar interfiriendo la captación del zinc, otros estudios (Perales *et al.*, 2006), también observaron en células Caco-2 que el calcio añadido a la leche ejerce un efecto negativo sobre la disponibilidad del cinc.

Tabla 32. Captación y disponibilidad de hierro por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con fórmula de continuación

	Papilla infantil	Contenido de Fe en las papillas infantiles + FC ($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de Fe soluble añadido a la monocapa ^a (μg)	Blanco ^b (μg)	Ensayo de captación ^c (μg)	Captación de hierro por las células ^d (μg)	Disponibilidad del hierro ^e (%)
Sin fitasa	Ocho cereales miel	97.1 \pm 10.1	41.8 \pm 9.6	2.67 \pm 0.3	4.63 \pm 0.9	1.96 \pm 0.9	4.7 \pm 0.9
	Multicereales	100.9 \pm 10	37.3 \pm 8.1	4.2 \pm 0.2	7.88 \pm 1.0	3.68 \pm 1.0	9.9 \pm 1.9
	Crema de arroz	101.2 \pm 10.6	52.6 \pm 9.6	1.88 \pm 0.2	3.44 \pm 1.1	1.55 \pm 1.1	2.9 \pm 2.1
	Cereales sin gluten	88.22 \pm 8.7	49.4 \pm 6.1	2.00 \pm 0.5	3.59 \pm 0.4	1.59 \pm 0.4	3.2 \pm 0.9
Con fitasa	Ocho cereales miel	97.1 \pm 10.1	39.8 \pm 2.9	2.67 \pm 0.3	6.66 \pm 1.3	3.99 \pm 1.3	10 \pm 0.9*
	Multicereales	100,9 \pm 10	46.4 \pm 1.9	4.2 \pm 0.2	8.17 \pm 1.4	3.97 \pm 1.4	8.6 \pm 0.8
	Crema de arroz	101.2 \pm 10.6	50.6 \pm 4.7	1.88 \pm 0.2	3.39 \pm 0.7	1.51 \pm 0.7	3 \pm 1.7
	Cereales sin gluten	88.22 \pm 8.7	45.9 \pm 8.7	2.00 \pm 0.5	3.91 \pm 0.8	1.91 \pm 0.8	4.2 \pm 1.3

^a Cantidad de mineral soluble añadido a la monocapa. ^b Blanco, monocapa celular incubada con el tampón de captación. ^c Ensayo de captación, monocapa celular incubada con la fracción soluble. ^d Calculado como (c -b). ^e Calculado como (d/a)x100. FC= fórmula de continuación. (*) indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre la misma papilla desfitinizada o no.

Tabla 33. Captación y disponibilidad de calcio por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con fórmula de continuación

	Papilla infantil	Contenido de Ca en las papillas infantiles + FC ($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de Ca soluble añadido a la monocapa ^a (μg)	Blanco ^b (μg)	Ensayo de captación ^c (μg)	Captación de calcio por las células ^d (μg)	Disponibilidad del calcio ^e (%)
Sin fitasa	Ocho cereales miel	2285 \pm 130	343.8 \pm 16.1	4.01 \pm 0.3	2.5 \pm 0.3	-	-
	Multicereales	2656 \pm 62.6	451.5 \pm 20	9.04 \pm 0.7	14.71 \pm 1.9	5.67 \pm 1.9	1.26 \pm 0.06
	Crema de arroz	3743 \pm 93.4	636. \pm 9.7	4.01 \pm 1.01	5.04 \pm 0.7	1.03 \pm 0.7	0.16 \pm 0.01
	Cereales sin gluten	2456 \pm 106.2	442.1 \pm 9.9	4.57 \pm 1.21	5.58 \pm 0.4	1.01 \pm 0.4	0.23 \pm 0.03
Con fitasa	Ocho cereales miel	2285 \pm 130	479.9 \pm 13.3	4.01 \pm 0.3	3.24 \pm 0.2	-	-
	Multicereales	2656 \pm 62.6	451.5 \pm 11.9	9.04 \pm 0.7	8.64 \pm 1.8	-	-
	Crema de arroz	3743 \pm 93.4	711.2 \pm 8.7	4.01 \pm 1.01	6.49 \pm 0.9	2.48 \pm 0.9	0.35 \pm 0.07*
	Cereales sin gluten	2456 \pm 106.2	368.4 \pm 10.1	4.57 \pm 1.21	6.75 \pm 0.7	2.18 \pm 0.7	0.59 \pm 0.1*

^a Cantidad de mineral soluble añadido a la monocapa. ^b Blanco, monocapa celular incubada con el tampón de captación. ^c Ensayo de captación, monocapa celular incubada con la fracción soluble. ^d Calculado como (c - b). ^e Calculado como (d/a)x100. FC= fórmula de continuación. (*) indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre la misma papilla desfitinizada o no.

Tabla 34. Captación y disponibilidad de cinc por las células Caco-2 a partir de papillas infantiles elaboradas a base de cereales (desfitinizadas o no) y reconstituidas con fórmula de continuación

	PAPILLA INFANTIL	Contenido de Zn en las papillas infantiles + FC ($\mu\text{g/g}$)	Cantidad de Zn soluble añadido a la monocapa ^a (μg)	Blanco ^b (μg)	Ensayo de captación ^c (μg)	Captación de cinc por las células ^d (μg)	Disponibilidad del cinc ^e (%)
Sin fitasa	Ocho cereales miel	12.18 \pm 1.3	2.7 \pm 0.9	2.28 \pm 0.6	1.02 \pm 0.6	-	-
	Multicereales	20.89 \pm 2.6	2.3 \pm 2	2.70 \pm 1.1	2.02 \pm 0.4	-	-
	Crema de arroz	17.78 \pm 2.3	7.1 \pm 2.7	3.96 \pm 1.2	2.00 \pm 0.3	-	-
	Cereales sin gluten	15.63 \pm 3.1	3.8 \pm 1.8	1.68 \pm 0.4	1.21 \pm 0.3	-	-
Con fitasa	Ocho cereales miel	12.18 \pm 1.3	3 \pm 1.3	2.28 \pm 0.6	1.63 \pm 0.3	-	-
	Multicereales	20.89 \pm 2.6	2.7 \pm 0.7	2.70 \pm 1.1	0.74 \pm 0.1	-	-
	Crema de arroz	17.78 \pm 2.3	8 \pm 2.9	3.96 \pm 1.2	0.93 \pm 0.07	-	-
	Cereales sin gluten	15.63 \pm 3.1	3.4 \pm 1.1	1.68 \pm 0.4	0.96 \pm 0.2	-	-

^a Cantidad de mineral soluble añadido a la monocapa. ^b Blanco, monocapa celular incubada con el tampón de captación. ^c Ensayo de captación, monocapa celular incubada con la fracción soluble. ^d Calculado como (c-b). ^e Calculado como (d/a)x100. FC= fórmula de continuación. (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la misma papilla desfitinizada o no.

Los resultados obtenidos en esta parte del estudio, nos llevan a concluir que la desfitinización de las papillas infantiles a base de cereales cuando estas son reconstituidas con agua incrementa la disponibilidad de hierro y calcio. Estos resultados confirmarían para el caso del hierro, los obtenidos por Hurrell (2004) realizando estudios *in vivo* en los que observó que la adición de fórmula láctea a alimentos a base de cereales inhibe la absorción de hierro y reduce la mejora que produciría sobre la misma la eliminación de su contenido en ácido fítico, recomendando por tanto la desfitinización de estos alimentos cuando son reconstituidos con agua, hecho que adquiere una gran importancia en la alimentación infantil de países en vías de desarrollo en los que la adición de leche para la reconstitución de los mismos, no es ni mucho menos habitual. En el caso de alimentos infantiles a base de cereales y que no han sido desfitinizados, nuestros resultados realizados *in vitro* están de acuerdo con los obtenidos mediante estudios *in vivo* por Davidsson *et al.*, (2004) para alimentos infantiles a base de cereales. De un modo similar, nosotros no encontramos un incremento en la disponibilidad del hierro de las papillas infantiles no desfitinizadas tras la adición de leche de continuación.

V.4.2.1.c. Efecto de la interacción de la desfitinización y de la adición de fórmula infantil sobre la captación mineral

En la tabla 35 se presentan los niveles de significación ($p < 0.01$) de un análisis de varianza multifactorial para determinar el efecto de la interacción de la adición de fitasa y de la reconstitución de la papilla (agua o fórmula infantil) sobre la disponibilidad mineral determinada a partir de la captación mineral por las células Caco-2.

Tabla 35. ANOVA de dos vías para la disponibilidad de hierro, calcio y cinc a partir de la captación mineral en las células Caco-2 de las papillas infantiles empleadas en este estudio

	Disponibilidad Fe (%)	Disponibilidad Ca (%)	Disponibilidad Zn (%)
Ocho cereales miel			
Tratamiento enzimático	p = 0.000	p = 0.005	-
Reconstituyente	p = 0.000	p = 0.000	-
Interacción	p = 0.000	p = 0.005	-
Multicereales			
Tratamiento enzimático	p = 0.000	p = 0.028	-
Reconstituyente	p = 0.007	p = 0.000	-
Interacción	p = 0.000	p = 0.000	-
Crema de arroz			
Tratamiento enzimático	p = 0.680	p = 0.000	-
Reconstituyente	p = 0.414	p = 0.000	-
Interacción	p = 0.594	p = 0.008	-
Cereales sin gluten			
Tratamiento enzimático	p = 0.000	p = 0.000	-
Reconstituyente	p = 0.175	p = 0.000	-
Interacción	p = 0.001	p = 0.000	-

Nivel de significación: $p < 0.05$

Como se observa en la Tabla 35, el efecto de la interacción de ambos factores fue significativo para la disponibilidad del hierro en tres de las cuatro papillas estudiadas a excepción de la papilla Crema de arroz en la que la disponibilidad de este mineral no se vio significativamente afectada ($p < 0.01$) por la adición de fitasa, la adición de fórmula infantil ni la interacción de ambas. La disponibilidad del calcio presentó efectos significativos entre la aplicación de fitasa y la reconstitución con agua o fórmula infantil, así como su interacción en todas las papillas estudiadas. Estudios realizados *in vivo*, muestran que la adición de leche a una dieta conteniendo ácido fítico no afecta a la disponibilidad del hierro (Rosado *et al*, 2005), en nuestro estudio, realizado empleando ensayos *in vitro* sobre la línea celular Caco-2, observamos un incremento en la disponibilidad del mismo a partir de papillas infantiles conteniendo ácido fítico cuando son reconstituidas con leche de continuación, mientras que

tras la desfitinización de las mismas, observamos un incremento en la disponibilidad de hierro y de calcio cuando las papillas eran reconstituidas con agua frente a aquellas mezcladas con leche de continuación. No obstante y tal y como se observa en la Tabla 35, la interacción de ambos factores fue en general significativa en los casos en que también lo fueron ambos factores por si solos, lo cual indicaría que la mezcla de la papilla infantil con agua o con fórmula infantil está relacionada con los efectos de la desfitinización sobre la captación de hierro y cinc. El efecto que ejercen ambos factores sobre la disponibilidad mineral se detallan en el apartado 3.1.2 de esta sección.

V.4.2.1.2. Correlación entre la solubilidad, diálisis y captación de hierro, calcio y cinc

Los resultados obtenidos en el análisis de correlación entre la solubilidad, diálisis y captación de hierro, calcio y cinc, se muestran en la Tabla 36. en ella se puede observar que existe correlación positiva entre el contenido en calcio y el porcentaje del mismo que dializa, es decir, que sería disponible; así como un efecto negativo entre el contenido en calcio sobre el porcentaje de dialización del zinc y del hierro, aunque en este último no fue estadísticamente significativo, ambos hallazgos, fueron ya observados por Perales *et al.*, (2006) estudiando leche enriquecida en calcio, y por Lönnerdal (1997) estudiando absorción de elementos traza durante la infancia. Observamos por el contrario una correlación positiva entre el contenido en cinc y el porcentaje de dialización del calcio. Es bien conocido que el cinc interfiere sobre la absorción de hierro (Lind *et al.*, 2003), en este sentido la correlación observada en nuestro estudio fue igualmente negativa entre el contenido en hierro y la disponibilidad del cinc, siendo además estadísticamente significativa ($p < 0.05$). En base a las correlaciones obtenidas, podemos concluir que en general se observó una ausencia de relación positiva entre la solubilidad del mineral y los parámetros de disponibilidad del mismo (diálisis y captación), lo cual confirmaría el hecho de que la solubilidad y la disponibilidad mineral no siguen siempre tendencias paralelas (Perales *et al.*, 2005).

Tabla 36. Análisis de correlación entre la solubilidad, diálisis y captación de hierro, calcio y cinc

	Fe (µg/g)	Ca (µg/g)	Zn (µg/g)	% solub Fe	% solub Ca	% solub Zn	% dializ Fe	% dializ Ca	% dializ Zn	% capt Fe	% capt Ca	% capt Zn
Fe (µg/g)	-	-	-	0.398 0.082	-0.364 0.115	-0.507* 0.023	-0.314 0.178	0.390 0.089	-0.526* 0.017	0.167 0.537	-0.118 0.664	-
Ca (µg/g)	-	-	-	0.663* 0.001	-0.505* 0.023	-0.474* 0.035	-0.421 0.065	0.625* 0.003	-0.706* 0.001	-0.043 0.874	-0.265 0.322	-
Zn (µg/g)	-	-	-	0.688* 0.001	-0.501* 0.024	-0.379 0.099	-0.437 0.054	0.609* 0.004	-0.747* 0.000	-0.066 0.808	-0.271 0.310	-
% solub Fe	0.398 0.082	0.663* 0.001	0.688* 0.001	-	-0.347 0.134	-0.232 0.324	-0.299 0.201	0.733* 0.000	-0.716* 0.000	-0.327 0.217	-0.464 0.071	-
% solub Ca	-0.364 0.115	-0.505* 0.023	-0.501* 0.024	-0.347 0.134	-	0.232 0.324	0.264 0.261	-0.385 0.093	0.437 0.054	0.394 0.131	0.104 0.703	-
% solub Zn	-0.507* 0.023	-0.474* 0.035	-0.379 0.099	-0.232 0.324	0.232 0.324	-	0.263 0.262	-0.343 0.139	0.373 0.106	-0.259 0.332	-0.082 0.763	-
% dializ Fe	-0.314 0.178	-0.421 0.065	-0.437 0.054	-0.299 0.201	0.264 0.261	0.263 0.262	-	-0.203 0.391	0.611* 0.004	0.356 0.176	-0.103 0.704	-
% dializ Ca	0.390 0.089	0.625* 0.003	0.609* 0.004	0.733* 0.000	-0.385 0.093	-0.343 0.138	-0.203 0.391	-	-0.595* 0.006	0.008 0.977	-0.422 0.103	-
% dializ Zn	-0.536* 0.017	-0.706* 0.001	-0.747* 0.000	-0.716* 0.000	0.437 0.054	0.373 0.106	0.611* 0.004	-0.595* 0.006	-	0.209 0.437	0.177 0.511	-
% capt Fe	0.167 0.537	-0.043 0.874	-0.066 0.808	-0.327 0.217	0.394 0.131	-0.259 0.332	0.356 0.176	0.008 0.977	0.209 0.437	-	0.438 0.090	-
% capt Ca	-0.118 0.664	-0.265 0.322	-0.271 0.310	-0.464 0.071	0.104 0.703	-0.082 0.763	-0.103 0.704	-0.422 0.103	0.177 0.511	0.438 0.090	-	-
% capt Zn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* indica correlación estadísticamente significativa (p<0.05) entre ambas variables

V.4.1.2. Biodisponibilidad mineral. Ensayos de captación, retención y transporte de hierro, calcio y cinc.

Estos ensayos se llevaron a cabo a partir de las fracciones solubles resultantes de la digestión gastrointestinal *in vitro* de las papillas infantiles siguiendo las recomendaciones de Aura, (2005).

V.4.1.2.a. *Evaluación de la toxicidad de las papillas infantiles sobre la monocapa celular: Resistencia eléctrica transepitelial (TEER)*

V.4.1.2.a.1. *TEER en muestras sin tratamiento con fitasa*

Los datos de toxicidad de los digeridos de las papillas infantiles se obtuvieron a partir de los valores de la TEER (Eklund *et al.*, 2003; Ranaldi *et al.*, 2003; Sambuy *et al.*, 2005) de las monocapas celulares incubadas con las fracciones solubles resultantes de la digestión gastrointestinal *in vitro* (Aura, 2005) de las papillas infantiles a base de cereales sin desfitinizar. Se midió cada 30 minutos la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), que queda reflejada en la Figura 28. Podemos observar que los valores se mantuvieron estacionarios y superiores a $1500 \Omega/\text{cm}^2$, lo cual nos indica el buen estado de la monocapa celular durante el ensayo para el estudio de la captación retención y transporte de minerales.

Los componentes de los digeridos de las papillas infantiles no indujeron por tanto toxicidad ninguna sobre las células. Del mismo modo, los valores de la TEER a lo largo de los 180 minutos de incubación, fueron muy similares para todas las papillas, manteniéndose por encima de los $700 \Omega/\text{cm}^2$, valor que según Lu *et al.*, 1996, indica un buen estado de la monocapa de células aunque en general se considera que las células Caco-2 han formado una monocapa con una adecuada función de barrera cuando la TEER presenta valores superiores a $250 \Omega/\text{cm}^2$ (Phillippy, 2006).

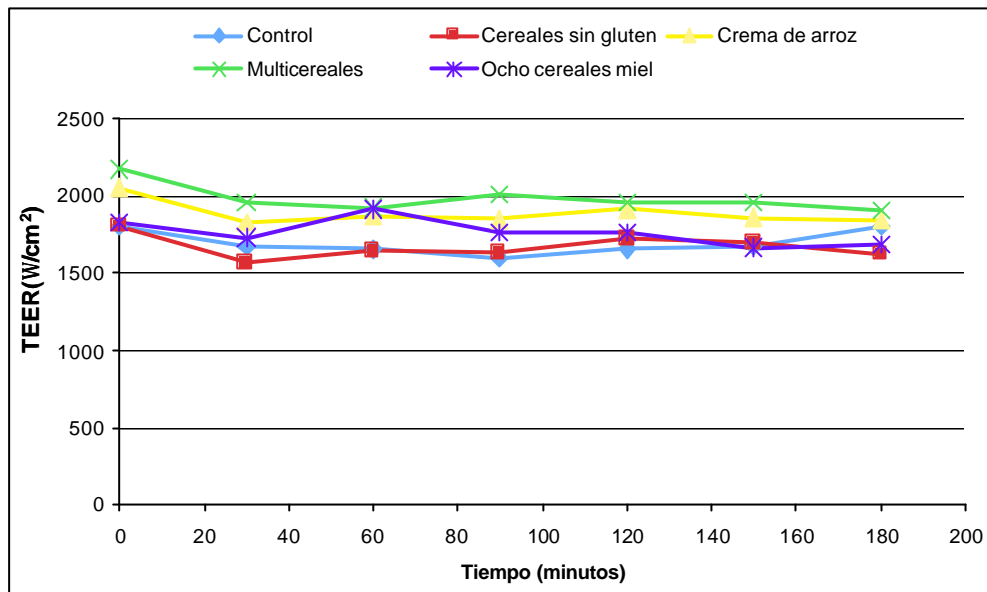


Figura 28. Valores de la TEER en células Caco-2 tratadas en su polo apical con las fracciones solubles procedentes de la digestión *in vitro* de papillas infantiles

V.4.1.2.a.2. TEER en muestras con tratamiento con fitasa

Los valores de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) medidos cada 30 minutos durante las tres horas de incubación con las fracciones solubles procedentes de la digestión *in vitro* de las papillas infantiles desfitinizadas, se muestran en la Figura 29.

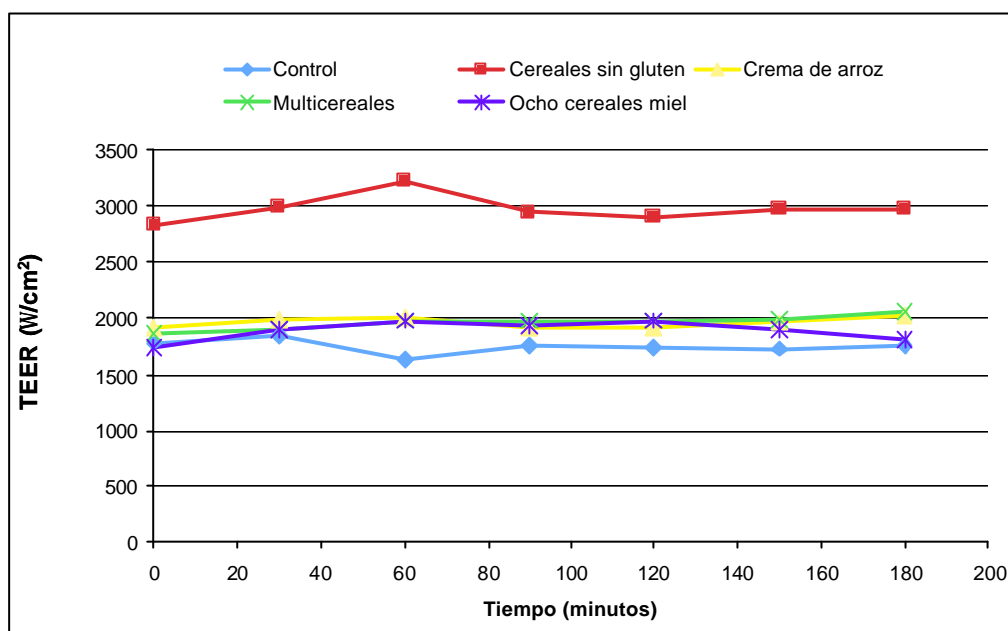


Figura 29. Valores de la TEER en células Caco-2 obtenidos durante el proceso de captación y transporte de minerales a partir de digeridos de papillas infantiles desfitinizadas

Se puede comprobar que los valores de la TEER se mantuvieron estacionarios durante todo el proceso de incubación. La muestra de Cereales sin gluten desfitinizada presentó unos valores de TEER superiores al resto de muestras estudiadas y a las papillas sin tratamiento enzimático, no obstante este valor se empleó únicamente con la finalidad de conocer una posible toxicidad de los componentes del digerido sobre las células.

Por tanto, la TEER mostró en nuestro estudio (Figuras 28 y 29) valores estables durante el tiempo de incubación, lo cual indicaría la ausencia de toxicidad de las papillas desfitinizadas o no y de sus componentes sobre las células.

V.4.1.2.b. Captación, retención y transporte de hierro, calcio y cinc de papillas infantiles reconstituidas con agua

Los resultados de captación, retención y transporte de hierro, calcio y cinc a partir de las fracciones solubles resultantes de la digestión gastrointestinal de las papillas infantiles desfitinizadas o no y reconstituidas con agua, se muestran en la Tabla 37 para el hierro, en la Tabla 38 para el calcio y en la Tabla 39 para el cinc. Estos parámetros se emplearon para conocer la fracción del mineral que es captado por las células, el mineral presente en éstas procedente del alimento, así como el mineral transportado a través de la monocapa y que sería equivalente al mineral que pasa a sangre tras su absorción. La fracción de mineral captado por las células se calculó a partir de la suma del mineral retenido a nivel intracelular y el mineral transportado a través de la monocapa (Perales *et al.*, 2005). Debido a las diferencias observadas en términos de solubilidad tras la digestión *in vitro* de las muestras, la captación y transporte mineral fueron determinados mediante el cálculo de los porcentajes de eficacia de los mismos tal y como se describe en el apartado III.8.2.3. en la sección Material y Métodos de esta tesis.

V.4.1.2.b.1. Hierro

En todas las papillas estudiadas, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los valores de solubilidad del hierro de las muestras desfitinizadas y las no desfitinizadas. De modo que, las papillas Ocho cereales miel y Multicereales mostraron unos mayores valores tras el tratamiento con fitasa, mientras que en las papillas Crema de arroz y Cereales sin gluten los mayores valores de solubilidad los encontramos en las muestras no desfitinizadas. Tal y como se muestra en la Tabla 37, la desfitinización de las papillas infantiles, produjo un incremento en la retención del hierro por la monocapa. También se observó una mayor cantidad de hierro transportado en todos los casos en las papillas tratadas con fitasa, así como una mayor captación del mismo; lo cual confirma los hallazgos realizados hasta ahora sobre el efecto inhibitorio que ejerce el ácido fítico sobre la captación y transporte de hierro empleando la línea celular Caco-2 (Wortley *et al.*, 2005; Glahn *et al.*, 2002; Viadel *et al.*, 2006). Observamos del mismo modo unos mayores

valores de porcentaje de retención intracelular, porcentaje de eficacia del transporte y de eficacia de la captación de hierro en las papillas Ocho cereales miel, Multicereales y Cereales sin gluten desfitinizadas con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a las no tratadas. Estos resultados confirmarían otros estudios sobre el efecto inhibitor del ácido fítico sobre la disponibilidad del hierro (Han *et al.*, 1994; Lestienne *et al.*, 2005 b).

En las papillas Ocho cereales miel y Multicereales, un incremento en el hierro soluble añadido a la monocapa se tradujo en un incremento en la captación (retención + transporte) del mismo. Estos resultados confirman el hecho de que la solubilidad de un mineral da una estimación de la fracción del elemento que se encuentra disponible para la absorción, pero no del mineral biodisponible (Jovaní *et al.*, 2001 a; Eklund *et al.*, 2003; Fairweather-Tait *et al.*, 2005). Resultados similares fueron encontrados por Viadel *et al.*, (2006) para el calcio. No obstante, no encontramos un incremento en la solubilidad del hierro tras la desfitinización de las papillas Crema de arroz y Cereales sin gluten, este hecho podría ser debido a las diferentes proporciones de cereales que se emplean como materia prima en cada una de ellas. Igualmente, se observó que los menores valores en la retención, transporte y captación de hierro lo presentó la papilla Cereales sin gluten sin desfitinizar. Esta papilla presentó el mayor ratio ($IP_6 + IP_5$): Fe (3.5:1). Sandberg y Svanberg (1991) observaron que concentraciones de ácido fítico (IP_6) por encima de $0,5 \mu\text{mol/g}$ pueden interferir con la absorción de hierro. En nuestro estudio se confirma este hecho empleando la línea celular Caco-2, ya que la eliminación completa del ácido fítico produjo un incremento en dichos parámetros relacionados con la disponibilidad mineral.

V.4.1.2.b.2. Calcio

En la Tabla 38 se muestran los resultados de retención, transporte y captación de calcio obtenidos en este estudio. En ella podemos observar que sólo la papilla Cereales sin gluten mostró un incremento ($p < 0.05$) en el porcentaje de solubilidad tras la desfitinización de las mismas, a pesar de lo que han observado algunos estudios (Vohra *et al.*, 1965; Simpson *et al.*, 1990) en los que se apunta que los fitatos reducen la solubilidad del calcio, nosotros encontramos bajos valores de solubilidad en las muestras desfitinizadas, lo cual podría estar

debido a la formación de compuestos insolubles entre el calcio y la fibra que no ha sido eliminada durante la aplicación del tratamiento con fitasa, este hecho ya fue señalado por Perales *et al.*, (2005) en estudios realizados sobre fórmulas lácteas y zumos de frutas que contenían cereales.

En la papilla Cereales sin gluten se observaron unos mayores valores de calcio transportado y captado tras la desfitinización, presentando igualmente unos mayores valores de solubilidad. Este hecho que podríamos atribuir al mayor ratio $(IP_6 + IP_5):Ca$ que presenta esta papilla previamente a la aplicación del tratamiento con fitasa lo que se tradujo en bajos niveles de transporte de calcio. Esta papilla mostró igualmente tras la desfitinización el mayor incremento en la eficacia del transporte lo cual se pudo deber del mismo modo a la diferencia existente en los niveles de ácido fítico antes y después de la desfitinización. Podemos afirmar por tanto, que un incremento en el calcio soluble añadido se traduce en un incremento en la captación (retención + transporte) del mismo (Perales *et al.*, 2006), así como que la desfitinización de las papillas se reflejó, en tres de las cuatro papillas estudiadas, en un incremento en la eficacia en la captación del calcio, aunque no en otras variables indicativas de disponibilidad mineral como es la eficacia en el transporte de calcio a través de la monocapa.

En este sentido, la variabilidad de los resultados de captación y transporte de calcio obtenidos en este estudio confirman las conclusiones de Phillippy (2006), según los cuales, el estudio de la captación de calcio por las células Caco-2 puede ofrecer datos confusos debido a la capacidad de unión del calcio a la superficie celular. Según este autor, el estudio de la captación de calcio en presencia de ácido fítico demuestra la formación de complejos IP_6-Ca que se unen a la membrana celular y que no son realmente captados por la célula. Los valores de captación (μg) y porcentaje de eficacia en la captación fueron muy heterogéneos entre las diferentes muestras; en este sentido Perales *et al.*, (2005) señalaron la existencia de determinados factores, y no solo la solubilidad del calcio, que estarían implicados en la variabilidad observada en estudios de disponibilidad del calcio. De nuestros resultados podemos deducir que la desfitinización de las papillas infantiles se traduce en un incremento en la captación de calcio en las células Caco-2, lo que podría traducirse en un incremento en

su disponibilidad. Aunque en este sentido, la variabilidad observada en los resultados nos impide confirmar este hecho.

V.4.1.2.b.3. *Cinc*

Los porcentajes de solubilidad obtenidos para cada papilla se muestran en la Tabla 39, en ella se puede observar que tras la desfitinización, no se produjo en ningún caso un incremento en la solubilidad del cinc. Sin embargo, si observamos unos mayores valores de captación y transporte de cinc a partir de las papillas que presentaban unos mayores valores de solubilidad. La retención intracelular del cinc, fue mayor en tres de las cuatro papillas tras la eliminación del ácido fítico ($p < 0.05$), así como un incremento en el porcentaje de eficacia de captación del cinc tras el tratamiento enzimático en todas las muestras estudiadas. No obstante, la variabilidad observada podría estar debida a la composición heterogénea de las papillas infantiles. Según nuestros resultados el ácido fítico influyó negativamente sobre la captación de cinc por las células Caco-2, aunque sólo las papillas Crema de arroz y Cereales sin gluten presentaron un incremento en el porcentaje de eficacia en el transporte. Lestienne *et al.*, (2005 b) no observaron una mejora en la disponibilidad de cinc en harina de mijo con la adición de una fitasa exógena tras su digestión gastrointestinal, nosotros hemos comprobado que este hecho está condicionado por la composición de la papilla. En este sentido, Van Dael *et al.*, (1999) concluyeron que la desfitinización de fórmulas infantiles elaboradas a base de leche de soja podría no ser necesaria ya que no incrementa la biodisponibilidad del hierro, calcio y cinc. El efecto negativo que ejerce el ácido fítico sobre la disponibilidad del cinc ha sido ampliamente documentado por estudios *in vivo* (Lönnerdal *et al.*, 1984; Jovaní *et al.*, 2001 a; Matsui, 2002) e *in vitro* (Guillem *et al.*, 2000), aunque en nuestro caso no se ha observado en general un incremento en la solubilidad del cinc tras la desfitinización, si observamos un incremento en otros parámetros indicadores de biodisponibilidad (retención, transporte y captación) tras la eliminación del ácido fítico de las muestras.

Tabla 37. Hierro: Retención, transporte y captación en células Caco-2 a partir de papillas infantiles desfitinizadas o no, reconstituidas con agua

	Papilla infantil	Fe añadido (µg)	Solubilidad (%)	Retención (µg)	Retención (%)	Transporte (µg)	Eficacia transporte (%)	Captación (µg)	Eficacia captación (%)
Sin fitasa	Ocho cereales	12,51	17,42 ± 6,1 ^b	1 ± 0,1 ^b	7,99 ± 2,2 ^b	1,59 ± 0,6 ^a	2,21 ± 1 ^b	2,59 ± 0,8 ^b	3,6 ± 0,9 ^b
	Multicereales	13,08	8,72 ± 2,7 ^b	0,79 ± 0,4 ^b	6,04 ± 0,6 ^b	0,21 ± 0 ^b	0,14 ± 0,03 ^b	1 ± 0,2 ^b	0,66 ± 0,2 ^b
	Crema de arroz	13,13	24,21 ± 1,9 ^a	2,19 ± 0,1 ^a	16,68 ± 3,8 ^a	1,09 ± 0,7 ^a	2,01 ± 0,8 ^a	3,28 ± 1,1 ^a	6,05 ± 2,2 ^a
	Cereales sin gluten	11,18	20,93 ± 4,8 ^a	0,78 ± 0,2 ^b	6,98 ± 0,8 ^b	0,18 ± 0,04 ^b	0,33 ± 0,1 ^b	0,96 ± 0,2 ^b	1,8 ± 0,3 ^b
Con fitasa	Ocho cereales	12,51	34,53 ± 8,6 ^a	2,52 ± 0,3 ^a	20,14 ± 3,9 ^a	2,18 ± 0,9 ^a	6,02 ± 1,3 ^a	4,7 ± 0,9 ^a	13 ± 2,5 ^a
	Multicereales	13,08	21,1 ± 1,8 ^a	2,1 ± 0,2 ^a	16,28 ± 2,1 ^a	2,49 ± 0,9 ^a	4,01 ± 0,8 ^a	4,62 ± 1,6 ^a	7,45 ± 3,9 ^a
	Crema de arroz	13,13	19,19 ± 3 ^b	2,41 ± 0,3 ^a	18,35 ± 3,4 ^a	1,66 ± 0,6 ^a	2,43 ± 0,6 ^a	4,0 ± 1,2 ^a	5,95 ± 1,1 ^a
	Cereales sin gluten	11,18	16,64 ± 6,2 ^b	1,65 ± 0,2 ^a	14,75 ± 1,3 ^a	0,99 ± 0,2 ^a	1,47 ± 0,3 ^a	2,64 ± 0,8 ^a	3,93 ± 0,7 ^a

Valores medios ± desviación standard (n=3). Distintas letras (a-b) como superíndice dentro de la misma papilla indica diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre las papillas tratadas o no con fitasa

Tabla 38. Calcio: Retención, transporte y captación en células Caco-2 a partir de papillas infantiles desfitinizadas o no, reconstituidas con agua

	Papilla infantil	Ca añadido (µg)	Solubilidad (%)	Retención (µg)	Retención (%)	Transporte (µg)	Eficacia transporte (%)	Captación (µg)	Eficacia captación (%)
Sin fitasa	Ocho cereales	206	38,9 ± 11,1 ^a	5,72 ± 0,3 ^a	2,78 ± 1 ^a	25,99 ± 8 ^a	4,9 ± 1,2 ^a	31,71 ± 4,9 ^a	5,99 ± 2 ^a
	Multicereales	261,6	15,2 ± 1,8 ^a	7,33 ± 0,2 ^a	2,8 ± 0,6 ^a	16,1 ± 3,9 ^b	0,94 ± 0,1 ^a	23,43 ± 3,6 ^b	0,66 ± 0,2 ^b
	Crema de arroz	424,7	2,8 ± 1 ^a	2,18 ± 0,3 ^b	0,51 ± 0,2 ^a	33,1 ± 6,1 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	35,28 ± 7,2 ^a	0,23 ± 0,2 ^a
	Cereales sin gluten	231,6	4,53 ± 1,3 ^b	4,45 ± 0,2 ^a	1,92 ± 0,3 ^a	15,64 ± 4,4 ^b	0,31 ± 0,08 ^b	20,09 ± 1,8 ^b	0,39 ± 0,1 ^b
Con fitasa	Ocho cereales	206	22,5 ± 2,3 ^b	0,7 ± 0,2 ^b	0,34 ± 0,09 ^b	29,59 ± 7,2 ^a	3,24 ± 1 ^a	30,29 ± 6,8 ^a	3,31 ± 0,9 ^a
	Multicereales	261,6	8,03 ± 2,7 ^b	7,33 ± 1,4 ^a	2,8 ± 0,6 ^a	23,08 ± 2,1 ^a	0,71 ± 0,04 ^b	30,41 ± 2,2 ^a	0,93 ± 0,2 ^a
	Crema de arroz	424,7	3,72 ± 1,9 ^a	5,5 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,7 ^a	28,1 ± 4,4 ^a	0,25 ± 0,07 ^a	33,6 ± 7,1 ^a	0,43 ± 0,09 ^a
	Cereales sin gluten	231,6	8,31 ± 1,2 ^a	2,98 ± 0,7 ^b	1,29 ± 0,9 ^a	66,16 ± 10,8 ^a	2,38 ± 0,1 ^a	69,14 ± 8,2 ^a	2,48 ± 0,3 ^a

Valores medios ± desviación standard (n=3). Distintas letras (a-b) como superíndice dentro de la misma papilla indica diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre las papillas tratadas o no con fitasa.

Tabla 39. Cinc: Retención, transporte y captación en células Caco-2 a partir de papillas infantiles desfitinizadas o no, reconstituidas con agua

	Papilla infantil	Zn añadido (µg)	Solubilidad (%)	Retención (µg)	Retención (%)	Transporte (µg)	Eficacia transporte (%)	Captación (µg)	Eficacia captación (%)
Sin fitasa	Ocho cereales	2,12	36,4 ± 7,1 ^b	0,18 ± 0,08 ^b	8,5 ± 2 ^b	1,88 ± 0,6 ^a	32,3 ± 3 ^a	2,06 ± 0,8 ^a	35,4 ± 4,1 ^b
	Multicereales	2,22	18,9 ± 3,8 ^a	0,09 ± 0,01 ^b	4,05 ± 2 ^b	0,5 ± 0,08 ^a	4,25 ± 1,1 ^a	0,59 ± 0,6 ^a	5 ± 0,9 ^b
	Crema de arroz	2,63	17 ± 1,9 ^b	0,54 ± 0,1 ^a	20,53 ± 3,8 ^a	0,62 ± 0,1 ^b	4 ± 0,8 ^b	1,16 ± 0,4 ^a	7,5 ± 0,2 ^b
	Cereales sin gluten	1,63	37,8 ± 6,2 ^a	0,09 ± 0,01 ^b	5,5 ± 1,6 ^b	0,71 ± 0,2 ^b	16,5 ± 0,3 ^a	0,8 ± 0,4 ^b	18,6 ± 1,2 ^b
Con fitasa	Ocho cereales	2,12	46,9 ± 6,6 ^a	0,84 ± 0,2 ^a	22,2 ± 2,7 ^a	1,04 ± 0,5 ^a	23 ± 3,6 ^b	1,88 ± 0,9 ^a	41,6 ± 6,5 ^a
	Multicereales	2,22	18,92 ± 2,7 ^a	0,42 ± 0,1 ^a	18,92 ± 2,8 ^a	0,44 ± 0,2 ^a	3,74 ± 0,3 ^b	0,86 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,2 ^a
	Crema de arroz	2,63	27,3 ± 6 ^a	0,38 ± 0,1 ^a	14,45 ± 3,4 ^b	1,59 ± 0,6 ^a	16,5 ± 2,6 ^a	1,97 ± 0,8 ^a	20,4 ± 2,1 ^a
	Cereales sin gluten	1,63	21 ± 4,3 ^b	0,18 ± 0,03 ^a	61,3 ± 9,9 ^a	1,43 ± 0,4 ^a	18,4 ± 4,1 ^a	1,61 ± 0,2 ^a	20,7 ± 0,6 ^a

Valores medios ± desviación standard (n=3). Distintas letras (a-b) como superíndice dentro de la misma papilla indica diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre las papillas tratadas o no con fitasa.

A fin de representar gráficamente los porcentajes de mineral captado y transportado con respecto al mineral añadido de cada una de las papillas infantiles (desfitinizadas o no) se ha elaborado la Figura 30. Si clasificamos los elementos minerales según los porcentajes de captación en las papillas desfitinizadas, el resultado sería Zn > Fe > Ca.

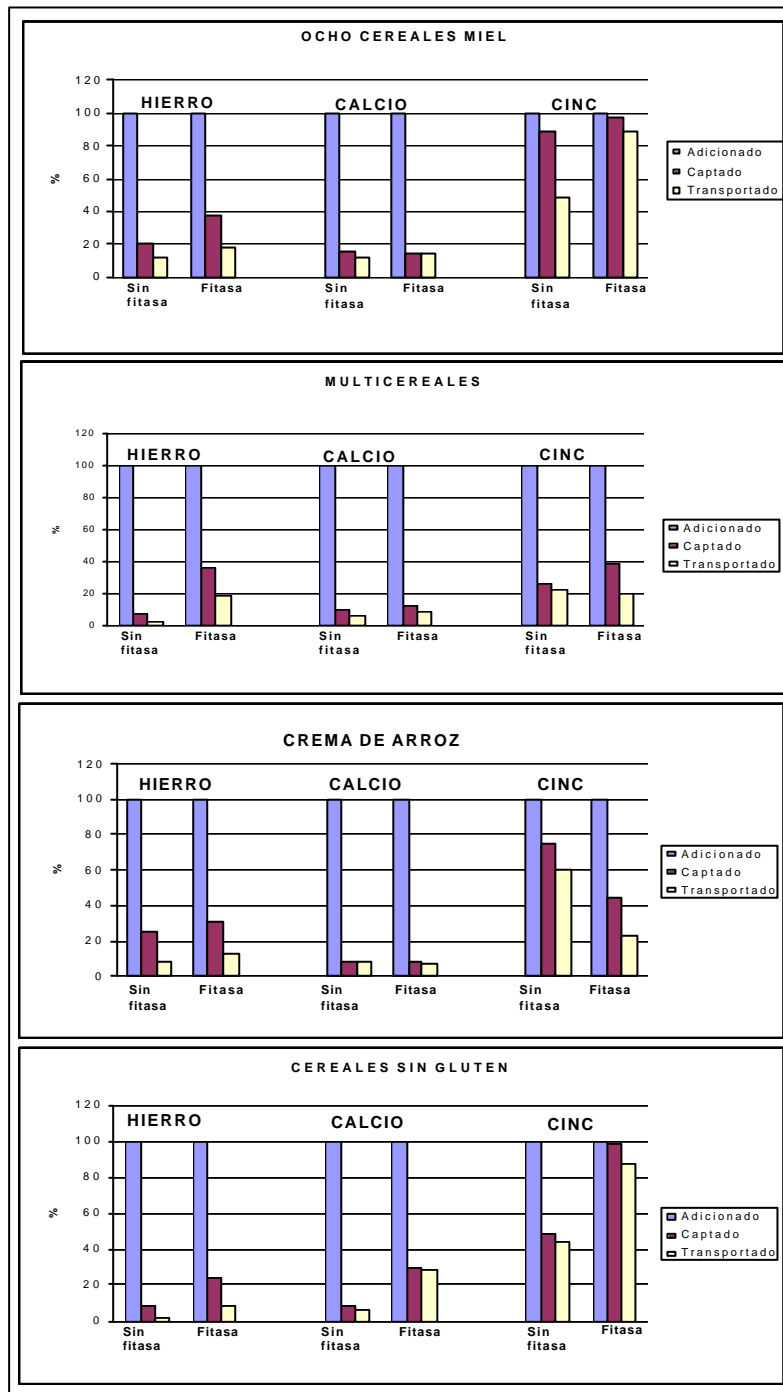


Figura 30. Papillas Ocho cereales miel, Multicereales, Crema de arroz y Cereales sin gluten. Porcentajes de captación y transporte de minerales

Para las papillas comerciales sin desfitinizar, dos muestras (Ocho cereales miel y Crema de arroz) presentaron similar tendencia $Zn > Fe > Ca$, mientras que la de Multicereales y Cereales sin gluten encontramos que $Zn > Ca > Fe$.

La desfitinización, tal y como muestra la Figura 30, incrementó el porcentaje de captación de hierro en todas las papillas estudiadas con respecto a las no tratadas con fitasa. Para el calcio, observamos gran variabilidad en este parámetro según la muestra analizada. Este hecho, no nos permitió obtener conclusiones claras sobre el efecto que ejerce la desfitinización.

Según el porcentaje de transporte de minerales en las papillas desfitinizadas la clasificación de los mismos sería $Zn > Fe > Ca$. Mientras que en las papillas comerciales el orden sería $Zn > Ca > Fe$ para tres de ellas (Ocho cereales miel, Multicereales y Cereales sin gluten) y de $Zn > Fe > Ca$ para Crema de arroz. Tras la eliminación del contenido en ácido fítico se observó un incremento en el transporte de hierro con respecto a las papillas no desfitinizadas en todas las muestras estudiadas.

En tres (Ocho cereales miel, Multicereales y Cereales sin gluten) de las cuatro papillas estudiadas se observó un incremento en el transporte de calcio en las papillas desfitinizadas con respecto a las papillas comerciales. La papilla Cereales sin gluten desfitinizada presentó unos mayores valores de transporte (próximos a un 30%) que en su versión comercial (6,8%). Las papillas Ocho cereales miel, Multicereales y Crema de arroz presentaron un menor ratio $(IP_5+IP_6):Ca$ que la papilla Cereales sin gluten, este hecho podría ser la causa de la mayor diferencia existente en el porcentaje de transporte de calcio en esta papilla desfitinada o sin tratar. Algunos autores (Kennefick y Cashman, 2000; Phillippy, 2006), observaron que la presencia de fitatos (2,4 mmol/L) disminuye la tasa de transporte de calcio en células Caco-2 en un 19%, comprobando igualmente que la desfitinización de muestras ricas en fibra mediante un tratamiento con fitasa, elimina el efecto inhibitorio que ejerce el ácido fítico sobre el transporte de calcio, lo cual demuestra que es el ácido fítico el principal componente de la fibra que inhibe el transporte de calcio a través de la monocapa. Tal y como concluyó Phillippy (2006) nosotros observamos que tras la total eliminación de los inositoles fosfato mediante la adición de fitasa, se produce un incremento en el transporte de calcio en las células Caco-2 en

tres de las cuatro muestras estudiadas (Ocho cereales miel, Multicereales y Cereales sin gluten).

Las papillas Ocho cereales miel y Cereales sin gluten presentaron un mayor porcentaje de transporte de cinc tras la eliminación de su contenido en ácido fítico. Estas dos papillas, antes de la eliminación de su contenido en ácido fítico presentaban los mayores ratios $(IP_5+IP_6):Zn$ (53:1 y 38:1) respectivamente, este hecho explicaría el mayor incremento en el % de transporte en estas dos papillas antes y después de la desfitinización. El efecto inhibitor que ejerce el ácido fítico sobre la absorción de cinc fue comprobado en alimentos infantiles por Davidsson *et al.*, (2004). No obstante, encontramos que tras la desfitinización de las muestras, en dos de ellas no se observó un incremento en el transporte de cinc, este hecho se pudo deber a la acción de fibras que no fueron eliminados durante el tratamiento con fitasa exógena y que se unen al cinc inhibiendo su transporte (Lestienne *et al.*, 2005 b).

Las papillas Crema de arroz y Multicereales, mostraron unos mayores valores de disponibilidad de cinc previamente a su desfitinización, esto pudo probablemente estar debido a los bajos ratios $(IP_5 + IP_6):Zn$ (<15) que presentaban inicialmente, valor que según algunos autores (Lestienne *et al.*, (2005 a); Bosscher *et al.*, (2001 a)) no compromete la absorción de cinc y podría por tanto hacer que la diferencia con respecto a la misma muestra desprovista de ácido fítico sea mínima, mientras que la mayoría de estudios en este sentido se han realizado in vivo sobre humanos (Turnlund *et al.*, 1984; Adams *et al.*, 2002). Fairweather *et al.*, (2005) señalaron que en las células Caco-2 no existen datos suficientes que permiten obtener conclusiones definitivas sobre la relación entre contenido en fitato en alimentos y el transporte de cinc.

V.4.1.2.1. Correlación entre la solubilidad, captación, retención y transporte de hierro, calcio y cinc

Los resultados obtenidos a partir del análisis de correlación entre las variables estudiadas se muestran en la Tabla 40. En ella, es particularmente destacable la correlación negativa entre el contenido en calcio presente en las papillas infantiles y los porcentajes de eficacia en el transporte y captación de hierro y cinc, estos resultados confirman los hallazgos de Perales *et al.*, (2006), mientras que el hecho conocido (Lind *et al.*, 2003) del efecto negativo que ejerce el cinc sobre la absorción de hierro también fue observado en nuestro estudio aunque no se observaron en este caso diferencias estadísticamente significativas. Tal y como sería de esperar los porcentajes de hierro, calcio y cinc solubles presentaron, una correlación positiva con los porcentajes de transporte y captación de hierro, calcio y cinc por las células Caco-2 respectivamente, lo cual indica que a mayores niveles de solubilidad mineral, mayor es su disponibilidad. Este hecho estaría debido a que el mineral ingerido debe encontrarse en forma soluble para poder ser absorbido a nivel intestinal (Bergqvist *et al.*, 2006; Perales *et al.*, 2005; Pyanert *et al.*, 2006). El efecto inhibitorio que ejerce el calcio sobre la disponibilidad del cinc y el hierro, no fue observado una vez captado el mineral por la célula, ya que la eficacia en el transporte de hierro y cinc no se vieron negativamente influidas por la eficacia en el transporte de calcio, lo cual indicaría que una vez alcanzada la monocapa, el efecto negativo observado previamente dejaría de producirse.

Tabla 40. Análisis de correlación entre la solubilidad, retención, transporte y captación de Fe, Ca y Zn

	Fe (µg/g)	Ca (µg/g)	Zn (µg/g)	Solubilidad Fe (%)	Solubilidad Ca (%)	Solubilidad Zn (%)	Retención Fe (%)	Retención Ca (%)	Retención Zn (%)	Eficacia transporte Fe (%)	Eficacia transporte Ca (%)	Eficacia transporte Zn (%)	Eficacia captación Fe (%)	Eficacia captación Ca (%)	Eficacia captación Zn (%)
Fe (µg/g)	-	-	-	0.163 0.446	0.834* 0.000	0.470* 0.020	-0.114 0.597	0.271 0.200	-0.255 0.228	0.486* 0.016	0.723* 0.000	0.433* 0.034	0.319 0.128	0.691* 0.000	0.544* 0.006
Ca (µg/g)	-	-	-	-0.486* 0.016	-0.613* 0.001	-0.731* 0.000	-0.175 0.414	0.374 0.071	-0.040 0.853	-0.426* 0.038	-0.730* 0.000	-0.855* 0.000	-0.407* 0.049	-0.717* 0.000	-0.914* 0.000
Zn (µg/g)	-	-	-	0.095 0.658	-0.442* 0.030	-0.327 0.119	0.429* 0.037	-0.394 0.057	-0.106 0.624	-0.009 0.967	-0.459* 0.024	-0.308 0.143	0.120 0.577	-0.424* 0.039	-0.281 0.184
% solub Fe	0.163 0.446	-0.486* 0.016	0.095 0.658	-	0.082 0.702	0.566* 0.004	0.516* 0.010	-0.432* 0.035	0.151 0.483	0.735* 0.000	0.195 0.361	0.195 0.361	0.794* 0.000	0.177 0.408	0.507* 0.011
% solub Ca	0.834* 0.000	-0.613* 0.001	-0.422* 0.030	0.082 0.702	-	0.505* 0.012	-0.236 0.267	0.366 0.078	-0.185 0.386	0.283 0.180	0.912* 0.000	0.680* 0.000	0.131 0.541	0.923* 0.000	0.657* 0.000
% solub Zn	0.470* 0.020	-0.731* 0.000	-0.327 0.119	0.566* 0.004	0.505* 0.012	-	0.013 0.950	-0.135 0.529	-0.198 0.355	0.461* 0.023	0.528* 0.008	0.732* 0.000	0.396 0.056	0.520* 0.009	0.838* 0.000
% ret Fe	-0.114 0.597	-0.175 0.414	0.429* 0.037	0.516* 0.010	-0.236 0.267	0.013 0.950	-	-0.568* 0.004	0.363 0.081	0.659* 0.000	-0.099 0.644	-0.029 0.892	0.678* 0.000	-0.083 0.698	0.158 0.460
% ret Ca	0.271 0.200	0.374 0.071	-0.394 0.057	-0.432* 0.035	0.366 0.078	-0.135 0.529	-0.568* 0.004	-	-0.329 0.116	-0.282 0.181	0.115 0.592	-0.018 0.932	-0.391 0.059	0.186 0.385	-0.241 0.256
% ret Zn	-0.255 0.228	-0.040 0.853	-0.106 0.624	0.151 0.483	-0.185 0.386	-0.198 0.355	0.363 0.081	-0.329 0.116	-	0.146 0.495	0.165 0.440	0.083 0.701	0.181 0.398	0.115 0.594	0.102 0.634
% efic tte Fe	0.486* 0.016	-0.426* 0.038	-0.009 0.967	0.735* 0.000	0.283 0.180	0.461* 0.023	0.659* 0.000	-0.282 0.181	0.146 0.495	-	0.373 0.073	0.226 0.288	0.942* 0.000	0.348 0.096	0.535* 0.007
% efic tte Ca	0.723* 0.000	-0.730* 0.000	-0.459* 0.024	0.195 0.361	0.912* 0.000	0.528* 0.008	-0.099 0.644	0.115 0.592	0.165 0.440	0.373 0.073	-	0.771* 0.000	0.236 0.267	0.984* 0.000	0.784* 0.000
% efic tte Zn	0.433* 0.034	-0.855* 0.000	-0.308 0.143	0.195 0.361	0.680* 0.000	0.732* 0.000	-0.029 0.892	-0.018 0.932	0.083 0.701	0.226 0.288	0.771* 0.000	-	0.129 0.547	0.789* 0.000	0.884* 0.000
% efic cap Fe	0.319 0.128	-0.407* 0.049	0.120 0.577	0.794* 0.000	0.131 0.541	0.396 0.056	0.678* 0.000	-0.391 0.059	0.181 0.398	0.942* 0.000	0.236 0.267	0.129 0.547	-	0.196 0.360	0.479* 0.018
% efic cap Ca	0.691* 0.000	-0.717* 0.000	-0.424* 0.039	0.177 0.408	0.923* 0.000	0.520* 0.009	-0.083 0.698	0.186 0.385	0.115 0.594	0.348 0.096	0.984* 0.000	0.789* 0.000	0.196 0.360	-	0.768* 0.000
% efic cap Zn	0.544* 0.006	-0.914* 0.000	-0.281 0.184	0.507* 0.011	0.657* 0.000	0.838* 0.000	0.158 0.460	-0.241 0.256	0.102 0.634	0.535* 0.007	0.784* 0.000	0.884* 0.000	0.479* 0.018	0.768* 0.000	-

* indica correlación estadísticamente significativa (p<0.05) e ntre ambas variables

V.5. PAPILLAS INFANTILES ¿DESFITINIZADAS O NO?, ¿MEZCLADAS CON AGUA O CON FÓRMULA INFANTIL?

El análisis de conglomerados, o análisis cluster tiene como objetivo lograr una clasificación o agrupamiento de los individuos en grupos homogéneos, según el comportamiento de estos para una serie de variables. De esta manera, los elementos que forman parte de estos grupos deben ser muy similares (alta homogeneidad interna), y a su vez muy diferentes con relación al resto de agrupamientos (alta heterogeneidad entre grupos). Se trata por tanto de clasificar una población (definida por unas características determinadas) en el menor número posible de grupos (conglomerados) mutuamente exclusivos y exhaustivos.

En nuestro caso, pretendemos clasificar los diferentes tipos de papillas infantiles, en función de una serie de variables que hemos considerado las más idóneas. Estas variables fueron: los porcentajes de dialización de hierro, calcio y cinc, así como la solubilidad, captación, retención y transporte de hierro, calcio y cinc por las células Caco-2. El análisis de conglomerados se desarrolló para las papillas infantiles utilizadas en este estudio, desfitinizadas o no y elaboradas con agua o con fórmula infantil.

A fin de visualizar mejor los resultados obtenidos en los análisis de conglomerados, éstos se han representado gráficamente (Figuras 31, 32 y 33) y las distintas muestras estudiadas se han codificado mediante números. La codificación de dichas muestras se presenta en la Tabla 41.

Tabla 41. Códigos empleados para cada muestra en la representación gráfica del análisis de conglomerados

1	Ocho cereales miel P-A	11	Multicereales P-F
2	Ocho cereales miel SP-A	12	Multicereales SP-F
3	Multicereales P-A	13	Crema de arroz P-F
4	Multicereales SP-A	14	Crema de arroz SP-F
5	Crema de arroz P-A	15	Cereales sin gluten P-F
6	Crema de arroz SP-A	16	Cereales sin gluten SP-F
7	Cereales sin gluten P-A	17	Trigo P-F
8	Cereales sin gluten SP-A	18	Trigo SP-F
9	Ocho cereales miel P-F	19	Trigo P-F
10	Ocho cereales miel SP-F	20	Trigo SP-F

P: fitasa; SP: sin fitasa; F: fórmula infantil; A: agua

Tal y como se muestra en la Tabla 42, en el estudio de disponibilidad mineral llevado a cabo mediante la dialización de hierro, calcio y cinc, se observa que el primer conglomerado fue el más idóneo, ya que obtuvo para el porcentaje de dialización del hierro y el porcentaje de dialización del cinc las mayores puntuaciones.

Tabla 42. Centros de conglomerados finales para la dialización mineral de las papillas infantiles

(%)	Conglomerado				Sig.
	1	2	3	4	
Dialización hierro	4.7950	3.0186	2.2775	-	0.001
Dialización calcio	2.2680	2.2181	2.6253	-	0.000
Dialización cinc	22.3246	11.7186	3.3752	-	0.000

Sig.: Nivel de significación

Para ambas variables la papilla infantil correspondiente (Figura 31) fue Trigo (muestras 17 y 18) reconstituida con agua, siendo indistinto si la papilla estaba desfitinizada o no. Por lo tanto, la mezcla de la papilla con agua mostró de un modo significativo ($p < 0.05$) una mayor disponibilidad de hierro y cinc en relación a las mezclas con fórmula infantil, mientras que la adición de fitasa no influyó en la diálisis de minerales. La papilla Trigo fue retirada del mercado por su escasa demanda, por lo que no se realizó el estudio de su biodisponibilidad con las células Caco-2. Todas las papillas infantiles incluidas en el segundo

conglomerado, fueron elaboradas con agua observándose el mayor porcentaje de dialización del cinc en la muestra 3 (Multicereales desfitinizado y reconstituido con agua), mientras que todas las papillas englobadas en el conglomerado 3 fueron elaboradas con fórmula infantil, siendo este último grupo el conglomerado menos idóneo en cuanto a porcentaje de mineral dializado.

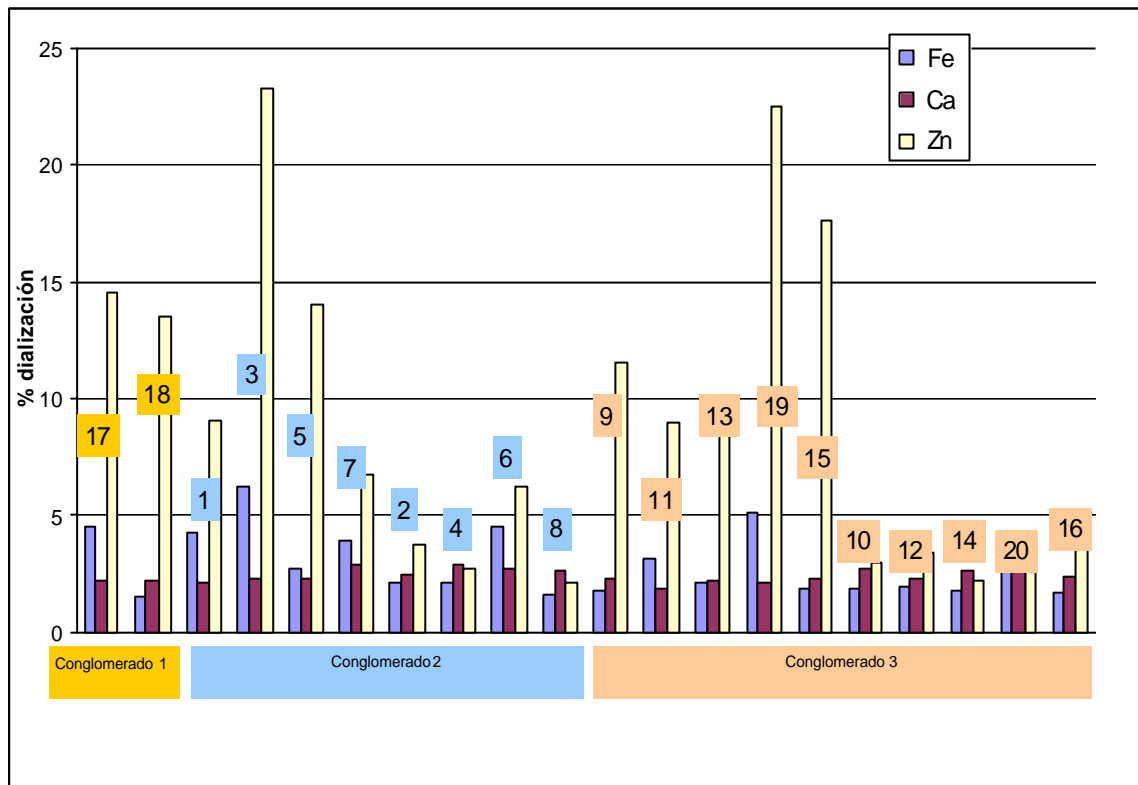


Figura 31. Representación gráfica de los tres conglomerados obtenidos mediante el análisis de Cluster para la dialización mineral de las papillas infantiles, así como de las muestras que pertenecen a cada uno de ellos

En la Tabla 43, se presentan los resultados del análisis de conglomerados obtenidos en el estudio de la solubilidad y captación mineral mediante el empleo de la línea celular Caco-2. En ella se puede observar que el segundo conglomerado fue el más idóneo.

Tabla 4B. Centros de conglomerados finales para la solubilidad y captación mineral de las papillas infantiles

(%)	Conglomerado				Sig.
	1	2	3	4	
Solubilidad hierro	26.55	33.25	47.48		0.001
Solubilidad calcio	28.38	82.80	18.35		0.000
Captación hierro	0.85	2.49	2.52		0.034
Captación calcio	3.77	6.23	1.55		0.111

Sig.: Nivel de significación

A fin de visualizar los porcentajes obtenidos para cada muestra, y el agrupamiento de éstas dentro de cada conglomerado se representa la Figura 32. En ella se puede observar que el segundo conglomerado incluye las muestras 1 y 3, las cuales corresponden respectivamente a las papillas Ocho cereales miel y Multicereales desfitinizadas y reconstituidas con agua. Las papillas infantiles reconstituidas con fórmula infantil (desfitinizadas o no desfitinizadas) se distribuyen de un modo similar entre los conglomerados 2 y 3.

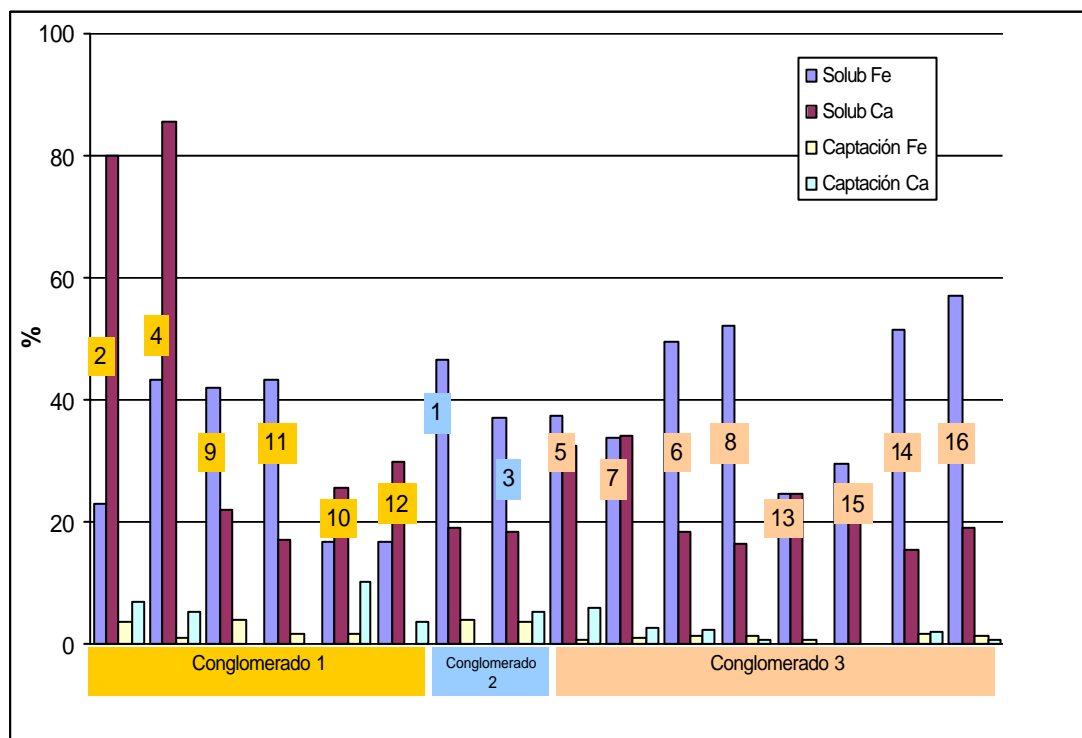


Figura 32. Representación gráfica de los tres conglomerados obtenidos mediante el análisis de Cluster para la solubilidad y captación mineral de las papillas infantiles, así como de las muestras que pertenecen a cada uno de ellos

En el estudio de la biodisponibilidad mineral mediante la determinación de los porcentajes de eficacia de la captación y eficacia del transporte de hierro, calcio y cinc, se observa (Tabla 44) que el conglomerado más idóneo fue el primero, dentro del cual se incluye la papilla Ocho cereales miel desfitinizada (Figura 33), en el conglomerado 2 (el segundo más idóneo) se incluye la muestra 2 (Ocho cereales miel no desfitinizada).

Tabla 44. Centros de conglomerados finales para la solubilidad, captación y transporte mineral de las papillas infantiles

	(%)	Conglomerado				Sig.
		1	2	3	4	
	Solubilidad hierro	34.51	17.47	17.44	17.98	0.210
	Solubilidad calcio	22.50	38.90	5.40	8.68	0.012
	Solubilidad cinc	46.90	36.40	28.70	18.34	0.052
	Eficacia captación hierro	13.00	3.60	3.78	4.73	0.189
	Eficacia captación calcio	3.31	5.99	1.10	0.62	0.021
	Eficacia captación cinc	41.60	35.44	19.90	6.60	0.000
	Eficacia transporte hierro	6.02	2.21	1.41	2.05	0.224
	eficacia transporte calcio	3.24	4.90	0.98	0.67	0.041
	Eficacia transporte cinc	23.00	32.30	17.13	4.00	0.000

Sig.: Nivel de significación

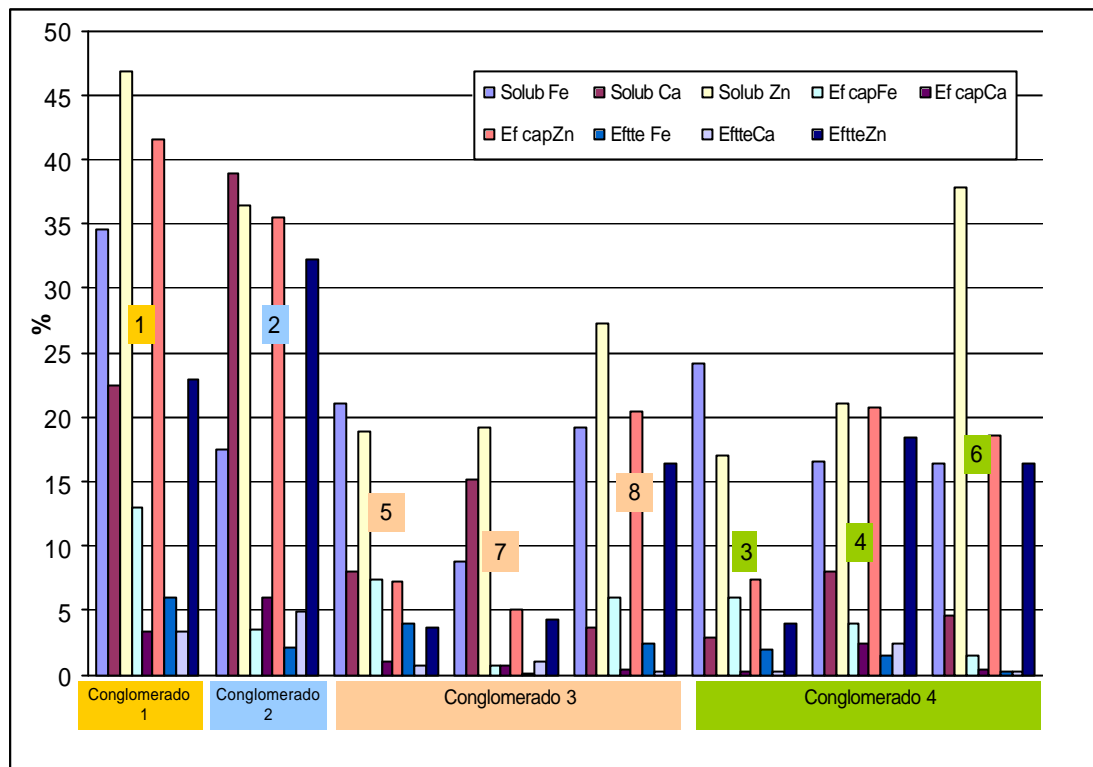


Figura 33. Representación gráfica de los tres conglomerados obtenidos mediante el análisis de Cluster para la solubilidad, captación y transporte mineral de las papillas infantiles así como de las muestras que pertenecen a cada uno de ellos

De acuerdo con los resultados obtenidos tras el análisis de conglomerados podemos observar que en los tres tipos de estudios realizados para determinar la biodisponibilidad mineral, los datos coinciden, mostrándose como más idóneas la mezcla de la papilla infantil con agua frente a su elaboración con fórmula infantil, no ejerciendo una influencia clara y de un modo general su desfitinización en las papillas elaboradas con fórmula infantil. En este sentido, Davidsson et al., (1997) concluyeron que la desfitinización de las papillas infantiles a base de cereales podría no ser necesaria. No obstante, la manera habitual de consumo de este tipo de cereales infantiles por parte de los niños sería mediante su mezcla con leche o fórmula infantil, por lo que a partir del análisis de conglomerados no se pueden obtener conclusiones sobre la mejora en la disponibilidad mineral tras la desfitinización cuando la papilla infantil es elaborada con fórmula infantil.

La mayor biodisponibilidad mineral en las papillas infantiles elaboradas con agua frente a las elaboradas con fórmula infantil se ha repetido a lo largo de los distintos

estudios desarrollados en esta tesis; no así cuando se adicionó fitasa exógena a las papillas infantiles con el objetivo de incrementar la disponibilidad, ya que los resultados han sido más heterogéneos.

En este sentido existen numerosas investigaciones (Wortley *et al.*, 2005; Glahn *et al.*, 2002; Viadel *et al.*, 2006) sobre el efecto inhibitorio del ácido fítico sobre la disponibilidad del hierro y (Lönnerdal *et al.*, 1984; Jovaní *et al.*, 2001; Matsui, 2002; Guillem *et al.*, 2000) sobre la disponibilidad del cinc.

En relación a que en los niños de países desarrollados el consumo de las papillas infantiles elaboradas con cereales se realiza mediante su mezcla previa con leche o fórmula infantil, serían necesarios más estudios para poder confirmar la conveniencia de la adición de una fitasa exógena a las mismas, ya que los resultados sobre mejora en la disponibilidad mineral obtenidos en este estudio a partir de las papillas mezcladas con fórmula infantil no son lo suficientemente evidentes. No obstante, aunque la adición de una fórmula láctea a las papillas infantiles incrementa el contenido mineral de las mismas, sería interesante la búsqueda de estrategias encaminadas a incrementar la disponibilidad mineral de estos alimentos.

CONCLUSIONES

Estudio 1

Los niveles de los distintos inositoles fosfato (IP₅ e IP₆) presentes en las papillas infantiles elaboradas a base de cereales son lo suficientemente elevados como para comprometer la disponibilidad mineral de este alimento básico en nutrición infantil.

Estudio 2

El tostado y el tratamiento con α -amilasa de las harinas de cereales empleadas para la obtención de papillas infantiles, consigue reducir su contenido inicial de inositoles fosfato. No obstante este procesado es insuficiente para alcanzar un cociente inositol fosfato/mineral que garantice una adecuada disponibilidad. La aplicación de fitasa exógena procedente de *Aspergillus oryzae* durante 20 minutos a 55° C y pH 5.5 consigue eliminar completamente este antinutriente.

Estudio 3

La desfitinización de las papillas infantiles elaboradas a base de cereales, mejora en general la disponibilidad *in vitro* del hierro y el cinc (empleando los métodos de solubilidad y diálisis) principalmente cuando éstas están elaboradas con agua, frente a las elaboradas con fórmula de continuación. La reconstitución con fórmula de continuación de las papillas infantiles desfitinizadas disminuye la disponibilidad del hierro, calcio y zinc, en relación a las papillas reconstituidas con agua.

Estudio 4

4.1. Los inositoles fosfato, influyen negativamente en la captación y disponibilidad del hierro y calcio y en la captación de cinc, en células Caco-2, observándose tras la desfitinización de las mismas un importante incremento en estos parámetros. La reconstitución de las papillas

con fórmula de continuación incrementa la captación y la disponibilidad del hierro en las papillas no desfitinizadas, mientras que la desfitinización de las mismas no se traduce en un claro incremento de la disponibilidad del hierro.

4.2. La desfitinización de las papillas infantiles reconstituidas con agua, se traduce en general en una mayor solubilidad del hierro, y parámetros de captación, retención y transporte de hierro y cinc, en relación a las mismas papillas reconstituidas con fórmula, mientras que no supone una mejora en la biodisponibilidad del calcio. De acuerdo con los resultados obtenidos tras el análisis de conglomerados en los tres tipos de estudios realizados para determinar la biodisponibilidad mineral, se muestra como lo más idóneo la mezcla de la papilla infantil con agua frente a su elaboración con fórmula de continuación.

4.3. Puesto que el consumo de las papillas infantiles elaboradas con cereales se realiza mediante su mezcla previa con leche o fórmula infantil, serían necesarios más estudios para poder confirmar la conveniencia de la adición de una fitasa exógena a las mismas. Recomendamos el empleo simultáneo de otras estrategias encaminadas a incrementar la disponibilidad mineral de estos alimentos como la búsqueda de fuentes de minerales más biodisponibles, la adición de promotores de su absorción en las dosis adecuadas y la biofortificación.

RESUMEN

Los cereales son empleados como dieta complementaria a la lactancia materna a partir del 4^o mes ya que suministra nutrientes esenciales (especialmente hidratos de carbono, proteínas, minerales y vitaminas (particularmente tiamina). Durante estas etapas de la vida, en las que se produce un rápido crecimiento corporal, y la demanda de nutrientes es mayor, se hace necesario optimizar la absorción de los mismos a fin de evitar deficiencias. El ácido fítico, inositol fosfato presente en los granos de cereales puede inhibir de forma significativa la absorción de minerales mediante la formación de complejos insolubles con minerales de interés nutricional, como el hierro no hemo, el calcio y el cinc. Los alimentos infantiles elaborados a partir de harinas procedentes de cereales pueden presentar compromiso en la biodisponibilidad de determinados minerales, por ello, es de gran importancia tratar de establecer los tratamientos tecnológicos necesarios para que la utilización de estos nutrientes esenciales sea la máxima. Se ha comprobado que el método más sencillo y eficaz de conseguir la eliminación del ácido fítico, es la adición de fitasa exógena.

El presente trabajo ha sido dividido en cuatro estudios en los que se han evaluado varias papillas infantiles presentes en el mercado. En el primer estudio, se procedió a estudiar el contenido en inositoles fosfato de estas papillas y de sus materias primas, así como el de minerales fundamentales en la nutrición (Fe, Ca y Zn). En el segundo estudio, se evaluó el efecto que el procesado tecnológico de estas papillas (tostado y aplicación de alfa-amilasa) produce sobre el contenido en inositoles fosfato y a la adición de fitasa procedente de *Aspergillus* para la eliminación completa de los mismos. En el tercer estudio, se procedió a la evaluación de la disponibilidad mineral de estas papillas para determinar el efecto que sobre ésta produce el ácido fítico, y el modo de reconstitución de las mismas, empleando para ello los métodos de solubilidad y diálisis mineral. En el último estudio desarrollado en este trabajo, se investigó la disponibilidad mineral de las papillas infantiles (desfitinizadas o no y reconstituidas con agua o con fórmula de continuación) mediante el empleo de la línea celular Caco-2.

Se comprobó que tanto las papillas infantiles comerciales como sus materias primas presentan unos niveles de inositolos fosfato que pueden comprometer la disponibilidad mineral de las mismas. Tras el tostado y tratamiento con alfa-amilasa de las materias primas, se observó un descenso en el contenido de ácido fítico, pero insuficiente, ya que el estudio de las razones molares fitato:mineral de las papillas infantiles comerciales presentó valores que siguen comprometiendo la disponibilidad mineral.

La desfitinización de las muestras se llevó a cabo mediante la adición de fitasa procedente de *Aspergillus oryzae*. El estudio de la disponibilidad mineral de las papillas infantiles desfitinizadas o no y mezcladas con agua o con fórmula de continuación mediante los métodos de solubilidad y diálisis mostró que la desfitinización de las papillas infantiles mejora en general la disponibilidad *in vitro* del hierro y el cinc principalmente cuando éstas están elaboradas con agua, frente a las elaboradas con fórmula de continuación. La reconstitución de las mismas con fórmula de continuación de las papillas infantiles desfitinizadas disminuye la disponibilidad del hierro, calcio y zinc, en relación a las papillas reconstituidas con agua.

Mediante el empleo de la línea celular Caco-2, se comprobó que los inositolos fosfato, presentes en las papillas infantiles influyen negativamente en la captación celular y disponibilidad del hierro y calcio y en la captación de cinc, observándose tras la desfitinización de las mismas un importante incremento en estos parámetros. La reconstitución de las papillas con fórmula de continuación incrementa la captación y la disponibilidad del hierro en las papillas no desfitinizadas, mientras que la desfitinización de las mismas no se traduce en un claro incremento de la disponibilidad del hierro. La desfitinización de las papillas infantiles reconstituidas con agua, se traduce en general en un incremento en la solubilidad del hierro, y en los parámetros de captación, retención y transporte de hierro y cinc, mientras que no supone una mejora en la biodisponibilidad del calcio.

En base a que en los niños el consumo de las papillas infantiles elaboradas con cereales se realiza mediante su mezcla previa con leche o fórmula infantil, serían necesarios

más estudios para poder confirmar la conveniencia de la adición de una fitasa exógena a las mismas, ya que los resultados sobre mejora en la disponibilidad mineral obtenidos en este estudio a partir de las papillas mezcladas con fórmula infantil no son lo suficientemente evidentes. No obstante, aunque la adición de una fórmula láctea a las papillas infantiles incrementa el contenido mineral de las mismas, sería interesante la búsqueda de estrategias encaminadas a incrementar la disponibilidad mineral de estos alimentos.

SUMMARY

Dietary minerals intake is of interest of human beings in general, but particularly for infant and young children in the first year of life, when growth is accelerated. Insufficient mineral intake in this period, mainly of iron, calcium and zinc, is responsible for diseases such as anaemia, rickets, osteoporosis or immune diseases. Cereals are introduced to infants at the age of four to six months to supplement breastmilk and follow-on formula, since this is a period of rapid growth and development. Phytic acid (myoinositol hexa-phosphoric acid, IP₆) is the major phosphorus storage compound of most seeds and cereal grains, and it has a strong ability to chelate multivalent metal ions, specially iron, zinc, and calcium. This binding may lead to very insoluble salts with poor bioavailability of minerals. During the pre-weaning period, the diet of an infant is based upon cereal flours as well as upon baby milk formulas, owing to the fact that cereals are rich in phytate which exerts an inhibitory effect on the absorption of minerals forming insoluble and undigestible complexes, the bioavailability of minerals could be compromised.

Based on this knowledge, complete phytate degradation by means of technological treatments is desirable, in order to overcome its negative effects on mineral bioavailability. Food processing-such as cooking, bread-making and fermentation-is known to reduce phytic acid content. However, the bioavailability of minerals can be considerably increased by dephytinization adding an exogenous phytase.

The development of the current thesis was divided in four studies. In the first study were identified and quantified the inositol phosphates content of raw cereals flours and commercial infant cereals, as well as the contents of iron, calcium and zinc. In the second study was studied the effects of roasting and alpha-amylase treatment of infant flours on phytate content and the effect of two different phytase treatments (*A. niger* and *A. oryzae*) were tested. In the third study the *in vitro* digestion of the infant cereals dephytinized or no, elaborated with water or follow-on formula was carried out. The soluble and dialyzable mineral fraction were determined and the differences between samples were studied. In the fourth study, the uptake, retention and transport of iron, calcium and zinc by Caco-2 cell

line were studied with the aim of know mineral bioavailability, at the same time we compared the effect of dephytinization and of the addition of an follow-on formula on mineral bioavailability.

Results showed that phytate (IP₅ + IP₆) content of infant cereals as well as raw flours used as ingredients for the manufacture in infant cereals reaches levels which could compromise its mineral bioavailability according to their molar ratio. Moreover, the industrial processing appears to be insufficient to achieve phytate degradation to an extent enough to yield optimal phytate-to-mineral ratios. Phytase addition (*Aspergillus oryzae*) during 20 min at 55°C and pH 5.5 achieves a complete phytate degradation. Dephytinization of infant cereals increases *in vitro* bioavailability of iron and zinc (solubility and dializability), mainly from infant cereals mixed with water compared to the same mixed with follow-on formula. However, follow-on formula addition did not improve Fe, Ca and Zn bioavailability compared to infant cereals reconstituted with water. Phytate content of infant cereals impaired Fe and Ca uptake into Caco-2 cells.

After dephytinization by an exogenous phytase addition, a significant (p<0.05) increase on these two minerals bioavailability was observed when infant cereals were mixed with water. However, when commercial infant cereals was combined with follow-on formula, only iron uptake and bioavailability increased, meanwhile dephytinization did not increase bioavailability for this mineral. An increase on iron solubility, as well as on uptake, retention and transport of iron and zinc were observed after dephytinization of commercial infant cereals. mixed with water. Dephytinization did not seem to improve calcium availability (solubility, uptake, retention and transport) by Caco-2 cells, but for this mineral a great variability was observed.

Results obtained in this thesis could indicate that dephytinization can be recommended for infant cereals reconstituted with water. More studies should be necessary to confirm the need of exogenous phytase addition when infant cereals are mixed with follow-on formula, since as results of mineral bioavailability obtained in this study from infant cereals mixed with an follow-on formula seems to not increase mineral availability after phytase treatment.

Nevertheless, although follow-on formula addition increases mineral content , it should be interesting the search for strategies to improve its mineral bioavailability.

EXTENDED SUMMARY

I. INTRODUCTION	224
II. OBJECTIVES	227
III. MATERIAL AND METHODS	228
Experimental shedule.....	228
Samples.....	230
III.1. 1st STUDY	230
III.1.1. Determination of inositol phosphates content.....	230
III.1.2. Calcium, iron and zinc determination and molar ratios of phytate/minerals of infant cereals.....	232
III.1.2.a. Assay quality control.....	232
III.1.2.b. Calculation of the mineral: phytate molar ratios.....	232
III.2. 2nd STUDY	233
III.2.1. Laboratory processing of cereal flours: roasting and alpha-amylase treatment.....	233
III.2.2. Dephytinization of infant cereals: addition of exogenous phytase.....	233
III.3. 3rd STUDY	234
III.3.1. Bioaccessibility of iron, calcium and zinc from infant cereals.....	234
III.3.1.a. Mineral soluble fraction.....	235
III.3.1.b. Mineral dialyzed fraction.....	235
III.4. 4th STUDY	236
III.4.1. Bioavailability of iron, calcium and zinc by Caco-2 cells: uptake, retention and transport.....	236
III.4.1.a. Control experiment: Integrity of the monolayers.....	236
III.4.1.b. Mineral uptake assays. Standard solutions.....	237
III.4.1.c. Toxicity assays. Integrity of the monolayers.....	238
III.4.1.d. Mineral uptake assays. Infant cereals.....	239
III.4.1.e. Mineral uptake, retention and transport. Infant cereals.....	240
III.5. Statistical analysis.....	241
IV. RESULTS AND DISCUSSION	243
IV.1. 1st STUDY	243
IV.1.1. Inositol phosphates content in infant cereals and raw materials.....	243
IV.1.2. Iron, calcium and zinc content and molar ratios of phytate (IP ₅ +IP ₆) to iron, calcium and zinc of infant cereals.....	244
IV.2. 2nd STUDY	246
IV.2.1. Effect of processing on phytate content in infant cereals and cereals flours: roasting and alpha-amylase treatment.....	246
IV.2.2. Dephytinization of infant cereals by addition of exogenous phytase.....	252
IV.3. 3rd STUDY	253
IV.3.1. <i>In vitro</i> digestion of infant cereals of infant cereals. Effect of dephytinization and follow-on formula addition on solubility and dialysis of Fe, Ca and Zn.....	253
IV.3.2. Effect of interaction between dephytinization and follow-on formula addition on bioaccessibility solubility and dializability of Fe, Ca and Zn.....	256
IV.3.3. Estimation of Fe, Ca and Zn available per intake (200 mL) from infant cereals reconstituted with follow-on formula.....	257
IV.4. 4th STUDY	258
IV.4.1. Bioavailability of iron, calcium and zinc from infant cereals by Caco-2 cells. Effect of dephytinization and follow-on formula adition.....	258

IV.4.1.a. Caco-2 growth, differentiation and integrity of the monolayer.....	258
IV.4.1.b. Toxicity assays.	261
IV.4.1.c. Mineral uptake by Caco-2 cells.	262
IV.4.1.d. Effect of interaction between dephytinization and follow-on formula addition on the estimated availability (calculated by the mineral uptake by cells) of Fe, Ca and Zn.....	272
IV.4.1.e. Correlation between solubility, dialysis and uptake of iron, calcium and zinc.....	274
IV.4.1.f. Iron, calcium and zinc uptake, retention and transport by Caco-2 cells. Effect of dephytinization.	274
IV.4.1.g. Correlation between solubility, uptake, retention and transport of iron, calcium and zinc.	281
IV.5. Infant cereals, dephytinized or no?, reconstituted with water or follow-on formula?.....	281
V. CONCLUSIONS.....	284

I. INTRODUCTION

Dietary minerals intake is of interest of human beings in general, but particularly for infant and young children in the first year of life, when growth is accelerated. Insufficient mineral intake in this period, mainly of iron, calcium and zinc, is responsible for diseases such as anaemia, rickets, osteoporosis or immune diseases with an increase in infections diseases influencing not only the immediate health, but may also have an important impact on adult health (Cámara *et al.*, 2004). Although breast-feeding is considered as the natural and preferable method for infant feeding, between 4 and 6 months and 3 years of age, the child's increasing nutritional requirements are no longer met by breast milk alone. Accordingly, pediatric guidelines advocate the gradual replacement of exclusive milk feeding by complementary foods from the fifth month of life onwards (Kersting *et al.*, 1995). Cereals are introduced to infants at the age of four to six months to supplement breastmilk and follow-on formula, since this is a period of rapid growth and development. Therefore, an adequate diet is crucial to meet infant nutrient needs (COMA, 1995). Infant cereals have high energetic load, based on their carbohydrate and protein contents, around 78% and 13%, respectively, and also provide minerals and vitamins, particularly thiamin. The most common cereals used to formulate infant cereal flours are wheat, barley, rye, oat, rice and maize. They may be used individually or mixed to obtain multicereal infant flours. Other products such as roots (tapioca, carrots) or legumes (peas) may also be used to prepare such foods (Febles *et al.*, 2001; Pérez-Conesa *et al.*, 2002). Moreover, infant flours are commonly fortified with vitamins and minerals in order to achieve Dietary Reference Intake (DRI) (Davidsson *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1998).

Phytic acid (myoinositol hexa-phosphoric acid, IP₆) is the major phosphorus storage compound of most seeds and cereal grains, and it has a strong ability to chelate multivalent metal ions, specially iron, zinc, and calcium. This binding may lead to very insoluble salts with poor bioavailability of minerals (Hurrell 2004). Low absorption of these nutrients from cereals is considered a factor in the aetiology of mineral deficiency in infants (Hurrell, 2004). Cereals may have poor bioavailability of calcium, and maintaining adequate calcium intake during childhood is necessary for the attainment of peak bone mass, which may be

important in reducing the risk of fractures and osteoporosis later in life (Frank et al., 2006). Zinc deficiency can lead to an increased severity and incidence of diarrheal and respiratory infections, as well as decreased growth rates (Harland and Oberleas, 1987).

Based on this knowledge, complete phytate degradation by means of technological treatments is desirable, in order to overcome its negative effects on mineral bioavailability. In this regard, several technological as well as household treatments such as soaking, fermentation, milling, roasting or germination have been shown to decrease the phytate content of cereals (García-Esteba *et al.*, 1999; Hurrell *et al.*, 2002; Temple *et al.*, 2002; Fageer *et al.*, 2004; Lestienne *et al.*, 2005). In addition to the roasting process, which is a common industrial treatment during infant food processing, industrial processing also involves alpha-amylase treatment (Pérez-Conesa *et al.*, 2002), which could also well contribute to dephytinization of cereals.

During the pre-weaning period, the diet of an infant is based upon cereal flours as well as upon baby milk formulas, owing to the fact that cereals are rich in phytate which exerts an inhibitory effect on the absorption of minerals forming insoluble and undigestible complexes, the bioavailability of minerals could be compromised (Ma *et al.*, 2005). Despite, the effect of phytate on this one depends upon not only the amount of phytate and minerals in the diets but also the ratio of phytate/minerals. The relative bioavailability of minerals can be predicted from the molar ratio of phytate/minerals in the food and diet (Morris & Ellis, 1989). Food processing-such as cooking, bread-making and fermentation-is known to reduce phytic acid content. However, the bioavailability of minerals can be considerably increased by dephytinization adding an exogenous phytase (Hurrell, 2004).

It can be estimated that the phytic acid (IP6) to iron molar ratio should be reduced to <0.7:1 so as to achieve at least a 2-fold increase in iron absorption. Infant

cereal flours still has a high phytate level after processing (300-400 mg/100 g), although many studies shows that it can be removed by adding exogenous phytase in order to decrease iron chelation and improve the nutritional value of cereal-based foods. Different types of

phytases can be used, although microbial phytase from *Aspergillus* have been showed high activity (Sandberg *et al.*, 1996).

Bioavailabilty should preferentially be determined by *in vivo* test, however, are time-consuming and expensive, complicated to perform and are unethical in the small infant, therefore, a rapid and valid *in vitro* model would be a valuable tool for estimating mineral bioavailability *in vitro* methods have been proposed as an alternative to *in vivo* methods. Most of the *in vitro* methods are based on the simulation of a gastrointestinal digestion and on measurement of the soluble or dialyzable element (Bosscher *et al.*, 2001). Promising correlations between *in vitro* dialysability and *in vivo* bioavailability were reported (Wolters *et al.*, 1993). This have been improved by incorporating a human colon carcinoma cell line, Caco-2, that shows many of the functional and morphological properties of mature human enterocytes (Jovaní *et al.*, 2001).

Processing and manufacturing of human food is a possible application field for phytase. Up to now, no phytase product for a relevant food application is on the market, research in this field focuses on better mineral absorption or technical improvement of food processing (Haefner *et al.*, 2005).

OBJECTIVES

The aims of the present thesis were:

- 1-** To study the occurrence of inositol phosphates in infant cereals and its raw materials.
- 2-** To relate the availability of minerals to the phytate content of infant cereals assessing the molar ratios of $(IP_5 + IP_6)/Fe$, $(IP_5 + IP_6)/Ca$ and $(IP_5 + IP_6)/Zn$ of infant cereals.
- 3-** To evaluate the effect of two subsequent steps, roasting and alpha-amylase treatment in the industrial processing of infant foods, on the phytic acid and inositol phosphates profile in infant cereals and their raw materials. To evaluate the effect of two kinds of microbial phytase from *Aspergillus (niger y oryzae)* on the phytic acid content.
- 4-** To determine the extent to which dephytinization modifies the iron, calcium and zinc solubility and dialyzability values from different infant cereals, using these parameters as indicators of mineral availability. Two different matrices were used: water and follow-on formula
- 5-** To estimate and compare the cell uptake of iron, calcium and zinc from infant cereals with and without phytase treatment to degrade phytate content, as well as the effect of an follow-on formula addition using a model that combines a simulated gastrointestinal digestion and the Caco-2 cell line to determine mineral uptake, retention and transport by the Caco-2 cell line to relate the absorption of minerals to the phytate presence.

MATERIAL AND METHODS

Experimental shedule

The development of the current thesis was divided in four studies, as it is shown in Figure 1.

1.-In the **first study** were identified and quantified the inositol phosphates content of raw cereals flours and commercial infant cereals. At the same time, the contents of iron, calcium and zinc were measured in order to assess the mineral bioavailability.

2.-In the **second study** was studied the effects of roasting and alpha-amylase treatment of infant flours on phytate content, as well as the effect of two different phytase treatments (*A. niger* and *A. oryzae*) were tested, and then infant cereals were dephytinized.

4.-In the **third study** the *in vitro* digestion of the infant cereals dephytinized or no, elaborated with water or follow-on formula was carried out. The soluble and dialyzable mineral fraction were determinated and the differences between samples were studied.

5.-In the **fourth study**, the uptake, retention and transport of iron, calcium and zinc by Caco-2 cell line were studied with the aim of know mineral bioavailability, at the same time we compared the effect of dephytinization and of the addition of a follow-on formula on mineral bioavailability.

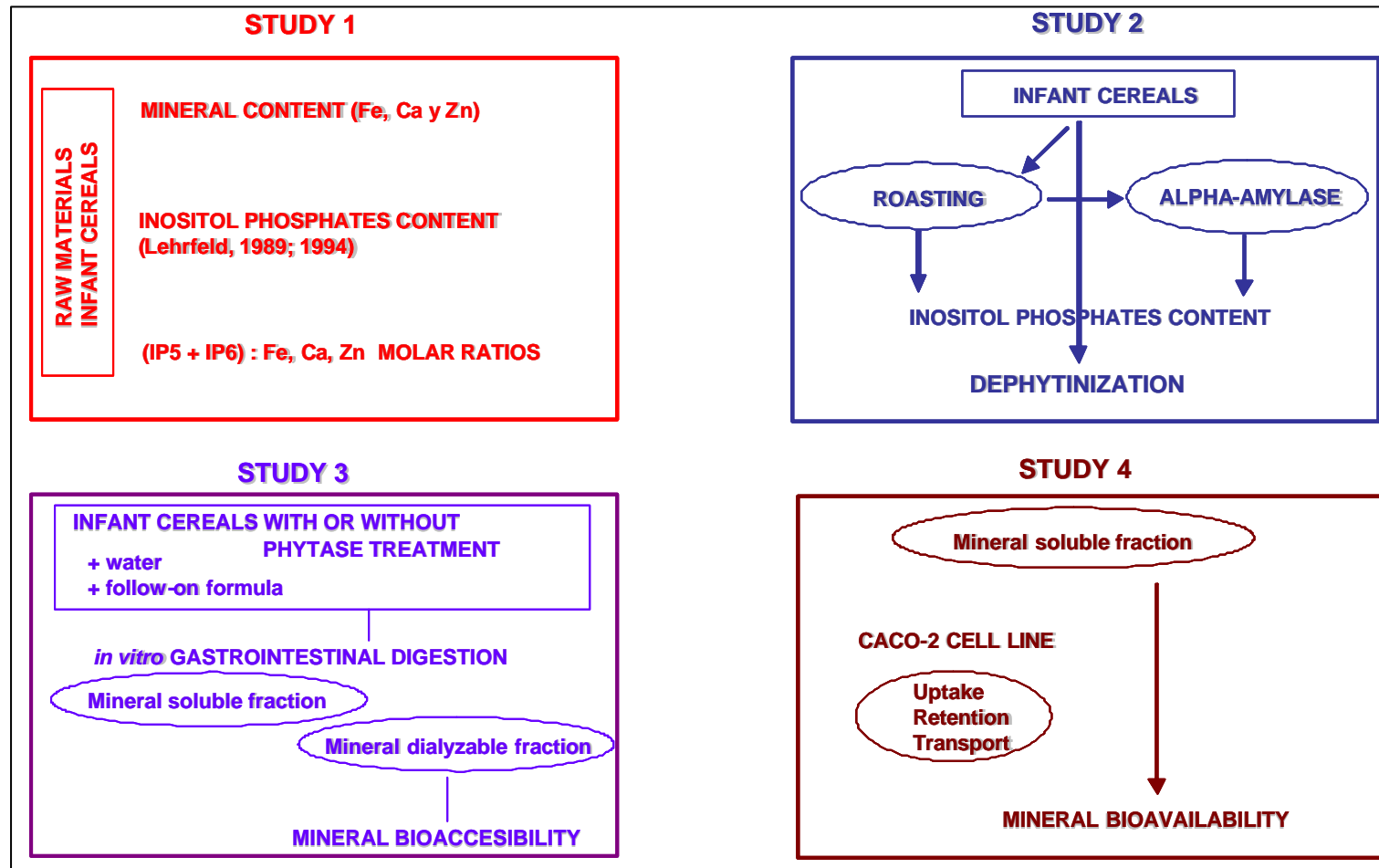


Figure 1. Schematic graph of the experimental design of the study

Samples

Six commercial types of infant cereal were analysed, namely “Eight-cereal honey”, “Gluten free-cereal”, “Rice cream”, “Wheat”, “Multicereals” and “Peas and carrots”. The cereal/vegetable flours used to prepare such commercial infant cereals were also sampled. The combinations of cereals and vegetables flours from which each infant flour were obtained are shown in **Table 1**. Each cereal/vegetable flour was analysed at different technological stages of processing: (A) Raw flours, (B) Roasted flours, and (C) enzymatically hydrolysed and drum dried flours. All raw materials and commercial products were provided by a local infant foods manufacturer company (Hero España, S.A. Alcantarilla, Spain). Wheat and Ecological Peas and Carrots were finally eliminated from the study since their manufacture stopped.

Table 1. Samples of infant cereals flours according to type

Cereals/vegetables flours	Commercial infant cereals
Millet, rye, barley, wheat, rice, sorghum, corn, oat	8- Cereal honey
Millet, rye, barley, wheat, rice, sorghum, corn, oat	Multicereals
Rice, corn	Gluten free cereals
Rice	Rice cream
Wheat	Wheat
Ecological rice, ecological corn, peas, carrots	Ecological peas and carrots

III.1. 1st STUDY

III.1.1. Determination of inositol phosphates content

Inositol phosphates were determined according to the method of Lehrfeld (1989; 1994). Inositol phosphates were extracted from different samples with 0.5M HCl at room temperature for 2 h. The extract was centrifuged and the supernatant was frozen overnight followed by thawing, and centrifugation. An aliquot of supernatant was removed, diluted with deionized water and poured onto an anion exchange (SAX) column (500 mg; Supelco, Bellefonte, PA, USA) that was connected to a vacuum manifold set a 20 mm Hg. The column was previously washed with 0.05M HCl to remove inorganic phosphates present in the resin,

and the resin-bound inositol polyphosphates were then eluted with 2 mL of 2 M HCl. Eluted samples were

evaporated to dryness in vacuo at 40°C and then dissolved in 1 ml of deionized water containing 15 µL tetrabutylammonium hydroxide (2052-49-5, cat. T 2761, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Twenty microliters of the clear supernatant was injected in the HPLC unit. HPLC analyses were carried out using a Merck Hitachi chromatograph (pump L-7100, an RI-detector L-7490, and an L-7350 column oven). For phytic acid analysis, a RP-18 5 µm reversed phase analytical column (Merck, Darmstadt, Germany) was used. Mobile phase was prepared by mixing methanol/0.035N formic acid (56:44, v/v) and 1 mL per 100 mL of tetrabutylammonium hydroxide. The optimal flow rate was 0.8 ml/min. The pH of the mobile phase was set to 4.3 by the addition of 72% (w/w) sulphuric acid to achieve an optimal separation between every inositol phosphate. Identification of the inositol phosphates was achieved by comparison with the mixture of standards obtained during hydrolysis of phytic acid sodium salt (Sigma-Aldrich, Inc., Milwaukee, USA) as described below (Sandberg *et al.*, 1989) while a quantitative analysis was conducted using an external standard of sodium phytate.

Commercial 40% phytic acid (Sigma-Aldrich, dodecasodium salt hydrate, water 10-15%, ref. 923.83, Milwaukee, Wi, USA) was used for calibration. Identification of inositol phosphates was achieved by comparison with the mixture of inositol phosphates (IP₃ to IP₆), prepared by hydrolyzing an aqueous solution of sodium phytate (15 mg/ml) in HCl 0,5 N at 70°C by refluxing for 7 h. The hydrolysate was evaporated to dryness at reduced pressure and a water-bath temperature of 40°C and then dissolved in 10 mL deionized water prior to injection of 20 µL to HPLC. Precision, detection limit and linearity of phytic acid concentration were calculated versus their corresponding peak area in the chromatogram. For that, 20 µl of solutions into a range from 0.1 to 4 mg/mL phytic acid were injected.

III.1.2. Calcium, iron and zinc determination and molar ratios of phytate/minerals of infant cereals

Zn, Fe, and Ca analyses were carried out by atomic absorption spectrophotometry. Samples were first dried overnight in a forced-draft oven at 90°C. Ashing was carried out according to Method 25.092 (AOAC, 1984) and the ash was subsequently collected with a mixture of 50 % HCl/HNO₃ (v/v) and filtered through a Whatman GF/C glass microfiber filter, according to Zurera *et al.* (1987). The filtered product was placed in a 15 ml volumetric flask, and the level was made up with the acid mixture used. Minerals were determined in the final filtrate solution using a Perkin-Elmer 110&B atomic absorption spectrophotometer. A 10 cm one-slot burner head and standard air-acetylene flame were used. The acids (Suprapure quality) and the mineral standard solutions (Tritisol®) used were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

III.1.2.a. Assay quality control

To minimize the risk of adventitious contamination, all glassware and crucibles were acid-washed overnight in a 6 N solution of analytical grade HCl, deionized water was used to rinse all glassware. The Community Bureau of Reference material CRM-189 (wholemeal flour) was used as a control to test the method for accuracy. The criteria of the American Chemical Society (ACS, 1980) were followed for detection limit determination.

III.1.2.b. Mineral : phytate molar ratios

To calculate the mineral (Fe, Ca and Zn) : phytate molar ratios of the infant cereals, the amount of mineral (Fe, Ca or Zn) present in 100 g infant cereal divided by the molecular mass of each mineral were related with the amount of phytate (g) present in 100 g infant cereal and was divided by the molecular mass of the inositol phosphate (IP₅ + IP₆).

III.2.2nd STUDY

III.2.1. Laboratory processing of cereal flours: roasting and alpha-amylase treatment.

As illustrated in Figure 1, roasting and alpha-amylase treatment of raw cereals are a common step in the industrial manufacture of infant cereals. As mentioned before, in this study we reproduced both treatments at a laboratory scale in order to better characterize their individual effect on phytate degradation. Samples were processed as follow: Firstly, each cereal flour was roasted separately in an oven at 120°C for 30 minutes, and later analyzed for their phytate content. For the alpha amylase treatment, 150 grams of each roasted flour was suspended in 310 mL of deionized water. Then, 700 mg per kg of flour of alpha-amylase from human saliva (EC. 3.2.1.1, cat. A1031, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) was added to each roasted cereal flour and then incubated at 55°C under stirring for 20 minutes, at pH 5.5. The reaction was stopped by heating the slurry at 98°C for 10 minutes. Mixtures were dried at 120°C in a drying cabinet to eliminate the moisture content, and then they were milled in a grinder in order to reduce the particle size, and analyzed by HPLC for their phytate content.

III.2.2. Dephytinization of infant cereals: addition of exogenous phytase

The influence of pH at optimal temperature has been studied for two phytases from *Aspergillus* (*A. niger* (EC 3.1.3.8) 5000 PU/g, and *A. oryzae* (EC 3.1.3.26), 2500 PU/g) were studied by incubation of sodium phytate solution for 20 min with each phytase and comparing phytate degradation in the same conditions (pH and T^a). Forty grams of infant cereal were mixed with 460 mL of distilled water and phytase from *Aspergillus oryzae* (2500 FTU/g) at T^a 55°C and pH 5.5 for 20 min under stirring, the reaction was stopped by heating at 98°C for 10 min. These samples were dried at 120°C in an oven overnight to obtain the dry weight and then milled, the procedure of Lehrfeld (1989; 1994) was followed for the inositol phosphate content.

III.3. 3rd STUDY

III.3.1. Bioaccessibility of iron, calcium and zinc from infant cereals

Bioaccessibility of iron, calcium and zinc in commercial infant cereals and after dephytinization, mixed with deionized distilled water or follow-on formula (Table 2) was determined by the *in vitro* method described by Miller *et al.*, (1981) with suitable modifications reducing amounts of enzymes, because the gastrointestinal tract in the early stages of life is not yet fully developed (Bosscher *et al.*, (2001) and Jovaní *et al.*, (2001)). *In vitro* estimation of the bioavailability of minerals involves the simulation of gastrointestinal digestion and measurement of the mineral soluble fraction or the mineral fraction that dialyses across a semipermeable membrane with a pore size of 12.000 Da. Total Fe, Ca and Zn contents of the soluble fraction and the dialysate were measured by flame atomic absorption spectroscopy (A.O.A.C., 1999). Follow-on formula were reconstituted according to the recommendations of the manufacturer (210 mL of water and 33 g of follow-on formula).

Table 2. Commercial and dephytinized infant cereals used in the *in vitro* digestion for Fe, Ca and Zn bioavailability studies, and the reconstitution liquid used:water or follow-on formula (IF)

Commercial infant cereals	Dephytinized infant cereals
Eight cereals honey + water	Eight cereals honey + water
Eight cereals honey + IF	Eight cereals honey + IF
Multicereals + water	Multicereals + water
Multicereals + IF	Multicereals + IF
Rice cream + water	Rice cream + water
Rice cream + IF	Rice cream + IF
Gluten-free cereals + water	Gluten-free cereals + water
Gluten-free cereals + IF	Gluten-free cereals + IF
Wheat + water	Wheat + water
Wheat + IF	Wheat + IF

The method consisted of two phases: a gastric and an intestinal stage. Prior to the gastric stage the pH of the food sample was lowered to pH 4 with 6 N HCl. 0.02 g of pepsin solution (0.125 g of pepsin dissolved in 6 mL of 0.1 N HCl) per g of sample was added, the sample was incubated in a shaking water bath at 37°C for 2 h. The digest was maintained in ice for 10 min to stop the pepsin digestion. For intestinal digestion, the pH of the gastric digests was raised to 5,0 by dropwise addition of NaHCO₃ 1M. Then a freshly prepared pancreatin-bile solution sufficient to provide 0,005 g of pancreatin and 0,03 g of bile salts/g of sample was added, and incubation was continued for an additional 2 h. to stop intestinal digestion, the sample was kept for 10 min in an ice bath, then the pH was adjusted to 7.2 by dropwise addition of 0.5 M NaOH.

III.3.1.a. *Mineral soluble fraction*

Alicuots of 20 g of sample were transferred to centrifuge tubes and centrifuged at 3500 g for 1 h at 4°C, the supernatants were used to determine the mineral content (soluble fraction).

Solubility percentages were calculated as follows:

$$\text{Solubility (\%)} = (\text{Soluble mineral content (mg/100 g)}/\text{Total mineral content of the sample (mg/100 g)}) \times 100$$

III.3.1.b. *Mineral dialyzed fraction*

A dialysis bag (molecular mass cut-off value 12000 Da) containing 50 ml of water and an amount of NaHCO₃ equivalent to the titrable acidity was placed in the flasks. Titrable acidity was measured in an aliquot of the gastric digest, and is defined as the amount of 0.5 N sodium hydroxide required attaining a pH of 7.5.

$$\text{g NaHCO}_3 = (2 \times \text{ml } 0.5 \text{ N NaOH} \times 84)/1000$$

After 30 min of dialysis, the pancreatic-bile mixture (0.005 g of pancreatin and 0,03 g bile salts/g of sample) was added, and dialysis was continued for another 2 h at 37°C under stirring. Dialysate iron, calcium and zinc content were determined by flame atomic absorption spectroscopy.

Dialysis percentages were calculated as follows:

$$\text{Dialysis (\%)} = (\text{Dialysate mineral content (mg/100 g)}/\text{Total mineral content of the sample (mg/100 g)}) \times 100$$

III.4.4th STUDY

III.4.1. Bioavailability of iron, calcium and zinc by Caco-2 cells: uptake, retention and transport

III.4.1.a. Control experiment: Integrity of the monolayers

During the differentiation period, Caco-2 cell growth and monolayer formation was assessed by measuring the trans-epithelial electrical resistance (TEER) and the passage of phenol red of the cell.

Cells were seeded onto polycarbonate membrane chamber inserts at a density of 50.000 cells/cm². The transwell filters were placed into six-well plates dividing an apical compartment from a basal compartment, and allowed to differentiate on the filters for 21 days before the experiments. The cells were grown in minimum essential medium (MEM) (Gibco BRL, Life Technologies) Rockville MD, USA) with 10% fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids, 1% glutamine and 1% antibiotic solution (penicillin-streptomycin) at 37°C in an incubator with 5% CO₂, 95% air atmosphere and 95% relative humidity, the medium was regularly changed three times a week. The trans-epithelial electrical resistance (TEER) was measured across the monolayer at set days from day 7 until day 21 after seeding onto polycarbonate membrane chamber inserts (Costar, Badhoevedorp, Netherland) and the values were expressed as Ω.cm² after subtracting from the reading the resistance of the supporting filter and multiplying it by the surface area of the monolayer.

The passage of phenol red was expressed as apparent permeability (P_{app}) according to the following equation (Ranaldi *et al.*, 2003):

$$V(\text{cm}^3)/A(\text{cm}^2)=dC/dt(\text{s})\cdot C_0$$

where V is the volume of the basolateral acceptor chamber, A is the filter area, t is the time, C is the phenol red concentration in the basolateral chamber at t time, C_0 is the phenol red concentration in the apical chamber at time zero. Phenol red flux across filters support was measured across the monolayer at set days from day 7 until day 21 after seeding. Phenol red concentration in the basolateral chamber was measured by molecular absorption spectrometry (UV-Vis, U-200, Hitachi Ltd. Tokyo, Japan) at 560 nm.

III.4.1.b. Mineral uptake assays. Standard solutions

For iron, calcium and zinc uptake assays, cells in 75 cm² plastic flask were seeded at a density of 50000 cells/cm² and allowed to differentiate on the flasks for 21 days. During this period, cells were maintained in minimum essential medium (MEM), with 10% fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids, 1% glutamine and 1% antibiotic solution (penicillin-streptomycin) at 37°C in an incubator with 5% CO₂, 95% air atmosphere and 95% relative humidity. The medium was changed every second day. Mineral uptake assays were carried out according to Viadel (2002).

Stock solutions containing aqueous 10 mM CaCl₂ for calcium, 10 mM FeCl₃·6H₂O and 20 mM nitriloacetic acid for iron and 10 mM ZnSO₄·7H₂O and 20 mM sodium citrate for zinc were prepared in 1mM HCl. Appropriate volumes of these stocks solutions were added to the uptake buffer (130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM HEPES, 5 mM glucose, pH 7). The mineral concentrations used are given in Table 3.

Table 3. Concentrations of Fe, Ca and Zn from mineral stocks solution

Fe (μM)	Ca (mM)	Zn (μM)
100	5	2
150	20	10
200	50	20

After removing the medium from the flasks, cells monolayer were washed two times with phosphate buffered solution (PBS) at 37°C, and then 10 ml of uptake buffer with iron, calcium, or zinc (standard solution) were added to the Caco-2 monolayer and incubated for 1 h at 37°C (5% CO₂, 95% air atmosphere and 95% relative humidity). Medium was then removed and the monolayer was washed two times with uptake buffer (4°C), cells were lysed by adding 1 ml of 2% SDS (sodium dodecyl sulfate) and then subjected to dry digestion at 450°C. Mineral cell content was measured by flame atomic absorption spectroscopy (AAS). Mineral availability was defined as the percentage of each mineral applied to the Caco-2 cells monolayer which was taken up by the cells.

III.4.1.c. Toxicity assays. Integrity of the monolayers

To investigate possible adverse effects of infant cereals components or digestive enzymes in the supernatants on the Caco-2 cells, the integrity of the cells was carefully assessed (Okada *et al.*, 2000) in a control experiment prior to the bioavailability experiments (21 days post-seeding). Background resistance was determined by measuring the trans-epithelial electrical resistance (TEER) across the monolayers.

At 21 days after initial seeding, spent culture medium was aspirated from the apical and basolateral chambers, and the apical and basolateral cell surfaces were washed two times with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2. Then, 1 mL of soluble mineral fraction obtained as described previously was added to the apical compartment, and 1 ml of BSS (Balanced salt solution), pH 7.4, was added to the basal chamber. Caco-2 monolayers were incubated for 180 min with supernatants of the infant cereals digest (dephytinized or no), and TEER was checked every 30 min, these TEER values were compared with monolayers

incubated with digestive enzymes without infant cereals. Monolayers with resistances < 200 Ω .cm² were not used in the bioavailability experiments.

III.4.1.d. Mineral uptake assays. Infant cereals

Infant cereals used in Caco-2 cells assays are showed in Table 4. The soluble fraction was selected to carry out uptake, retention and transport assays with Caco-2 cells, because is it more similar to the in vivo digest (Perales *et al.*, 2005). Moreover, the mineral content of the dialysate was lower than in the case of the soluble fractions, because only the soluble forms of mineral with a molecular weight below the cutoff value (12000 Da) of the dialysis membrane are able to dialyze, resulting in low additions to the cells.

Table 4. Commercial and dephytinized infant cereals used in Caco-2 cells experiments, and the reconstitution liquid used: water or follow-on formula (IF)

Commercial infant cereals	Dephytinized infant cereals
Eight cereals honey + water	Eight cereals honey + water
Eight cereals honey + IF	Eight cereals honey + IF
Multicereals+ water	Multicereals + water
Multicereals + IF	Multicereals + IF
Rice cream + water	Rice cream + water
Rice cream + IF	Rice cream + IF
Gluten-free cereals + water	Gluten-free cereals + water
Gluten-free cereals + IF	Gluten-free cereals + IF

The gastrointestinal digest from the solubility assay was heated for 4 min at 100°C to inhibit the sample proteases, and then cooled in an ice bath. Glucose (5 mM) and HEPES (50 mM) were added to the soluble fraction, and water was added to adjust the osmolarity (310 ± 10 mOsm/kg). After removing the medium from the flasks, the monolayers were washed two times with phosphate buffered solution (PBS) at 37°C, and then incubated with the soluble fraction (10 mL) from the digests in the same manner that with the standard solutions.

The differences between the calcium, iron and zinc contents of cell cultures incubated with samples or uptake buffer (blank) give an estimation of the cellular uptake of these mineral elements. Mineral availability was defined as the percentage of the iron, calcium and zinc applied to the Caco-2 cell monolayer which was taken up by the cells.

III.4.1.e. *Mineral uptake, retention and transport. Infant cereals.*

To evaluate mineral uptake, transport and retention, the *in vitro* digestion modified described by Aura (2005) was applied to the samples. Salivary alpha-amylase 30 U was added prior to the gastric digestion step, pepsine 0.4 g / 100 g sample and pancreatine 5 mg/100 g sample were added. The gastrointestinal digest were centrifuged at 9187 g for 30 min at 4°C. The supernatant fraction was transferred to centrifugal filter devices (30.000 MWCO) and then centrifugation was carried out at 4000 g for 90 min at 4°C. 30 mM of 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) was added to the supernatant portion, the pH was raised to 6.5-6.9, water was added to adjust the osmolarity to 310 ± 10 mOsm/kg and finally 1 mM Ca^{+2} and Mg^{+2} were added to maintain the integrity of tight junctions (Ferruzza *et al.*, 1999).

Cells were seeded onto polycarbonate membrane chamber inserts at a density of 50.000 cells/cm². The transwell filters were placed into six-well plates dividing an apical compartment from a basal compartment. The cells were grown in minimum essential medium (MEM) with 10% fetal bovine serum, 1% nonessential amino acids, 1% glutamine and 1% antibiotic solution (penicillin-streptomycin) at 37°C in an incubator with 5% CO₂, 95% air atmosphere and 95% relative humidity. The medium was changed every second day, and the cells were used in the experiments at 21 days after initial seeding. The growth medium was then aspirated from the apical and basolateral chambers, and cells were rinsed two times with phosphate buffered solution (PBS). After incubation, the apical compartment was aspirated, and the monolayers were washed two times with PBS at 4°C to remove non specifically bound mineral and residual medium. The cells were lysed by adding 0.5 mL of distilled deionized water. The basal content was pipetted off for the determination of mineral across the monolayer. Iron, calcium and zinc contents were determined in the sample (total),

soluble, in the cell monolayer and the basal chamber, all measurements were done by flame atomic absorption spectroscopy (A.O.A.C., 1999) according to Viadel (2002). All samples were previously subjected to dry digestion at 450°C. To dissolve the ashes, 2 mL of 37% HCl was added, the vessel was covered with a watch glass and gently warmed (70-75°C) for four hours, leaving at the end of heating about 1 mL of liquid. The solution was then transferred to flasks, and the volume was completed to 7 mL with distilled deionized water. An amount of lanthanum chloride sufficient to yield a lanthanum final content of 0.2% was added to suppress phosphate interferences (Roig *et al.*, 1999).

Differences between the mineral content of the cell monolayer incubated with a soluble mineral fraction and the mineral content of the nonexposed cell monolayer (blank) yield an estimation of the cellular retention (μg) of iron, calcium and zinc. Cellular transport was evaluated by the difference between the mineral amount in the basal chamber and the amount in the transport buffer (BSS) (blank). The following calculation was used for retention percentages: retention % = $100 \times R/C$, where R = mineral retention (μg of mineral/well) and C = mineral soluble added (μg). Transport percentages were calculated as follows: Transport % = $100 \times T/C$, where T = cellular transport (μg of mineral/well) and C = mineral soluble added (μg). Uptake was defined as the sum of retained and transported mineral (Perales *et al.*, 2005).

Mineral transport and uptake were moreover expressed as follows: % transport efficiency = $(\% \text{ solubility} \times \% \text{ transport})/100$, % uptake efficiency = $(\% \text{ solubility} \times \% \text{ uptake})/100$.

III.5. Statistical analysis

Student's paired t test was used to determine whether significant differences exist between content of each inositol phosphate of different cereal flours and infant cereals, using the mean of five determinations and standard deviation (SD). To study the effect of the different steps of the industrial processing (roasting and alpha-amylase treatment) on the inositol phosphates content, one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test to

evaluate significant differences among means ($p < 0.05$) were carried. Mineral content was expressed as the mean of five determination and standard deviation (SD). To determine the effect of dephytinization and follow-on formula addition on mineral solubility and dialyzability, samples were measured in triplicate for both, and means of the measurements were used for ANOVA (one-way) and Student's test. To assess the significant differences between mineral uptake from both dephytinized and commercial infant cereals, the Student's test was applied. For these bioavailability assays, two-way analysis of variance (ANOVA) were also performed to investigate the effect of dephytinization and follow-on formula addition, as well as their interaction. For uptake, retention and transport studies, one-way ANOVA procedures were applied, using Tukey and T3 Dunnett post hoc tests to determine the effect of dephytinization on mineral bioavailability. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant. A Pearson correlation analysis was performed to investigate the possible correlation between different variables assessed in this study. Correlation was significant at the 0.05 level. For identify homogeneous subgroups of cases in samples used in this thesis, a Cluster Analysis was applied, then the cases with the lowest distance (or highest similarity) were combined into a cluster to arrange samples according to similarity based on several measurements variables within each bioavailability study. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Statistical analyses of the data were carried out using a statistical software package (SPSS 11.5, Inc., Chicago, IL, USA).

IV. RESULTS AND DISCUSSION

IV.1.1st STUDY

IV.1.1. Inositol phosphates content in infant cereals and raw materials

The inositol phosphates content of the raw materials used in this study were identified by the retention times of the reference compounds by HPLC (Lehrfeld, 1989; 1994), values are presented in Table 5.

Table 5. Inositol phosphates content (mg/100 g) of raw materials

FLOUR	IP ₅	IP ₆	IP ₅ +IP ₆
Rice	138.5 ± 13.3 ^c	328.5 ± 5.4 ^c	467.0
Wheat	ND	205.8 ± 5.7 ^c	205.8
Corn	42.6 ± 0.52 ^e	410.3 ± 2.7 ^b	452.9
Rye	ND	184.1 ± 9.9 ^d	184.1
Barley	71.9 ± 18.5 ^d	521.9 ± 20.8 ^b	593.8
Sorghum	144.6 ± 3.6 ^c	1011.3 ± 32.9 ^a	1155.9
Millet	160.4 ± 0.8 ^b	1099.4 ± 84.3 ^a	1259.8
Oat	184.2 ± 0.8 ^a	1119.6 ± 9.3 ^a	1303.8
Ecological rice	134.3 ± 0.2 ^c	488.5 ± 16.9 ^b	622.8
Ecological corn	ND	365.3 ± 25.9 ^c	365.3
Tapioca	ND	ND	ND
Pea	ND	208.6 ± 16.4 ^c	208.6
Carrot	ND	ND	ND

ND: Non detected.

Results are expressed as average (n=5) and standar deviation. (a -c) different letters as superscript within the same row indicate significant differences between treatments (p<0.05).

Two different classes of inositol phosphate peaks appeared on the chromatografic charts (inositol pentaphosphate (IP₅) and inositol hexaphosphate (IP₆)). The larger amounts of IP₅ + IP₆ were observed in oat, millet and sorghum (p<0.05), whereas in rye and wheat the phytate values were the lowest. Only wheat, rye, ecological corn and pea contained just IP₆. The higher values of phytic acid (IP₆) were found in oat (1119.6 mg/100g), millet (1099.4 mg/100g) and sorghum (1011.3 mg/100 g). These values were higher than those reported for the same cereals (Harland & Oberleas, 1987; Kasim & Edwards, 1998; Carlsson *et al*, 2001).

The data we report show that the phytate content of raw flours used as ingredients for the manufacture of infant foods is similar to those reported by other researchers (Harland & Oberleas 1987).

Table 6 summarized the inositol phosphates content (mg/100 g) in different commercial infant cereals. Ecological peas and carrots showed values ($IP_5 + IP_6$) and separately much higher than the rest. Multicereals had the lowest mean (143.5 mg (IP_5+IP_6)/100g). On the other hand, the range observed could be probably due to the different proportion of each flour between different commercial infant cereal.

Table 6. Inositol phosphates content (mg/100 g) of commercial infant cereals

Commercial infant cereal	IP_5	IP_6	IP_5+IP_6
Ecological peas and carrots	157.8 ± 0.3 ^a	272.9 ± 4.2 ^a	430.7
Eight cereals honey	133.4 ± 0.9 ^b	186.2 ± 2.2 ^b	319.6
Wheat	137.9 ± 0.2 ^b	157.6 ± 10.2 ^b	295.5
Rice cream	59.8 ± 7.1 ^c	107.3 ± 20.4 ^c	167.1
Multicereals	43.5 ± 1.3 ^d	100 ± 9.3 ^c	143.5
Gluten-free cereals	131.9 ± 4.4 ^b	167.9 ± 12.5 ^b	299.8

ND: Non detected.

Results are expressed as average (n=5) and standard deviation. (a-c) different letters as superscript within the same row indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

The amounts of phytate in commercial infant cereals found in this study, were in close agreement with literature values (Gibson *et al.*, 1998; Brooks & Lampi, 2001; Febles *et al.*, 2001; Lind *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006). However, as shown in this study, the industrial process did not completely degrade inositol phosphates, and appreciable quantities of phytate forms continue to be present in the commercially available infant foods.

IV.1.2. Iron, calcium and zinc content and molar ratios of phytate (IP_5+IP_6) to Fe, Ca and Zn of infant cereals

Total Fe, Ca and Zn contents in the analyzed infant cereals and an follow-on formula are listed in Table 7. Values found for the three measured minerals were in the ranges recommended (NRC, 1991) for infants younger than 6 months.

Table 7. Total mineral content (per 100 g)

Commercial infant cereals	Fe (mg/100 g)	Ca (mg/100 g)	Zn (mg/100 g)
Ecological peas and carrots	10.5 ± 0.1	386 ± 8.9	1.2 ± 0.4
Eight cereals honey	8.3 ± 0.4	137.3 ± 5.6	0.6 ± 0.3
Wheat	12 ± 0.7	280 ± 22.3	0.7 ± 0.3
Rice cream	8.8 ± 0.1	283.1 ± 27.7	1.2 ± 0.2
Multicereals	8.7 ± 0.2	174.4 ± 21.0	1.5 ± 0.4
Gluten-free cereals	7.5 ± 1	154.4 ± 38.9	1 ± 0.3
Follow-on formula	9 ± 0.2	600.0 ± 49.6	4.7 ± 0.9

Values are means ± standard deviation (SD) of five determinations.

The estimation of the phytate-to-mineral molar ratio is a valuable tool for the prediction of the inhibitory effect of phytate on the bioavailability of minerals, such as iron (Hurrell 2004), zinc (Bosscher *et al.*, 2001; Hotz and Gibson, 2001) or calcium (Ma *et al.*, 2005). For this reason, we calculated the molar ratios of phytate to iron, calcium and zinc of the commercial infant cereals. Table 8 presents the molar ratios of phytate to each mineral (Fe, Ca and Zn) of the commercial infant cereals. The values for (IP₅+IP₆)/Fe molar ratios of commercial infant cereals which are associated with mineral absorption capacity (Perlas & Gibson, 2005) and ranged from 3.8:1 in 8-Cereals-honey to 1.4:1 in Multicereals. For calcium, molar ratios of all samples had a value below of 0,2. For zinc, the molar ratio with phytate had large values for all the samples analyzed. The ranges were between 9.8 for Multicereals and 53.1 for Eight Cereals honey.

Table 8. Molar ratios of phytate to Fe, Ca and Zn of infant cereals

Commercial infant cereals	(IP ₅ +IP ₆):Fe	(IP ₅ +IP ₆):Ca	(IP ₅ +IP ₆):Zn
Ecological peas and carrots	4,6	0,07	35
Eight cereals honey	3,8	0,16	53,1
Wheat	2,1	0,06	44,5
Rice cream	1,6	0,11	14,4
Multicereals	1,4	0,07	9,8
Gluten-free cereals	3,5	0,18	31,8

All the samples analyzed had phytate to iron ratios above the critical level 0.4:1 (Hurrell, 2004). The molar ratio of phytate/calcium of all samples was < 0.24, under this value, calcium bioavailability is unlikely compromised (Ma *et al*, 2005). The ranges of phytate to zinc molar ratios for Gluten-free cereals, Wheat, 8 cereals-honey and Ecological peas and carrots were above the critical value (15:1) (Gibson & Hotz, 2000; Ma *et al.*, 2005; Perlas & Gibson, 2005). In our study, the calculated molar ratio phytate/iron and phytate/zinc of all the commercial infant cereal analyzed were above those expected not to compromise mineral bioavailability. For instance, the phytate-to-iron ratio should be reduced to below 0.4 in order to achieve, at least, a 2-fold increase in iron absorption (Hurrell, 2004). In the case of zinc, it appears that phytate/zinc ratios above 1.5 may inhibit Zn availability in small infants, and thus, they should be reduced below 0.5 (Bosscher *et al.*, 2001). Unlike iron and zinc, the phytate/calcium ratios in all the samples analyzed in this study were below the levels regarded as indicative of poor calcium absorption, which are above 0.24 (Ma *et al.*, 2005).

IV.2.2nd STUDY

IV.2.1. Effect of processing on phytate content in infant cereals and cereals flours: roasting and alpha-amylase treatment

The hexa (IP₆) and penta (IP₅) forms of inositol phosphates (IPs) account for over 90% of the total phytate content in raw grains (Agte *et al.*, 1999). These forms are endowed with iron chelating activities which may impair iron absorption from the intestine (Sandberg & Svanberg 1991). Therefore, the reduction of IP₆ and IP₅ forms to lower levels is desirable in

the industrial production of infant cereals, in order to prevent a negative effect on iron bioavailability in a crucial life stage. In this context, different researchers have reported the degradative effect of common industrial heat treatments, such as malting (Larsson and Sandberg, 1991), roasting or boiling (Agte et al, 1999; Hurrell et al, 2002) on the phytate content of different raw flours.

The results of roasting on inositol pentaphosphate content in cereals flours are shown in Table 9. Inositol pentaphosphate (IP₅) was not detected in neither raw nor roasted rye and wheat flours. Roasting significantly ($p<0.05$) increased the IP₅ content of corn, sorghum, oat, millet and rice, whilst, in the case of barley, no IP₅ was detected after the roasting treatment.

Table 9. Effect of roasting on the inositol pentaphosphate content (mg/100 g) of cereals/vegetables flours

Flours	Raw flours	Roasted flours	% increase
	IP ₅ (mg/100 g)	IP ₅ (mg/100 g)	
Barley	82.6 ± 0.3	nd	ND
Corn	42.6 ± 0.5	199.2 ± 2.1	367.6
Rye	ND	ND	ND
Sorghum	144.6 ± 3.6	225.5 ± 5.6	55.9
Wheat	ND	ND	ND
Oat	184.2 ± 0.8	197.7 ± 1.7	7.3
Millet	160.4 ± 0.8	247.1 ± 3.6	54.1
Rice	138.5 ± 13.3	198.0 ± 1.8	43
Peas	ND	ND	ND
Carrots	ND	ND	ND
Ecological rice	134.3 ± 0.2 ^a	ND	ND
Ecological corn	ND	ND	ND

ND: non detected.

Results are expressed as average and standar deviation. All the differences between raw and roasted flours for IP₅ were significantly different ($p<0.05$).

In Table 10 are shown the inositol hexaphosphate (IP₆) content of all the cereal flours, as well as the effect of roasting on IP₆ content. As can be see, a significant ($p<0.05$) decrease after the roasting treatment was observed.

Table 10. Effect of roasting on the inositol hexaphosphate content (mg/100 g) of cereals/vegetables flours

Flours	Raw flours	Roasted flours	% DECREASE
	IP ₆ (mg/100 g)	IP ₆ (mg/100 g)	
Barley	639.0 ± 2.1	257.7 ± 9.0	59.7
Corn	410.3 ± 2.7	285.2 ± 3.7	30.5
Rye	188.6 ± 6.3	84.1 ± 1.9	55.4
Sorghum	1028.8 ± 12.9	612.6 ± 12.6	40.5
Wheat	209.0 ± 1.5	48.3 ± 1.5	76.9
Oat	1119.6 ± 9.3	46.8 ± 1.9	95.8
Millet	1099.4 ± 8.3	603.8 ± 4.9	45.1
Rice	328.5 ± 5.4	305.4 ± 4.4	7
Peas	ND	ND	ND
Carrots	ND	ND	ND
Ecological rice	ND	ND	ND
Ecological corn	ND	ND	ND

ND: non detected

Results are expressed as average and standar deviation. All the differences between raw and roasted flours for IP₆ were significantly different (p<0.05).

Oat have been reported to have a low phytase activity (Bartnik & Szafranska, 1987; Egli, 2001), in oat roasting caused an IP₆ degradation higher than expected (95.8%), this fact probably could be due to the high phytate content on raw oat flour and perhaps more exposed.

To further characterize the effect of processing on phytate content, we also evaluated the effect of alpha-amylase treatment on IP₅ and IP₆ levels. The main goals of the alpha-amylase treatment of infant cereals is to facilitate starch digestibility, since it breaks down starch into oligosaccharides. In addition, this process sweetens the gruels and also gives them a more acceptable consistency. Alpha-amylase treatment in this manner, increases flour solubility, enhances the energy intake, and improves their organoleptic characteristics (Pérez-Conesa *et al.*, 2002; Moursi *et al.*, 2003). Interestingly, the alpha-amylase activity has been suggested to play a role in the phytate degradation during grain germination, as both alpha-amylase and phytase activities increases during germination. In this regard, the use of germinated flours has been suggested as a feasible approach to obtain gruels with increased energy and nutrient density, and with a lower phytate-to-mineral ratio (Hotz & Gibson 2001). Therefore, the use of alpha-amylase might help in reducing the phytate content of

flours, more probably by means of an increase in the fluidity of the gruel (increasing so the solubility of the IPs) than by a direct effect of alpha-amylase on phytate.

The effect of alpha-amylase treatment on inositol pentaphosphate content in roasted infant cereals are shown in Table 11. Similarly to the above mentioned results, the roasting treatment of the mixed cereal flours significantly ($p < 0.05$) increased the IP₅ content, whilst IP₅ was not detected in the Wheat mixture neither raw nor roasted. The greater increases were observed in the Peas and Carrots mixture, whose IP₅ content increased by 220% after roasting. For the other cereal mixtures, the increases in IP₅ ranged from 40% to 105% in rice cream and multocereals, respectively. As the raw wheat mixture did not contain IP₅, no changes were observed. The alpha-amylase treatment had a strong degradative effect on IP₅, as revealed by the observation that no IP₅ was detected after the enzymatic treatment of the Eight cereals honey, Gluten free and Multicereal flour mixtures. In the case of the Peas and Carrots mixture, the IP₅ content of the roasted flour decreased by 66% after the alpha-amylase treatment. A decrease in the IP₅ content was also observed after the alpha-amylase treatment in the Peas and Carrots mixture, whilst, in the case of the Rice Cream mixture, a slight but non significant increase in the IP₅ content was observed. The IP₅ levels decreased to undetectable levels in Eight cereals honey, Gluten-free and Multocereals. This effect could be explained by the fact that once an IP₆ molecule is hydrolyzed to IP₅, the formed IP₅ molecule would have a greater probability of being further hydrolyzed than the remaining IP₆ for two reasons. First, the IP₅ molecule is already in close proximity to the endogenous phytase. Second, IP₅ is more soluble than IP₆ since the solubility of the IPs increases as the number of phosphate groups decreases (Phillippy *et al.*, 1988). No IP₅ was detected in the Wheat mixture.

Table 11. Inositol pentaphosphate content (mg/100 g) of raw, roasted, after alpha-amylase content of infant cereals on laboratory. Inositol pentaphosphate content (mg/100 g) of commercial infant cereals

Infant cereal	Raw infant cereals	Roasted infant cereals	Roasted & alpha-amylase
Eight cereals-honey	25.9±0.9 ^b	49±1 ^a	ND
Gluten free	110.7±1.7 ^b	198.1±1.8 ^a	ND
Multicereals	24.4±1.3 ^b	50±1.7 ^a	ND
Peas and carrots	61.5±0.9 ^c	198±2.5 ^a	66±3.3 ^b
Rice cream	138.5±2.9 ^b	195.5±2 ^a	197.9±2.7 ^a
Wheat	ND	ND	ND

ND: non detected

Results are expressed as average and standar deviation. (a-c) different letters as superscript within the same row indicate significant differences between treatments (p<0.05)

We have observed a strong degradative effect on IP₆ content in both in raw cereal flours and infant cereal mixtures after roasting, accompanied by a marked increase in the IP₅ levels. The degradation of IP₆ involves subsequent dephosphorylation steps leading to different hydrolysis products, such as penta (IP₅), tetra (IP₄), tri (IP₃), di (IP₂) or even mono (IP₁) forms (Skoglund, 1997), the latter (IP₁-IP₄) possessing lower mineral complexing ability (Phyllippy *et al.*, 1988; Kozłowska *et al.*, 1996). Hence, the observed increase in IP₅ levels indicates that the laboratory roasting treatment was not capable of achieving IP₆ degradation to lower inositol phosphate forms, since neither IP₄ nor lower phosphorylated forms were detected after the treatment. Moreover, IPs degradation may take place by the action of endogenous phytases of grains (Sandberg *et al.*, 1995) and/or due to the heat treatment itself (Hurrell *et al.*, 2002). However, our laboratory roasting treatment involved non-optimal conditions (120°C, 30 minutes) for the endogenous phytase activity, which are around 55°C (Hurrell 2004). Therefore, in our study, the observed IP₆ degradation would be attributable to the roasting treatment.

Table 12 shows the IP₆ content of infant cereals after the subsequent laboratory steps of roasting and alpha-amylase treatment. As can be seen from the table, the inositol hexaphosphate (IP₆) content of the mixtures of cereal flours significantly (p<0.05) decreased after roasting in all samples. Particularly, roasting caused large IP₆ degradation in Wheat, Eight cereals honey and Multicereal flours, with losses above 50 % of the initial (raw flour)

content. In contrast, roasting decreased the IP₆ content of Peas and carrots, Cereals gluten-free, and Rice Cream, to a lesser extent (below 25%).

Table 12. Inositol hexaphosphate content (mg/100 g) of raw, roasted, after alpha-amylase content of infant cereals on laboratory. Inositol hexaphosphate content (mg/100 g) of commercial infant cereals

Infant cereal	Raw infant cereals	Roasted infant cereals	Roasted & alpha-amylase
Eight cereals-honey	285.5 ± 3.9 ^a	112.9 ± 3.3 ^b	72 ± 6.6 ^c
Gluten free	324.4 ± 6.1 ^a	283.1 ± 7.1 ^b	116.2 ± 5.8 ^c
Multicereals	254.9 ± 2.8 ^a	126.8 ± 0.7 ^b	ND
Peas and carrots	383.2 ± 5.8 ^a	292.2 ± 1.1 ^b	112 ± 9.9 ^c
Rice cream	328.5 ± 5.5 ^a	300.8 ± 5.1 ^b	274.5 ± 10.4 ^c
Wheat	195.9 ± 2.8 ^a	45.4 ± 0.9 ^b	ND

N.D: not detected

Results are expressed as average and standard deviation. (a -c) different letters as superscript within the same row indicate significant differences between treatments (p<0.05)

Similarly, the alpha-amylase treatment significantly (p<0.05) reduced the IP₆ content of the roasted flour mixtures, even though achieving total degradation Multicereals and Wheat flours. A marked decrease in the IP₆ content of Peas and Carrots, Cereals gluten-free, multicereals and wheat flours was observed after the enzymatic treatment, whilst the IP₆ content of rice cream flour remained almost unaffected. Interestingly, the IP₆ content of 8-cereals honey flour increased by around 36% with respect to the roasted flour content, after the alpha amylase treatment.

The data we report clearly show that both roasting and alpha-amylase treatments have an effect on phytate content. However, their effectiveness largely depends on the cereal treated and, in some cases, the treatments are unable to markedly decrease the phytate content. This is confirmed by the observation that phytate continues to be present in commercial samples even after undergoing standardized technological processing. Moreover, based on the molar ratios of phytate-to-iron and phytate-to-zinc of the analyzed commercial infant cereals (Table 8), the industrial processing appears to be insufficient to achieve phytate degradation to an extent enough to yield optimal phytate-to-mineral ratios. Therefore, the industrial processing shows room for the improvement, so that the inclusion of an additional technological step involving the use of phytase should be subject of further studies. In fact, the use of phytase has been reported as an effective means of reducing the

phytate content of cereals (Hurrell, 2004), suggesting that such a treatment might be a feasible approach to obtain infant foods with phytate/mineral ratios not compromising mineral bioavailability.

IV.2.2. Dephytinization of infant cereals by addition of exogenous phytase

The complete phytic acid degradation was obtained after incubation of sodium phytate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with phytase from *Aspergillus niger* (5000 FTU/g) at 55 °C and pH 5.5-6.2, meanwhile for phytase from *Aspergillus oryzae* (2500 FTU/g) it was observed at 55 °C and pH 5-5.7 (Figure 2). As can be seen, degradation of phytate varied after incubation for 20 minutes between 9,5% and 100% of the initial value depending on the source of phytase.

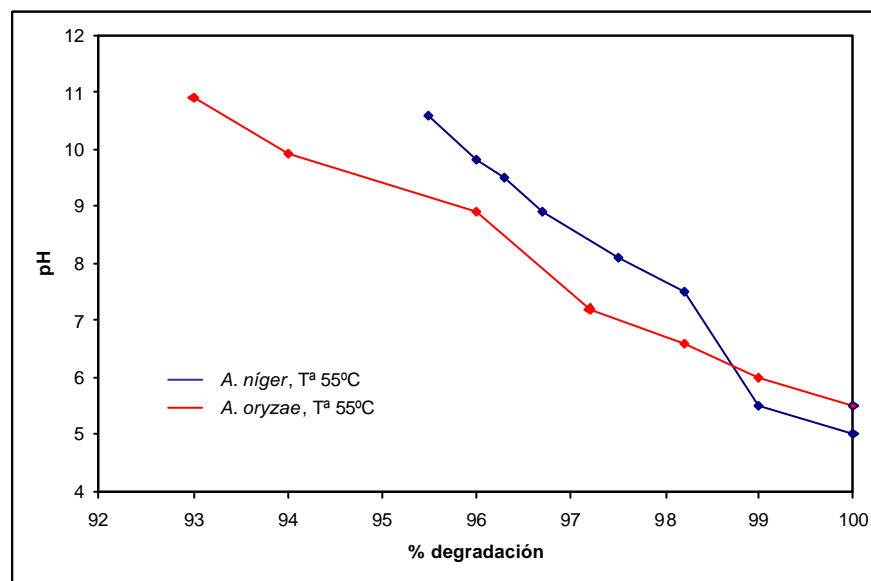


Figure 2. Effect of exogenous phytase from *A. oryzae* and *A. niger* in phytate degradation during incubation of sodium phytate for 20 min at 55°C

The effect of exogenous phytase from *Aspergillus* over phytate at optimal conditions shows a complete reduction of its concentration, this fact could be a good reason to use a phytase to reduce phytate content during cereal processing to improve mineral bioavailability (Hallberg et al., 1989). Despite have been reported (Brinch-Pedersen *et al.*,

2006) that phytase from any *Aspergillus spp.* degrade efficiently phytic acid, in our study phytase from *Aspergillus oryzae* was chosen because its optimal pH was in close agreement with the pH conditions used in infant cereals processing.

Phytic acid was completely degraded by adding phytase from *Aspergillus oryzae* (2500 FTU/g) to infant cereals as is described in the section III.2.2 of this thesis. By HPLC (Lehrfeld 1989; 1994) the absence of inositol phosphates content was then checked.

IV.3. 3rd STUDY

IV.3.1. *In vitro* digestion of infant cereals. effect of dephytinization and follow -on formula addition on solubility and dializability of Fe, Ca and Zn

Cereals, incorporated as flours, are usually the first solid foods given to infant to supplement breast milk and follow-on formula (COMA, 1995). The main minerals supplied by cereals are calcium, iron and zinc; however, cereals are also a source of antinutrients like phytic acid, which can negatively affect mineral bioavailability due to its strong ability to chelate multivalent metal ions (Davidsson *et al.*, 1997). Our aim was to study the effect of dephytinization on mineral bioavailability of different infant cereals by *in vitro* methods based on simulation of gastrointestinal digestion and estimation of the mineral soluble fraction and the proportion of the ingested mineral that dialyses through a semipermeable membrane of a certain pore size (Miller *et al.*, 1981). The dialysability of a mineral gives an estimation of its availability for absorption (Sebastiá *et al.*, 2001). We have also estimated the influence of water or follow-on formula addition to infant cereals with or without dephytinization, on mineral availability.

After *in vitro* digestion (Miller *et al.*, (1981) with suitable modifications reducing amounts of enzymes, because the gastrointestinal tract in the early stages of life is not yet fully developed (Bosscher *et al.*, (2001) and Jovaní *et al.*, (2001), soluble and dialysate mineral content were measured.

As shown in Table 13, phytase treatment significantly ($p < 0,05$) increased Fe and Zn *in vitro* availability, but not that of Ca which was similar with or without enzymatic treatment. The changes in Fe and Zn dialisability depended on the cereal analysed, there is a variability in the mineral dialysis percentages that is related to the phytate content; a lower phytate content gives high dialisability. High mineral solubility was not always related to a high dialysis percentage, because the mineral may be bound to compounds of molecular sizes in excess of the pore size of the dialysis membrane (Cámara *et al.*, 2004). Although follow-on formula added to infant cereals increased mineral concentration of homogenates, the percentages of dialysed calcium were similar ($p < 0,05$), meanwhile a higher dialyzed iron and zinc was observed when samples were mixed with water to those of the infant cereals homogenized in follow-on formula. The addition of follow-on formula inhibits iron and zinc absorption and overcomes the enhancing effect of phytic acid degradation for both minerals, but not for calcium. These results agree with those reported by others authors (Hurrell *et al.*, 1989; Dragó & Valencia, 2004) who observed the inhibitory effect of casein from milk or emulsifier on iron and zinc dializability (Sarriá *et al.*, 2001).

We conclude that dephytinization improves Fe and Zn *in vitro* availability, but not for calcium, mainly in cereals mixtures reconstituted with water, similar results were reported by Hurrell (2004) for iron. Follow-on formula addition to infant cereals not increased solubility and dializability of iron, calcium and zinc, despite follow-on formula addition implied an increased on mineral content.

Table 13. Mineral solubility (MS) and dialyzed mineral (DM) percentage (%) (mean \pm standard deviation of n= 5)

	Fe		Ca		Zn	
	MS	DM	MS	DM	MS	DM
8 cereals honey + W	43.5 \pm 4 ^a	1.86 \pm 0.03 ^b	85.6 \pm 3.2 ^a	2.3 \pm 0.02 ^b	36.3 \pm 2.6 ^a	11.53 \pm 0.52 ^a
8 cereals honey + W + P	23 \pm 6 ^d	4.55 \pm 0.25 ^{*c}	80 \pm 4 ^c	2.26 \pm 0.03 ^d	36.3 \pm 2 ^c	14.55 \pm 0.95 ^{*c}
8 cereals honey + IF	42.2 \pm 1 ^a	1.84 \pm 0.02 ^a	17.2 \pm 0.8 ^b	2.7 \pm 0 ^a	23.5 \pm 1.8 ^b	2.92 \pm 0.08 ^b
8 cereals honey + IF + P	43.3 \pm 1 ^c	3.89 \pm 0.3 ^{*d}	22.2 \pm 1.2 ^d	2.94 \pm 0.11 ^{*c}	24.7 \pm 2.2 ^d	6.82 \pm 1.51 ^{*d}
Gluten-free + W	33.8 \pm 1.1 ^b	1.87 \pm 0.77 ^a	22.9 \pm 1 ^a	2.32 \pm 0.38 ^a	39.5 \pm 3 ^a	17.59 \pm 0.39 ^{*a}
Gluten-free + W + P	24.6 \pm 2.1 ^d	2.72 \pm 0.85 ^c	24.5 \pm 4.4 ^c	2.24 \pm 0.18 ^d	38.2 \pm 3.5 ^c	13.99 \pm 0.55 ^c
Gluten-free + IF	57.1 \pm 3.3 ^a	1.78 \pm 0.14 ^a	19.2 \pm 0.9 ^a	2.42 \pm 0.04 ^a	24.6 \pm 1 ^b	3.77 \pm 0.04 ^{*b}
Gluten-free + IF + P	51.6 \pm 3 ^c	1.64 \pm 0.21 ^d	15.5 \pm 1.7 ^d	2.61 \pm 0.07 ^{*c}	23.4 \pm 1.7 ^d	2.15 \pm 0.78 ^d
Multicereals + W	17 \pm 1 ^b	3.16 \pm 0.44 ^{*a}	30 \pm 2.2 ^a	1.88 \pm 0.04 ^b	29 \pm 7.7 ^a	9.02 \pm 0.3 ^a
Multicereals + W + P	17 \pm 1.3 ^d	1.53 \pm 0 ^d	26 \pm 6.7 ^c	2.18 \pm 0.11 ^d	29.5 \pm 2 ^c	13.54 \pm 1.28 ^{*c}
Multicereals + IF	37.2 \pm 2.4 ^a	1.91 \pm 0.01 ^b	18.4 \pm 1.8 ^b	2.3 \pm 0 ^a	11.8 \pm 1.8 ^b	3.37 \pm 0.08 ^b
Multicereals + IF + P	46.8 \pm 2.9 ^{*c}	2.16 \pm 0.05 ^{*c}	19.1 \pm 5.1 ^d	2.49 \pm 0.08 ^{*c}	13 \pm 5.6 ^d	3.88 \pm 0.99 ^d
Rice cream + W	33.8 \pm 1.1 ^b	2.12 \pm 0 ^a	34.2 \pm 1.7 ^a	2.23 \pm 0 ^b	88.2 \pm 3.8 ^a	9.08 \pm 0 ^a
Rice cream + W + P	37.5 \pm 1.5 ^{*d}	4.24 \pm 0.3 ^{*c}	32.7 \pm 3.8 ^c	2.13 \pm 0.02 ^d	76.5 \pm 7 ^c	9.08 \pm 0 ^c
Rice cream + IF	52.2 \pm 7 ^a	1.8 \pm 0.01 ^b	16.7 \pm 0.9 ^b	2.65 \pm 0.14 ^a	41.4 \pm 2.8 ^b	2.26 \pm 0.11 ^b
Rice cream + IF + P	49.4 \pm 6.7 ^c	2.16 \pm 0.06 ^{*d}	18.6 \pm 2 ^d	2.91 \pm 0 ^{*c}	44.2 \pm 9.5 ^d	2.65 \pm 0.39 ^d
Wheat+ W	24.8 \pm 1 ^b	5.07 \pm 0 ^a	35 \pm 2.7 ^a	2.11 \pm 0 ^b	50 \pm 3.4 ^a	22.49 \pm 0 ^a
Wheat + W + P	30 \pm 1.2 ^d	6.25 \pm 0 ^{*c}	33.6 \pm 3 ^c	2.27 \pm 0 ^{*d}	48.5 \pm 3 ^c	23.33 \pm 0 ^{*c}
Wheat + IF	43.7 \pm 1.8 ^a	2.66 \pm 0.03 ^b	19.9 \pm 1.2 ^b	2.75 \pm 0 ^{*a}	24.1 \pm 2 ^b	3.45 \pm 0.09 ^b
Wheat+ IF + P	51 \pm 2 ^c	4.57 \pm 0.06 ^{*d}	20 \pm 3.8 ^d	2.67 \pm 0 ^c	25 \pm 4.4 ^d	6.34 \pm 0.16 ^{*d}

W=water, IF=follow-on formula, P=phytase. For each infant cereal, an asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) between assays carried out with phytase or no, within infant cereals mixed with water or follow-on formula. For each infant cereal, different letters denotes statistically significant differences ($p < 0.05$) between water (a-b) or follow-on formula (c-d) addition within the same treatment (phytase addition or no)

IV.3.2. Effect of interaction between dephytinization and follow -on formula addition on solubility and dializability of Fe, Ca and Zn.

An ANOVA two-way was applied to assess the effect of interaction between added exogenous phytase and the addition of water or follow-on formula (reconstitution).

Table 14. Two-way ANOVA for the effect of phytase addition, reconstitution as well as their interaction on the solubility and dialysis percentages of iron, calcium and zinc of infant cereals (p values)

	Solubility Fe (%)	Solubility Ca (%)	Solubility Zn (%)	Dialysis Fe (%)	Dialysis Ca (%)	Dialysis Zn (%)
Eight Cerels Honey						
Phytase addition	0.001	0.850	0.645	0.000	0.017	0.000
Reconstitution	0.002	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000
Phytase addition x reconstitution	0.002	0.009	0.645	0.016	0.003	0.436
Multicereals						
Phytase addition	0.004	0.538	0.774	0.001	0.000	0.037
Reconstitution	0.000	0.007	0.000	0.042	0.000	0.000
Phytase addition x reconstitution	0.004	0.386	0.905	0.000	0.216	0.095
Rice Cream						
Phytase addition	0.878	0.887	0.257	0.000	0.086	0.134
Reconstitution	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Phytase addition x reconstitution	0.287	0.246	0.082	0.000	0.002	0.134
Wheat						
Phytase addition	0.000	0.940	0.879	0.000	0.610	0.000
Reconstitution	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000
Phytase addition x reconstitution	0.276	0.900	0.548	0.000	0.701	0.001
Cereals gluten-free						
Phytase addition	0.010	0.480	0.413	0.360	0.668	0.000
Reconstitution	0.000	0.002	0.000	0.123	0.094	0.000
Phytase addition x reconstitution	0.825	0.098	0.973	0.207	0.306	0.010

Statistical significance: $p < 0.05$

For each infant cereal, the level of significance was established at $p < 0.01$ and values are showed in Table 14 for each variable (solubility percentage of iron, calcium and zinc and dialysis percentage of iron, calcium and zinc).

There were significant interaction ($p < 0.05$) between the follow-on formula or water addition and dephytinization in solubility percentage of calcium of Eight cereals honey, dialysis percentage of calcium in Rice Cream and Eight cereals honey and for dialysis percentage of iron in Multicereals, meanwhile no statistically significant effect was found for each treatment separately. Two-way analysis of variance also revealed a significant interaction for solubility percentage of iron in Eight cereals honey and Multicereals, dialysis percentage of iron in Rice Cream and Wheat and dialysis percentage of zinc in Wheat and Cereals gluten-free, however a significant effect of dephytinization or follow-on formula addition separately was also observed. We can conclude that interaction between dephytinization and water or follow-on formula addition did not exert a significant effect on mineral solubility or dialysis.

IV.3.3. Estimation of Fe, Ca and Zn available per intake (200 mL) from infant cereals reconstituted with follow -on formula

An insufficient mineral supply will result in the depletion of body minerals stores and finally lead to a deficiency (COMA, 1995). Based in this fact, a better knowledge of the mineral composition in the normal diet of growing infants is required to improve the nutrition of infants. The infant cereals analyzed showed (Table 15) that availabilities of iron, calcium and zinc increased after phytase treatment for the most of the cases. Per intake (200 mL), availabilities from commercial infant cereals were account for 2.1%, 1.6% and 8.6% of RDR (Recommended Daily Requirements) of iron, calcium and zinc respectively (NRC, 1991), meanwhile from dephytinized commercial infant cereal 3.2%, 6.8% and 11.8% of RDR were found for each mineral respectively. From the results in this

in vitro study, it appears the dephytinization increases the availabilities of Fe, Ca and Zn, nevertheless depending on the type of infant cereal used.

Table 15. Available mineral (mg) per intake (200 mL) from infant cereals mixed with a follow-on formula

	Commercial infant cereal			Dephytinized commercial infant cereal		
	Fe	Ca	Zn	Fe	Ca	Zn
Eight cereals honey	0,11	6,07	0,39	0,23	6,61	0,92
Multicereals	0,12	5,17	0,46	0,13	5,60	0,52
Wheat	0,20	7,75	0,47	0,34	7,52	0,86
Rice cream	0,11	7,50	0,31	0,13	8,24	0,37
Cereals gluten-free	0,10	5,60	0,52	0,11	6,10	0,29

IV.4. 4th STUDY

IV.4.1. Bioavailability of iron, calcium and zinc from infant cereals by Caco-2 cells. effect of dephytinization and follow-on formula addition

IV.4.1.a. Caco-2 growth, differentiation and integrity of the monolayer .

To estimate cell proliferation and differentiation, the integrity of the monolayer, the growth curve, the trans epithelial electrical resistance (TEER) and the passage of phenol red across the monolayer were used. In the cell growth curve (Figure 3), three phases can be differentiated: a lag period from days 0 to 3, an exponential phase of quick growth from days 4 to 13, and a stationary third phase after day 13. The TEER of cell monolayers was monitored at set days from day 2 until day 21 after seeding.

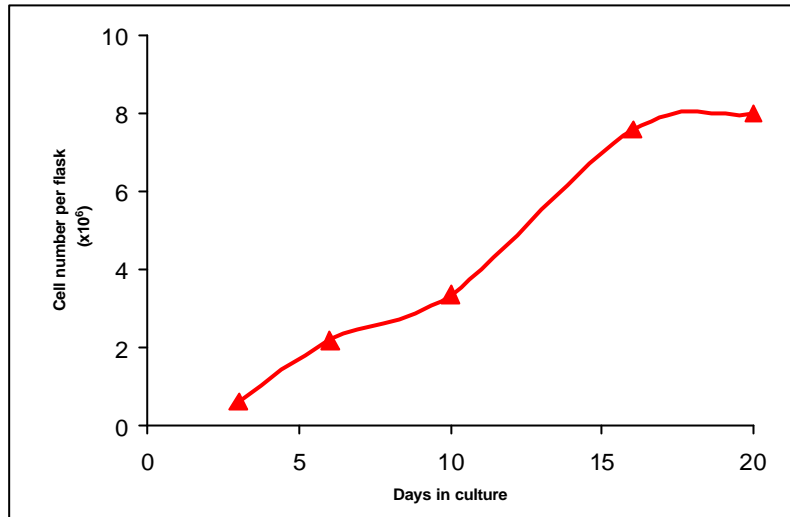


Figure 3. Cell growth curve

The TEER of cell monolayers was monitored at set days from day 2 until day 21 after seeding. The Table 16 shows that the TEER values increased gradually until reaching maximum (1938.9 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) on day 21.

The TEER values were also measured (Figures 5 and 6) before and after every transport experiment (day 21). These values were found to be unchanged after the experimentation, suggesting that the monolayers remained intact during and after the transport studies.

Table 16. TEER values during differentiation of Caco-2 cells

Days from seeding	TEER (Ω .cm ²)
2	154.19 \pm 21
4	415.62 \pm 48.98
7	312.36 \pm 76.55
9	689.73 \pm 99.66
11	987.57 \pm 119.90
14	1900.34 \pm 117.76
17	1947.98 \pm 77.04
21	1938.91 \pm 106.12

Passage of phenol red from the upper compartment to the lower compartment was used as non-destructive test to determine the confluency of the cell monolayers.

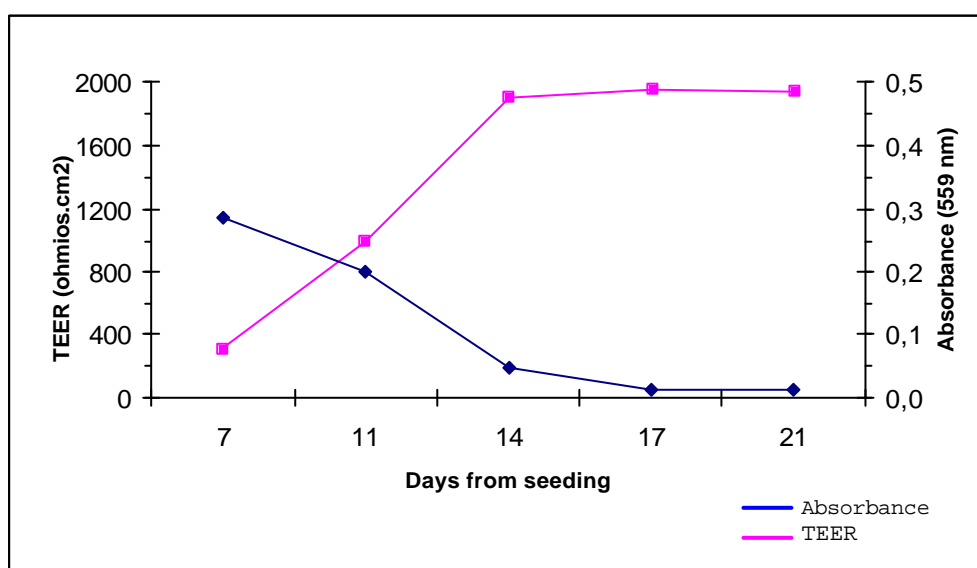


Figure 4. Development of functional tight junctions in the monolayer of Caco-2 cells during differentiation

After 11 days post seeding, the absorbance decreased (Figure 4), and at the same time, TEER values increased. These two parameters are inversely related during differentiation, and are an indicator of tight junctions maturation (Ranaldi *et al.*, 2003).

IV.4.1.b. Toxicity assays

To investigate possible adverse effects of foods components or digestive enzymes in the supernatants from digests on the Caco-2 cells, the integrity of the monolayer was assessed in a control experiment prior to the bioavailability experiments (Eklund *et al.*, 2003; Ranaldi *et al.*, 2003; Sambuy *et al.*, 2005). The results from the integrity control experiment showed that the TEER was stable for 180 min (Figure 5) during incubation with supernatants of *in vitro* digested commercial infant cereals.

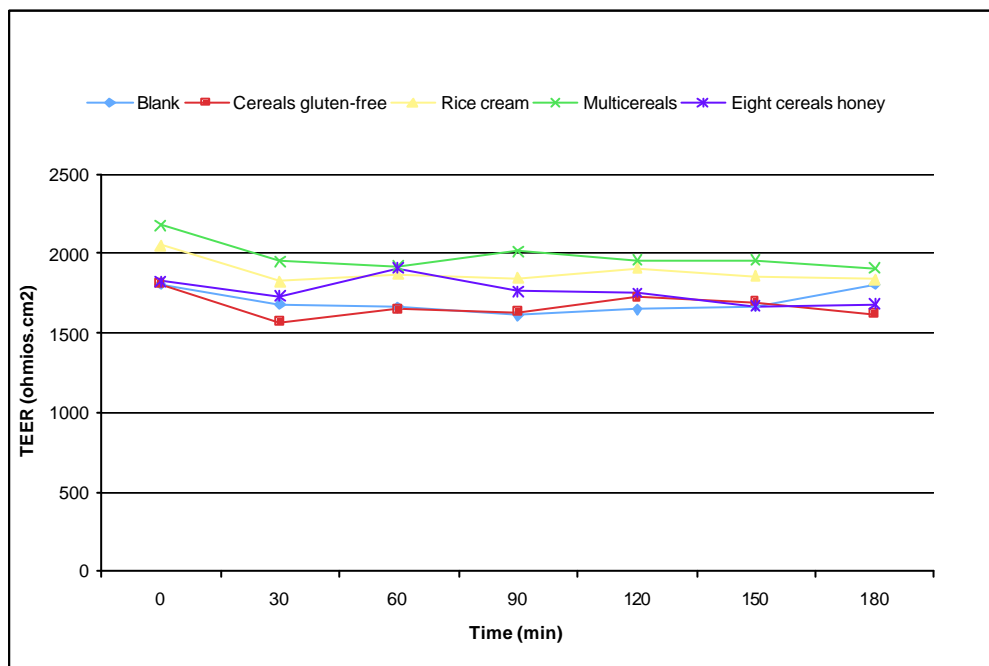


Figure 5. Measurement of TEER across Caco-2 monolayers during incubation with supernatant of *in vitro* digested infant cereals

As well as, for supernatants resulted of *in vitro* digested dephytinized infant cereals, stable values for all samples analyzed were observed (Figure 6).

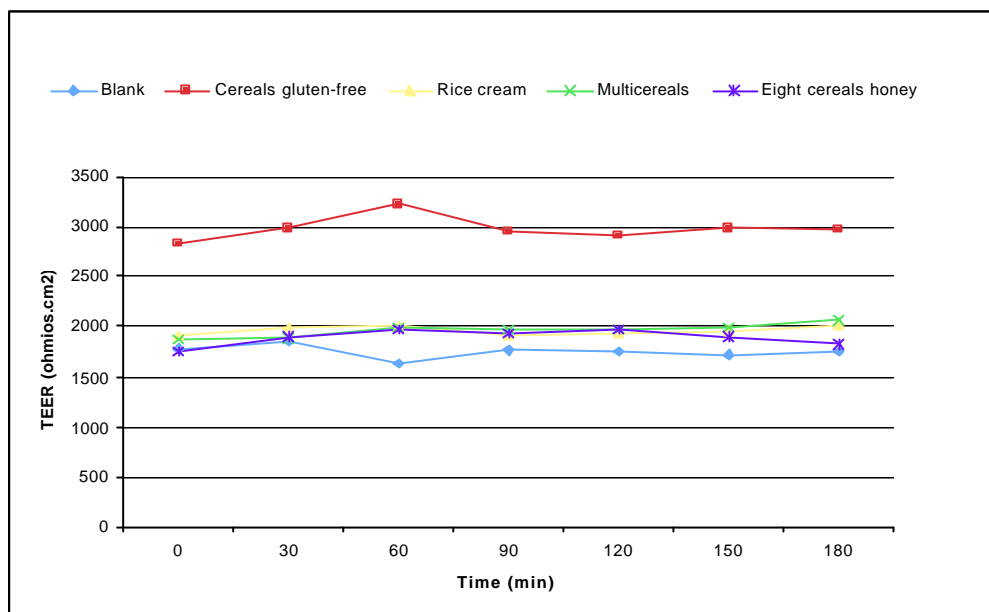


Figure 6 Measurement of TEER across Caco-2 monolayers during incubation with supernatant of *in vitro* digested dephytinized infant cereals

An homogeneity in TEER values, between 1500-2000 Ω .cm², was found during incubation with soluble fraction of infant cereals dephytinized or no, Cereals gluten-free showed the higher TEER value. Results demonstrate that supernatants of the digest or digestive enzymes does not affect Caco-2 monolayer.

IV.4.1.c. Mineral uptake by Caco-2 cells

From mineral stocks solutions, maximum uptake of iron was found at 100 μ M, 20 mM for calcium, and 20 μ M for zinc. It has been reported that iron uptake by Caco-2 cells from a standard solution depends on the amount of iron available in the media (Glahn *et al.*, 1996), in this way, our results showed a lower availability of iron at 150 μ M and 200 μ M, the uptake of calcium and zinc showed a different behavior. For calcium, higher uptake happened at 20 mM meanwhile for zinc was found at 20 μ M. Nevertheless, have been reported (Phillippy, 2006; Ostreicher & Cousins, 1989) that calcium and zinc cell uptake from standard solutions showed great variability depending on different factors.

The results obtained in the mineral-uptake assay in which the heated soluble fraction from infant cereals mixed with water was added to the cell monolayer are summarized in Table 17 for iron, Table 18 for calcium and Table 19 for zinc.

Table 17. Caco-2 cell iron uptake and estimated availability from heated soluble fraction of infant cereals reconstituted with water (means \pm standard deviation, n = 3)

	Infant cereal	Infant cereals iron content($\mu\text{g/g}$)	Soluble iron added ^a (μg)	Blank ^b (μg)	Uptake assay ^c (μg)	Iron uptake by cells ^d (μg)	Estimated iron availability ^e (%)
Without	Eight cereals honey	83,41 \pm 3,1	36,7 \pm 1,9	1,85 \pm 0	3,07 \pm 0,35	1,22 \pm 0,35	3,32 \pm 0,11
	Multicereals	87,21 \pm 6,3	14 \pm 2,1	3,3 \pm 0,30	2,82 \pm 0,14	-	-
	Rice Cream	87,50 \pm 2,7	28,9 \pm 0,7	1,71 \pm 0,30	2,87 \pm 0,13	1,16 \pm 0,13	4,01 \pm 0,23
	Cereals gluten-free	74,52 \pm 3,9	22,4 \pm 1,7	4,41 \pm 0,38	4,41 \pm 0	-	-
With phytase	Eight cereals honey	83,41 \pm 3,1	19,2 \pm 0,7	1,85 \pm 0	5,6 \pm 0,14	3,75 \pm 0,14*	19,5 \pm 0,21*
	Multicereals	87,21 \pm 6,3	14 \pm 0,1	3,3 \pm 0,30	5,25 \pm 0,26	1,95 \pm 0,26*	13,93 \pm 0,8*
	Rice Cream	87,50 \pm 2,7	31,5 \pm 1,0	1,71 \pm 0,30	2,73 \pm 0,11	1,02 \pm 0,11	3,24 \pm 0,14
	Cereals gluten-free	74,52 \pm 3,9	16,4 \pm 1,9	4,41 \pm 0,38	5,4 \pm 0,17	0,99 \pm 0,17*	6,04 \pm 0,09*

^a Amount of soluble mineral added to the cell monolayer. ^b Blank, cell monolayer incubated with uptake buffer.

^c Uptake assay, cell monolayer incubated with soluble mineral fraction of follow-on formulas. ^d Calculated by difference (c-b). ^e Calculated as (d/a)x100. (*) indicate significant differences (p<0.05) between two assays carried out in the same infant cereal dephytinized or no

Table 18. Caco-2 cell calcium uptake and estimated availability from heated soluble fraction of infant cereals reconstituted with water (means \pm standard deviation, n = 3)

	Infant cereal	Infant cereals calcium content($\mu\text{g/g}$)	Soluble calcium added ^a (μg)	Blank ^b (μg)	Uptake assay ^c (μg)	Calcium uptake by cells ^d (μg)	Estimated calcium availability ^e (%)
Without phytase	Eight cereals honey	1373 \pm 1.9	1153 \pm 11	2.9 \pm 0.6	8.24 \pm 0.8	5.34 \pm 0.8	0.46 \pm 0.03
	Multicereals	1744 \pm 3.1	505.8 \pm 8.1	2.8 \pm 0.4	6.36 \pm 1.0	3.56 \pm 1.0	0.70 \pm 0.07
	Rice Cream	2831 \pm 8.6	962.5 \pm 12.1	10.45 \pm 1.1	13.25 \pm 2	2.8 \pm 2	0.3 \pm 0.03
	Cereals gluten-free	1544 \pm 9.4	355.1 \pm 8.4	11.9 \pm 1.0	5.38 \pm 0.9	-	-
With phytase	Eight cereals honey	1373 \pm 1.9	1098.4 \pm 10.1	2.9 \pm 0.6	10.01 \pm 1.0	7.11 \pm 1.0	0.65 \pm 0.08*
	Multicereals	1744 \pm 3.1	436 \pm 9.1	2.8 \pm 0.4	12.88 \pm 1.1	10.08 \pm 1.1*	2.3 \pm 0.2*
	Rice Cream	2831 \pm 8.6	905.9 \pm 11	10.45 \pm 1.1	16.64 \pm 1.6	6.19 \pm 1.6	0.68 \pm 0.03*
	Cereals gluten-free	1544 \pm 9.4	370.6 \pm 10.6	11.9 \pm 1.0	9.32 \pm 0.8	-	-

^a Amount of soluble mineral added to the cell monolayer. ^b Blank, cell monolayer incubated with uptake buffer.

^c Uptake assay, cell monolayer incubated with soluble mineral fraction of follow-on formulas. ^d Calculated by difference (c-b). ^e Calculated as (d/a)x100. (*) indicate significant differences ($p < 0.05$) between two assays carried out in the same infant cereal dephytinized or no

Table 19. Caco-2 cell zinc uptake and estimated availability from heated soluble fraction of infant cereals reconstituted with water (means \pm standard deviation, n = 3)

	Infant cereal	Infant cereals zinc content($\mu\text{g/g}$)	Soluble zinc added ^a (μg)	Blank ^b (μg)	Uptake assay ^c (μg)	Zinc uptake by cells ^d (μg)	Estimated zinc availability ^e (%)
Without phytase	Eight cereals honey	6.1 \pm 0.8	2.2 \pm 0.09	3.85 \pm 0.9	2.1 \pm 0.4	-	-
	Multicereals	14.81 \pm 2.3	4.29 \pm 0.3	9.2 \pm 0.14	1.6 \pm 0.5	-	-
	Rice Cream	11.70 \pm 2.1	10.06 \pm 0.09	6.3 \pm 0.6	2.3 \pm 0.7	-	-
	Cereals gluten-free	9.55 \pm 1.8	3.72 \pm 0.1	3.6 \pm 0.5	1.9 \pm 0.6	-	-
With phytase	Eight cereals honey	6.1 \pm 0.8	2.2 \pm 0.1	3.85 \pm 0.9	2.3 \pm 0.3	-	-
	Multicereals	14.81 \pm 2.3	4 \pm 0.4	9.2 \pm 0.14	2.4 \pm 0.8	-	-
	Rice Cream	11.70 \pm 2.1	8.78 \pm 0.06	6.3 \pm 0.6	2.5 \pm 0.9	-	-
	Cereals gluten-free	9.55 \pm 1.8	3.6 \pm 0.1	3.6 \pm 0.5	2.4 \pm 1	-	-

^a Amount of soluble mineral added to the cell monolayer. ^b Blank, cell monolayer incubated with uptake buffer.

^c Uptake assay, cell monolayer incubated with soluble mineral fraction of follow-on formulas. ^d Calculated by difference (c-b). ^e Calculated as (d/a)x100. (*) indicate significant differences ($p < 0.05$) between two assays carried out in the same infant cereal dephytinized or no

For iron uptake (Table 17) a great variability among infant cereals was observed, nevertheless Eight cereals-honey, Multicereals and Cereals gluten free iron availability was higher ($p < 0.05$) after phytase treatment (Han *et al.*, 1994; Au & Reddy, 2000; Glahn *et al.*, 2002). The different values for estimated iron availability for Eight cereals honey and Rice cream without phytase treatment could be explained by the molar ratios phytate:iron of each one, 3.8 y 1.6 respectively.

Statistically significant differences ($p < 0.05$) between calcium uptake from infant cereals dephytinized or no (Table 18) were observed. It is well-documented that phytic acid exerts an inhibitory effect on calcium bioavailability by Caco-2 cells (Han *et al.*, (1994); Kennefick & Cashman, (2000); Hambidge *et al.*, (2005); Phillippy, 2006), an increase on calcium uptake was observed after infant cereals dephytinization.

The absence of data on zinc availability and zinc uptake by cells (Table 19) could be explained by the zinc values obtained from the blanks (cell monolayer incubated with uptake buffer) which were higher than the zinc uptake from the digests, this fact could be explained by a saturable process on zinc uptake by Caco-2 cells (Raffaniello *et al.*, (1992); Finley *et al.*, (1995)) Great variability between infant cereals was observed, this fact was probably due to the different composition and proportions of cereals flours, as well as the between-day variance which make difficult to compare assays in Caco-2 measured on different days (Kloots *et al.*, 2004). Nevertheless, we can conclude that an increase on mineral uptake (iron, calcium and zinc) and on estimated availability of iron and calcium were observed after dephytinization.

The results obtained in the mineral uptake assays in which the heated soluble fraction from infant cereals mixed with follow-on formula was added to the cell monolayer are summarized in Table 20 for iron, Table 21 for calcium and Table 22 for zinc.

Table 20. Caco-2 cell iron uptake and estimated availability (means \pm standard deviation, n = 3) from heated soluble fraction of infant cereals reconstituted with follow-on formula (IF).

	Infant cereal	Infant cereals iron content + IF ($\mu\text{g/g}$)	Soluble iron added ^a (μg)	Blank ^b (μg)	Uptake assay ^c (μg)	Iron uptake by cells ^d (μg)	Estimated iron availability ^e (%)
Without phytase	Eight cereals honey	97.1 \pm 10.1	41.8 \pm 9.6	2.67 \pm 0.3	4.63 \pm 0.9	1.96 \pm 0.9	4.7 \pm 0.9
	Multicereals	100.9 \pm	37.3 \pm 8.1	4.2 \pm 0.2	7.88 \pm 1.0	3.68 \pm 1.0	9.9 \pm 1.9
	Rice Cream	101.2 \pm 10.6	52.6 \pm 9.6	1.88 \pm 0.2	3.44 \pm 1.1	1.55 \pm 1.1	2.9 \pm 2.1
	Cereals gluten-free	88.22 \pm 8.7	49.4 \pm 6.1	2.00 \pm 0.5	3.59 \pm 0.4	1.59 \pm 0.4	3.2 \pm 0.9
With phytase	Eight cereals honey	97.1 \pm 10.1	39.8 \pm 2.9	2.67 \pm 0.3	6.66 \pm 1.3	3.99 \pm 1.3	10 \pm 0.9*
	Multicereals	100,9 \pm	46.4 \pm 1.9	4.2 \pm 0.2	8.17 \pm 1.4	3.97 \pm 1.4	8.6 \pm 0.8
	Rice Cream	101.2 \pm 10.6	50.6 \pm 4.7	1.88 \pm 0.2	3.39 \pm 0.7	1.51 \pm 0.7	3 \pm 1.7
	Cereals gluten-free	88.22 \pm 8.7	45.9 \pm 8.7	2.00 \pm 0.5	3.91 \pm 0.8	1.91 \pm 0.8	4.2 \pm 1.3

^a Amount of soluble mineral added to the cell monolayer. ^b Blank, cell monolayer incubate d with uptake buffer.

^c Uptake assay, cell monolayer incubated with soluble mineral fraction of follow-on formulas. ^d Calculated by difference (c-b). ^e Calculated as (d/a)x100. (*) indicate significant differences (p<0.05) between two assays carried out in the same infant cereal dephytinized or no. IF = follow-on formula.

Table 21. Caco-2 cell calcium uptake and estimated availability (means \pm standard deviation, n = 3) from heated soluble fraction of infant cereals reconstituted with follow-on formula (IF).

	Infant cereal	Infant cereals calcium content + IF ($\mu\text{g/g}$)	Soluble calcium added ^a (μg)	Blank ^b (μg)	Uptake assay ^c (μg)	Calcium uptake by cells ^d (μg)	Estimated calcium availability ^e (%)
Without phytase	Eight cereals honey	2285 \pm 130	343.8 \pm 16.1	4.01 \pm 0.3	2.5 \pm 0.3	-	-
	Multicereals	2656 \pm 62.6	451.5 \pm 20	9.04 \pm 0.7	14.71 \pm 1.9	5.67 \pm 1.9	1.26 \pm 0.06
	Rice Cream	3743 \pm 93.4	636. \pm 9.7	4.01 \pm 1.01	5.04 \pm 0.7	1.03 \pm 0.7	0.16 \pm 0.01
	Cereals gluten-free	2456 \pm 106.2	442.1 \pm 9.9	4.57 \pm 1.21	5.58 \pm 0.4	1.01 \pm 0.4	0.23 \pm 0.03
With phytase	Eight cereals honey	2285 \pm 130	479.9 \pm 13.3	4.01 \pm 0.3	3.24 \pm 0.2	-	-
	Multicereals	2656 \pm 62.6	451.5 \pm 11.9	9.04 \pm 0.7	8.64 \pm 1.8	-	-
	Rice Cream	3743 \pm 93.4	711.2 \pm 8.7	4.01 \pm 1.01	6.49 \pm 0.9	2.48 \pm 0.9	0.35 \pm 0.07*
	Cereals gluten-free	2456 \pm 106.2	368.4 \pm 10.1	4.57 \pm 1.21	6.75 \pm 0.7	2.18 \pm 0.7	0.59 \pm 0.1*

^a Amount of soluble mineral added to the cell monolayer. ^b Blank, cell monolayer incubated with uptake buffer.

^c Uptake assay, cell monolayer incubated with soluble mineral fraction of follow-on formulas. ^d Calculated by difference (c-b). ^e Calculated as (d/a)x100. (*) indicate significant differences ($p < 0.05$) between two assays carried out in the same infant cereal dephytinized or no. IF = follow-on formula.

Table 22. Caco-2 cell zinc uptake and estimated availability (means \pm standard deviation, n = 3) from heated soluble fraction of infant cereals reconstituted with follow-on formula (IF).

	Infant cereal	Infant cereals zinc content($\mu\text{g/g}$)	Soluble zinc added ^a (μg)	Blank ^b (μg)	Uptake assay ^c (μg)	Zinc uptake by cells ^d (μg)	Estimated zinc availability ^e (%)
Without phytase	Eight cereals honey	12.18 \pm 1.3	2.7 \pm 0.9	2.28 \pm 0.6	1.02 \pm 0.6	-	-
	Multicereals	20.89 \pm 2.6	2.3 \pm 2	2.70 \pm 1.1	2.02 \pm 0.4	-	-
	Rice Cream	17.78 \pm 2.3	7.1 \pm 2.7	3.96 \pm 1.2	2.00 \pm 0.3	-	-
	Cereals gluten-free	15.63 \pm 3.1	3.8 \pm 1.8	1.68 \pm 0.4	1.21 \pm 0.3	-	-
With phytase	Eight cereals honey	12.18 \pm 1.3	3 \pm 1.3	2.28 \pm 0.6	1.63 \pm 0.3	-	-
	Multicereals	20.89 \pm 2.6	2.7 \pm 0.7	2.70 \pm 1.1	0.74 \pm 0.1	-	-
	Rice Cream	17.78 \pm 2.3	8 \pm 2.9	3.96 \pm 1.2	0.93 \pm 0.07	-	-
	Cereals gluten-free	15.63 \pm 3.1	3.4 \pm 1.1	1.68 \pm 0.4	0.96 \pm 0.2	-	-

^a Amount of soluble mineral added to the cell monolayer. ^b Blank, cell monolayer incubated with uptake buffer.

^c Uptake assay, cell monolayer incubated with soluble mineral fraction of follow-on formulas. ^d Calculated by difference (c-b). ^e Calculated as (d/a)x100. (*) indicate significant differences ($p < 0.05$) between two assays carried out in the same infant cereal dephytinized or no. IF = follow-on formula.

Table 20 shows that follow-on formula addition increased iron uptake by Caco-2 cells in infant cereals, nevertheless, after phytase treatment this fact not was observed. Despite a significant increase on iron availability was observed in commercial infant cereals mixed with follow-on formula compared with the same samples after dephytinization. Dephytinized infant cereals mixed with water showed the highest values of iron uptake by Caco-2 cells, interestingly Hallberg *et al.*, (1992), Davidsson *et al.*, (1997) and Hurrell (2002) found that some milk components could inhibit iron absorption. In Table 21 is shown that Rice cream and Cereals gluten-free showed the highest availability values ($p < 0.05$) after phytase treatment. Nevertheless, in general a low calcium availability from infant cereals (dephytinized or no) mixed with follow-on formula was observed. In the same way, an inhibitory effect of phytic acid on calcium uptake was observed when infant cereals (Gluten-free and Multicereals) were mixed with follow-on formula, meanwhile dephytinization did not affect calcium solubility. Regarding this subject it should be noted that Weaver *et al.*, 1991 and Pennington *et al.*, 1995, reported an increase on calcium bioavailability in the presence of milk, however their study was measured in humans and the amount of calcium was lower (101 mg/100 g) than that in our assays. We did not found researchs about bioavailability of an follow-on formula with a calcium content of 600 mg/100 g by Caco-2 cells. Estimated zinc availability (Table 22) not showed any value because a higher zinc content from cell monolayer incubated with uptake buffer (blank) was found. Nevertheless, as shown in Table 22, zinc uptake (μg) from commercial infant cereals (Multicereals, Rice cream and Cereals gluten-free) mixed with follow-on formula was lower than the same infant cereals mixed with water, this fact could indicate that components of follow-on formula negatively affect Zn uptake by Caco-2 cells (Sändstrom, (2001); Cámara & Amaro (2003)).

Based on our results, we can conclude that dephytinization applied on infant cereals reconstituted with water increased iron and calcium availability. Results are in agreement with *in vivo* study by Hurrell (2004), who reported that the addition of milk inhibits iron absorption and overcomes the enhancing effect of phytic acid degradation, and concludes that dephytinization can be strongly recommended for

cereals reconstituted with water, specially foods destined for infants in developing countries.

For infant cereals with its native phytic acid content, our results are in agreement with *in vivo* study by Davidsson *et al.*, (2004). Similarly, we found no enhancing effect on iron availability by Caco-2 after follow-on formula addition in these infant cereals.

IV.4.1.d. Effect of interaction between dephytinization and follow-on formula addition on the estimated availability (calculated by the mineral uptake by cells) of Fe, Ca and Zn

Two-way ANOVA (see Table 23) revealed a significant interaction ($p < 0.01$) between dephytinization and follow-on formula addition on the estimated availability (studied by the cell uptake) of iron and calcium in Eight Cereals honey, Multicereals and Cereals gluten-free, meanwhile a lack of significant effect of phytase treatment, follow-on formula addition or their interaction on estimated availability was observed in Rice Cream. Preliminary *in vivo* studies have reported previously that the addition of milk to a diet high in phytate did not affect iron availability (Rosado *et al.*, 2005).

Table 23. Two-way ANOVA for the effect of phytase addition, reconstitution as well as their interaction on the estimated availability of iron, calcium and zinc of infant cereals (p values)

	Estimated availability of iron (%)	Estimated availability of calcium (%)	Estimated availability of zinc (%)
	Eight Cereals Honey		
Phytase addition	0.000	0.005	-
Reconstitution	0.000	0.000	-
Phytase addition x reconstitution	0.000	0.005	-
	Multicereals		
Phytase addition	0.000	0.028	-
Reconstitution	0.007	0.000	-
Phytase addition x reconstitution	0.000	0.000	-
	Rice Cream		
Phytase addition	0.680	0.000	-
Reconstitution	0.414	0.000	-
Phytase addition x reconstitution	0.594	0.008	-
	Cereals gluten-free		
Phytase addition	0.000	0.000	-
Reconstitution	0.175	0.000	-
Phytase addition x reconstitution	0.001	0.000	-

Statistical significance: $p < 0.01$

Our study showed an increase on iron bioavailability by Caco-2 cells in infant cereals containing phytate and reconstituted with follow-on formula, meanwhile after dephytinization an increase on iron and calcium availability in infant cereals mixed with water were found, compared with the same mixed with follow-on formula. In Table 23 can be observed as when the interaction between phytase addition and reconstitution was significant ($p < 0.01$), differences for one of them were also observed. Based in this fact, we can conclude that reconstitution (water or follow-on formula addition) did not seem to alter the effects of dephytinization on iron and zinc uptake.

IV.4.1.e. Correlation between solubility, dialysis and uptake of iron, calcium and zinc.

A positive correlation between calcium content and calcium dialysis percentage was found ($r = 0.625$, $p < 0.05$), as well as a negative correlation between calcium content and zinc and iron dialysis percentages ($r = -0.706$, $r = -0.421$), these results are in agreement with previous reports Lönnerdal (1997) studying trace elements absorption during infancy; as well as Perales *et al.*, (2006) studying calcium fortified milk, nevertheless, a positive correlation between zinc content in infant cereals and calcium dialysis percentage was found. It has been reported that zinc can have a negative effect on iron absorption (Lind *et al.*, 2003), according to these authors, a negative correlation between iron content and zinc dialysis percentage ($r = -0.536$, $p < 0.05$) was found. The observed lack of correlation between mineral solubility and bioavailability variables, indicates that solubility and bioavailability do not always show parallel trends, as previously reported Perales *et al.*, (2005).

IV.4.1.f. Iron, calcium and zinc uptake, retention and transport by Caco-2 cells. Effect of dephytinization

The soluble fraction from the gastrointestinal digestion (Aura, 2005) was selected to carry out iron, calcium and zinc uptake, retention and transport assays with Caco-2 cells.

The results obtained in the mineral (Fe, Ca and Zn) uptake, retention and transport assays as indicators of mineral bioavailability have been estimated from the soluble fraction of the infant cereals digest, and are reported in Table 24 for iron, Table 25 for calcium and Table 26 for zinc. As shown in Table 24, iron solubility did differ significantly ($p < 0.05$) between infant cereals dephytinized or no, Multicereals and Eight Cereals honey were those having the highest percentages of solubility after phytase treatment. Probably, cereals proportions of the infant cereals affected the solubility of iron. Accordingly, it has been reported that phytic acid inhibits iron

absorption by Caco-2 (Wortley *et al.*, 2001; Glahn *et al.*, 2002; Viadel *et al.*, 2006), since dephytinization increased ($p < 0.05$) retention, transport, transport efficiency and uptake of iron in Eight cereals honey, Multicereals and Cereals gluten-free. The increase in soluble iron added to Caco-2 cells resulted in an increase in iron uptake (retention + transport), nevertheless differences obtained between infant flours after dephytinization could be due to different cereals flours proportions.

Eight cereals honey, Multicereals and Cereals gluten-free dephytinized had higher retention, % transport efficiency and % uptake efficiency than the same samples without treatment ($p < 0.05$), these results could be attributed to the formation of insoluble compounds between iron and phytic acid from cereals, and thus phytate inhibitory effect on iron bioavailability by Caco-2 cells (Wortley *et al.*, 2001; Glahn *et al.*, 2002; Viadel *et al.*, 2006). It was observed that iron solubility non increased after phytase treatment, however the highest solubility values resulted in higher uptake (retention + transport) by Caco-2, nevertheless solubility percentages of mineral would not be a good indicator of mineral bioavailability (Jovaní *et al.*, 2001; Eklund *et al.*, 2003; Fairweather-Tait *et al.*, 2005).

As can be seen from Table 24, Cereals gluten-free without phytase treatment showed the lower retention, uptake and transport values, the high ($IP_6 + IP_5$): Fe (3.5:1) molar ratio found in this infant cereal is probably the reason for this. Showing that dephytinization increased iron availability by Caco-2 cells. These results, confirmed those obtained previously in this thesis by solubility and dialysis methods and by cell uptake, about the effect of phytase addition on iron bioavailability for infant cereals reconstituted with water.

Table 24. Iron retention, transport and uptake by Caco-2 from infant cereals dephytinized or no

	IRON	Iron added (µg)	Solubility (%)	Retention (µg)	Retention (%)	Transport (µg)	Transport efficiency (%)	Uptake (µg)	Uptake efficiency (%)
Without phytase	Eight cereals honey	12,51	17,42 ± 6,1 ^b	1 ± 0,1 ^b	7,99 ± 2,2 ^b	1,59 ± 0,6 ^a	2,21 ± 1 ^b	2,59 ± 0,8 ^b	3,6 ± 0,9 ^b
	Multicereals	13,08	8,72 ± 2,7 ^b	0,79 ± 0,4 ^b	6,04 ± 0,6 ^b	0,21 ± 0 ^b	0,14 ± 0,03 ^b	1 ± 0,2 ^b	0,66 ± 0,2 ^b
	Rice cream	13,13	24,21 ± 1,9 ^a	2,19 ± 0,1 ^a	16,68 ± 3,8 ^a	1,09 ± 0,7 ^a	2,01 ± 0,8 ^a	3,28 ± 1,1 ^a	6,05 ± 2,2 ^a
	Cereals gluten-free	11,18	20,93 ± 4,8 ^a	0,78 ± 0,2 ^b	6,98 ± 0,8 ^b	0,18 ± 0,04 ^b	0,33 ± 0,1 ^b	0,96 ± 0,2 ^b	1,8 ± 0,3 ^b
With phytase	Eight cereals honey	12,51	34,53 ± 8,6 ^a	2,52 ± 0,3 ^a	20,14 ± 3,9 ^a	2,18 ± 0,9 ^a	6,02 ± 1,3 ^a	4,7 ± 0,9 ^a	13 ± 2,5 ^a
	Multicereals	13,08	21,1 ± 1,8 ^a	2,1 ± 0,2 ^a	16,28 ± 2,1 ^a	2,49 ± 0,9 ^a	4,01 ± 0,8 ^a	4,62 ± 1,6 ^a	7,45 ± 3,9 ^a
	Rice cream	13,13	19,19 ± 3 ^b	2,41 ± 0,3 ^a	18,35 ± 3,4 ^a	1,66 ± 0,6 ^a	2,43 ± 0,6 ^a	4,0 ± 1,2 ^a	5,95 ± 1,1 ^a
	Cereals gluten-free	11,18	16,64 ± 6,2 ^b	1,65 ± 0,2 ^a	14,75 ± 1,3 ^a	0,99 ± 0,2 ^a	1,47 ± 0,3 ^a	2,64 ± 0,8 ^a	3,93 ± 0,7 ^a

Means ± standard deviation, n = 3. Different letters (a -b) denotes significant differences (p<0.05) between two assays carried out in the same infant cereal dephytinized or no.

Table 25 shows results obtained for calcium, the low solubility observed for infant cereals after phytase treatment could be attributed to the formation of insoluble compounds with fiber from cereals as reported Perales *et al.*, (2005), since after dephytinization these compounds remain intact. A highest solubility (4.53 and 8.31), transport (15.6 and 66.2 μg), uptake (20.1 and 69.1 μg) were observed from Cereals gluten-free after dephytinization, probably because of the presence of the highest (IP₅+IP₆): Ca ratio in this infant cereal before phytase treatment. As could be expected, the increase in soluble calcium added to Caco-2 cells results in an increase in calcium uptake (retention + transport), this have also been reported by Perales *et al.*, (2006) in milk and calcium fortified milk. It should be noted that most of samples (Multicereals, Rice cream and Cereals gluten-free) showed an increase of calcium uptake efficiency after phytase treatment, meanwhile this trend was not observed in calcium transport efficiency; in relation to this fact it should be noted that the study of calcium bioavailability by Caco-2 may involve some disadvantages because calcium absorption in the presence of IP₆, appears to bind to the membrane as calcium phytate (Phillippy, 2006), and this could explain the variability of results, as well as reported Perales *et al.*, (2005), some factors not well known could be involved in calcium absorption by Caco-2 cells.

Table 25. Calcium retention, transport and uptake by Caco-2 from infant cereals dephytinized or no

	CALCIUM	Calcium added (µg)	Solubility (%)	Retention (µg)	Retention (%)	Transport (µg)	Transport efficiency (%)	Uptake (µg)	Uptake efficiency (%)
Without phytase	Eight cereals honey	206	38,9 ± 11,1 ^a	5,72 ± 0,3 ^a	2,78 ± 1 ^a	25,99 ± 8 ^a	4,9 ± 1,2 ^a	31,71 ± 4,9 ^a	5,99 ± 2 ^a
	Multicereals	261,6	15,2 ± 1,8 ^a	7,33 ± 0,2 ^a	2,8 ± 0,6 ^a	16,1 ± 3,9 ^b	0,94 ± 0,1 ^a	23,43 ± 3,6 ^b	0,66 ± 0,2 ^b
	Rice cream	424,7	2,8 ± 1 ^a	2,18 ± 0,3 ^b	0,51 ± 0,2 ^a	33,1 ± 6,1 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	35,28 ± 7,2 ^a	0,23 ± 0,2 ^a
	Cereals gluten-free	231,6	4,53 ± 1,3 ^b	4,45 ± 0,2 ^a	1,92 ± 0,3 ^a	15,64 ± 4,4 ^b	0,31 ± 0,08 ^b	20,09 ± 1,8 ^b	0,39 ± 0,1 ^b
With phytase	Eight cereals honey	206	22,5 ± 2,3 ^b	0,7 ± 0,2 ^b	0,34 ± 0,09 ^b	29,59 ± 7,2 ^a	3,24 ± 1 ^a	30,29 ± 6,8 ^a	3,31 ± 0,9 ^a
	Multicereals	261,6	8,03 ± 2,7 ^b	7,33 ± 1,4 ^a	2,8 ± 0,6 ^a	23,08 ± 2,1 ^a	0,71 ± 0,04 ^b	30,41 ± 2,2 ^a	0,93 ± 0,2 ^a
	Rice cream	424,7	3,72 ± 1,9 ^a	5,5 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,7 ^a	28,1 ± 4,4 ^a	0,25 ± 0,07 ^a	33,6 ± 7,1 ^a	0,43 ± 0,09 ^a
	Cereals gluten-free	231,6	8,31 ± 1,2 ^a	2,98 ± 0,7 ^b	1,29 ± 0,9 ^a	66,16 ± 10,8 ^a	2,38 ± 0,1 ^a	69,14 ± 8,2 ^a	2,48 ± 0,3 ^a

Means ± standard deviation, n = 3. Different letters (a-b) denotes significant differences (p<0.05) between two assays carried out in the same infant cereal dephytinized or no.

The results obtained in the zinc uptake, retention and transport are showed in Table 26. It should be noted that zinc solubility non increased after phytase treatment, however a higher intracellular retention was observed (Cereals gluten-free, Multicereals and Eight Cereals-honey) ($p < 0.05$), as well as an increase on percentage uptake efficiency and on retention percentage were also observed after dephytinization. It has been reported that phytic acid impair zinc absorption by *in vivo* studies (Lönnerdal *et al.*, 1984; Jovaní *et al.*, 2001; Matsui, 2002) and *in vitro* studies (Guillem *et al.*, 2000), as can be seem from Table 26, our results were in agreement since percentage of transport efficiency and uptake were higher after phytase treatment.

Table 26. Zinc retention, transport and uptake by Caco-2 from infant cereals dephytinized or no

	ZINC	Zinc added (µg)	Solubility (%)	Retention (µg)	Retention (%)	Transport (µg)	Transport efficiency (%)	Uptake (µg)	Uptake efficiency (%)
Without phytase	Eight cereals honey	2,12	36,4 ± 7,1 ^b	0,18 ± 0,08 ^b	8,5 ± 2 ^b	1,88 ± 0,6 ^a	32,3 ± 3 ^a	2,06 ± 0,8 ^a	35,4 ± 4,1 ^b
	Multicereals	2,22	18,9 ± 3,8 ^a	0,09 ± 0,01 ^b	4,05 ± 2 ^b	0,5 ± 0,08 ^a	4,25 ± 1,1 ^a	0,59 ± 0,6 ^a	5 ± 0,9 ^b
	Rice cream	2,63	17 ± 1,9 ^b	0,54 ± 0,1 ^a	20,53 ± 3,8 ^a	0,62 ± 0,1 ^b	4 ± 0,8 ^b	1,16 ± 0,4 ^a	7,5 ± 0,2 ^b
	Cereals gluten-free	1,63	37,8 ± 6,2 ^a	0,09 ± 0,01 ^b	5,5 ± 1,6 ^b	0,71 ± 0,2 ^b	16,5 ± 0,3 ^a	0,8 ± 0,4 ^b	18,6 ± 1,2 ^b
With phytase	Eight cereals honey	2,12	46,9 ± 6,6 ^a	0,84 ± 0,2 ^a	22,2 ± 2,7 ^a	1,04 ± 0,5 ^a	23 ± 3,6 ^b	1,88 ± 0,9 ^a	41,6 ± 6,5 ^a
	Multicereals	2,22	18,92 ± 2,7 ^a	0,42 ± 0,1 ^a	18,92 ± 2,8 ^a	0,44 ± 0,2 ^a	3,74 ± 0,3 ^b	0,86 ± 0,2 ^a	7,3 ± 0,2 ^a
	Rice cream	2,63	27,3 ± 6 ^a	0,38 ± 0,1 ^a	14,45 ± 3,4 ^b	1,59 ± 0,6 ^a	16,5 ± 2,6 ^a	1,97 ± 0,8 ^a	20,4 ± 2,1 ^a
	Cereals gluten-free	1,63	21 ± 4,3 ^b	0,18 ± 0,03 ^a	61,3 ± 9,9 ^a	1,43 ± 0,4 ^a	18,4 ± 4,1 ^a	1,61 ± 0,2 ^a	20,7 ± 0,6 ^a

Means ± standard deviation, n = 3. Different letters (a-b) denotes significant differences (p<0.05) between two assays carried out in the same infant cereal dephytinized or no.

IV.4.1.g. Correlation between solubility, uptake, retention and transport of iron, calcium and zinc.

A significant ($p < 0.05$) negative correlation between calcium content and iron and zinc transport ($r = -0.426$; $r = -0.855$) and uptake ($r = -0.407$; $r = -0.914$) efficiencies were found. Nevertheless no negative correlation was found between iron or zinc transport efficiency and calcium transport efficiency. These results are in agreement with the observations of Perales *et al.*, (2006). It has been reported that zinc can have a negative effect on iron absorption (Lind *et al.*, 2003), according to these authors our results showed a negative correlation ($r = -0.009$) between zinc content and iron transport efficiency. A significant ($p < 0.05$) positive correlation between mineral solubility and percentages of uptake and transport were also found, this fact confirms that mineral would be in a soluble form adequate for intestinal absorption (Bergqvist *et al.*, 2006; Perales *et al.*, 2005; Pyanert *et al.*, 2006).

IV.5. Infant cereals, dephytinized or no?, reconstituted with water or follow-on formula?

Cluster Analysis is the name given to a diverse collection of techniques that can be used to classify objects (e.g. individuals, quadrats, species *etc*). The classification has the effect of reducing the dimensionality of a data table by reducing the number of rows (cases).

In this study, Cluster analysis classifies different infant cereals into homogeneous groups by means of a conglomerate analysis based to the following variables: (dialysis percentage, solubility percentage, mineral uptake, retention and transport by Caco-2 cells), to select the most suitable infant cereal, dephytinized or no and mixed with water or follow-on formula, according these variables.

Table 27 shows that for the first group of variables first conglomerate was the most suitable, since as iron and zinc dialysis percentages showed the highest values corresponding to infant cereals called Wheat and mixed with water, whereas exogenous phytase addition did not affect. For second and third group of variables

similar results than for Wheat were obtained for Eight cereals honey elaborated with water, this trend was observed previously in this study. Despite, in this analysis phytase addition did not seem to be a crucial variable, in this thesis an increase on mineral bioavailability after dephytinization were observed when infant cereals were reconstituted with water.

Table 27. Final conglomerate cluster for infant cereals

	Conglomerate	Conglomerate				Sig.
		1	2	3	4	
(%)						
Dialysis Fe	4.7950	3.0186	2.2775	-	0.001	
Dialysis Ca	2.2680	2.2181	2.6253	-	0.000	
Dialysis Zn	22.3246	11.7186	3.3752	-	0.000	
Solubility Fe	33.25	50.07	36.02	19.53	0.000	
Solubility Ca	82.80	17.71	26.07	26.83	0.000	
Uptake Fe	2.49	2.08	1.97	0.98	0.612	
Uptake Ca	6.23	1.12	2.93	4.55	0.156	
Solubility Fe	17.44	31,88	17,98	14,21	0,006	
Solubility Ca	5.40	23,83	8,68	44,45	0,000	
Solubility Zn	28,7	46,05	18,34	32,85	0,000	
Uptake efficiency Fe	3,78	10,43	4,73	4,05	0,032	
Uptake efficiency Ca	1,10	3,48	0,62	6,99	0,000	
Uptake efficiency Zn	19,90	41,08	6,60	33,35	0,000	
Transport efficiency Fe	1,41	5,32	2,05	1,71	0,002	
Transport efficiency Ca	0,98	3,36	0,67	5,50	0,000	
Transport efficiency Zn	17,13	26,08	4,00	30,80	0,000	

Sig.: Significance level: (p<0.05)

In western countries, infant cereals are usually consumed mixed with milk or an follow-on formula, however, in developing countries cereals based complementary

foods destined for infants are usually consumed mixed with water. Based in this fact, results obtained in this thesis could indicate that dephytinization can be recommended for infant cereals reconstituted with water. More studies should be necessary to confirm the need of exogenous phytase addition when infant cereals are mixed with follow-on formula, since as results of mineral bioavailability obtained in this study from infant cereals mixed with an follow-on formula seems to not increase mineral availability after phytase treatment. Nevertheless, although follow-on formula addition increases mineral content , it should be interesting the search for strategies to improve its mineral bioavailability.

V. CONCLUSIONS

Conclusion to the **first study**

Phytate (IP₅ + IP₆) content of infant cereals as well as raw flours used as ingredients for the manufacture in infant cereals reaches levels which could compromise its mineral bioavailability according to their molar ratio.

Conclusion to the **second study**

Infant cereal processing (roasting and alpha-amylase treatment) have an effect on phytate content. However, their effectiveness largely depends on the cereal itself and, in some cases, the treatments are unable to markedly decrease the phytate content. This is confirmed by the observation that phytate is still presents in commercial samples even after undergoing standardized technological processing. Moreover, the industrial processing appears to be insufficient to achieve phytate degradation to an extent enough to yield optimal phytate-to-mineral ratios. Phytase addition (*Aspergillus oryzae*) during 20 min at 55°C and pH 5.5 achieves a complete phytate degradation.

Conclusion to the **third study**

Dephytinization of infant cereals increases *in vitro* bioavailability of iron and zinc (solubility and dializability), mainly from infant cereals mixed with water compared to the same mixed with follow-on formula. However, follow-on formula addition did not improve Fe, Ca and Zn bioavailability compared to infant cereals reconstituted with water.

Conclusion to the **fourth study**

4.1. Phytate content of infant cereals impaired Fe and Ca uptake into Caco-2 cells. After dephytinization by an exogenous phytase addition, a significant ($p < 0.05$)

increase on these two minerals bioavailability was observed when infant cereals were mixed with water. However, when commercial infant cereals was combined with follow-on formula, only iron uptake and bioavailability increased, meanwhile dephytinization did not increase bioavailability for this mineral.

4.2. An increase on iron solubility, as well as on uptake, retention and transport of iron and zinc were observed after dephytinization of commercial infant cereals mixed with water. Dephytinization did not seem to improve calcium availability (solubility, uptake, retention and transport) by Caco-2 cells, but for this mineral a great variability was observed.

4.3. Since infant cereals are usually consumed mixed with milk or an follow-on formula, further studies should be necessary to confirm the need of exogenous phytase addition. We recommend searching for strategies to improve its mineral bioavailability, such as dephytinization, fortification of infant cereals with a mineral form that is less influenced by inhibiting dietary ligands and the addition of ascorbic acid to improve mineral absorption.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham SA., Vieria NE., Yergey AL. (1990). Unequal distribution of a stable isotopic calcium tracer between casein and whey fractions of infant formulas, human milk and cow's milk. *J. Nutr.* 120(2):1672-1676.
- Adams C., Hambidge M., Raboy V., Westcott J., Lei S. (2002). Zinc absorption from a low-phytic acid maize. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76:556-559.
- Agte, V V, Tarwadi, KV, Chiplonkar, S A., (1999). Phytate degradation during traditional cooking: significance of the phytic acid profile in cereal-based vegetarian meals. *Journal of Food Composition and Analysis* 12:161-167.
- Agte V., Jahagirdar M., Chiplonkar.S. (2005). Apparent absorption of eight micronutrients and phytic acid from vegetarian meals in ileostomized human volunteers. *Nutrition*, 21:678-685.
- Akaninwor JO., Okechukwu PN (2004). Comparative nutrient and anti-nutrient levels in commercial and formulated weaning mixtures. *Biokemistry*, vol. 16, n° 1:15-21.
- Alabaster, O., Tang, Z., Shivapurkar, N. (1996). Dietary fiber and chemopreventive modelation of colon carcinogenesis. *Mutation Research*, 350, 185-197.
- Alvarez-Hernández X., Nichols GM., Glass J. (1991) Caco-2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1070:205-208.
- Allen LH. (2001). Biological mechanism that might under iron's effects on fetal growth and preterm birth. *J. Nutr.* 131:581S-589S.
- Amaro MA., Cámara F. (2004). Iron availability: An updated review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 55, 8:597-606.
- Anderson RJ. (1914). A contribution to the chemistry of phytin. *J. Biol. Chem.*, 17:171-190.
- Andrews NC. (2005). Molecular control of iron metabolism. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 18 (2): 159-169.
- Anno T., Nakamishi K., Matsuno R., Kamikubo T. (1985). Enzymatic elimination of phytate in soybean milk . *J. Japan Soc. Food Sci. Technol.* 32:174-180.
- AOAC (1986). Association of Official Agricultural Chemist. Official methods of analysis, Virginia USA, XXIV Ed.
- AOAC (1997). Official methods of analysis. In: Cunniff P. (ed.) 16th edition, 3rd revision. Gaithersburg, MD. USA.
- AOAC (1999). Association of Official Agricultural Chemist. Official methods of Analysis, 1141. 16th edition. Association of Analytical Chemist, Washington DC.
- Arosio P., Yokota M. Drysdale JW. (1976). Structural and immunological relationships of isoferritins in normal and malignant cells. *Cancer Research*, 36:1735-1739.
- Arredondo M., Orellana A., Gárate MA., Núñez MT. (1997). Intracellular iron regulates iron absorption and IRP activity in intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Am. J. Of Physiology*, 273:G275-G280.
- Au AP. , Reddy MB (2000). Caco-2 Cells Can Be Used to Assess Human Iron Bioavailability from a Semipurified Meal. *Journal of Nutrition*, 130:1329-1334.
- Augspurger NR., Baker DH. (2004). Phytase improves dietary calcium utilization in chicks, and oyster shell, carbonate, citrate and citrate-malate forms of calcium are

- equally bioavailable. *Nutr. Res.* 24(4):293-301.
- Aura MJ.* (2005). *In vitro* digestion models for dietary phenolic compounds. Espoo VTT Biotechnology Publications 575. Tesis Doctoral. Universidad de Helsinki (Finlandia).
- Barberá R., Farré R.* (1992). Biodisponibilidad de los elementos traza. *Revista española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 34, nº 4:381-399.
- Bartnik M., Szafranska, I.* (1987). Changes in phytate content and phytase activity during the germination of some cereals. *J. Cereal Sci.*, 5:23.
- Bauminger ER., Harrison P., Nowik I., Teftry A.* (2006). Composition and dynamics of iron-poor ferritin. Hyperfine interactions, vol. 42, nº 1-4:873-876.
- Bergqvist SW., Andlid T., Sandberg AS* (2006). Lactic acid fermentation stimulated iron absorption by Caco-2 cells is associated with increased soluble iron content in carrot juice. *Br. J. Nutr.*, 96(4):705-711.
- Bering S., Suchdev S., Sjoltov L., Berqqren A., Tetens I., Bukhave K* (2006). A lactic acid fermented oat gruel increases non-haem iron absorption from a phytate-rich meal in healthy women of childbearing age. *Br J. Nutr.*, 96(1):80-85.
- Bermejo P., Peña EM., Domínguez R., Bermejo A., Cocho JA., Fraga JM.* (2002). Iron and zinc in hydrolysed fractions of human milk and infant formulas using an *in vitro* method. *Food Chemistry*, Volume 77, Iss. 3:361-369
- Berridge MJ., Irvine RF.* (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341:197-205.
- Berseth CL., Van Aerde JE., Gross S., Stolz SI., Harris CL., Hansen JW* (2004). Growth, efficacy and safety of feeding an iron-fortified human milk fortifier. *Pediatrics*, 114(6):699-706.
- Bidlack WR.* (2002). Proteins of iron metabolism. *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 21, nº 3:290-291.
- Bitar, K., Reinhold H.* (1972). Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf and man. *Biochim. Biophys. Acta* 268: 442-452.
- Bodemann HH., Rieger A., Bross KJ., Schröfer-Urban H., Löhr GW.* (1984). Erythrocyte and plasma ferritin in normal subjects, blood donors and iron deficiency anemia patients. *Annals of Hematology*, vol 48, nº3:131-127.
- Bohn T, Davidsson L Walczyk T, Hurrell RF.* (2004). Phytic acid added to white-wheat bread inhibits fractional apparent magnesium absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* ;79(3):418-23
- Boland AR., Garner GB., O'Dell BL.* (1975). Identification and properties of phytate in cereal grain oilseed products. *J. Agric. Food Chem.*, 23:1186-1189.
- Bosscher D., Lu Z., Janssens G., Van Caillie-Bertrand M., Robberecht H., De Rycke H., De Wilde R., Deelstra H.* (2001 a) *In vitro* availability of zinc from infant foods with increasing phytic acid contents. *British Journal of Nutrition*, 86: 241-247
- Bosscher D., Lu Z., Van Cauwenbergh R, Van Caillie-Bertrand M, Robberecht H, Deelstra H.* (2001 b) A method for *in vitro* determination of calcium, iron and zinc availability from first-age infant formula and human milk. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 52: 173-182.
- Bosscher D., Van Caillie-Bertrand M., Robberecht H., Van Dyck K., Van Cauwenbergh R., Deelstra H.* (2001 c). *In vitro* availability of calcium, iron and zinc from first-age infant formulae and human milk. *Journal of*

- Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 32:54-58.
- Bosscher D., Van Cauwenbergh R., Van der Auwera JC., Robberecht H., Deelstra H. (2002).* Calcium, iron and zinc availability from weaning meals. *Acta Paediatrica*, 91:761-768.
- Bosscher D., Van Caillie-Bertrand M., Deelstra H. (2003).* Do thickening properties of locust bean gum affect the amount of calcium, iron and zinc available from absorption from infant formula? *In vitro* studies. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 54:261-268.
- Bosscher D., Van Caillie-Bertrand M., Van Cauwenbergh R., Deelstra H. (2003).* Availabilities of calcium, iron and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. *Nutrition*, 19: 641-645.
- Boveri, M., Pazos, P., Gennari, A., Casado, J., Hartung, T., Prieto, P. (2004).* Comparison of the sensitivity of different toxicological endpoints in Caco-2 after cadmium chloride treatment. *Archives of Toxicology*. Iss: vol 78, n° 4. pp. 201-206.
- Bressani R, Turcios JC, Colmenares de Ruiz AS, de Palomo PP. (2004).* Effect of processing conditions on phytic acid, calcium, iron, and zinc contents of lime-cooked maize. *J Agric Food Chem.* 2004 Mar 10;52(5):1157-62.
- Brinch-Pedersen H., Hatzack F., Stöger E., Arcalis E., Pontopidan K., Holm PB. (2006).* Heat-stable phytases in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.): Deposition pattern, Thermostability and phytate hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, 54:4624-32.
- Briske-Anderson MJ., Finley JW., Newman SM. (1996).* The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *PSEBM*, 214:248-257.
- Brooks SPI., Lampi BJ. (2001).* Problems associated with measuring phytate in infant cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 49(1):564-569.
- Cámara F., Amaro MA. (2003).* Nutritional aspects of zinc availability. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 54:143-151.
- Cámara F. (2004).* Biodisponibilidad mineral de menús escolares. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Cámara F., Amaro MA., Barberá R., Clemente G. (2005).* Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chemistry*, 92: 481-489.
- Carlsson, N.G., Bergman, E.L., Skoglund, E., Hasselblad, K., Sandberg, A.S. (2001).* Rapid analysis of inositol phosphates. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 1695-1701.
- Carnovale E, Lugaro E, Lombardi-Boccia G. (1988).* Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. *Cereal Chem* 65: 114-17.
- Chen, Q. (2004)* Determination of phytic acid and inositol pentakis phosphates in foods by high-performance ion chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4604-4613.
- Chen YC., Yiang CI., Lin RS., Pu YS., Lai MK., Sung FC. (2005).* Diet vegetarian food and prostate carcinoma among men in Taiwan. *Br. J. Cancer*, 93(9):1057-61.
- Cherian M (1980).* Phytic acid interactions in foods systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13: 297-329.
- Chitra U., Singh U., Rau PV. (1996).* Phytic acid, *in vitro* protein digestibility, dietary fiber, and mineral of pulses as influenced

by processing methods. *Plant Foods Hum. Nutr.* 49(4):207-316.

Cisse D., Guiro AT., Diahm B., Souane M., Doumbouya NT., Wade, S. (1998). Effect of food processing on iron availability of african pearl millet weaning foods. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 49(5):375-381.

COMA (1995). Department of Health. Weaning and the weaning diet. Report on Health and Social Subjects N° 45. London: Her Majesty's Stationery Office.

Cook JD., Dassenko SA., Whittaker P. (1991) Calcium supplementation: effect on iron absorption. *Am J Clin Nutr.*, 53 (1): 106-111

Cook JD, Reddy MB, Burri J Juillerat MA, Hurrell RF (1997). The influence of different cereal grains on iron absorption from infant cereal foods. *Am J Clin Nutr.*;65(4):964-9.

Cotter AA, Cashman KD (2005). The effect of two dietary and a synthetic phytoestrogen on transepithelial calcium transport in human intestinal-like Caco-2 cells. *European Journal of Nutrition*, 44:72-78.

Couzy F., Mansourian R., Labate A., Guinchard S., Montagne DH., Dirren H. (1998). Effect of dietary phytic acid on zinc absorption in the healthy elderly, as assessed by serum concentration curve test. *British Journal of Nutrition*, vol 80, n° 2:177-182.

Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. (2002). Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J. Inorg. Biochem.*, 91(1):9-18.

Dallmann PR. (1992). Changing iron needs from birth through adolescence. In: Fomon SJ., Zlotkin S. (eds.). *Nutritional anemias:*

Nestlé Nutrition Workshop Series, 30. New York:Raven Press Ltd.:29-36.

Davidsson L, Almgren A, Juillerat MA, Hurrell RF. (1995). Manganese absorption in humans: the effect of phytic acid and ascorbic acid in soy formula. *Am J Clin Nutr.* 62(5):984-7.

Davidsson L., Galan P., Cherouvrier F., Kastenmayer P., Juillerat M.-A., Herberg S, Hurrell R.F. (1997). Iron bioavailability from infant cereals by infants: the effect of dephytinization. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol. 65: 916-920.

Davidsson L. (2003). Approaches to improve iron bioavailability from complementary foods. *J. Nutr.* 133: 1560-1562.

Davidsson L., Asif Jamil K., Alam Sarker S., Zeder C., Fuchs G., Hurrell R. (2004). Human milk as a source of ascorbic acid: no enhancing affect on iron bioavailability from a traditional complementary food consumed by Bangladeshi infant and young childrens. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79:1073-1077.

Davidsson L, Ziegler EE., Kastenmayer P., van Dael P., Barclay D. (2004). Dephytinisation of soyabean protein isolate with low native phytic acid content has limited impact on mineral and trace element absorption in healthy infants. *British Journal of Nutrition*, 91:287-293.

Davies, N. T. (1979). Antinutrients factors affecting mineral utilization. *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 38, 121.

Davis NT., Warrington S. (1986). The phytic acid, mineral, trace element, protein and moisture content of UK Asian immigrant foods. *Human Nutrition and Applied Nutrition*, 49-59.

De Boland AR., Garner GB., O'Dell BL (1975). Identification and properties of phytase in cereals grains and oilseed product. *J. Agric. Food Chem.* 23:1186-1189.

- De Souza Nogueira C., Colli C., Silverio-Amancio OM.* (2004). Infant formula iron dialysability related to other nutrients. *Food Chemistry*, vol. 90, iss.4: 779-783
- Debon, SJJ., Tester, RF.* (2001). In vitro binding of calcium, iron and zinc by non starch polysaccharides. *Food Chem.*, 73: 401-440.
- Denstadli V., Vestre R., Svihus B., Skrede A., Storebakken T* (2006). Phytate degradation in a mixture of ground wheat and ground defatted soybeans during feed processing: Effects of temperature, moisture level, and retention time in small- and medium-scale incubation systems. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5887-5893
- Denbow, D., Grabau, E., Lacy, G. Kornegay, E., Russell, D y Umbeck, P.*(1998). Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poultry Sci.* 77: 878-881.
- Derman DP., BotwellTH., McPhail AP., Torrance JD., Bezwoda WR., Charlton RW., Mayet FGH.* (1980). Importance of ascorbic acid in the absorption of iron from infant foods. *Scand. J. Haematol.* 25:193-201.
- Deshpande SS, Damodaran S*(1989). Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. *J Food Sci.*; 54: 695-99.
- Diaz-Batalla L, Widholm JM, Fahey GC Jr, Castaño-Tostado E Paredes-Lopez O,* (2006). Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.*, 54(6):2045-52.
- Dintzis F., Lehrfeld J., Nelsen T., Finney P.* (1992). Phytate content of soft wheat brans as related to kernel size, cultivar, location and milling and flour quality parameters. *Cereal Chemistry*, 69(5):577-581.
- Drago SR, Valencia ME.* (2004). Influence of components of infant formulas on in vitro iron, zinc, and calcium availability. *J Agric Food Chem.*, 19;52(10):3202-7.
- Duskova D., Dvorak R., Rada V., Doubek J., Marounek M.* (2001). Concentration of phytic acid in faeces of calves fed starter diets. *Acta Vet. Brno.*, 70:381-385.
- Edwards, H. M., Jr, Veltmann J. R. Jr* (1983). The role of calcium and phosphorus in the etiology of tibial dyschondroplasia in young chicks. *J. Nutr.* 113:1568-1575
- Eeckhout W., De Paepe M.* (1994). Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. *Animal. Feed. Sci. Technol.*, 47: 19-29.
- Egli I.M.* (2001). Traditional food processing methods to increase mineral bioavailability from cereal and legume based weaning foods. Tesis doctoral. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich (Suiza).
- Ellis R., Morris ER.* (1982). Comparison of ion-exchange and iron precipitation methods for analysis of phytate. *Cereal Chm.* 59:232-233.
- Ellis R., Kelsay JL., Reynolds RD., Morris ER., Moser PB., Frazier CW* (1987). Phytate: zinc and phytate x calcium:zinc millimolar ratios in self-selected diets of american, Asian Indians and Nepalese. *J. Am. Diet Assoc.*; 87:1043-1047.
- Engelmann MD., Davidsson L., Sanstrom B., Walczyk T., Hurrell RF., Michaelsen KF* (1998). The influence of meat on nonheme iron absorption in infants. *Pediatr. Res.* 43: 768-773.
- Engle-Stone R, Yeung A, Welch R, Glahn R* (2005). Meat and ascorbic acid can promote Fe availability from Fe-phytate but not from Fe-tannic acid complexes. *J Agric Food Chem.* Dec 28;53(26):10276-84.

- Erdman J. W.* (1979). Oilseed phytates: nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemist Society*, vol. 56, 736-741.
- Eklund G., Lindén A., Tallkvist J., Oskarsson A.* (2003). Bioavailability of cadmium from *in vitro* digested infant food studied in Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4168-4174
- Ekmekcioglu C., Feyertag J., Marktl W.* (1996). A ferric reductase activity is found in brush border membrane vesicles isolated from Caco-2 cells. *J. Nutr.* 126:2209-2217.
- Ekmekcioglu C., Pomazal K., Steffan I., Schweiger B., Marktl W.* (1999). Calcium transport from mineral waters across Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 47:2594-2599.
- Ekmekcioglu C.* (2002). A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*, 76: 225-230.
- ESPAGAN (European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition) (1982). Committee on nutrition Guidelines on infant nutrition. III. Recommendations for infant feeding. *Acta Paediatr. Scand.*; suppl: 302.
- Etcheverry P., Wallingford J. C., Miller D. D., Glahn R. P.* (2004) Calcium, Zinc, and Iron Bioavailabilities from a Commercial Human Milk Fortifier: A Comparison Study. *J. Dairy Sci.* 87: 3629-3637.
- Etcheverry P., Wallingford J. C., Miller D. D., Glahn R. P.* (2005). The effect of calcium salts, ascorbic acid and peptic pH on calcium, zinc and iron bioavailabilities from fortified human milk using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell model. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 75(3):171-8.
- Fairweather-Tait S., Hurrell R.F.* (1996). Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutr. Res. Rev.*, 9: 295-324.
- Fairweather-Tait S., Lynch S., Hotz C., Hurrell R., Abrahamse L., Beebe S., Bukhave K., Glahn R., Bering S., Bukhave K., Glahn R., Hambidge M., Hunt J., Lonnerdal B., Miller D., Mohktar N., Nestel P., Reddy M., Sandberg AS., Sharp P., Teucher B., Trinidad TP.* (2005). The usefulness of *in vitro* models to predict the bioavailability of iron and zinc: a consensus statement from the harvest expert consultation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 75 (6): 371-374.
- FAO (Food and Agriculture Organization) (1987). Promoting under exploited food plants in Africa. Rome (Italy).
- FAO (Food and Agriculture Organization) (1998). Promoting under exploited food plants in Africa. Rome (Italy).
- FAO (Food and Agriculture Organization) (2001). Improving nutrition through home gardening. Nutrition Programmes. Proximate composition of Foods, ISBN 92-5-104388-4. Rome (Italy).
- Favier, A. E* (1993). Nutritional and clinical factors affecting the bioavailability of trace elements in humans. In U. Schlemmer (Ed.), Proceedings of the international conference bioavailability '93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability (pp 202-212). Karlsruhe.
- Febles C.I., Arias A., Hardisson A., Rodriguez-Alvarez C., Sierra A.* (2001). Phytic acid level in infant flours. *Food Chemistry*. Vol. 74, 437-441.
- Feil B., Fossati D.* (1997). Phytic acid in triticale grain as affected by cultivar and environment. *Crop Sci.*, 37:916-921.
- Ferguson EL., Darmon N., Fahmida U., Fitriyanti S., Harper TB., Premachandra IM.* (2006). Design of optimal food-based complementary feeding recommendations and identification of key "problem nutrients" using goal programming. *Journal of Nutrition*, 136:2399-2404

- Fernández Serret A., Aguilera Y., Morales I., Alonso E.* (2002). Validación de los métodos analíticos para la identificación y cuantificación del dextrometorfano jarabe. *Rev. Cubana Farm.*, 36(1):28-34.
- Ferruzza S., Scarino ML., Rotilio G., Ciriolo M., Santaroni P., Onetti-Muda A., Sambuy Y.* (1999). Copper treatment alters the permeability of tight junctions in cultured human intestinal Caco-2 cells. *American Journal of Physiology (Gastrointestinal Liver Physiology)* 277, G1138-G1148
- Finley JW., Briske-Anderson M., Reeves PG., Johnson LK.* (1995). Zinc uptake and transcellular movement by Caco-2 cells: studies with media containing fetal bovine serum. *Nutrition Biochemistry*, 6:137-144
- Fleet JC., Bradley J., Reddy GS., Ray R., Wood RJ.* (1996) 1 alpha,25-(OH)₂-vitamin D₃ analogs with minimal in vivo calcemic activity can stimulate significant transepithelial calcium transport and mRNA expression in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.*, 329(2):228-34
- Fleming RE., Bacon BR.* (2005). Orchestration of iron homeostasis. *N. Engl. J. Med.* 352:1741-4
- Forbes RM., Erdman JW., Parker HM., Kondo HM., Ketelsen SM.* (1983). Bioavailability of zinc in coagulated soy protein (tofu) to rats and effect of dietary calcium at a constant phytate/zinc ratio. *Journal of Nutrition*, 113, 205
- Ford D.* (2004). Intestinal and placental zinc transport pathways. *Proc. Nutr. Soc.*, 63(1):21-9.
- Forsell, P., Eberhardson, M., Lennernas, H., Knutson, T., Knutson, L.* (2006). Rapid modulation of Ca⁺² uptake in jejunal enterocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340: 961-966.
- Frapin D., Nys Y.* (1995). Relative efficiency of microbial and vegetal phytases and additional effects on phosphorus availability. *Proceed. 10th European Symposium on Poultry Nutrition, Antalya, Turkey, 15-19 October*, 352-354.
- Fredlund K, Bergman EL, Rossander-Hulthen L, Isaksson M, Almgren A, Sandberg AS* (2003). Hydrothermal treatment and malting of barley improved zinc absorption but not calcium absorption in humans. *Eur J Clin Nutr. Dec;57(12):1507-13.*
- Fredlund K, Isaksson M, Rossander-Hulthen L, Almgren A, Sandberg AS.* (2006) Absorption of zinc and retention of calcium: dose-dependent inhibition by phytate. *J Trace Elem Med Biol.;20(1):49-57.* Epub. Mar 2.
- Fretzdorff B., Brümmer JM.* (1992). Reduction of phytic during breadmaking of whole-meal breads. *Cereal Chem.* 69(3):266-270.
- Fretzdorff B. Weipert D.* (1986). Phytinsäure in Getreide und Getreideerzeugnissen. Mitteilung I: Phytinsäure und Phytase in Roggen und Roggenprodukten. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 182:287-293.
- Frias, J., Doblado, R., Antezana, J.R., Vidal-Valverde, C.* (2003). Inositol phosphate degradation by the action of phytase enzyme in legume seeds. *Food Chemistry*. Vol. 81, 233-239.
- Frolich W., Drakenberg T., Asp N G.* (1986). Enzymic degradation of phytate (myoinositol hexaphosphate) in whole grain flour suspension and dough. A comparison between ³¹P NMR spectroscopy and a ferric ion method. *J. Cereal Sci.*, 4:325-334.
- Frühbeck G., Alonso R., Marzo F., Santillán S.* (1995). A modified method for the indirect quantitative analysis of phytate of foodstuffs. *Analytical Biochemistry*, 225:206-12.

- Gad SS., Mohamed MS., El-Zalaki ME., Mohasseb SZ. (1982). Effect of processing of phosphorous and phytic acid contents of some Egyptian varieties of legumes. *Food Chem.*, 8:11-19.
- Gahlawat P., Sehgal S. (1993). The influence of roasting and malting on the total and extractable mineral contents of human weaning mixtures prepared from indian raw materials. *Food Chemistry*, 46: 253-256.
- Gangloff MB., Lai C., Van Campen DR., Miller DD, Norvell WA. and Glahn, RP. (1996 a). Ferrous iron uptake but not transfer is down regulated in Caco-2 cells grown in high iron serum-free medium. *Journal of Nutrition*, 126:3118-3127.
- Gangloff MB., Glahn RP., Miller DD., Van Campen DR.(1996 b) Assessment of iron availability using combined *in vitro* digestion and caco-2 cels culture. *Nutrition Research*, 16:479-487.
- Ganz T. (2003). Hcpcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anaemia of inflammation. *Blood*, 102:783-788.
- García M N., Flowers, C., Cook, JD. (1996). The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability. *Journal of Nutrition*, 126: 251-258
- García-Casal MN, Leets I Layrresse M (2000). Beta-carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J Nutr*. 2000 Jan;130(1):5-9
- García Villanova-Ruiz, B. Guerra Hernández EJ. (2005). *Tratado de Nutrición*. Tomo II, capítulo 2-6. ISBN 84-88336-12-X. Grupo Acción Médica, Madrid (España).
- Gibson RS., Ferguson EL., Lehrfeld J. (1998). Complementary foods for infant feeding in developing countries: their nutrients adequacy and improvement. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 52(10):764-770
- Gibson RS., Hotz C. (2000). The adequacy of micronutrients in complementary foods. *Pediatrics*, vol. 106 (5):1298-1299.
- Giuliano AR, Wood RJ. (1991). Vitamin D regulated calcium transport in Caco-2 cells: unique *in vitro* model. *Am. J. Physiol.*; 260(2 Pt 1):G207-12
- Gilman J, Cashman KD. (2006). The effect of probiotic bacteria on transepithelial calcium transport and calcium uptake in human intestinal-like Caco-2 cells.: *Curr Issues Intest Microbiol*. 2006 Mar;7(1):1-5
- Glahn R. P. (1998). Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Nutrition*, vol. 128: 1555-1561.
- Glahn, R. P., Rassier, M., Goldman, M.I., Lee, O. A., Cha, J. (2000). A comparison of iron availability from commercial iron preparations using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. *J. Nutr. Biochem*. 11:62-68
- Glahn RP., Van Campen DR (1997). Iron uptake is enhanced in Caco-2 cell monolayers by Cysteine and reduced cisteinyl glycine. *J. Nutr*. 127:642-647.
- Glahn RP., Wortley GM., South PK., Miller DD. (2002). Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid, and ZnCl₂: studies using an *in vitro* digestion/Caco-2 cell model. *J Agric Food Chem*. Jan 16;50(2):390-5.
- Greer FR., Krbs NF. and Committee on Nutrition (2006). Optimizing bone health and calcium intakes of infants, children and adolescents. *Pediatrics*, 117:578-585
- Greiner R, Carlsson N, Alming ML, (2000). Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytate-degrading enzyme of *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. Nov 17;84(1):53-62.

- Greiner R.(2004). Degradation of myo-inositol Hexakisphosphate by a phytate-degrading enzyme from *Pantoea agglomerans*. The Protein Journal, Volume 23, Number 8: 577-585.
- Greiner R., Konietzny U., (2006). Phytase for food application. Food Technol. Biotechnol., 44 (2): 125-140.
- Guillem A, Alegría A., Barberá R., Farré R., Lagarda MJ., Clemente G. (2000). In vitro dialyzability of zinc from different salts used in the supplementation of infant formulas. Biol. Trace Elem. Res., 73:1-8.
- Guillen Gómez, E., (2006). Distribución tisular de transportadores de fármacos en tejidos normales y transformados. Papel en el sistema nervioso central. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.
- Guyton AC., Hall JE. (2001). Tratado de fisiología médica. 10ª edición. McGrawHill-Interamericana, Madrid (España).
- Haefner S., Knietsch A., Scholten E., Braun J., Lohscheidt M., Zelder O. (2005). Biotechnological production and applications of phytases. Appl. Microbiol. Biotechnol. , 68:588-597.
- Hallberg L., Rossander L., Skanberg AB. (1987). Phytates in the inhibitory effect of bran on iron absorption in man. Am. J. Clin. Nutr., 45:988-996.
- Hallberg L., Brune M. and Rossander L (1989). Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. Am. J. Clin. Nutr. 49:140-144.
- Hallberg L., Rossander-Hulthén L., Brune M., Glerup A. (1992). Inhibition of non-haem iron absorption in man by calcium. Br. J. Nutr., 69:533-540.
- Halleux C., Schneider YJ., (1994) Iron absorption by Caco 2 cells cultivated in serum-free medium as in vitro model of the human intestinal epithelial barrier. J Cell Physiol. ;158(1):17-28.
- Han O, Failla M L, Hill AD, Morris E R, Smith J C Jr. (1994). Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. Journal of Nutrition, vol.124: 580-587.
- Hansen M., Sandström B., Lönnnerdal B. (1996). The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in rat pups and Caco-2 cells. Pediatric Research 40(4):547-552.
- Hansen M, Sandstrom B, Jensen M, Sorensen SS. (1997). Effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from bread meals. J. Trace Elem Med Biol., nov 11(3): 143-9.
- Harland, B.F., Oberleas D. (1987) Phytate in foods. Wld. Rev. Nutr. Diet., vol. 52:235-259.
- Harland, B.F., Gurleen M. (1999). Food phytate and its hydrolysis products. Nutrition Research, vol 19,nº 6, pp 947-961.
- Haro JF. (2006). Biodisponibilidad de diferentes compuestos de hierro añadidos a un nectar de frutas funcional. Interacción con las vitaminas y fructooligosacáridos. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
- Hawkins PT., Poyner DR., Jackson TR., Letcher AJ., Lander DA., Irving RF. (1993). Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for myo-inositol hexakisphosphate. Biochem. J. 294:929-934.
- Heaney RP., (2006). Absorbability and utility of calcium in mineral waters. Am J. Clin Nutr., 84:371-374.
- Hemalatha S., Platel K., Srinivasan K. (2006). Zinc and iron contents and their

bioaccessibility in cereals and pulses consumed in India. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.07.15

Hemalatha S., Platel K., Srinivasan K. (2007). Influence of germination and fermentation on bioaccessibility of zinc and iron from food grains. European Journal of Clinical Nutrition, 61:342-348.

Hernández Rodríguez, M. (1999) Capítulo 52. Alimentación en la primera infancia. En: Tratado de Nutrición. Ediciones Díaz de Santos. S.A. Madrid. Pp. 809-829

Herold G., Besemer F., Rogler D. (1994). Morphology of Caco-2 cells varies in different batches. In vitro cellular and Developmental Biology 30:A, 289-291.

*Hoefkens P., Smit MH., deJen-Jaspars NM., Huijkes-Heins MI., deLong G., VanEijk HG (1996). Isolation, renaturation and partial characterization of recombinant human transferrin and its half molecules from *Escherichia coli*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 28:975-982.*

Hotz C. (2005). Evidence for the usefulness of in vitro dialyzability, Caco-2 cell models, animal models, and algorithms to predict zinc bioavailability in humans. Int J Vitam Nutr Res.;75(6):423-35.

*Hotz C., Gibson RS, (2001). Assessment of home-based processing methods to reduce the phytate content and phytate/zinc molar ratio of white maize (*Zea mays*) (2001). Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:692-698.*

Hotz C, Gibson RS, Temple L. (2001 a). A home-based method to reduce phytate content and increase zinc bioavailability in maize-based complementary diets. Int J Food Sci Nutr. Mar;52(2):133-42.

*Hu Y, Cheng Z, Heller LI, Krasnoff SB, Glahn RP, Welch RM (2006). Kaempferol in red and pinto bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) coats inhibits iron bioavailability using an*

in vitro digestion/human Caco-2 cell model. J Agric Food Chem., 29;54(24):9254-61.

Hurrell R., Lynch S., Trinidad T. (1989). Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. Am. J. Clin. Nutr., 49:546-552.

Hurrell RF., Juillerat MA., Reddy MB., Lynch SR., Dassenko SA., Cook JD. (1992). Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. Am. J. Clin. Nutr., 56:573-578.

Hurrell RF., Reddy, M B., Cook, J D. (1999). Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. Br. J. Ntr. 81:289-295.

Hurrell RF, Reddy MB, Burri J, Cook JD (2000). An evaluation of EDTA compounds for iron fortification of cereal-based foods. Br J Nutr. Dec;84(6):903-10.

Hurrell RF. (2002 a). Fortification: overcoming technical and practical barriers. J. Nutr. 132:806S-12S.

Hurrell, R F., Reddy, M B., Burri, J., Cook, J D., (2002 b). Phytate degradation determines the effect of industrial processing and home cooking on iron absorption from cereal-based foods. British Journal of Nutrition, vol 88, issue. 2, pp. 117-23.

Hurrell RF., Reddy MB., Juillerat MA., Cook JD. (2003). Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. Am. J. Clin. Nutr. 77: 1213-9.

Hurrell RF. (2003). Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. J. Nutr. 133(9):2973S-7S.

Hurrell RF. (2004). Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. Int. J. Vitam. Nutr. Res., 74 (6): 445-452.

- Hussain B, Khan S, Ismail M, Sattar A. (1989). Effect of roasting and autoclaving on phytic acid content of chickpea. *Nahrung*, 33(4):345-8.
- Jewell C, Cusack S, Cashman KD. (2005). The effect of conjugated linoleic acid on transepithelial calcium transport and mediators of paracellular permeability in human intestinal-like Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 72(3):163-71.
- Jovani M, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ, Clemente G. (2000). Effect of proteins, phytates, ascorbic acid and citric acid on dialysability of calcium, iron, zinc and copper in soy-based infant formulas. *Nahrung*; 44(2):114-7.
- Jovaní M., Barberá R., Farré R., Martín de Aguilera E. (2001). Calcium, iron and zinc uptake from digest of infant formulas by Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3480-3485.
- Jovaní M., Alegria R., Barberá R., Farré R., Lagarda MJ., Clemente G. (2001). Effects of proteins, phytates, ascorbic acid and citric acid on dialysability of calcium, iron, zinc and copper in soy-based infant formulas. *Nahrung*, 44: 114-117.
- Jovaní M., Viadel B., Laparra M., Barberá R., Farré R. (2004). Improvement of analytical conditions of mineral Caco-2 cell uptake assays. *Food Sci. Tech. Int.*, 10(3):197-201.
- Kapsokefalou M., Alexandropoulou I., Komaitis M., Politis I (2005). *In vitro* evaluation on iron solubility and dialyzability of various iron fortificants and of iron-fortified milk products targeted for infants and toddlers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(4):293-302.
- Kasim, A.B, Edwards H.M. Jr. (1998). The analysis for inositol phosphate forms in feed ingredients. *J. Sci. Food Agric.*, 76, 1-9.
- Kastenmayer P., Davidsson L., Galan P., Cherouvier F., Herberg S., Hurrell R. (1994). A double stable isotope technique for measuring iron absorption in infants. *British Journal of Nutrition*, 71:411-424.
- Kaup SM. (1998). Aspects of mineral bioavailability in infant nutrition. *Int. Dairy Journal*, 8: 435-441.
- Kayode AP., Hounhouigan JD., Nout NJ. (2006 a). Impact of brewing process operations on phytate, phenolic compounds and in vitro solubility of iron and zinc in opaque sorghum beer. *Food Science and Technology*, doi: 10.1016/j.lwt.2006.04.001
- Kayode AP., Nout MJ., Bakker EJ., Van Boekel MA. (2006 b). Evaluation of the simultaneous effects of processing parameters on the iron and zinc solubility of infant sorghum porridge by response surface methodology. *J Agric Food Chem.*, Jun 14;54(12):4253-9.
- Kennefick S., Cashman D. (2000). Inhibitory effect of wheat fibre extract on calcium absorption in Caco-2 cells: evidence for a role of associated phytate rather than fibre *per se*. *European Journal of Nutrition*, 39(1):12-17.
- Kerovuo J. (2000). A novel phytase from *Bacillus*. Characterization and production of the enzyme. Academic Dissertation. Faculty of Science of the University of Helsinki.
- Key T., Appleby PN., Rosell M. (2006). Health effects of vegetarian and vegan diets. *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 65 (1):35-41.
- Khokar S., Chauhan BM. (1986). Antinutritional factors in moth bean (*Vigna aconitifolia*):varietal differences and effects of methods of domestic processing and cooking. *J. Food Sci.*, 51:591-594.
- Khokar S., Fenwick GR. (1994). Phytate content of indian foods and intakes by

- vegetarian Indians of Hisar region, Haryana state. *J. of Agriculture and Food Chem.*, 42:2440-2444.
- Kloots W., Op Den Kamp D., Abrahamse L.* (2004). In vitro iron availability from iron-fortified whole-grain wheat flour. *J. Agric. Food Chem.*, 52:8132-8136.
- Kojima N, Wallace D, Bates GW.* (1981). The effect of chemical agents, beverages, and spinach on the in vitro solubilization of iron from cooked pinto beans. *Am J Clin Nutr.*;34(7):1392-401
- Kozłowska, H., Honke, J., Sadowska, J., Frías, J., Vidal-Valverde, C.,* (1996). Natural fermentation of lentils: Influence of time, concentration and temperature on the kinetics of hydrolysis of inositol phosphates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 367-375.
- Laparra JM., Barberá R., Farré R.* (2005). Effect of enzyme amounts used in gastrointestinal digestion upon solubility and Caco-2 cells uptake assays of minerals from infant formulas. *Food Sci. Tech. Int.*, 11(6):425-431.
- Larsson, M., Sandberg, A S.,* (1991). Phytate reduction in bread containing oat flour, oat bran or rye bran. *Journal of Cereal Science*, 14:141-149.
- Larsson M., Rossander-Hulthén L., Sandström B., Sandberg, A S.* (1996). Improved zinc and iron absorption from breakfast meals containing malted oats with reduced phytate content. *Br. J. Nut.*, 76:677-688
- Latta M., Eskin M.* (1980). A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric Food Chem.*, 28:1313-1315.
- Lee K., Abendroth JA* (1983). High performance liquid chromatographic determination of phytic acid in foods. *Journal of Food Science*, 48: 1344-1345.
- Lee PL, Halloran C, Cross AR, Beutler E.* (2000). NADH-ferric reductase activity associated with dihydropteridine reductase. *Biochem Biophys Res Commun.*, 19;271(3):788-95.
- Leenhardt F., Levrat-Verny MA., Chauhand E., Remesy C.* (2005). Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity. *J. Agric. Food Chem.*, 53(1):98-102.
- Lehrfeld, J.* (1989). High-performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable macroporous polymer column. *Cereal Chemistry*, vol. 66, 510-515.
- Lehrfeld J.* (1994). HPLC separation and quantitation of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2726-2731
- Lestienne I., Icard-Vernière C., Mouquet C., Picq C., Trèche S.* (2005). Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. *Food Chemistry*, 89:421-425
- Lestienne I., Besançon P., Caporiccio B., Lullien-Pellerin V., Trèche S.* (2005). Iron and zinc *in vitro* availability in pearl millet flours (*Pennisetum glaucum*) with varying phytate, tannin, and fiber contents. *J. Agric. Food Chem.*, 53:3240-3247.
- Lieu PT., Heiskala M., Peterson PA., Yang I* (2001). The roles of iron in health and disease. *Molecular aspects of Medicine*, 22:1-87.
- Lim SL., Lim LY.* (2006). Effects of citrus fruit juices on cytotoxicity and drug transport pathways of Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.*, 307 (1): 42-50. Epub 2005 Nov.
- Lind T., Lonnerdal B., Stenlund H., Ismail D., Seswandhana R., Ekström EC., Persson L.* (2003). A community-based randomized controlled trial of iron and zinc

supplementation in Indonesian infants: interactions between iron and zinc. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77:883-90.

Lind T., Persson L., Lonnerdal B., Stenlund H., Hernell O. (2004). Effects of weaning cereals with different phytate content on growth, development and morbidity: a randomized intervention trial in infants from 6 to 12 months of age. *Acta Paediatr.*, 93(2):1575-82.

Linder MC. (1988). Nutrición y aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos. EUNSA. Pamplona.

Liuzzi JP, Cousins RJ. (2004) Mammalian zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr.*;24:151-72.

Lolas GM., Palamidis N., Markakis P. (1976). The phytic acid-total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans and wheat. *Cereal Chem.*, 53:867-871.

Lombardi-Boccia G., Schelemmer U., Cappelloni M., Di Lullo G. (1998). The inhibitory effect of albumin extracts from white beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on in vitro iron and zinc dialysability: role of phytic acid. *Food Chemistry*, vol. 63, n° 1: 1-7

Lönnnerdal B., Ceberblad A., Davidsson L and Sandstrom B. (1984). The effect of individual components of soy formula and cows' milk formula on zinc bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 40 (5): 1064-1070.

Lönnnerdal B., Sandberg AS., Sändstrom B. and Kunz, J. (1989). Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium-absorption in suckling rats. *J. Nutr.* 119, 211-214.

Lönnnerdal B. (1997). Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace elements absorption during infancy. *Physiol. Rev.* 77(3):643-669.

Lönnnerdal B. (2000). Dietary factors influencing zinc absorption. *J. of Nutrition*, 130: 1378-83.

López HW., Vallery F., Levrat-Verny MA., Coudray C., Denigue C., Remesy C. (2000). Dietary phytic and wheat bran enhance mucosal phytase activity in rat small intestine. *J. Nutr.* 130:2020-2025.

Lopez Hubert W., Vallery F., Levrat-Verny MA, Coudray C., Demigné C., Rémésy C. (2001). Dietary Phytic Acid and Wheat Bran Enhance Mucosal Phytase Activity in Rat Small Intestine. *Journal of Nutrition*. 130:2020-2025.

Lu S., Gough A.W., Bobrowski W.F., Stewart B.H. (1996). Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 85, n° 3.

Luten J., Crews H., Flynn A., Van Dael P., Kastenmayer P., Hurrell R., Deelstra H., Shen LH., Fairweather-Tait S., Hickson K., Farré R., Schlemmer U., Frøhlich W. (1996). Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron dialysability from food. *J. Sci. Food Agric.*, 72:415-424.

Ma G., Jin Y., Piao J., Kok F., Guusje B., Jacobsen E. (2005). Phytate, calcium, iron, and zinc and their molar ratios in foods commonly consumed in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 10285-10290.

Maberly G.F., Trowbridge F.L., Yip R., Sullivan K.M., West C.E. (1994) Programs against micronutrient malnutrition: Ending hidden hunger, *Ann. Rev. Public Health*, 15: 277-301.

Maenz DD., Engele-Schaan CM., Newkirk RW., Classen HL (1999) The effect of minerals and mineral quelators on the formation of phytase-resistant and phytase susceptible forms of phytic acid in solution

and in solution and in a slurry of canola meal. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 81:171-192.

Makokha AO, Oniang'o RK, Njoroge SM, Kamar OK (2002). Effect of traditional fermentation and malting on phytic acid and mineral availability from sorghum (*Sorghum bicolor*) and finger millet (*Eleusine coracana*) grain varieties grown in Kenya. *Food Nutr Bull.* 2;23(3 Suppl):241-5.

Marfo EK., Simpson BK., Idowu JS., Oke OL. (1990). Effect of local food processing on phytate levels in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean. *J. Agric. Food Chem.*, 38:1580-1585.

Marounek M., Dušková D., Skrivánová V. (2003). Hydrolysis of phytic acid and its availability in rabbits. *British Journal of Nutrition*, 89: 287-294.

Martínez B., Rincón F., Ibáñez MV. (2006). Dialysability of trace elements in infant foods containing liver. *Food Chemistry*, 94: 210-218.

Martínez B, Ibáñez MV, Rincón, F. (2002). Acido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, vol.52, no.3, p.219-231. ISSN 0004-0622.

Massheimer V., Boland R., deBoland AR. (1994). Rapid 1,25 (OH) 2-vitamin D3 stimulation of calcium uptake by rats intestinal cells involves a dihydropyridine-sensitive cAMP-dependent pathways. *Cell Signal*, 6:299-304.

Mackenzie B., Garrick MD. (2005). Iron imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 289: 981-986.

Matsubara T, Ben Ammar Y, Anindyawati T, Yamamoto S Ito K, Iizuka M, Minamiura N (2004). Degradation of raw starch granules by alpha-amylase purified from culture of *Aspergillus awamori* KT-11. *J Biochem Mol Biol.*, 31;37(4):422-8.

Matsui T. (2002). Relationship between mineral bioavailabilities and dietary phytate in animals. *Anim. Sci. J.*, 73:21-28.

McCance RA., Edgcombe CN., Widdowson EM. (1943). Phytic acid on iron absorption. *Lancet*, 2:126-128.

McCance RA, Widdowson EM (1935). Estimation of phytic acid. *Biochem J.*, 29:2694-2695.

McKevith B. (2004). The nation's diet: promoting healthy eating. *Nurs Stand.*, 11-17;18(48):45-52.

Mehran M., Levy E., M. Bendayan, and E. Seidman. (1997) Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 33:118-128.

Miller DD., Schriker BR, Rasmussen RR and Van Campen D (1981). An *in vitro* method for estimation of iron bioavailability from meal. *Am. J. Clin Nutr.*,34: 2248-2256.

Mitjavila S. (1990) Sustancias naturales nocivas en los alimentos. In R. Derache, *Toxicología y seguridad de los alimentos.* Editorial Omega. Barcelona (España).

Morris ER., Ellis R. (1985). Bioavailability of dietary calcium: Effect of phytate on adult men consuming non vegetarian diets. In: Kies C. (ed.) *Nutritional bioavailability of calcium.* ACS symposium series. 275. American Chemical Society. Washington DC; 63-72.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

Moursi M., Mbemba, F., Trèche, S., (2004). Does the consumption of amylase-containing gruels impact on the energy intake and growth of Congolese infants? *Public Health Nutrition*, 6(3), 249-257.

- Nasi, M. (1990). Microbial phytase supplementation for improving availability of plant phosphorus in the diet of growing pigs. *Journal of Agricultural Science in Finland*. 60. 435-443.
- Navarro P., Aspe T., Seiquer I. (2000). Zinc transport in Caco-2 cells and zinc balance in rats: influence of the heat treatment of a casein-glucose-fructose mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3589-3596.
- Nävert B Sandstrom B Cederblad A (1985). Reduction of the phytate content of bran by leavening in bread and its effect on zinc absorption in man. *Br J Nutr.* 1985 Jan;53(1):47-53.
- Nayini NR., Markakis P (1983). Effect of fermentation time on the inositol phosphates of bread. *J. Food Sci.*, 48:262-263.
- Nelson TS (1967). The utilization of phytin phosphorous by poultry. *Poultry Sci.*:46:862-869.
- Nestares T, Barrionuevo M, Urbano G, Lopez-Frias M. (1999). Effect of processing methods on the calcium, phosphorus, and phytic acid contents and nutritive utilization of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J Agric Food Chem.* Jul;47(7):2807-12.
- Nititham S, Srianujata S, Rujirawat T. (1999). Dietary intake of phytate, zinc and calcium of self-selected diets of Ubon Ratchathani and Bangkok subjects, Thailand. *J Med Assoc Thai.*;82(9):855-61
- Nogueira C., Colli C., Amancio O. (2004). Infant formula iron dialysability related to other nutrients. *Food Chemistry*, vol. 90, nº 4.
- NRC (1991). National Research Council. Nutrient Requirements of Recommended dietary allowances. Washington DC, National Academic Press.
- Oberleas D., Harland BF. (1986) Analytical methods for phytate. In: Graf E. (ed.). Phytic acid: chemistry and applications. Minneapolis: Pilatus Press, 77-100.
- O'Connell MJ., Ward RJ., Baum H., Teffry A., Peters TJ. (1988). Evidence of biosynthetic link between ferritin and haemosiderin. *Biochem. Soc. Trans.* 16: 828-829.
- O'Dell BL., Boland AR., Koirtiyohann SR. (1972). Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereals grains. *J. Agric. Food Chem.*, 20:718-721.
- Oestreicher P., Cousins RJ. (1989). Zinc uptake by basolateral membrane vesicles from rat small intestine. *J. Nutr.*, 119:639-646.
- Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Takizawa T, Adachi T, Kimura S. (1995). Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*, jun. 41 (3): 281-91.
- Okada T., Narai A., Matsunaga S., Fusetani N., Shimizu M. (2000). Assessment of the marine toxins by monitoring the integrity of human intestinal Caco-2 cells monolayers. *Toxicology in vitro*, 14(3):219-226.
- Ologhobo AD., Fetuga BL. (1984). Effect of processing on the trypsin inhibitor, haemagglutinin, tannic and phytic acid contents of ten cowpea varieties. *Tropical Agriculture*, 61:261-264.
- Oloofs K., Dolbusin A., Jeroch H., (1998). Einfluss von mikrobieller und nativer weizen phytase auf die phosphorverwertung bei broilern. *Archiv für geflügelkunde*, 62:260-263
- Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2002). Compuestos de hierro para la fortificación de alimentos. Guías para

América latina y el Caribe. Biblioteca Sede OPS, Washington DC (USA).

Pan, C., Igbasan, F., Guenter, W y Marquardt, R. (1998). Effects of enzyme and inorganic phosphorus supplements in wheat and rye-based diets on laying hen performance, energy, and phosphorus availability. *Poultry Sci.* 77: 83-89.

Pappenheimer JR., Michel CC. (2003). Role of villus microcirculation in intestinal absorption of glucose: coupling of epithelial with endothelial transport. *J. Physiol.*; 553:561-574.

Park H.R., Ahn H.J., Kim S.H., Lee C.H., Byum M.W., Lee G.W. (2006). Determination of the phytic acid levels in infant foods using different analytical methods. *Food Control*, 17: 727-732.

Pennington JAT., Schoen SA., Salmon GD., Young B., Johnson RD., Marts RW. (1995). Composition of core foods of the U.S. food supply, 1982-1991. II. Calcium, magnesium, iron and zinc. *J. Food Compos Anal.*, 8(2):129-69.

Perales S., Barberá R., Lagarda MJ., Farré R. (2005). Bioavailability of calcium from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dializability and uptake and transport by Caco-2 cells). *J of Agric. Food Chem.*, 53: 3721-3726.

Perales, S., Barberá, R., Lagarda, MJ., Farré, R (2006). Fortification of milk with calcium bioavailability and interactions with iron and zinc. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4901-4906.

Pérez-Conesa D., Ros G. and Periago M.J. (2002). Protein nutritional quality of infant cereals during processing. *Journal of Cereal Science*, vol. 36, 125-133.

Pérez G., Vittori D., Pregi N., Garbossa G., Nesse A. (2005). Homeostasis del hierro.

Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(3):301-314.

Pérez-Llamas F., Larqué E., Marín JF., Zamora S. (2001). Disponibilidad *in vitro* de minerales en fórmulas infantiles con distinta fuente proteica. *Nutrición Hospitalaria*, (5): 157-161

Perlas LA., Gibson RS. (2005). Household dietary strategies to enhance the content and bioavailability of iron, zinc and calcium of selected rice- and maize-based Philippini complementary foods. *Maternal and Child Nutrition*, 1(4): 263-273.

Phillippy, BQ., Johnston, M.R., Tao, SH., Fox, M.R.S. (1988). Inositol phosphates in processed foods. *Journal of Food Science*, vol 53, nº2.

Phillippy, BQ (2006). Transport of calcium across caco-2 cells in the presence of inositol hexakisphosphate. *Nutrition Research*, 26: 146-149.

Pinggera W. (2004). Treatment of disorders of iron metabolism. *MMW Fortschr Med.* 25, 146 (48):37-40.

Pisacane A., Graziano L., Mazzarella G., Scarpellino B., Zona G. (1992). Breast-feeding and urinary tract infection. *J. Pediatr.* 120:87-90.

Pointillart, A. (1991). Enhancement of phosphorus utilization in growing pigs fed phytase-rich diets by feeding rye bran. *J. Aim. Sci.* 69:1109-1115.

Pointillart, A. (1994). Phytates, phytases: leur importance dans l'alimentation des monogastriques. *INRA Prod. Anim.* 7:29-39.

Polycarpe Kayodé AP., Linnermann AR., Nout MJR., Van Boeckel MAJJ (2007). Impact of sorghum processing on phytate, phenolic compounds and *in vitro* solubility of iron and zinc in thick porridges. J. Sci. of Food and Agriculture, vol. 87, iss. 5:832-838.

Porres J.M., Etcheverry P., Miller DD., Lei XG. (2001). Phytase and citric acid supplementation in whole-bread improves phytate phosphorous release and iron dializability. Journal of Food Science, vol. 66, n° 4.

Power, R., Khon N. (1993). Phytase: The limitations to its universal use and how biotechnology is responding. Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's. 335-367.

Prasad AS., Schulert AR., Miale A., Farid Z., Sandstead HH. (1963). Zinc and iron deficiency in male subjects with dwarfism and hypogonadism but without ancylostomiasis, schistosomiasis or severe anemia. Am. J. Clin. Nutr., 12:437-444.

Pynaert I., Armah C., Fairweather-Tait S., Kolsteren P., van Camp J., De Henauw S. (2006). Iron solubility compared with *in vitro* digestion-Caco-2 cell culture method for the assessment of iron bioavailability in a processed and unprocessed complementary food for Tanzanian infants (6-12 months). British Journal of Nutrition, 95:721-726.

Qian H., Hornegay ET., Denbow DM. (1997). Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase, cholecalciferol and the calcium: total phosphorus ratio in broiler diets. Poultry Sci., 76:37-46.

Raboy V., Noaman MN., Taylor GA., Pickett SG. (1991). Grain phytic acid and protein are highly correlated in winter wheat. Crop Sci., 31:631-635.

Raboy V. (2002). Progress in breeding low phytate crops. J. Nutr., 132 (Suppl.):503-505.

Raffaniello RD., Lee S., Teichberg S., Wapnir RA. (1992). Distinct mechanism of zinc uptake at the apical and basolateral membranes of caco-2 cells". J of Cellular Physiology, 152:356-361.

Ramond, M., Martinot-Peignoux, M., Erlinger, S. (1985). Dome formation in the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Influence of ouabain and permeable supports. Biol. Cell 54: 89-92

Ranaldi G., Consalvo R., Sambuy Y., Scarino ML. (2003). Permeability characteristics of parentl and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum-supplemented and serum-free media. Toxicology in Vitro, 17:761-767.

Rapoport S., Leva E., Guest GM. (1941). Phytase in plasma and erythrocytes of various species of vertebrates. J Biol. Chem., 139:621-632.

Reddy N., Sathe, S. y Salunkhe, D. (1982). Phytase in legumes and cereals. Adv. Food Res. 28: 1-92.

Reddy MB., Hurrell RF, Cook JD. (2006). Meat consumption in a varied diet marginally influences nonheme iron absorption in normal individuals. J. Nutr. 136:576-581.

Reeves PG., Briske-Anderson M., Johnson L. (2001). Pretreatment of Caco-2 cells with zinc during the differentiation phase alters the kinetics of zinc uptake and transport. J. of Nutritional Biochemistry, 12:674-684.

Rehms H., Barz W. (1995). Degradation of stachyose, raffinose, melibiose and sucrose by different tempe-producing *Rhizopus* fungi. Appl Microbiol Biotechnol. 44(1-2):47-52.

Rhou, J.R., Erdman, J.V. (1995). Phytic acid in health and disease. CRC Critical Reviews in

Food Science and Nutrition, vol. 35, 495-508.

Rimbach G., Markant A., Pallauf J., Krämer K. (1996). Zinc-Update eines essentiellen Spurenelements. Z. Ernährungswiss, 35 :123-142.

Roig, MJ; Alegria, A; Barbera, R; Farre, R; Lagarda, MJ (1999 a). Effects of different infant formula components on calcium dialysability. Eur. Food Res. Technol. 209: 93-96. (a)

Roig, MJ; Alegria, A; Barbera, R; Farre, R; Lagarda, MJ (1999 b). Calcium dialysability as an estimation of bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas. Food Chemistry, 64: 403-409.(b)

Rosado JL., Díaz M., González K., Griffin I., Abrams SA., Preciado R. (2005). The addition of milk or yogurt to a plant-based diet increases zinc bioavailability but does not affect iron bioavailability in women. J. Nutr. 135:465-468.

Sahuquillo A., Barberá R., Farré R. (2003). Bioaccessibility of calcium, iron and zinc from three legume samples. Nahrung, 47(6): 438-441

Salovaara S., Sandberg AS., Andlid T. (2003). Combined impact of pH and organic acids on iron uptake by Caco-2 cells. J. Agric. Food Chem., 51:7820-7824.

Sambuy Y., De Angelis I Ranaldi G Scarino ML, Stammati A, Zucco F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biol Toxicol.;21(1):1-26.

Sandberg A.S, Ahderinne R. (1986). HPLC method for determination of inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates in foods and intestinal contents. Journal of Food Science. Vol. 51, 547-550.

Sandberg AS, Andersson H, Carlsson NG, Sandstrom B (1987). Degradation products of bran phytate formed during digestion in the human small intestine: effect of extrusion cooking on digestibility. J Nutr.,117(12):2061-5.

Sandberg AS, Andersson H (1988). Effect of dietary phytase on the digestion of phytate in the stomach and small intestine of humans. J Nutr. 1988 Apr;118(4):469-73.

Sandberg A.S., Carlsson N.G. and Svanberg U (1989). Effects of inositol tri-, tetra-, penta-, hexaphosphates on in vitro estimation of iron availability. Journal of Food Science, vol. 54, 159-186.

Sandberg A.S., Svangerg U. (1991). Phytate hydrolysis by phytase in cereals, effects on in vitro estimation of iron availability. Journal of Food Science, vol. 56: 1330-1333.

Sandberg A.S. Hulthen L.R. and Türk M. (1996). Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. Journal of Nutrition, vol. 126: 476-480.

Sandberg AS., Brune M., Carlsson NG., Hallberg L., Skoglund E., Rossander-Hulthén L. (1999). Inositol hosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. Am. J. Clin. Nutr., 70: 240-246.

Sandberg AS., Andlid T (2002). Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. International Journal of Food Science and Technology, 37: 823-833.

Sandström B., Almgren A., Kivistö B., Cederblad A. (1987). Zinc absorption in humans from meals based on rye, barley, oatmeal, triticale and whole wheat. J. Nutr., 117:1989-1902.

Sandström B., Sandberg AS. (1992). Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease, 6:99-103.

- Sandström B.* (2001). Micronutrient interactions: effect on absorption and bioavailability. *Br. J. Nutr.* 85:suppl. 2:S181-5.
- Sarriá B., López-Fandiño R. Vaquero MP.* (2001). Does processing of a powder or in-bottle-sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability? *Nutrition*, 17:326-331.
- Schlemmer U* (1995). Bioavailability of nutrients: conceptual aspects of definitions and problems of determination. *Br. J. Nutr.* 73:150-151
- Schuman K., Elsenhaus B., Gordon D., Schlemmer U.* (1994). Bioavailability. Different aspects of "bioavailability" in perspective. *Br. J. Nutr.*, vol 72, 6:950-952.
- Sebastiá V., Barberá R., Farré R., Lagarda MJ.* (2001). Effects of legume processing on calcium, iron and zinc contents and dialysabilities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81:1180-1185.
- SEDCA (Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación), 2006, www.nutricion.org
- Serfass RE., Reddy MB.* (2003). Breast milk fractions solubilize Fe(III) and enhance iron flux across Caco-2 cells. *J. Nutr.*, 133:449-455.
- Simell M., Turunen M., Piironen J., Vaara T.* (1989). Feed and food applications of phytase. Lecture at 3rd Meet. Industrial Applications of Enzymes. Barcelona (España).ç
- Simons, P., Jongbloed, W., Versteegh, H y Kemme, P.* (1992). Improvement of phosphorus available by microbial phytase in poultry and pigs. Pages 100-109 in: Proceeding Georgia Nutrition Conference, Atlanta, GA.
- Simpson CJ., Wise A.* (1990). Binding of zinc and calcium to inositol phosphates (phytate) *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 64:225-232.
- Simwemba CG., Hosoney RC., Varriano-Marston E., Zehznak K.* (1984). Certain B vitamin and phytic acid contents of pearl millet. *J. Agric. Food Chem.*, 32:31-34.
- Sirén M., Linne L., Persson L.* (1991). Pharmacological effects of Dmyo-inositol-1,2,6-triphosphate. In: *Inositol phosphate and Derivatives Synthesis. Biochemistry and Therapeutic Potential* (edited by AB Reitz): 103-110. Washington DC: American Chemical Society.
- Skibniewska KA., Kozirok W., Fornal L., Markiewicz K.* (2002). *In vitro* availability of minerals from oat products. *J. of Science, Food and Agriculture*, 82: 1676-1981.
- Skoglund E., Lönnerdal B. Sandberg AS.* (1999). Inositol phosphates influence iron uptake in Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 47:1109-1113.
- Skoog DA., Holler FJ., Nieman TA.* (2001). *Principios de análisis instrumental*. Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.V., Madrid.
- Sotelo A., Mendoza J., Argote RM.* (2002). Contenido de ácido fitico en algunos alimentos crudos y procesados. Validación de un método colorimétrico. *J. of the Mexican Society*, 46:301-306.
- Splett PL., Story M* (1991). Chile Nutrition: objectives for the decade. *J. Am. Diet. Ass.* 91:665-668.
- Steele TM., Frazer DM., Anderson GJ.* (2005). Systemic regulation of intestinal iron absorption. *IVBMB Life*, 7:499-503.
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I* (1983) Release of calcium from a nonmitochondrial intracellular store in

- pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 306: 67–69.
- Tabekhia A., Luh BS.* (1980). Effect of germination, cooking and canning on phosphorous and phytate retention in dry beans. *J. Food Sci.*, 45:406-408.
- Talamond P., Gallon G., Treche S.* (1998). Rapid and sensitive liquid chromatographic method using a conductivity detector for the determination of phytic acid in food. *Journal of Chromatography A*, 805:143-147.
- Tallkvist J, Bowlus CL, Lonnerdal B* (2000). Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cells to iron treatment. *Am J Clin Nutr.* 72(3):677-678.
- Tapia V., Arredondo M., Núñez MT.* (1996). The regulation of iron absorption by cultured intestinal epithelia (Caco-2) cell monolayers with varied Fe status. *American J. Physiol.*, 271:G443-G447.
- Teucher B., Majsak-Newman G, Dainty JR, McDonagh D, FitzGerald RJ, Fairweather-Tait SJ.* (2006). Calcium absorption is not increased by caseinophosphopeptides. *Am J Clin Nutr.*:84(1):162-6.ç
- Thomas C, Oates PS.* (2005). Ferroportin/IREG-1/MTP-1/SLC40A1 modulates the uptake of iron at the apical membrane of enterocytes. *Gut*, 53(1):44-9.
- Thompson DB., Erdman JW.* (1982). Structural model of ferric phytate: implication for phytic acid analysis. *Cereal Chem.* 59:525-528.
- Thompson L. U.* (1988). Antinutrients and blood glucose. *Food Technol.*, 42; 4:123-132.
- Thompson L. U.* (1993). Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Research International*, 26, 131-149.
- Tijskens L.M.M., Greiner R, Biekman ES, Konietzny U* (2001) Modeling the effect of temperature and pH on activity of enzymes: the case of phytases. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 72, nº 3.
- Torelm I, Bruce A.* (1982). Phytic acid in foods. *Var Töda*, 34:74-96.
- Towo E., Matuschek E., Svanberg U* (2006). Fermentation and enzyme treatment of tannin sorghum gruels: effects of phenolic compounds, phytate and in vitro accessible iron. *Food Chemistry*, 94:369-376-
- Traoré T., Mouquet C., Icard-Vernière, C., Traoré AS, Trèche S.* (2004). Changes in nutrient composition, phytate and cyanide contents and α -amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food Chemistry*, Vol. 88, Issue (1):105-114.
- Trugo L.C., Muzquiz M., Pedrosa M.M., Ayet G., Burbano C., Cuadrado C., Caviates E.* (1999). Influence of malting on selected components of soya bean, black bean, chickpea and barley. *Food Chemistry*, 65: 85-90
- Turnland JR, King JC, Keyes WR, Gong B, Michel MC.* (1984). A stable isotope study of zinc absorption in young men: effect of phytate and alpha-cellulose. *Am J Clin Nutr.* 40:1071-1077.
- Turnlund JR, King JC, Gong B Keyes WR, Michel MC.,*(1985). A stable isotope study of copper absorption in young men: effect of phytate and alpha-cellulose. *Am J Clin Nutr.* 42(1):18-23.
- UNICEF (United Nations International Children's Emergency Fund) (2003). The state of the world's children 2003, accessed 5/1/2006. <http://www.unicef.org/sowc03/index.html>
- Urbano G., Aranda P., Gómez-Villalva E., Frejnagel S., Porres JM., Frías J., Vidal-Valverde C., López-Jurado M.* (2003). Nutritional evaluation of pea (*Pisum*

- sativum* L.) protein diets after mild hydrothermal treatment and with and without added phytase. *J. Agric. Food Chem.* 51:2415-2420.
- Valencia S., Svanberg U., Sandberg AS., Ruales J. (1999). Processing of quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd):effects of *in vitro* iron availability and phytate hydrolysis. *Int. J. of Food Sci. and Nutr.*, 50:203-211.
- Van Dael P., Kastenmayer P., Ziegler EH., Davidsson L., Haschke F., Hurrell RF., Barclay D. (1999). The effect of dephytinisation on calcium, copper, iron, manganese and zinc absorption from a soy infant formula. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition: volume 28 (5):595.*
- Van Dyck K., Tas S., Robberecht H., Deelstra H. (1996). The influence of different food components on the *in vitro* availability of iron, zinc and calcium from a composed meal. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 47, 499-506.
- Velickovic D., Vucelic-Radovic B., Blagojevic S., Barac M., Stanojevic S., Ljubcic M. (1999). A modification of a method for phytic acid determination. *J. Serb. Chem. Soc.* 64(4):303-310.
- Venekamp, J., Tas, A y Somers, W. (1995). Developments in phytase activity determination: NMR-approach. In: *Proceedings of the 2nd European symposium on feed Enzymes*, Noordwijkerhout (W.Van Hartingsveldt, M. Hensing, J.P. Van der Lugt and W. Somers, eds). TNO, Zeist, The Netherlands, p. 151-156.
- Viadel, M. B. (2002). Biodisponibilidad de calcio, hierro y cinc en leguminosas mediante ensayos *in vitro* con cultivos celulares. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
- Viadel B., Barberá R., Farré R. (2006). Effect of cooking and legume species upon calcium, iron and zinc uptake by Caco-2 cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20:115-120.
- Vohra P., Gray GA., Kratzer FH. (1965). Phytic acid-metal complexes. *Proceedings Society of Experimental Biology and Medicine* 120:447-449.
- Vucenik I., Yang G. Y., Shamsuddin M. (1995). Inositol hexaphosphate and inositol inhibit DMBA-induced rat mammary cancer. *Carcinogenesis*, 16(5), 1055-1058.
- Weaver CM, Heaney RP, Martin BR, Fitzsimmons ML (1991). Human calcium absorption from whole-wheat products. *J Nutr.*;121(11):1769-75.
- Welch RM., House WA., Beebe S., Senedhira D., Gregorio G., Cheng Z. (1999). Testing iron and zinc availability in genetically enriched bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) using a rat model. Improving human nutrition through agriculture: the role of international agricultural research. International Rice Research Institute. Los Baños, Filipinas.
- Wienk KJ., Marx JJ., Beynen AC (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur. J. Nutr.* 38:51-75.
- Wise, A. (1983). Dietary factors determining the biological activities of phytate. *Nutr. Abstr. Rev.* 53:791-806.
- Wolters MG, Schreuder HA, van den Heuvel G, van Lonkhuijsen HJ, Hermus RJ, Voragen AG. (1993). A continuous *in vitro* method for estimation of the bioavailability of minerals and trace elements in foods: application to breads varying in phytic acid content. *Br J Nutr.*; 69(3):849-61
- World Health Organization (WHO)(1998). Trace elements in human nutrition and health, Technical Report Series Geneva (Switzerland)
- World Health Organization (2001). *Iron Deficiency Anaemia:Assessment, Prevention*

and Control. A Guide for Programme Managers. Document WHO/NHD/01.3. Geneva: WHO.

Wortley G, Leusner S, Good C, Gugger E, Glahn R. (2005). Iron availability of a fortified processed wheat cereal: a comparison of fourteen iron forms using an *in vitro* digestion/human colonic adenocarcinoma (Caco-2) cell model. *Br J Nutr.* , 93(1):65-71.

Yeung CK., Glahn RP., Miller DD. (2005). Inhibition of iron uptake from iron salts and chelates by divalent metals cations in intestinal epithelial cells. *J. Agric. Food Chem.* 53: 132-136.

Yi Z., Korenegay E., Ravindran V, Denbow D. (1996). Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values fo phytase. *Poultry Sci.* 75: 240-249.

Zerounian NR.; Linder MC (2002). Effects of copper and ceruloplasmin on iron transport in the Caco 2 cell intestinal model. *J. Nutr. Biochem.*, 13, n°3, pp: 138-148 .

Zhou R. J., Erdman J. (1995). Phytic acid in health and disease. *Critical reviews. Food Science and Nutrition*, 35(6), 495-508.

Zhu L, Glahn RP, Yeung CK, Miller DD. (2006). Iron Uptake by Caco-2 Cells from NaFeEDTA and FeSO(4): Effects of Ascorbic Acid, pH, and a Fe(II) Chelating Agent. *J Agric Food Chem.*, 54(20):7924-7928.

Zödl B., Sargazi M., Zeiner M., Roberts NB., Steffan I., Marktl W., Ekmekcioglu C. (2004). Toxicological effects of iron on intestinal cells. *Cell Biochemistry and Function*, (22): 143-147.

Zorov IN, Semenova MV, Tsurikova NV, Sinitsyn AP. (2005). Hydrolysis of wheat flour with amylase preparations and

individual enzymes. *Prikl Biokhim Mikrobiol.*,42(6):700-4.

Zyla K., Mika M., Gambus H., Nowotuy A., Szymczyk B (2005). Fungal phytases in wholemeal breadmaking I: 3-phytase a improves storage stability and *in vitro* digestibility of nutrients in wheat breads. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, vol. 8, iss. 4.