

**Dpto. de Bromatología y Tecnología de Alimentos**  
**Universidad de Córdoba**



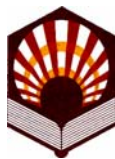
**BIODISPONIBILIDAD MINERAL DE  
MENÚ ESCOLARES**

**TESIS DOCTORAL**

**Fernando Cámara Martos**

Directores:  
**Dr. D. Manuel Ángel Amaro López**  
**Dra. D<sup>a</sup>. Reyes Barberá Sáez**

Córdoba, Junio de 2004



Dpto. Bromatología y Tecnología de los Alimentos  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**BIODISPONIBILIDAD MINERAL DE MENUS ESCOLARES**

Tesis presentada por  
D. Fernando Cámara Martos  
para optar al Grado de Doctor

Fdo.: Fernando Cámara Martos

V°B°  
El Director

V°B°  
El Director

Dr. Manuel Angel Amaro López

Dra. Reyes Barberá Sáez



Universitat de València

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT PÚBLICA

, BROMATOLOGIA, TOXICOLOGIA I MEDICINA LEGAL

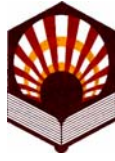
ÀREA DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

REYES BARBERÁ SÁEZ profesora titular del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA QUE: FERNANDO CÁMARA MARTOS, licenciado en Ciencias Químicas y Ciencia y Tecnología de Alimentos ha realizado, bajo su dirección y en los laboratorios del área, un trabajo que lleva por título **“Biodisponibilidad mineral de menús escolares”**, y autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado, en Córdoba, Junio de 2004.

Fdo: Reyes Barberá Saez



Prof. Manuel Ángel Amaro López  
Dpto. Bromatología y Tecnología de los Alimentos  
FACULTAD DE VETERINARIA  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

MANUEL ANGEL AMARO LÓPEZ profesor titular del  
Departamento de Bromatología y Tecnología de Alimentos de la  
Universidad de Córdoba

CERTIFICA QUE: FERNANDO CÁMARA MARTOS, licenciado en  
Ciencias Químicas y Ciencia y Tecnología de Alimentos ha realizado,  
bajo su dirección y en los laboratorios del área, un trabajo que lleva por  
título “**Biodisponibilidad mineral de menús escolares**”, y autorizan  
su presentación para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado, en  
Córdoba, Junio de 2004.

Fdo. Manuel Ángel Amaro López

*Todas las cosas que pasan en nuestra vida tienen un sentido. Todos los finales son también comienzos, lo que ocurre es que nunca lo sabemos en su momento.*

**Mitch Albom**

*A mi familia,  
por su constante apoyo*

## Agradecimientos

Los agradecimientos, aunque aparezcan al principio, son la parte final de una Tesis. Atrás quedan cuatro años de duro trabajo, de largas horas en el laboratorio y por supuesto, en mi caso, delante de un ordenador. Mucho más atrás, están los años de carrera universitaria. Así pues, cuando uno empieza a escribir estas líneas le vienen a la cabeza muchas personas con las que día a día has ido compartiendo tu trabajo y alguna que otra cosa más. Mi gratitud para todas ellas. Espero no olvidar a nadie.

A los directores de esta Tesis, Profesores Manuel Angel Amaro López y Reyes Barberá Sáez, al primero por la amistad compartida a lo largo de estos cuatro años, a la segunda, excelente investigadora y mejor persona, por ser una auténtica “mamá profesional” para todos los que hemos tenido la suerte de caer en su manos.

A todas las profesoras del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Valencia, Dras. Rosarura Farré, Amparo Alegría, M<sup>a</sup> Jesús Lagarda, Isabel Frasquet, Ana Frígola y M<sup>a</sup> Victoria Alonso, por toda su amabilidad, afecto y buen humor que han hecho que en su departamento me sintiera como en casa.

Al Prof. Rafael Moreno Rojas por su inestimable ayuda con la cámara de grafito y al resto de profesores del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba. Al Prof. Diego Santiago, maestro y amigo, por su gran apoyo en los años que precedieron a esta Tesis.

Con el mayor de los cariños a mis “compis” de despacho, Fernando y Antonio. Cuántos senderos y picachos habremos trepado juntos (con lipotimias y congelaciones en algunos emblemáticos). Por todo lo andado y lo que nos quede por recorrer, gracias por ser dos bellísimas personas. A Elena, porque siempre has tenido la capacidad de sacarme una sonrisa en mis momentos de máximo agobio, por todas nuestras parrafadas y por tu eterna simpatía. Junto a

ellos, al resto de compañeros de departamento, a los recién llegados y a los que ya se fueron, Jose María, Rafa, Rosa, Rocío, Giovanni, Beatriz, Nada, Olga, Cristina, Pino, Paco y Elena G, por todos los momentos compartidos dentro y fuera del trabajo.

A mis otros compañeros de fatigas, los de Valencia, con los que he pasado la otra mitad de esta Tesis. A las Dras. Viadel Crespo y Jovaní Duatis, es decir Blanqui y Moni, por su eterna paciencia conmigo en el manejo de los cultivos celulares, por toda la amistad que nos une y alguna que otra gala de Operación Triunfo (algún día ganaremos Eurovisión). A Moisés por toda su hospitalidad, los kilómetros de costa levantina recorridos y los arroces que nos hemos comido a orillas del Mediterraneo. A los Pacos (Ortega y Torregrosa) por los “breaks” laborales, a Meli, Pili, Lourdes, Clara, Sara y Lupe

A los Colegios Mayores Cardenal Cisneros, Albayzin y La Concepción, de las Universidades de Granada y Valencia, que con su espíritu y buen hacer han ido completando la otra cara de mi formación universitaria. A la ciudad de Granada a la que, por muchas razones, siempre llevo en el corazón.

Al jerezano Cristian por toda la amistad que nos une y aquellos emblemáticos viernes de tascas cordobesas. A esa panda de amigos, Andrés, Gabi, Esme, Marta, Laia, Henar, Mariano y Mariví, que de manera tácita se reúne verano tras verano en El Escorial para “emborracharse de cultura” y de algo más, haciendo menos insoportables los calores estivales.

A mis padres, Fernando y M<sup>a</sup> Carmen. La capacidad de trabajo y lucha de él y la humanidad y bondad de ella, sirven de modelo a imitar en mi vida diaria. Gracias por vuestra generosidad a la hora de darme una formación. A mi hermana Manmen y al resto de mi familia.

A mis amigos de siempre, los de Martos, y en particular a Jesús y Tomás, con los que me sigue uniendo un vínculo inquebrantable con el paso de los años.



Finalmente, al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por concederme una beca predoctoral FPU sin la cual no hubiera podido realizar esta Tesis.

# ÍNDICE

## I. Introducción

Evolución del consumo de alimentos: de la alimentación en el hogar a la restauración colectiva.....	1
Establecimientos de restauración colectiva.....	3
Comedores escolares.....	5
Variaciones en los contenidos de minerales de los alimentos.....	11
Concepto de biodisponibilidad.....	14

## II. Objetivos

Objetivos.....	17
----------------	----

## III. Unidad temática

Evaluación de la biodisponibilidad mineral.....	18
Métodos <i>in vivo</i> .....	18
Métodos <i>in vitro</i> .....	21
Cultivos celulares.....	22
Factores que influyen en la biodisponibilidad mineral.....	24
Factores fisiológicos o intrínsecos.....	25
Factores dietéticos o extrínsecos.....	26
Estimación <i>in vitro</i> de la biodisponibilidad mineral de menus escolares.....	37
Cultivos celulares.....	38
Aporte de los menús a la ingesta dietética diaria de elementos minerales.....	51

## IV. Metodología

Muestras.....	62
Determinación de proteínas.....	62
Determinación del contenido en humedad.....	63
Métodos <i>in vitro</i> de estimación de la biodisponibilidad mineral.....	64
Ensayo de diálisis.....	64
Ensayo de solubilidad.....	68
Preparación de la muestra previa a la adición de la monocapa celular.....	70
Ensayo de captación y transporte mineral con células Caco-2.....	73

Determinación del contenido mineral.....	77
Especiación de hierro en la fracción soluble.....	81

## **V. Resultados**

Influence of dietary factors on calcium bioavailability: a brief review.....	85
Nutritional aspects of zinc availability.....	105
Iron availability: an update review.....	132
Bioaccessibility of minerals in school meals. Comparison between dialysis and solubility methods.....	172
Speciation of bioaccessible (heme, ferrous and ferric) iron from school menus.....	205

## **VI. Discusión general**

Discusión general.....	225
------------------------	-----

## **VII. Conclusiones**

Conclusiones.....	247
-------------------	-----

## **VIII. Bibliografía**

Bibliografía.....	250
-------------------	-----

## **IX. Anexo**

Tabla de contenido en humedad y proteínas	
---	--

## I. INTRODUCCIÓN

## **I.1. Evolución del consumo de alimentos: de la alimentación en el hogar a la restauración colectiva**

La evolución de la alimentación a lo largo de la historia ha estado influenciada por cambios sociales, políticos y económicos. Los grandes viajes y descubrimientos contribuyeron a la diversificación de la dieta; pero al mismo tiempo, la abundancia o escasez de alimentos ha condicionado el desarrollo de los acontecimientos históricos.

Hasta hace unos años la ingesta de alimentos, se realizaba, principalmente, en el hogar y era la mujer la encargada de cocinar para toda la familia. Los alimentos utilizados para la elaboración de los platos no se elegían sino que se utilizaban aquellos al alcance de cada grupo familiar o población de acuerdo con el clima, condiciones del terreno, costumbres, etc, y tan solo cuando existía escasez en algún recurso alimentario esencial se trataba de localizar en otras poblaciones cercanas (Gracia, 1997).

La transformación, a finales del siglo XX, de una sociedad agrícola en una cada vez más industrializada, produce una serie de cambios en los estilos de vida y en lo que a la alimentación se refiere, una mayor tendencia a consumir alimentos con un cierto grado de elaboración y una mayor preferencia por comer fuera de casa.

En la última década ha emergido con fuerza una demanda de alimentación localizada fuera del hogar. El gasto que los consumidores dedican a la amplia variedad de actividades de restauración se está incrementando notablemente y, por ejemplo, mientras que a comienzos de la década de los noventa se dedicaba un 19% del gasto en alimentación a comer fuera de casa, en la actualidad este porcentaje se acerca al 30% (Martín Cerdeño, 2003).

En estos momentos, resulta evidente que el consumo de alimentos y bebidas fuera del hogar se ha incrementado notablemente, tanto en volumen como en gasto per cápita durante los últimos años. Entre los factores que producen este incremento podrían citarse la incorporación de la mujer al mundo laboral, la excesiva distancia entre el domicilio familiar y los centros de trabajo y una mejora en el nivel de vida.

Por otra parte, el número de miembros que forman el hogar también tiene una influencia favorable tanto en los gastos en comedor escolar como en otros servicios de restauración ya que un número elevado de miembros repercute de forma negativa para el gasto en comidas y cenas fuera del hogar (Martín Cerdeño, 2003). El descenso de la natalidad ocasionado en España en los últimos años, con una reducción del número de hijos por familia a 1, justifica aun más el aumento del gasto en restauración colectiva.

Con carácter general, un mayor poder adquisitivo en la familia, supone una mayor posibilidad de gastar en servicios de restauración. Así este hecho se

refleja en los gastos en: comedor escolar para las parejas que tienen dos hijos, comidas y cenas fuera del hogar en los hogares donde trabaja el cónyuge, comidas bonificadas en el lugar de trabajo en los hogares situados en municipios de hasta 10.000 habitantes o desayunos fuera del hogar cuando se habita en municipios con más de 500.000 habitantes (Martín Cerdeño, 2003).

## **I.2. Establecimientos de restauración colectiva**

Los establecimientos de restauración colectiva pueden clasificarse atendiendo a diferentes aspectos (Garmendia, 2003):

### **1. Por sus fines, con o sin ánimo de lucro:**

- *Restauración social:* proporciona comidas a colectividades, sin tener implícito un fin lucrativo (hospitales, asilos, escuelas, etc).
- *Restauración comercial:* lleva a cabo el suministro de comidas a colectividades, pero con finalidad lucrativa, promocionadas por empresas de restauración.

### **2. Por la concepción de sus planteamientos:**

- *Tradicional:* responde a un concepto clásico del consumo de comidas fuera del hogar (restaurantes, mesones, cafeterías, bares, casas de comidas, tascas, etc).
- *Neo-restauración:* sistemas innovadores que procuran responder a una concepción evolutiva del consumo de comidas fuera del hogar. Sus instalaciones varían con la oferta comercial y procuran

adecuarse a los gustos y necesidades culinarias de la sociedad moderna (hamburgueserías, pizzerías, bocadillerías, croasanterías, etc).

- *Restauración complementaria:* implica el consumo de comidas en un lugar cuyo primer fin no es éste (comedor de hoteles, servicio de comidas aereo, marítimo y ferroviario, discotecas, etc).

**3. Por la localización de la cocina que elabora los platos cocinados:**

- *Integradas:* disponen de espacio culinario propio, adyacente al comedor donde se sirven los platos cocinados.
- *Cocinas centrales:* las operaciones más importantes (aprovisionamientos, preparaciones previas y operaciones culinarias) se centralizan en unidades de trabajo con carácter industrial. De estas cocinas se reparte a comedores satélites o terminales.

**4. Por el tiempo transcurrido desde la elaboración del plato hasta su consumo:**

- *Directa:* no existe un hueco temporal entre el proceso de cocinado y su servicio en caliente.
- *Diferida:* tras la preparación del plato cocinado, se mantiene un periodo de tiempo más o menos prolongado hasta su servicio. Durante dicho tiempo el mantenimiento del plato se puede desarrollar:
  - En caliente, a elevada temperatura para evitar el crecimiento de microorganismos.



- Bajo refrigeración, por debajo de los 3° C, para evitar el desarrollo de esporas de *Clostridium botulinum* y es necesario un calentamiento posterior al menos a 65° C antes de su consumo.
- Congelado, los alimentos se congelan a –20° C, se almacenan a –18° C, para después descongelarlos y calentarlos hasta un mínimo de 65° C antes de ser servidos.

### I.3. Comedores escolares

La población infantil también se ha integrado en las nuevas formas de organización alimentaria en las que la comida tradicional en casa se sustituye por la comida fuera del hogar y, en su caso, por la de los comedores escolares. Estos desempeñan un papel muy importante dentro de los establecimientos de restauración colectiva, además de por su número, por su importante función sanitaria y social, mereciendo una atención especial.

Los comedores escolares influyen notablemente en el establecimiento de unos adecuados hábitos alimentarios en el niño. En la infancia, el niño entra en contacto con la sociedad en diversos aspectos y especialmente en el alimentario. Se producen influencias evidentes por parte de otros componentes de la familia, sus propios amigos, y se le ofrecen alimentos, en muchas ocasiones, lejos de los patrones alimenticios recomendados (dulces, helados, golosinas...), lo que puede afectar significativamente a su comportamiento alimentario.

Entre los escolares son similares los patrones de ingesta alimentaria y de nutrientes y, de forma individual, se establecen los hábitos, gustos y desagrados, muchos de los cuales van a persistir durante el resto de sus vidas. Los programas de alimentación escolar pueden tener una influencia significativa sobre la ingesta nutricional, especialmente en cuanto se refiere a la cantidad y tipo de alimentos, por lo que la alimentación por esta vía tiene relevancia y repercusiones posteriores en la vida del niño.

Es responsabilidad de los padres, asegurarse de que el funcionamiento del comedor escolar se ajusta a lo estipulado por ley. En este sentido, el comedor escolar es un servicio educativo que debe complementar la labor de la escuela y cuyos objetivos a conseguir deben ser (López Nomdedeu, 2002):

- desarrollar hábitos alimentarios adecuados en el alumnado a través de una oferta de menús equilibrados nutricionalmente
- enriquecer la capacidad de adaptación del niño hacia una variedad de alimentos para que adquiera una postura de “*comer de todo*”
- fomentar una disciplina en el acto de comer que incluya el compañerismo, el respeto y la tolerancia con el resto de comensales
- garantizar una dieta sana y rica que favorezca la salud y el crecimiento
- favorecer la continuidad de la jornada escolar con actividades complementarias y extraescolares

- contribuir a la organización de la vida familiar cuando el padre y la madre trabajan

La dieta de los españoles se ha basado tradicionalmente en el consumo de alimentos que en la actualidad se consideran pueden actuar en aspectos preventivos de muchas enfermedades crónicas; incluye alimentos como cereales, legumbres, aceite de oliva, patatas, frutas y hortalizas de temporada, huevos, pescado y vino; con un moderado consumo de carne y leche. Esta dieta responde a lo que se considera “saludable” (Castillo y León, 2002).

Sin embargo, en los últimos 20 años se han producido cambios en la dieta de gran relevancia. El consumo de carne y productos cárnicos, así como el de la leche y derivados ha crecido de forma rápida, duplicando la ingesta de grasa animal. Al mismo tiempo se ha incrementado drásticamente el consumo de productos de elevada elaboración industrial, como los destinados a aperitivos, postres, alimentos precocinados o listos para servir, bollería y pastelería. Estos productos originan un mayor aporte de sal, grasas saturadas y azúcares. En sentido inverso, productos tradicionales en la dieta como el pan, arroz, legumbres, patatas, etc., disminuyen en su consumo (Briones, 1989).

El menú escolar representa entre un 30-35% del valor calórico total diario y no deben faltar una serie de alimentos necesarios para el desarrollo corporal del niño y para la adquisición de buenos hábitos alimentarios. Se ha de potenciar los platos de legumbres, cereales, verduras o ensaladas como

primer plato, fruta fresca de postre, y pescado bajo distintas formas de cocinado.

La comida del mediodía constituye la más importante del día, de ahí la trascendencia de que los menús escolares se compongan de platos que, además de resultar agradables para niños y adolescentes, no olviden los criterios nutritivos. No sólo se trata de propiciar un buen rendimiento escolar, sino también de educar a los más jóvenes en hábitos alimentarios correctos que les permita disfrutar con una amplia gama de alimentos saludables y ayude a evitar enfermedades como obesidad, caries y problemas cardiovasculares.

Entre las principales recomendaciones que se pueden establecer a la hora de elaborar un menú escolar podemos citar:

- promover el consumo de alimentos ricos hidratos de carbono complejos y fibra (cereales, legumbres y vegetales) favoreciendo las combinaciones de estos grupos de alimentos (ej: garbanzos con arroz, lentejas con arroz, etc)
- aumentar el consumo de pescado como fuentes de proteínas animales debido a que su grasa es más saludable que la de las carne y eliminar en esta última la grasa visible (rica en colesterol y ácidos grasos saturados)
- no cocinar con mucha sal

- incluir en platos con gran aceptación por parte de los niños (croquetas, empanadillas, filetes) una guarnición de verduras ya que es más fácil que se la coman
- evitar el consumo de alimentos precocinados y fáciles de preparar
- evitar la monotonía y favorecer el consumo en grupo de los alimentos ya que el niño se estimula a comer cuando el resto de sus compañeros lo hacen
- fomentar el consumo de fruta en el postre desplazando a las golosinas, bollería industrial y postres lácteos muy azucarados.

Una dieta equilibrada evitará los problemas más frecuentes, en este periodo de la vida del niño relacionados con la nutrición que son:

- sobrepeso/obesidad por ingesta inadecuada o elevada de alimentos y ejercicio físico escaso.
- inapetencia y desinterés hacia la comida provocada en ocasiones por problemas al margen de la alimentación: dificultades de relación, problemas escolares, inadecuada organización familiar, etc.
- pérdida del apetito por comidas irregulares, abuso de determinado tipo de alimentos: exceso de dulces, golosinas, refrescos, etc.
- número limitado de alimentos y rechazo de comidas para él poco conocidas, calificándolas de raras.
- gusto por alimentos pastosos, feculentos, de sabores muy acentuados: dulces o salados.

- desayuno insuficiente y comida del mediodía más abundante de lo razonable para compensar, de forma instintiva, la baja ingesta alimentaria de las primeras horas de la mañana.

En los últimos años han aumentado el número de voces críticas respecto a la alimentación que se ofrece los comedores escolares, una queja muchas veces justificada debido a la falta de consenso y regulación que hay en este ámbito. Por el momento, no existe en nuestro país una ley que estipule claramente que clases de menús deben elaborarse en los colegios, aunque algunas autonomías han comenzado a aprobar normativas en asuntos referentes a la higiene y distribución.

Las únicas leyes sobre comedores escolares en España se limitan a definir aspectos básicos como que el personal de cocina esté cualificado, que se revise de forma periódica la fecha de caducidad de los productos o que el menú sea el mismo para profesores y alumnos (a no ser que alguien necesite un menú especial por circunstancias excepcionales). Sin embargo, los expertos en nutrición creen que estas medidas son insuficientes, ya que en muchos centros el menú es excesivamente alto en grasas, azúcares sencillos y sal. Por esta razón, proponen que el Gobierno obligue a que en todas las escuelas se sirva una dieta sana y equilibrada (Alimentaria, 2004).

Junto a los carbohidratos, grasas y proteínas, otros nutrientes como determinados minerales y vitaminas necesitan ser aportados en una adecuada cantidad para un correcto crecimiento y desarrollo fisiológico. Las vitaminas y

los minerales son sustancias imprescindibles para el buen funcionamiento del organismo en todas las etapas de la vida y, de forma especial en la edad infantil y escolar, ya que intervienen en numerosas reacciones metabólicas y, aunque se necesitan en baja cantidad, es recomendable que se aporten a través de los alimentos.

El contenido de micronutrientes en los alimentos depende de diversos factores entre los que cabe mencionar la manipulación y los procesos de elaboración de los mismos. Así, los métodos de cocinado, el almacenamiento y el transporte hasta el lugar de consumo desde las empresas de catering pueden modificar el valor nutritivo de los alimentos preparados sensiblemente (British Nutrition Foundation, 1987).

Debido a la enorme importancia de las vitaminas y minerales en el periodo de crecimiento del niño, es imprescindible controlar el aporte de éstos en la dieta y por tanto, en el comedor escolar donde realizan la principal comida del día.

#### **I.4. Variaciones en los contenidos de minerales de los alimentos**

El cocinado de los alimentos origina pérdidas de minerales (Yakushiji y Kagawa, 1975; Kimura e Itokawa, 1990). Se han señalado pérdidas de Na, K, P, Ca, Mg, Fe. Zn, Cu y Mg del 30-40% en diferentes alimentos antes y

después de ser cocinados, siendo especialmente importantes en los vegetales sometidos a cocción por pérdidas por solubilización en el agua de cocción.

Una alternativa para evitar esta pérdida de minerales producida en el proceso de cocción de los vegetales consiste en consumir este caldo como sopa ó utilizarlo en la elaboración de otros platos. También la adición de una pequeña cantidad de sal en el proceso de cocción (en torno al 1% de NaCl) reduciría estas pérdidas. Finalmente la cocción con vapor de agua reduce los fenómenos de osmósis de manera significativa disminuyendo las pérdidas de vitaminas y minerales.

El asado, cocción de un alimento en su propia grasa, y la fritura, cocción total por inmersión en un cuerpo graso caliente favorece la conservación de los principios nutritivos al formarse una costra protectora en la superficie, concentrando los minerales en el interior del alimento y evitando su transferencia al exterior (Cervera et al., 1993).

También el procesado puede modificar las distintas formas químicas de los minerales presentes en los alimentos. Este hecho es especialmente importante en el caso del hierro donde las transformaciones por el procesado, de hierro hemo en no hemo, implica diferencias en su absorción. Diferentes estudios han mostrado como el cocinado (Lombardi-Boccia et al., 2002b), congelación (Gómez-Basauri y Regenstein, 1992a) y almacenamiento (Gómez-Basauri y Regenstein, 1992b) incrementan el contenido de hierro no hemo en



detrimento del hemo en carne y pescado, como consecuencia de la desnaturalización proteica.

El empleo de sartenes de hierro y acero proporciona a los alimentos cocinados en ellas un mayor contenido en este elemento, siendo tanto mayor cuanto el contenido en humedad del alimento es más elevado y su pH más ácido (Brittin y Nossaman, 1986; Zhou y Brittin, 1995). Kollipara et al. (1996) ponen de manifiesto que 12 de 14 alimentos cocinados con utensilios metálicos contienen una concentración final de hierro superior a los preparados en contacto con vidrio, pudiendo incrementarse de esta forma la ingesta mensual de hierro hasta un 374%. Recientemente, Kumari et al. (2004) han demostrado como el cocinado de vegetales de hojas verdes en utensilios de hierro aumenta no solo el contenido en este elemento sino también su biodisponibilidad frente a otros utensilios como aluminio y acero inoxidable.

Como consecuencia de todo lo anterior, a la hora de calcular en una dieta los aportes de minerales, pueden ser numerosas las fuentes de error si no se tienen en cuenta determinados aspectos. Diversos estudios han puesto de manifiesto, con determinados elementos minerales presentes en distintos tipos de dietas, las diferencias existentes entre los valores analizados en laboratorio y los valores calculados mediante el uso de tablas de composición de alimentos (Hakala et al., 1996; Panwar y Punia, 2000).

Aunque el empleo de tablas de composición puede resultar de utilidad a la hora de diseñar un menú escolar con aportes adecuados minerales, el uso

exclusivo de estas bases de datos no es suficiente, ya que muchos de los contenidos que aparecen son datos para alimento crudo, mientras que en las dietas los alimentos son parcial ó completamente cocinados y en consecuencia las pérdidas nutritivas debido a la preparación y procesado no son tenidas en cuenta en muchos casos.

### **I.5. Concepto de biodisponibilidad**

Junto a las modificaciones producidas en el contenido mineral de los alimentos a consecuencia del procesado y cocinado de estos, otro aspecto a tener en cuenta a la hora de estimar los aportes de micronutrientes es que no todo el contenido de éste presente en la dieta va a ser eficientemente absorbido y utilizado surgiendo así el concepto de biodisponibilidad.

El concepto de biodisponibilidad se desarrolló a comienzos de los años 60 a partir de estudios farmacológicos que demostraban que un principio activo formulado en diferentes productos farmacéuticos podría no tener las mismas propiedades farmacológicas y/o toxicológicas aún cuando fueran administrados en el mismo régimen terapéutico.

Trasladando este concepto al campo de la nutrición, la biodisponibilidad se define como la fracción de nutriente que se digiere, absorbe y metaboliza por vías normales (Fairweather-Tait, 1987) ó como el porcentaje de nutriente capaz de ser absorbido y disponible para ser almacenado (Bender, 1989). Ekmekcioglu (2000) define la biodisponibilidad como la proporción de un

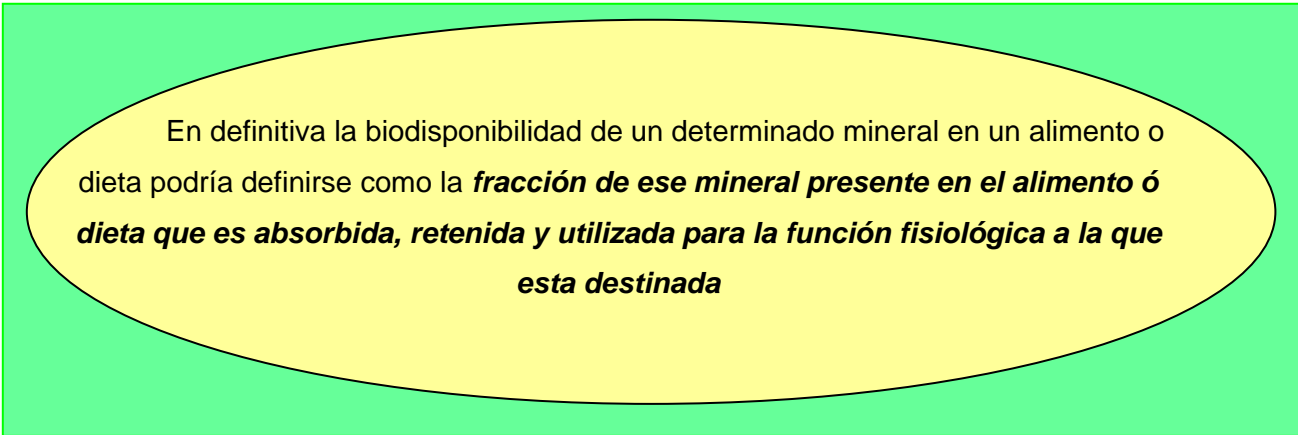
mineral ó elemento traza presente en un alimento, comida o dieta que es utilizada para una función fisiológica normal. Bocca et al. (1984) indican que es la relación entre la cantidad de mineral que, tras ser absorbida, ejerce su efecto en el organismo y la cantidad ingerida.

Puede observarse a raíz de las definiciones anteriores que la biodisponibilidad mineral es el resultado final de tres procesos (Watzke, 1998):

- -disponibilidad en el lumen intestinal para absorción
- absorción y/o retención por el organismo
- y, finalmente, utilización por el organismo del elemento absorbido

La evaluación completa e ideal de la biodisponibilidad de un elemento mineral en una dieta o alimento incluirá: la determinación de su contenido total, una estimación de la fracción del total que se halla en forma absorbible (máximo teórico), la cantidad real absorbida y finalmente el porcentaje que es utilizado por el organismo (Southon et al., 1988).

En la Unidad Temática se expondrá detalladamente como la biodisponibilidad mineral va a estar condicionada por multitud de factores fisiológicos y dietéticos, como pueden ser el status del propio individuo, la edad, el tipo de alimento en el que está presente el mineral e, incluso, las propias interacciones entre minerales (Rossander-Hulten et al., 1991; Hallberg et al., 1991) y entre éstos y otros nutrientes (García-Casal et al., 1998; Sandström, 2001).



En definitiva la biodisponibilidad de un determinado mineral en un alimento o dieta podría definirse como la ***fracción de ese mineral presente en el alimento ó dieta que es absorbida, retenida y utilizada para la función fisiológica a la que esta destinada***

## II. OBJETIVOS

El objeto del estudio de esta Tesis Doctoral es estimar la biodisponibilidad "*in vitro*" de calcio, hierro, cinc y cobre en platos habitualmente incluidos en la planificación de menús escolares, utilizando distintos criterios de valoración de la biodisponibilidad mineral como son solubilidad, diálisis y captación y transporte con células Caco-2. Se plantean los siguientes objetivos:

Primero.- **Revisión bibliográfica de los factores dietéticos que afectan a la biodisponibilidad de calcio, hierro, zinc y cobre.**

Segundo.- **Estudio de la biodisponibilidad mineral de los menús escolares mediante ensayos de solubilidad y diálisis.**

Tercero.- **Desarrollo de un método analítico para determinar las diferentes formas químicas de hierro en la fracción soluble de los platos.**

Cuarto.- **Evaluación de la biodisponibilidad mineral de los menús escolares mediante ensayos de captación y transporte con células Caco-2.**

Quinto.- **Valoración nutricional de los aportes minerales de los menús escolares en función de su biodisponibilidad.**

### III. UNIDAD TEMÁTICA

### III.1. EVALUACION DE LA BIODISPONIBILIDAD MINERAL

Para estimar la cantidad de minerales que aportan los alimentos no basta con conocer el contenido total presente en ellos sino que es necesario saber la fracción de éste que se absorbe y utiliza por el organismo, es decir, su biodisponibilidad (Barberá y Farré, 1992). Los métodos utilizados para la determinación de la biodisponibilidad mineral se dividen en dos grandes grupos: métodos *in vivo* (con seres humanos o animales) e *in vitro*.

#### **Métodos *in vivo***

En los seres humanos, el método del *balance químico* fue el primero en utilizarse antes de que el uso de radioisótopos fuera introducido y consiste en evaluar la diferencia entre la cantidad ingerida y excretada de un determinado mineral durante un cierto periodo de tiempo (Van Campen y Glahn, 1999). Este método se ha utilizado para el estudio de la biodisponibilidad de calcio, hierro (Rosado et al., 1992), cinc (Vijay y Kies, 1994) y cobre (Kies y Harms, 1989). Como ventaja señalar la no exposición de los sujetos a radiaciones ionizantes y su fácil realización. Sin embargo, en la práctica, errores en la determinación de la cantidad ingerida o excretada pueden ocasionar errores significativos en la estimación de la absorción (Van Campen y Glahn, 1999). Uno de los principales inconvenientes de la técnica radica en diferenciar en la muestra de heces, el elemento no absorbido de origen dietético del procedente de la excreción endógena.



Los *isótopos radioactivos* han sido ampliamente utilizados para la determinación de la biodisponibilidad mineral y presentan como principal ventaja que, al suministrar dos isótopos radioactivos de un mismo elemento, uno por vía oral y otro por vía parenteral, puede determinarse la excreción endógena. Además, la cantidad de elemento que es absorbida ó retenida generalmente no se afecta por la contaminación. Sin embargo, aunque no se dispone de pruebas de que las radiaciones ionizantes a las dosis que se aplican en los ensayos provoquen efectos perjudiciales en el hombre, existe una comprensible cautela al uso de isótopos radioactivos en ciertos grupos de población como niños y mujeres embarazadas (Barberá y Farré, 1992).

Frente a los isótopos radioactivos, los *isótopos estables* no presentan ningún riesgo para la salud a consecuencia de las radiaciones ionizantes y además no sufren decaimiento por lo que las muestras marcadas pueden ser almacenadas indefinidamente. Estudios con  $^{57}\text{Fe}$  y  $^{58}\text{Fe}$  han sido utilizados recientemente para evaluar la influencia del ácido ascórbico sobre la biodisponibilidad de hierro en mujeres (Fidler et al., 2003; Díaz et al., 2003). Sin embargo, estos estudios no se hallan exentos de inconvenientes. En primer lugar, los isótopos estables son más caros y además las dosis necesarias para obtener un adecuado enriquecimiento con un isótopo estable pueden ser demasiado elevadas para ser considerado un marcador (Weaver, 1998).

Otro aspecto a tener en cuenta en la utilización de isótopos radioactivos o estables es la forma de marcaje del elemento, extrínseca ó intrínseca. En determinados estudios con alimentos individuales se utiliza el marcaje

intrínseco. Para un alimento de origen vegetal éste supondría la incorporación del isótopo del elemento a una solución hidropónica en la que la planta esté creciendo, añadirlo al suelo ó inyectarlo sobre la raíz de la planta. Para obtener alimentos de origen animal intrínsecamente marcados, el isótopo es usualmente suministrado por vía intravenosa ya que es un camino más efectivo que la vía oral a través de la alimentación. Aunque con el marcaje intrínseco el elemento en cuestión es incorporado al alimento como ocurriría de forma natural, éste no permite la determinación de la biodisponibilidad mineral de comidas completas. Así surge el concepto de marcaje extrínseco, más sencillo y barato que el anterior, mediante el cual el isótopo es añadido directamente a la comida completa ó a uno de sus componentes mayoritarios (Cook et al., 1972).

Aunque lo ideal sería la realización de estudios *in vivo* con humanos, el uso de modelos animales para predecir la biodisponibilidad es más práctico que los estudios en seres humanos con isótopos ya que los ensayos clínicos son caros, laboriosos y difíciles de llevar a cabo con precisión (Forbes et al. 1989). Además, proporcionan datos limitados en cada experimento y requieren amplias precauciones y material sofisticado, que sólo está al alcance de escasos laboratorios. Por tanto, junto a los estudios *in vivo* en humanos, los que utilizan animales de experimentación están sujetos a menores limitaciones. El principal problema de este tipo de ensayos radica en el hecho de que los resultados obtenidos no siempre son extrapolables debido a las diferencias existentes entre el metabolismo de los animales y el hombre.

## **Métodos *in vitro***

Una alternativa a los estudios *in vivo* con humanos o animales son los estudios *in vitro*. Frente a los *in vivo*, este tipo de métodos son más rápidos, sencillos y de menor coste económico. La estimación *in vitro* de la biodisponibilidad de elementos minerales implica una digestión gastrointestinal simulada del alimento con pepsina-HCl a pH 2 y pancreatina-sales biliares a pH neutro y posterior medida de la fracción de elemento soluble o que dializa a través de una membrana semipermeable con un determinado tamaño de poro. Estos métodos se basan en que la premisa que debe cumplir un mineral para ser absorbido es estar en forma soluble. Se clasifican en dos grupos según se determine la fracción soluble o la fracción de ésta que dializa:

### 1.- Métodos basados en la solubilidad

Determinan la cantidad de elemento soluble presente en el sobrenadante obtenido por centrifugación (Crews et al., 1983; Sauquillo et al. 2003;) ó filtración (Naransinga Rao y Prabhavathi, 1978) del digerido gastrointestinal del alimento.

### 2. Métodos basados en la dializabilidad

Incorporan una membrana de diálisis durante el proceso de digestión gastrointestinal para simular una difusión pasiva a través de la mucosa intestinal. Los métodos *in vitro* basados en la dializabilidad del elemento difieren de aquellos basados en la solubilidad en que incorporan un paso de difusión pasiva que permite diferenciar entre compuestos solubles de alto y bajo peso molecular (Hazell y Johnson, 1987). A su vez, en los procedimientos

de diálisis el mineral dializado puede medirse en equilibrio (Miller et al. 1981; Keane et al. 1988) o en continuo (Minihane et al. 1993; Wolters et al. 1993; Shen et al., 1994).

Aunque estos métodos sólo estiman la fracción soluble/dializable de elemento disponible para la absorción y por tanto sólo el primer paso del proceso *in vivo* es tenido en cuenta, son ampliamente usados por su buena correlación con estudios *in vivo* (Roig et al., 1999; Wienk et al., 1999). Los resultados de estos modelos deben tomarse como índices relativos de la biodisponibilidad, proporcionando datos que permiten establecer tendencias, comparaciones y determinar el efecto causado por diferentes factores sobre la biodisponibilidad mineral (Azenha y Vascondeclos, 2000).

En el presente trabajo se utiliza la solubilidad y la dializabilidad como criterios evaluadores de la biodisponibilidad mineral de diferentes platos consumidos en un comedor escolar.

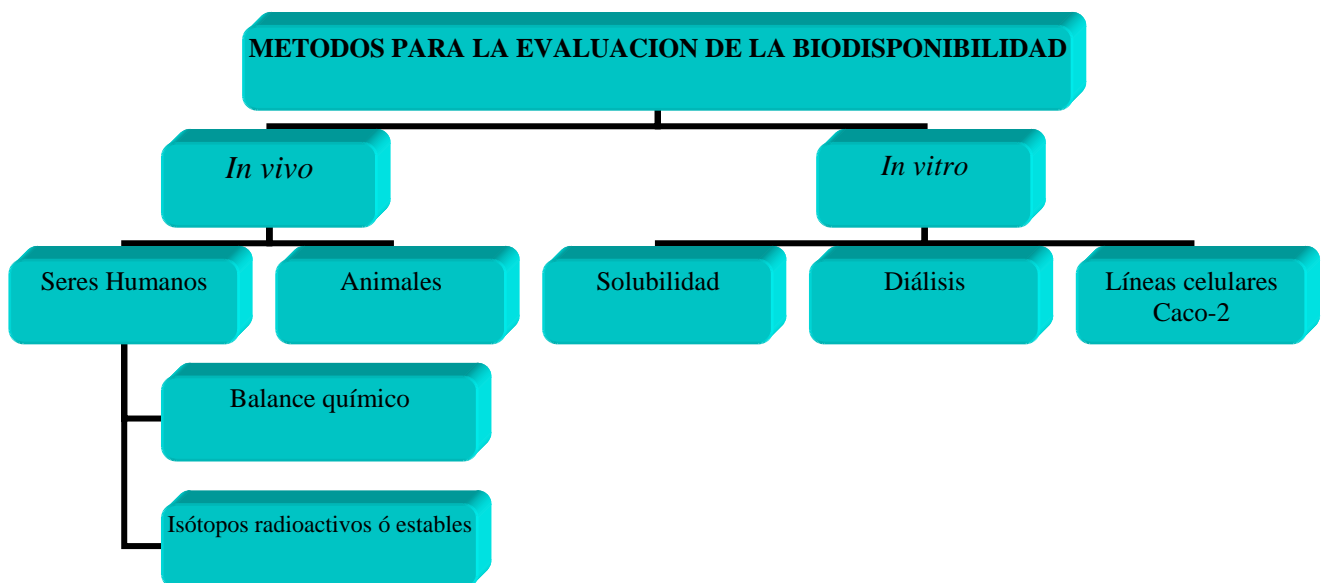
### **Cultivos celulares**

Aunque la estimación de la biodisponibilidad basada en la cantidad de mineral soluble o dializable puede ser útil en muchas ocasiones, no todo el mineral soluble o dializado es absorbido. Los sistemas mencionados carecen de un componente vivo y éste es necesario para una determinación real de la disponibilidad mineral. En un esfuerzo por desarrollar métodos *in vitro* basados tanto en la solubilidad como en la dializabilidad pero que incluya el paso de absorción, se han desarrollado técnicas que utilizan cultivos celulares. La línea

más utilizada son las células Caco-2 procedentes de adenocarcinoma de colon humano, que han demostrado poseer características morfológicas y funcionales similares al enterocito maduro.

En la figura 1 se muestra el organigrama de una clasificación general de los métodos *in vivo* e *in vitro* utilizados para la determinación de la biodisponibilidad mineral.

Figura 1.- Métodos de estimación de la biodisponibilidad mineral

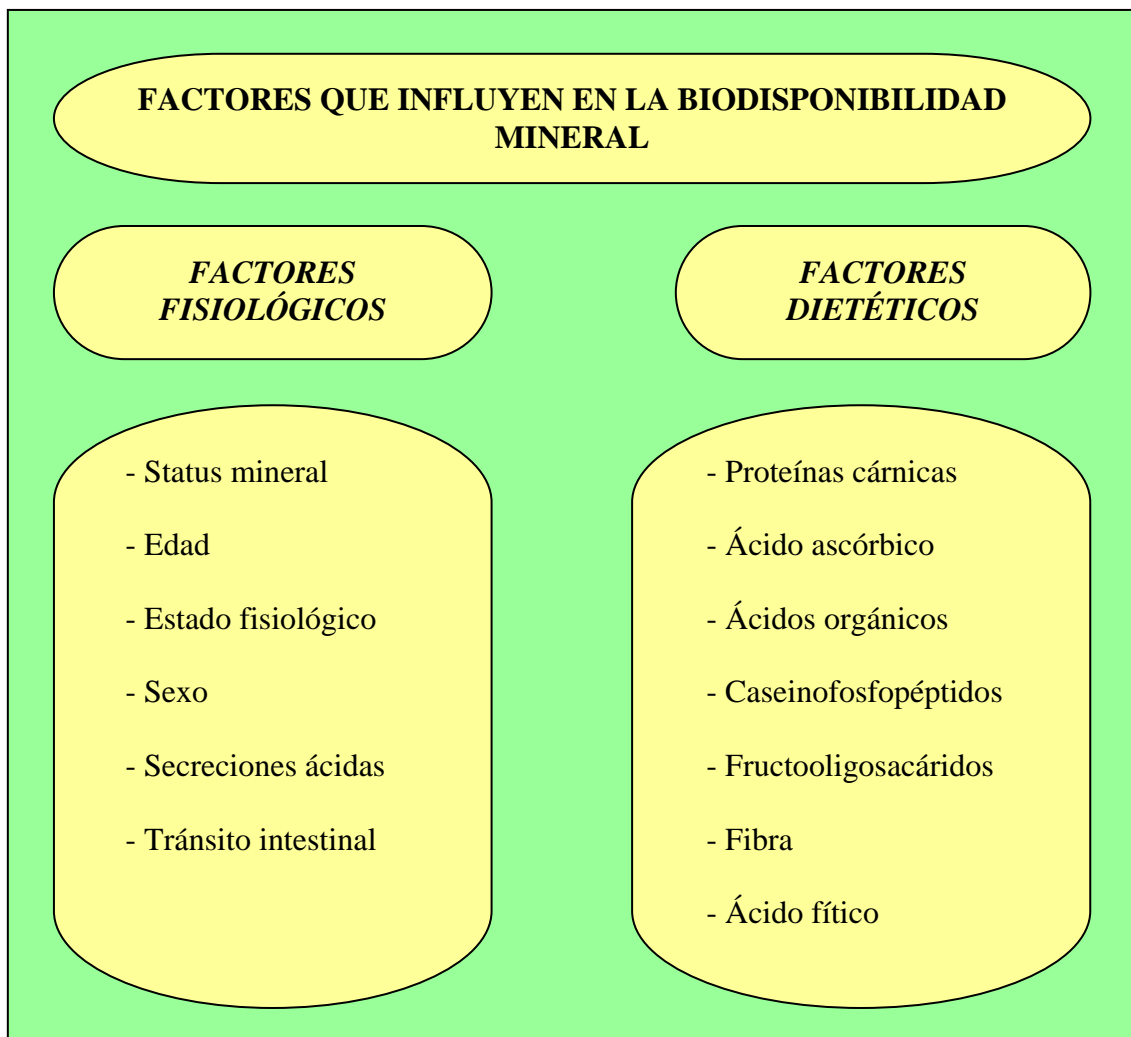


En el último punto de esta unidad se tratarán más ampliamente los cultivos celulares, al constituir la utilización de un sistema combinado digestión *in vitro*-cultivo celular, la tercera técnica por la que se evalúa la biodisponibilidad de los menús escolares de esta Tesis.

### III.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIODISPONIBILIDAD MINERAL

Son numerosos los parámetros que influyen en la absorción de los elementos minerales, incrementándola o inhibiéndola, siendo sus efectos acumulativos, de ahí la complejidad de estas interacciones (Fairweather-Tait, 1996). Los factores que influyen en la biodisponibilidad de los nutrientes, y en concreto de minerales, se clasifican en dos grandes grupos: factores de tipo intrínseco ó fisiológico y de tipo extrínseco ó dietético (figura 2).

Figura 2.- Factores que influyen sobre la biodisponibilidad mineral



## FACTORES FISIOLÓGICOS O INTRÍNSECOS

### **Status**

El status de un mineral en el organismo es uno de los factores fisiológicos más importantes que afectan a su absorción. Así, la absorción de hierro aumenta en estados de depleción de este elemento y algunos estudios han mostrado una buena correlación entre absorción y reservas corporales de hierro (Bothwell et al., 1979; Cook, 1990). En el caso de cinc, estudios realizados en niños con isótopos estables han demostrado que el porcentaje de cinc absorbido es superior en niños con un menor status en este elemento (Ziegler et al., 1989).

### **Estado fisiológico, edad y sexo**

Cualquier tipo de situación o enfermedad que cause anomalías en las células de la mucosa intestinal puede afectar a la absorción mineral. Por contra, la absorción de elementos minerales es aumentada en aquellas etapas de la vida en las que los requerimientos nutricionales son máximos (infancia, embarazo, lactancia). Así, se ha observado por diversos investigadores (Moser-Veillon et al., 1996; Fung et al., 1997) un incremento en la absorción de cinc durante la lactancia para compensar las pérdidas producidas a través de la leche materna. De igual modo, la absorción de cobre es elevada durante la infancia y disminuye en personas ancianas (Ekmekcioglu, 2000).

### **Secreción ácida y tiempo de tránsito intestinal**

Existe una menor absorción de hierro en pacientes con aclorhidria con respecto a sujetos que tienen una secreción ácida normal. Aunque el

mecanismo mediante el cual el jugo gástrico influye en la absorción de hierro no está bien clarificado, parece que un componente del jugo gástrico o bien el propio medio ácido producido durante la digestión, produciría una mejora en la absorción de hierro. Por otro lado el tiempo de vaciado gástrico y de tránsito intestinal podría determinar la especies minerales que son formadas durante la digestión y la solubilización de las mismas. En general, un mayor tiempo de contacto de los minerales en el tracto gastrointestinal facilita la solubilización y posterior absorción (Benito y Miller, 1998).

### **FACTORES DIETÉTICOS O EXTRÍNSECOS**

Existen numerosos trabajos sobre la influencia de los componentes de la dieta sobre la biodisponibilidad de los elementos minerales. Algunos de ellos como el ácido ascórbico tienen un efecto promotor sobre la biodisponibilidad de hierro pero ejercen un efecto negativo sobre la de cobre. Otros, como las proteínas aumentan la biodisponibilidad de hierro y cinc y no ejercen ningún efecto sobre la de calcio. Por esta razón, se estima más conveniente revisar la influencia de estos factores para cada uno de los minerales objeto de estudio por separado.

#### **Calcio**

El calcio es esencial para un apropiado desarrollo, mineralización y mantenimiento de la masa ósea. Además, en los últimos años diversas investigaciones han demostrado que una cantidad apropiada de calcio a través de la dieta está relacionada con una reducción en el riesgo de padecer



osteoporosis, hipertensión y cáncer (Allender et al., 1996; Cumming et al., 1997; Kelloff et al., 2000). Una adecuada ingesta de calcio durante la infancia está asociada con un incremento en el pico de masa ósea durante la adolescencia, con el consiguiente menor riesgo de fracturas, una reducción del desarrollo de células precancerosas en la mucosa del colon y del cáncer de mama y un retraso en la prevalencia de osteoporosis y altas presiones sanguíneas en la etapa adulta.

Existen diversos factores que afectan a la biodisponibilidad del calcio. Algunos compuestos como lactosa y caseinofosfopéptidos, procedentes de la digestión de la caseína de la leche, parecen mejorar la absorción de calcio. Otros como el ácido fítico tienen un claro efecto inhibitorio. Con el objeto de estudiar con mayor profundidad los factores dietéticos que influyen en la biodisponibilidad de calcio se realiza la siguiente revisión bibliográfica:

<p>Cámara-Martos, F. and Amaro-López, M.A. (2002). <b>Influence of dietary factors on calcium bioavailability: a brief review.</b> <i>Biological Trace Element Research</i>, <b>89</b>, 48-56</p>
---

## Cinc

El cinc es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo ya que juega un importante papel en la expresión génica, crecimiento y diferenciación celular y respuesta inmune (Hambidge, 2000). Actúa como cofactor de más de 300 enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas (Salgueiro et al., 2002) y es un nutriente crítico para el desarrollo

del sistema nervioso central (Sandstead, 2000). La deficiencia en cinc es un problema nutricional bastante común en países desarrollados y en vías de desarrollo; en la infancia, produce serias consecuencias para la salud como retraso en el crecimiento, un incremento de las enfermedades infecciosas y una alteración de la función cognitiva (Rosado, 1998).

Los alimentos más ricos en cinc son la carne y productos cárnicos constituyendo además una buena fuente de cinc biodisponible. Sin embargo las interacciones con otros elementos como hierro, cobre y calcio, así como otros componentes de la dieta van a condicionar la biodisponibilidad de este elemento. Por todo ello se estima de interés realizar una revisión bibliográfica de los estudios realizados hasta el momento.

Cámara, F. and Amaro, M.A. (2003). **Nutritional aspect of zinc availability.** *International Journal of Food Science and Nutrition*, **54**, 143-151

## Hierro

De entre todos los micronutrientes minerales el hierro ha sido el más ampliamente estudiado. Se trata de un elemento esencial para los organismos vivos. En el hombre, la principal función fisiológica es la de forma parte de la mioglobina y hemoglobina participando en los procesos de transferencia de electrones de la cadena respiratoria (Aranda y Llopis, 1993). La deficiencia en hierro es un serio problema de salud y afecta a una gran parte de la población mundial (WHO, 1992). Un pobre status de hierro ha sido asociado con una disminución en la productividad laboral (Scholz et al., 1997) y una reducción en

el desarrollo cognitivo (Scrimshaw, 1991). La deficiencia en hierro y sus efectos sobre la función neurofisiológica y cerebro ha sido bien documentada (Sandstead, 2000). En este sentido, una mejora en la memoria y el aprendizaje verbal en niñas escolarizadas deficientes en hierro se ha relacionado con una suplementación en este elemento (Bruner et al, 1996).

El status nutricional de hierro de un individuo ó grupo de población va a ser función de la cantidad de hierro presente en la dieta, de la biodisponibilidad del mismo y de las pérdidas fisiológicas de este elemento. Aunque son varios los factores responsables de la deficiencia en hierro, en ocasiones este problema nutricional, sobre todo en países desarrollados, es debido a una baja biodisponibilidad de este elemento en la dieta. Muchos alimentos que aparentemente son buenas fuentes de hierro presentan por el contrario una baja biodisponibilidad.

Entre los factores que aumentan la biodisponibilidad de hierro se encuentran la presencia de proteínas cárnicas, ácido ascórbico y determinados caseinofosfopéptidos. Otros factores como ácido fítico y polifenoles parecen tener un claro efecto inhibidor. En este contexto se sitúa el siguiente trabajo de revisión:

Amaro-López, M.A. and Cámara-Martos, F. <b>Iron availability: an updated review.</b> Enviado a <i>International Journal of Food Science and Nutrition</i> .
---

Un factor de especial interés que condiciona la biodisponibilidad de hierro en los alimentos en la forma química en la que se encuentra presente;

Fe hemo, ferroso y férrico. Una correcta estimación de la biodisponibilidad de hierro requiere un estudio de las distintas especies químicas de este mineral presente en los menús.

### *Especiación de hierro*

Existen dos formas de hierro en la dieta: hierro hemo y no hemo. El primero, presente en carne, pescado y derivados, es hierro procedente de hemoglobina y mioglobina. Cada molécula de hemoglobina esta formada por cuatro subunidades proteicas (globina) con un grupo hemo en cada una de ellas. Las subunidades proteicas al unirse entre si, forman una estructura en la que se disponen unas cavidades donde se alojan los grupos hemo. A su vez, el grupo hemo esta formado por un anillo de pofirina con un átomo de hierro en posición central. La mioglobina tiene una estructura muy similar a la hemoglobina con una cadena polipeptídica unida a un grupo hemo. Junto a esta forma de hierro, el hierro no hemo es el presente en alimentos de origen vegetal y el utilizado usualmente en la suplementación con este mineral.

La distinción entre ambas formas de hierro radica en su diferente biodisponibilidad. La disponibilidad de hierro hemo es superior al 15% frente a la del hierro no hemo, normalmente inferior al 5% (Schricker et al., 1982). Además la biodisponibilidad de hierro hemo no se ve afectada por la mayoría de los componentes de la dieta.

Para algunos autores, la mayor biodisponibilidad del hierro hemo radica en la porción proteica de la molécula de hemoglobina ya que es posible que los péptidos liberados durante la digestión de la globina puedan mejorar la biodisponibilidad de hierro a través de un incremento en su solubilidad (Fly y Czarnecki-Maulden, 2000). Para otros, es el anillo de porfirina el responsable de la alta absorción de hierro hemo (South et al., 2000).

El hierro hemo y no hemo se absorben por diferentes mecanismos. El hierro hemo es absorbido como un complejo hierro porfirina intacto con una alta afinidad por un receptor específico (Gräsbeck et al., 1982) y, una vez dentro del enterocito, es liberado del anillo de porfirina por acción de la hemooxigenasa, pasando a pool común con el hierro no hemo (Carpenter y Mahoney, 1992).

A su vez, el hierro no hemo puede encontrarse en estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ó férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), cada uno con diferente disponibilidad. Es bien conocido que el hierro (II) es más disponible que el hierro (III) ya que este último tiene una menor solubilidad (South y Miller, 1998). Además se señala la reducción de Fe (III) a Fe (II) como prerrequisito para la captación de hierro por las células de la mucosa intestinal (Barrand et al., 1990; Raja et al., 1992).

Distintos estudios han mostrado que el cocinado, congelación y almacenamiento disminuyen el contenido de hierro hemo presente en los alimentos, incrementando el contenido en hierro no hemo (Benjakul y Bauer, 2001; Lombardi-Boccia et al., 2002b; Purchas et al., 2003). Junto a esto, las diferentes transformaciones que sufren los alimentos en el proceso de digestión

gastrointestinal podrían modificar el estado del hierro inicialmente presente en el alimento crudo o cocinado cuando éste alcanza el intestino delgado donde realmente es absorbido (Han et al., 1995).

Lo anteriormente indicado demuestra el gran interés que tiene el estudio de especiación de hierro en el alimento una vez que éste ha sido sometido al proceso de digestión gastrointestinal.

Cámara, F., Amaro, M.A., Barberá, R., Lagarda, M<sup>a</sup>.J. **Speciation of bioaccessible iron (heme iron, ferrous and ferric) from school menus.**  
Enviado a *Analytical and Bioanalytical Chemistry*

### Cobre

El cobre es un mineral esencial para el metabolismo del hierro y la biosíntesis de hemoglobina. La suplementación con cobre acelera la síntesis de hemoglobina en niños con anemia hipocrómica tratados con sales de hierro (Mills, 1930). Se indica que una enzima dependiente de cobre como la ceruloplasmina cataliza la oxidación de ión ferroso (Harris, 2001), siendo éste el primer paso requerido para la incorporación efectiva del hierro a la protoporfirina IX para dar lugar al grupo hemo (Taylor et al., 2004). Otra enzima como la cobre-cinc superóxido dismutasa es un agente protector frente a radicales libres (Southorn y Powis, 1988) y su actividad depende de la concentración de cobre.

Por todo ello el cobre se considera un nutriente antioxidante relacionado con la salud cardiovascular (Allen y Klevay, 1994; Klevay, 2000;). Russo et al. (1998) indican en pacientes hipertensos unos menores niveles de cobre en plasma y de la actividad de superóxido dismutasa en eritrocitos frente a pacientes con tensión normal. Junto a esto, el colágeno y la elastina de las arterias requieren lisil oxidasa, otra enzima dependiente de cobre. Además se ha encontrado una correlación entre hipercolesterolemia y deficiencia en cobre en distintas especies (Klevay, 2000), por lo que puede establecerse una relación entre deficiencia en este elemento y enfermedades cardiovasculares.

Aunque la deficiencia en cobre es poco frecuente, ha sido descrita principalmente en prematuros y niños recuperándose de una malnutrición (Cordano, 1998). Su biodisponibilidad según estudios *in vivo* oscila entre 25-70% (Davis and Mertz, 1987) y parece estar menos afectada por inhibidores de la absorción mineral como fibra, ácido fítico y polifenoles.

### Cobre-fibra

El efecto de la fibra dietética sobre la biodisponibilidad de cobre es controvertido. La adición de salvado de trigo y avena a la dieta de hombres adultos disminuye la absorción de cobre siendo este efecto más acusado para la fibra de avena (Moak et al.,1987). Similarmente, Ward y Reichert (1986) señalan que la adición de un 12% de fibra dietética, procedente de diferentes fuentes, a la dieta de ratas produce una menor absorción aparente de distintos minerales, entre ellos de cobre.

La pectina es capaz de captar cobre y otros cationes divalentes a pH 4-6 debido a las interacciones electrostáticas entre los distintos cationes y los grupos carboxilo de los residuos de D-ácido galacturónico que integran la pectina. No obstante, un aumento del pH a 6-8 no afecta a la disponibilidad mineral (Schlemmer, 1989). De igual modo, estudios en humanos con pectina (Behall et al., 1987) no han mostrado ningún efecto significativo sobre la absorción de cobre ya que al parecer las pectinas son degradadas por las enzimas bacterianas presentes en el colon, liberando los minerales que han sido captados y permitiendo su reabsorción en el intestino.

En los últimos años, determinadas fracciones de la fibra soluble como fructooligosacáridos han demostrado tener un efecto beneficioso sobre la absorción mineral. Lopez et al. (2000) señalan en ratas una absorción de cobre en una dieta, libre de fibra, del 16% mientras que la introducción de fibra en forma de fructooligosacáridos aumenta esta absorción hasta un 29%. Entre las hipótesis que se proponen para explicar este efecto se indican que los fructooligosacáridos, al no poder ser hidrolizados por las enzimas presentes en el intestino delgado, llegan al colon intactos siendo fermentados por la microflora intestinal con la consiguiente producción de gases, lactato y ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato. La alta concentración de ácidos grasos de cadena corta en el ciego produce un descenso en el pH cecal aumentando la solubilidad de los minerales presentes ó bien la formación de complejos de menor carga facilitando la difusión pasiva del mineral a través de la membrana.



Cobre-ácido fólico

No está suficientemente claro el efecto del ácido fólico sobre la biodisponibilidad del cobre. Para algunos autores, en el hombre, el ácido fólico no tiene efecto sobre la absorción de cobre (Turlund et al., 1985). Otros estudios realizados en ratas señalan un aumento en la absorción de este elemento en presencia de ácido fólico (Lee et al., 1988). Se estima que el efecto del ácido fólico sobre la absorción de cobre es debido a su capacidad para captar cinc contrarrestando la competencia entre ambos minerales en la absorción intestinal (Champagne y Hinojosa, 1987).

No se ha señalado una correlación estadísticamente significativa entre contenido de ácido fólico y dializabilidad de cobre en fórmulas infantiles (Jovaní et al., 2000) posiblemente por un bajo contenido en ácido fólico presente en las fórmulas. Otros estudios realizados en mujeres han investigado el efecto de la absorción de cobre de una dieta lactoovovegetariana frente a una no vegetariana (Hunt y Vanderpool, 2001), encontrando que aunque el porcentaje de cobre absorbido fue mayor en la dieta no vegetariana (42,1%) frente a la lactoovovegetariana (33,0%), como el contenido de cobre fue mayor en esta última, la absorción aparente de cobre también lo fue (0,48 mg en lactoovovegetariana frente a 0,40 mg) no existiendo diferencias significativas en los niveles de cobre plasmático y ceruloplasmina en las mujeres que ingieren ambas dietas.

### Cobre-polifenoles

El efecto de los polifenoles en la reducción de la biodisponibilidad de hierro y cinc es conocido (Ganji y Kies, 1994; Hurrell et al., 1999; Samman et al., 2001). Sin embargo, es posible que este efecto sea diferente sobre la absorción de cobre. De Vos y Schrijver (2003) han observado en ratas que la absorción de cobre aumenta con el consumo de te negro. Por otro lado, Vaquero et al. (1994) señalan en estudios *in vivo* e *in vitro*, un mayor porcentaje de cobre dializado como de  $^{64}\text{Cu}$  retenido en ratas, a partir de un desayuno consumido con té frente al mismo consumido con agua. Es posible que algunos taninos y flavonoides solubles del té formen compuestos de bajo peso molecular capaces de competir con otros productos de la digestión del desayuno en la captación de cobre. Estos compuestos son fácilmente absorbidos y retenidos por las ratas. Particularmente, la retención de cobre en hígado fue incrementada por el consumo de te lo que indica una alta biodisponibilidad de cobre.

### **III.3. ESTIMACION *IN VITRO* DE LA BIODISPONIBILIDAD MINERAL DE MENUS ESCOLARES**

Como ya se ha indicado, gran parte de los métodos *in vitro* de evaluación de la biodisponibilidad mineral se basan en la simulación de una digestión gastrointestinal con pepsina-HCl y pancreatina-sales biliares y posterior medida de la fracción mineral que se solubiliza ó dializa a través de una membrana con un determinado tamaño de poro.

Estos métodos han sido ampliamente utilizados para evaluar la biodisponibilidad mineral de diversos alimentos y cuya bibliografía se considera demasiado extensa para indicarla en la memoria. Sin embargo son escasos los trabajos relativos a la estimación de la biodisponibilidad mineral en platos compuestos o dietas (Pushpanjali y Khokhar, 1996; Lucarini et al., 1999)

En esta Tesis Doctoral, se ha aplicado ambos métodos (solubilidad y diálisis) para la estimación de la biodisponibilidad de calcio, hierro, zinc y cobre en trece platos, habitualmente consumidos en un comedor escolar, elaborados con distintos ingredientes y diferentes formas de preparación.

Estos platos son representativos del menú mensual habitualmente consumido por la población escolar que realiza la principal comida del día en el comedor del colegio y pueden clasificarse en función de su ingrediente mayoritario de la siguiente forma; con base cereal (arroz a la cubana, arroz con magro, espaguetis con chorizo y macarrones con atún), con base de

leguminosas (lentejas con chorizo y cocido), tubérculo (estofado de patatas), con base cárnica (pollo empanado con menestra y pollo en salsa), pescados (merluza frita y merluza empanada precocinada) y finalmente los que presentan como ingrediente principal el huevo (tortilla de patatas y tortilla de espinacas). Una descripción más detallada de los platos analizados se indica en la tabla 1 del apartado de Metodología.

Los resultados obtenidos en este estudio se discuten en la siguiente publicación:

Cámara, F., Amaro, M.A., Barberá, R. and Clemente, G. **Mineral bioavailability in school meals or menus. Comparison between dialysis and solubility methods.** Enviado a *Food Chemistry*.

### Cultivos celulares

En un intento de avanzar un paso más en los estudios *in vitro* de estimación de la biodisponibilidad, desde hace unos años se han incorporado los cultivos celulares que permiten estimar captación y transporte de nutrientes. El modelo que incorpora línea celulares debe presentar características similares a los enterocitos en cuanto a permeabilidad y formación de una barrera polarizada. La línea celular Caco-2 es la más prometedora y versátil para este fin.

Esta línea fue establecida en 1977 por Fogh et al. a partir de adenocarcinoma de colon humano obtenido de un paciente de 72 años (Pinto et al., 1983). En cultivo, estas células son capaces de diferenciarse de forma espontánea para dar lugar a una monocapa celular polarizada que posee muchas de las características funcionales y morfológicas de los enterocitos humanos maduros (organización de las células dentro de una monocapa polarizada, formación de domas, uniones intercelulares estrechas, microvellosidades en la zona apical y enzimas de excreción propios de la membrana del borde en cepillo) (Pinto et al., 1983; Hidalgo et al., 1989; Álvarez-Hernandez et al., 1991). Funcionalmente, la diferenciación se caracteriza por actividades enzimáticas (hidrolasas) altas asociadas a la membrana del borde en cepillo (Pinto et al., 1983; Hidalgo et al., 1989).

Estas células pueden hallarse en los cultivos en tres estados diferentes: a) no diferenciadas, de forma homogénea (subconfluencia), b) polarizadas y diferenciadas en forma no homogénea (confluencia, estado transitorio) y c) polarizadas y diferenciadas de forma homogénea (postconfluencia). En este último estado las células muestran polaridad morfológica y actividades enzimáticas en el borde en cepillo similares a las de los enterocitos maduros (Vachon y Beaulieu, 1992).

La mayoría de los trabajos que utilizan cultivos celulares Caco-2 para estimar la biodisponibilidad mineral tienen por objeto el estudio de hierro, utilizan disoluciones patrón y tratan de los efectos de los componentes dietéticos sobre la biodisponibilidad de este elemento. Así, se ha estudiado los

efectos que sobre la captación y el transporte de hierro ejerce la adición de inositol fosfatos con distinto grado de fosforilación (Han et al., 1994; Skoglund et al., 1999) y, en trabajos posteriores (Han et al., 1995), el efecto compensador del ácido ascórbico.

Otros trabajos que utilizan la línea celular Caco-2 para el estudio de la biodisponibilidad de hierro en alimentos son los de Glahn et al. (1996, 1998a, 2002a), quienes proponen un método que combina una digestión gastrointestinal simulada, una diálisis en equilibrio y la captación por las células Caco-2. Aplican este sistema al estudio de la influencia del tipo de proteína (carne de ternera, pollo, pescado y caseína) sobre la captación de hierro. Los resultados obtenidos son similares a los procedentes de estudios *in vivo*, con una menor captación de hierro procedente de la caseína.

Los mismos autores evalúan el uso de ferritina como alternativa al hierro radiactivo, como parámetro indicador de la captación, por las células Caco-2, de hierro procedente de pescado, carne, maíz y judías (Glahn et al., 1998b). Señalan asimismo la utilidad del sistema combinado (digestión *in vitro*-células Caco-2) como modelo para el desarrollo de formulaciones de alimentos. Utilizando este mismo método, Boato et al. (2002) estudian los efectos del ácido ascórbico y de los polifenoles presentes en distintos zumos de fruta sobre la disponibilidad de hierro. Más recientemente, Glahn et al. (2002b) lo utilizan para comparar la biodisponibilidad de hierro de 15 genotipos diferentes de arroz. Asimismo, Oikeh et al. (2003) lo aplican al estudio de la biodisponibilidad de este elemento en maíz

El número de trabajos relativos al cinc es inferior al del hierro. Los mecanismos de transporte de cinc en las células Caco-2 han sido estudiados por Raffaniello et al. (1992) y Finley et al. (1995) con resultados contradictorios. Se ha evaluado, asimismo, el efecto de los fosfopéptidos de la caseína y de los fitatos sobre la absorción de cinc, con resultados positivos y negativos, respectivamente. El efecto de los productos derivados de la reacción de Maillard sobre la captación y transporte de Zn ha sido estudiado por Seiquer et al. (2000) a partir de disoluciones modelo utilizando un sistema combinado digestión *in vitro*/células Caco-2.

En el caso del calcio, el uso de las células Caco-2 se centra en el estudio de las principales vías de transporte (transcelular y paracelular) (Blais et al., 1997) y en el papel de la vitamina D en dichos mecanismos. Se demuestra que la vitamina D favorece el transporte paracelular de calcio de forma muy similar a lo que sucede *in vivo* (Giuliano y Wood, 1991). Kennefick y Cashman (2000a) estudian el papel de la fibra de trigo y de los fitatos asociados a ella en la inhibición de la absorción de calcio. El transporte de calcio procedente de distintas aguas minerales es evaluado por (Ekmekcioglu et al., 1999a).

En relación al cobre, los efectos toxicológicos de este elemento con el incremento de su concentración, se estiman mediante el uso de líneas celulares Caco-2 (Zöld et al., 2003) y Zerounian et al. (2003) aplican este modelo para investigar el mecanismo regulador de la absorción de cobre.

Jovaní et al. (2001) aplican un sistema combinado fracción mineral soluble/células Caco-2 a fórmulas para lactantes al objeto de estimar la captación de calcio, hierro y zinc.

La revisión bibliográfica realizada permite concluir que el modelo *in vitro* que incluye el uso de las células Caco-2 es útil y válido para evaluar la captación y el transporte de minerales, puesto que sus resultados han sido refrendados por numerosos estudios *in vivo*. No obstante, es obligado señalar las diferencias que el sistema celular *in vitro* presenta con respecto a las condiciones *in vivo*, entre ellas, que el área de transporte en el ensayo es sólo una pequeña fracción de la correspondiente al intestino delgado y la imposibilidad de reproducir *in vitro* la regulación neuroendocrina. Sin embargo, y a pesar de las limitaciones, este modelo *in vitro* ofrece ventajas frente a los ensayos *in vivo* en seres humanos. Una de las principales es que el sistema puede ser estandarizado y proporciona resultados reproducibles, lo que es de especial interés en los estudios de comparación (Jovaní, 2001).

Es importante señalar que no se han encontrado estudios relativos a la utilización de células Caco-2 para evaluar biodisponibilidad mineral en platos compuestos o dietas, por lo que, a este respecto, podría considerarse este trabajo de la Tesis Doctoral pionero en este campo. Por ello, el objetivo de este trabajo es estudiar la biodisponibilidad mineral de menús escolares mediante ensayos de captación y transporte con células Caco-2.



**Estimación de la captación y transporte de Ca, Fe, Zn y Cu en menús escolares** (Trabajo actualmente en fase de redacción).

Materiales y métodos

De los trece platos estudiados, se seleccionan ocho representativos para los correspondientes ensayos de captación y transporte mineral.

El procedimiento de digestión *in vitro* de los platos seleccionados, la preparación y mantenimiento del cultivo celular, así como los correspondientes ensayos de captación y transporte y la determinación de proteínas de los menús se detallan en el apartado de Metodología. La captación se define como la cantidad de mineral que es incorporada a la monocapa celular y el transporte se refiere a aquella cantidad del mismo que atraviesa dicha monocapa y es transferida al medio basal.

Resultados y discusión

Los contenidos de proteínas de los platos analizados se indican en la tabla 1 y los porcentajes de captación y transporte de calcio, hierro, zinc y cobre de los platos analizados se muestran en la tabla 2.

Tabla 1.- **Contenido en proteínas** (mg/g muestra, peso fresco )

<b>Plato</b>	<b>Proteínas (mg/g)</b>
<b>Arroz a la cubana</b>	22.92 ± 2.12
<b>Cocido</b>	51.61 ± 4.32
<b>Lentejas con chorizo</b>	44.83 ± 2.59
<b>Macarrones con atún</b>	34.86 ± 2.50
<b>Merluza frita</b>	162.88 ± 3.23
<b>Pollo con menestra</b>	80.21 ± 5.05
<b>Pollo en salsa</b>	102.06 ± 12.07
<b>Tortilla de patatas</b>	54.01 ± 2.44

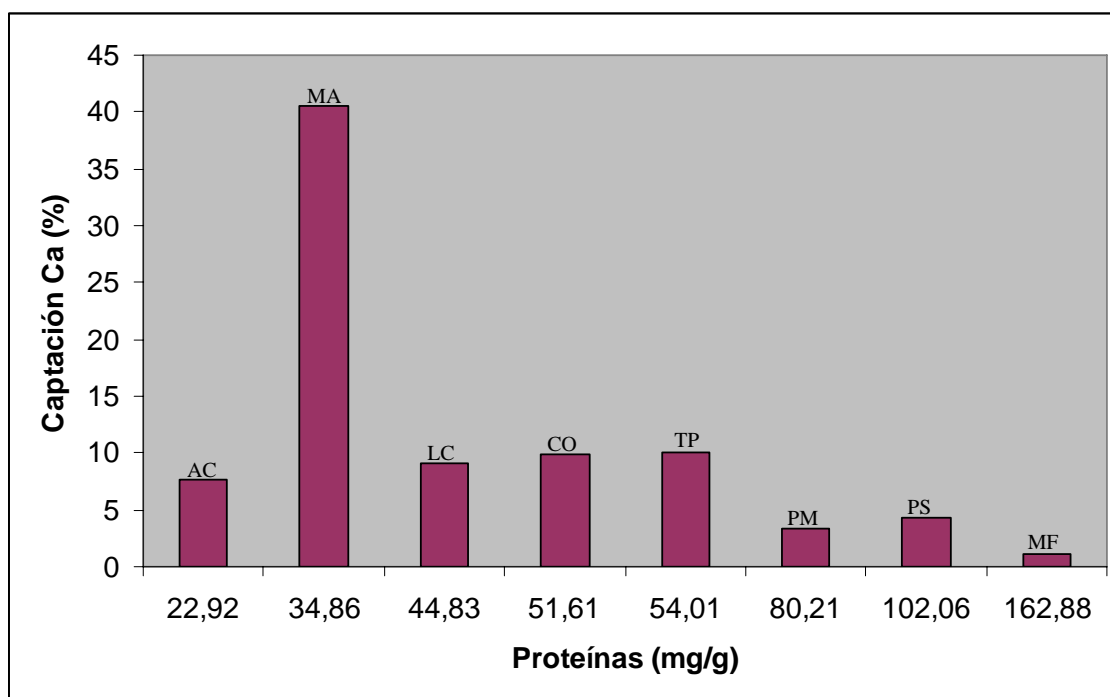
Los porcentajes de captación de calcio más altos corresponden a macarrones con atún (40.58%) y tortilla de patatas (10.07%) y los mayores porcentajes de mineral transportado a leguminosas, lentejas (36.85%) y cocido (33.91%). Los platos de leguminosas y cereales presentan los mejores resultados de calcio biodisponible mientras que los de carne y pescado poseen una menor biodisponibilidad para este mineral. Además, aunque no se ha podido establecer una correlación entre porcentaje de captación y contenido en proteínas, si se observa una tendencia a disminuir la cantidad de calcio captada con el aumento del contenido proteico (figura 3).

Tabla 2.- Porcentajes (%) de captación y transporte de Ca, Fe, Zn y Cu de los platos analizados. (n.d: no detectable)

Plato	Captación (%)*				Transporte (%)*			
	Ca	Fe	Zn	Cu	Ca	Fe	Zn	Cu
Macarrones con atún	40.58 ± 5.79	60.05 ± 0.01	16.93 ± 0.01	8.62 ± 0.91	15.68 ± 4.73	7.52 ± 0.01	30.68 ± 4.96	20,60 ± 4,50
Cocido	9.94 ± 0.01	5.46 ± 0.01	33.96 ± 5.12	80.15 ± 1.73	33.91 ± 4.68	6.83 ± 2.73	20.70 ± 2.93	n.d.
Tortilla de patatas	10.07 ± 3.88	2.79 ± 1.93	1.70 ± 0.01	n.d.	28.37 ± 3.88	5.03 ± 0.01	5.52 ± 3.60	24.70 ± 0.77
Pollo salsa	4.33 ± 2.04	8.42 ± 3.64	2.96 ± 0.59	95.96 ± 4.16	23.10 ± 5.00	20.00 ± 4.46	4.22 ± 2.39	0.54 ± 0.01
Arroz cubana	7.70 ± 2.90	7.19 ± 4.06	10.59 ± 4.49	60.72 ± 9.71	24.47 ± 1.96	7.67 ± 3.32	2.83 ± 1.83	11.88 ± 3.96
Lentejas con chorizo	9.04 ± 1.50	n.d.	7.53 ± 2.80	12.41 ± 3.61	36.85 ± 9.58	7.98 ± 0.01	23.77 ± 2.78	10.34 ± 2.79
Pollo empanado	3.43 ± 2.90	14.55 ± 0.01	12.07 ± 1.63	32.60 ± 5.22	n.d.	9.70 ± 0.01	n.d.	n.d.
Merluza frita	1.09 ± 0.51	55.73 ± 0.01	5.65 ± 0.01	14.60 ± 6.25	2.18 ± 0.01	6.19 ± 0.01	n.d.	n.d.

\*Los resultados se expresan como valor medio ± desviación estandard

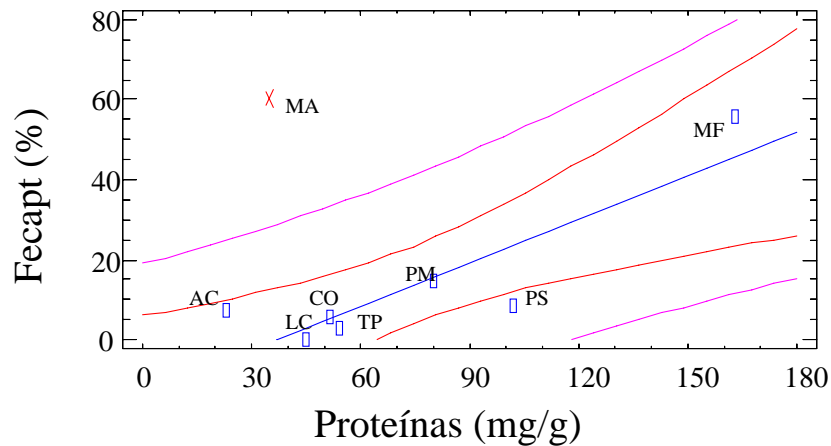
Figura 3.- Efecto de las proteínas sobre la captación de calcio



AC: Arroz a la cubana; CO: Cocido; LC: Lentejas con chorizo; MA: Macarrones con atún; MF: Merluza frita; PM: Pollo con menestra; PS: Pollo en salsa; TP: Tortilla de patatas

A los platos con un alto contenido en proteínas (pollo con menestra, pollo en salsa y merluza frita) les corresponde los mayores porcentajes de hierro captado. Junto a estos platos, los macarrones con atún presentan también un alto porcentaje de captación de hierro a pesar de un menor contenido proteico. El efecto potenciador de las proteínas cárnicas sobre la biodisponibilidad de hierro está bien documentado (Engelmann et al., 1998; South et al., 2000). De hecho, según los datos obtenidos puede establecerse una correlación lineal positiva entre porcentaje de hierro captado y contenido en proteínas ( $r = 0.87$ ;  $p < 0.01$ ) para todos los platos estudiados a excepción de macarrones con atún (figura 4) cuyo elevado porcentaje de captación podría explicarse atendiendo a otros factores como se verá más adelante.

Figura 4.- Efecto de las proteínas sobre la captación de hierro

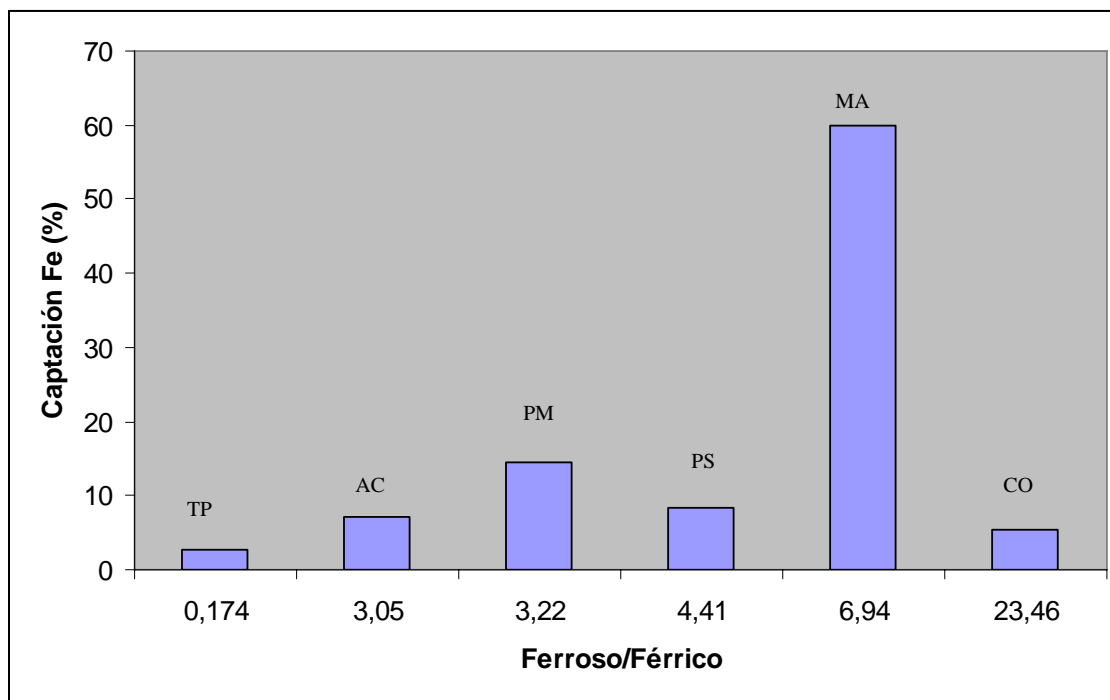


Glahn et al. (1996) observan en células Caco-2 un aumento de la captación de hierro en presencia de proteínas cárnicas (vaca, pollo y pescado) frente a otras fuentes proteicas como caseína. El efecto de las proteínas cárnicas sobre la biodisponibilidad de hierro se debe a la capacidad que tienen los grupos sulfidrilo de determinados aminoácidos como cisteína de reducir el Fe(III) a Fe (II) mucho más biodisponible (Mulvihill y Morrissey, 1998).

El hierro en estado ferroso es más soluble que el férrico en el lumen gastrointestinal (Forth y Schafer, 1987). Kapsokfalou y Miller (1995) han demostrado en contenidos intestinales de ratas una correlación ( $r = 0,980$ ;  $p > 0,001$ ) entre absorción de hierro y hierro soluble en estado ferroso, siendo superior el porcentaje de hierro en estado ferroso en presencia de proteínas cárnicas respecto a otras fuentes de proteínas como huevo y leche. Además, la reducción de hierro parece ser un requisito previo para la captación por las células de la mucosa intestinal (Wien y Van Campen, 1991). Nuestros

resultados ponen de manifiesto una tendencia a incrementarse el porcentaje de hierro captado cuando aumenta el ratio ferroso/férrico (figura 5), si bien no existe una correlación estadísticamente significativa.

Figura 5.- Efecto del ratio ferroso/férrico sobre la captación de hierro



AC: Arroz a la cubana; CO: Cocido; MA: Macarrones con atún; PM: Pollo con menestra; PS: Pollo en salsa; TP: Tortilla de patatas

En pollo con menestra y pollo en salsa, con ratios ferroso/férrico superior a 3, los porcentajes de captación de hierro son 14,55% y 8,42% respectivamente. Para merluza frita, con un porcentaje de captación de 55,73% el hierro iónico se halla en estado ferroso. En macarrones con atún, que presenta el mayor porcentaje de hierro captado, la ratio ferroso/férrico es alta (6.94). Sin embargo, para el cocido con la ratio ferroso/ férrico más alta de los platos analizados, el porcentaje de captación de Fe es bajo (5.46%), probablemente debido a la presencia de sustancias inhibidoras como ácido fítico y fibra.

Los porcentajes de hierro transportado más altos corresponden a pollo en salsa y pollo con menestra, siendo inferiores para merluza frita, lo que vuelve a poner de manifiesto el efecto de las proteínas de la carne sobre la biodisponibilidad de hierro.

Por otro lado, se ha indicado que una interacción hierro-zinc podría afectar a la biodisponibilidad de ambos minerales (Solomons y Ruz, 1997). De acuerdo con esto, se ha observado, para todos los platos estudiados, una correlación negativa ( $r = -0.64$ ;  $p < 0.1$ ) entre el porcentaje de hierro captado y el contenido en cinc soluble, lo que apoyaría la existencia de dicha interacción.

Al igual que ocurre para el hierro, la presencia de proteínas animales puede mejorar la absorción de cinc (Sandström, 1992). Sin embargo en nuestro estudio no se ha podido establecer una correlación entre contenido en proteínas y captación y transporte de cinc

En lo referente a las interacciones de zinc con otros minerales, los resultados ponen de manifiesto correlaciones positivas entre contenido de cobre en los platos analizados y porcentaje de zinc captado ( $r = 0.72$ ;  $p < 0.05$ ) ó transportado ( $r = 0.88$ ;  $p < 0.01$ ) por lo que no parece existir una interacción negativa del cobre sobre la captación de zinc

Finalmente, para el cobre no existe relación entre contenido proteico y cobre captado y transportado. El mayor porcentaje de cobre captado se obtiene para pollo en salsa (95.96%), con un elevado contenido en proteínas,

mientras que merluza frita, con el contenido proteico más alto, presenta uno de los porcentajes de captación de cobre más bajos (14.60%).



### **III.4.- APOORTE DE LOS MENÚS A LA INGESTA DIETÉTICA DIARIA DE ELEMENTOS MINERALES**

En la actualidad existe un consenso entre los expertos en nutrición en considerar que las enfermedades que afectan a las sociedades desarrolladas son, en parte, manifestaciones de los excesos y desequilibrios de la dieta y por tanto prevenibles en cierta medida. Esto ha llevado a proponer a diferentes instituciones, recomendaciones de nutrientes dirigidas no solo a grupos de alto riesgo sino a la población en general.

Se han utilizado diferentes términos para indicar las necesidades de nutrientes y no siempre existe un acuerdo que unifique los criterios con objeto de determinar los requerimientos fisiológicos de un determinado nutriente.

La National Academy of Sciences (Estados Unidos) propone el concepto de **Ingesta Dietética de Referencia ó Dietary Reference Intake (DRI)** que es un valor de referencia de estimaciones cuantitativas de ingestas de nutrientes, utilizadas para establecer y planificar dietas para personas sanas. Incluye distintos términos (Joyanes et al., 2002; Barr et al., 2002; Garmendia, 2003):

- **-Requerimiento medio estimado ó Estimated Average Requirement (EAR)** que se define como la ingesta dietética diaria media que cubre los requerimientos del 50% de los individuos sanos para una determinada etapa de la vida.

- **Ración Dietética Recomendada ó Recommended Dietary Allowances (RDA)** es la cantidad diaria promedio de un determinado nutriente que satisface los requerimientos nutricionales del 97-98% de los individuos pertenecientes a un determinado grupo de población para la cual se establece (Joyanes et al., 2002).
- **Ingesta Adecuada ó Adequate Intake (AI)** es el valor de ingesta aportado cuando se carece de la suficiente evidencia científica para expresar valores de EAR. Es una ingesta dietética diaria basada en observaciones o aproximaciones determinadas experimentalmente de ingestas de nutrientes por un grupo de población sana. Se utiliza cuando la RDA no puede ser determinada y no tiene por qué tener una relación directa con ella.
- **Nivel de ingesta superior tolerable ó Tolerable Upper Intake Level (UL)** es el nivel más alto de ingesta diaria de un nutriente que no parece presentar riesgo de efectos adversos en la salud para la mayoría de los individuos de la población.

El contenido de las recomendaciones es variable de un país a otro, debido a las particularidades del clima y la agricultura, así como a los hábitos alimentarios y tradiciones del lugar. Además, en el caso de los elementos minerales resulta particularmente difícil proponer recomendaciones sobre la ingesta diaria, debido a que la absorción y utilización de éstos, es decir su biodisponibilidad, se ve influenciada por diversos factores.

En España existen las “Tablas Recomendadas de Energía y Nutrientes para la Población Española” (Moreiras et al., 2004), editadas por el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad Complutense de Madrid. Sin embargo, estas tablas proporcionan valores de ingestas recomendadas únicamente para calcio, hierro, zinc y magnesio, y no para otros elementos minerales.

En la tabla siguiente se muestran los valores de las DRI americanas (Food and Nutrition Board, 1997, 2001) y las Ingestas recomendadas para la población española (Moreiras et al., 2004) para los minerales estudiados

Tabla 3.- **Dietary Referente Intake (DRI) e Ingestas Recomendadas para la población española**

Categoría/Edad (años)	Ingesta Recomendada			Dietary Referente Intake (DRI)			
	Ca (mg/día)	Fe (mg/día)	Zn (mg/día)	Ca (mg/día)	Fe (mg/día)	Zn (mg/día)	Cu (µg/día)
4-9	800	9	10				
4-8				800	10	5	440
Niños (10-12)	1300	12	15				
Niñas (10-12)	1300	18	15				
Males (9-13)				1300	8	8	700
Females (9-13)				1300	8	8	700

Las contribuciones a la ingesta recomendada de un elemento mineral a partir de un alimento se calculan generalmente a partir de su contenido mineral.

Sin embargo, como ya se ha indicado en esta memoria, no todo el mineral presente en un alimento será absorbido y utilizado eficientemente.

Teniendo en cuenta que los resultados de biodisponibilidad mineral obtenidos en este trabajo, y que incorporan la línea celular Caco-2, permiten una mejor aproximación a la situación *in vivo*, se han utilizado estos datos para estimar los aportes a la ingesta recomendada de los platos seleccionados. Para ello se considera como cantidad del elemento que se absorbería, la suma correspondiente al mineral que es captado por las células y transportado al medio basal.

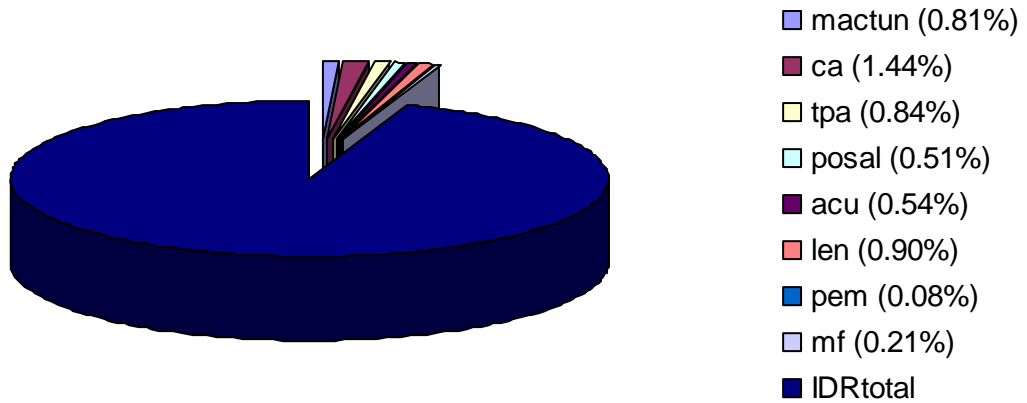
### **Calcio**

La ingesta diaria recomendada de calcio para la población española es de 800 mg para niños/as entre 4-9 años y en 1300 mg para niños/as de 10-12 años (tabla 3). Se ha estimado que la ración media de los platos objeto de estudio consumida por niños/as de 4 a 9 años es de 150 g y para 10-12 años de 200 g.

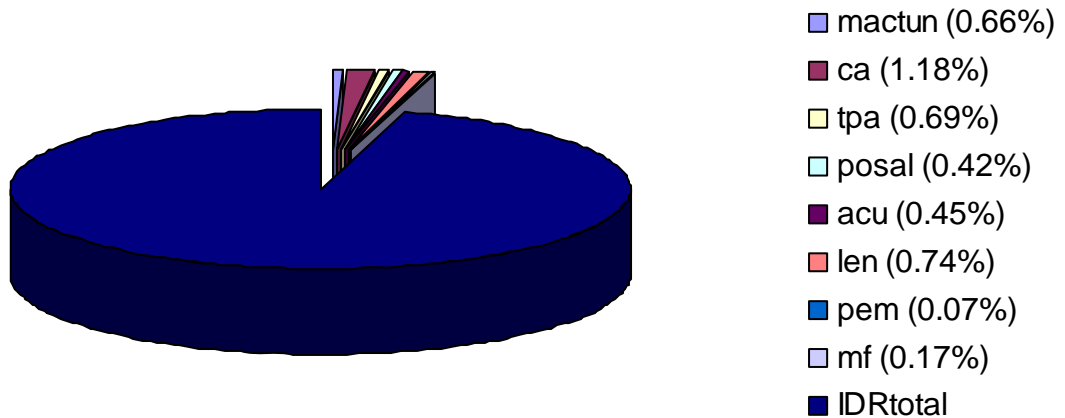
Teniendo en cuenta el peso de alimento consumido y su biodisponibilidad (suma de elemento captado y transportado por las células Caco-2), la contribución de los platos estudiados a la ingesta recomendada de calcio se muestra en la siguiente figura (figura 6).

Figura 6.- Porcentaje del aporte diario de calcio para los platos seleccionados

Niños/as 4-9 años



Niños/as 10-12 años



**mactun:** macarrones con atún; **ca:** cocido andaluz; **tpa:** tortilla de patatas; **posal:** pollo en salsa; **acu:** arroz a la cubana; **len:** lentejas; **pem:** pollo empanado con menestra; **mf:** merluza frita

Como puede observarse, las contribuciones a las ingestas recomendadas de calcio son bajas, inferiores al 1% en la mayoría de los platos analizados, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que las principales fuentes dietéticas de este mineral son la leche y los productos lácteos. Teniendo en cuenta la importancia de este mineral en la época de crecimiento es necesaria la colaboración por parte de los padres para conseguir que los principales aportes diarios de calcio se realicen durante el desayuno o merienda incluyendo la leche o lácteos en la dieta del niño.

### **Hierro**

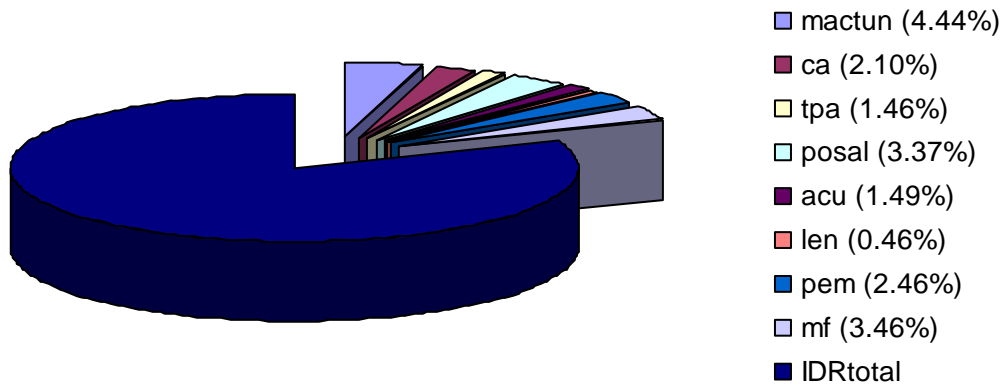
La ingesta recomendada de hierro para niños/as de 4-9 años es de 9 mg, para niños de 10-12 años de 12 mg y para niñas de 10-12 años de 18 mg. Las contribuciones a la ingesta recomendada de hierro a partir de los platos analizados se muestra a continuación (figura 7)

La contribución a la ingesta recomendada de hierro está entre el 4.44% y 0.30%. Las principales contribuciones la constituyen el grupo de las carnes y los pescados siendo las principales fuentes dietéticas de este elemento.

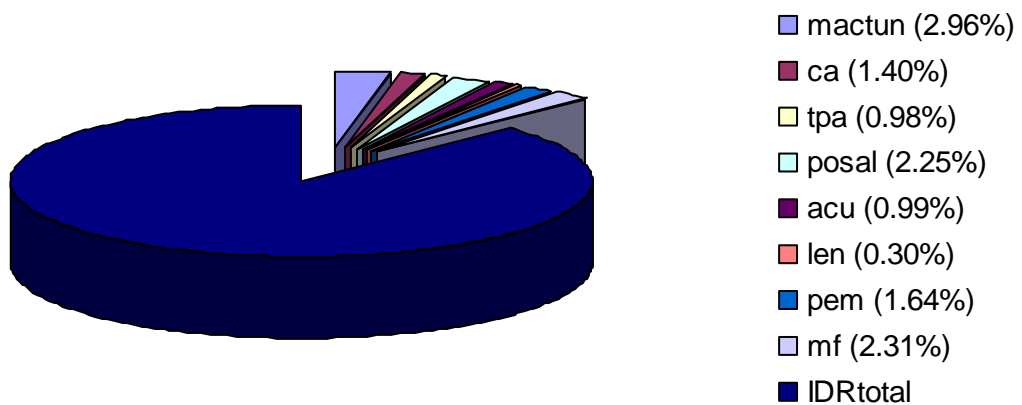
A partir de los 10 años de edad, la ingesta recomendada de hierro es superior para las niñas frente a los niños debido a la proximidad de la edad fértil. Como consecuencia de este hecho el mismo menú proporcionado a niños y niñas de la misma edad, las recomendaciones no se verán tan plenamente satisfechas para el caso de las niñas.

Figura 7.- Porcentaje del aporte diario de hierro para los platos seleccionados

Niños/as 4-9 años y Niños 10-12 años



Niñas 10-12 años



**mactun:** macarrones con atún; **ca:** cocido andaluz; **tpa** tortilla de patatas; **posal:** pollo en salsa; **acu:** arroz a la cubana; **len:** lentejas; **pem:** pollo empanado con menestra; **mf:** merluza frita

## **Zinc**

Las recomendaciones nutricionales para zinc son de 10 mg/día para niños/as de 4-9 años y de 15 mg para 10-12 años (Moreiras et al., 2004)

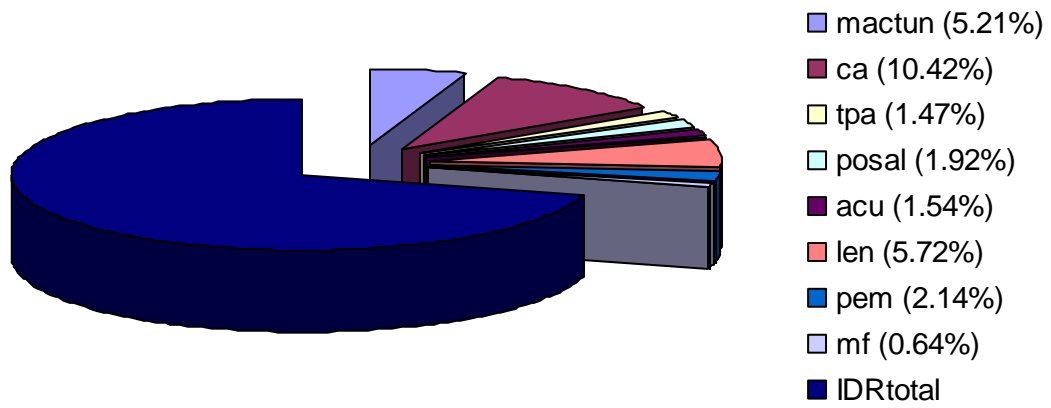
Es frecuente encontrar trabajos en los que se documentan ingestas de zinc inferiores a las recomendadas (Jorhem et al., 1998; Farré et al., 1999). De hecho, según Curtay et al. (2000), entre la población sana en general, el 80% de los niños y adultos no recibe a través de la alimentación diaria las cantidades recomendadas de zinc. La deficiencia afecta de manera muy especial a mujeres gestantes durante la segunda mitad del embarazo y a madres en periodos de lactancia, debido al importantísimo papel del zinc en el crecimiento y duplicación celular. En la figura 8 se indican las contribuciones a la ingesta diaria de zinc a partir de los platos analizados

Los alimentos que contribuyen en mayor medida a la ingesta recomendada de zinc son los platos de leguminosas (cocido y lentejas) seguido de los platos de carne. De acuerdo con esto, teniendo en cuenta la enorme importancia del zinc en la época de crecimiento, es recomendable la inclusión en el menú escolar de platos de legumbres al menos una vez por semana. Para el resto de los platos la contribución a la ingesta recomendada de zinc fue también buena a excepción de la merluza frita.

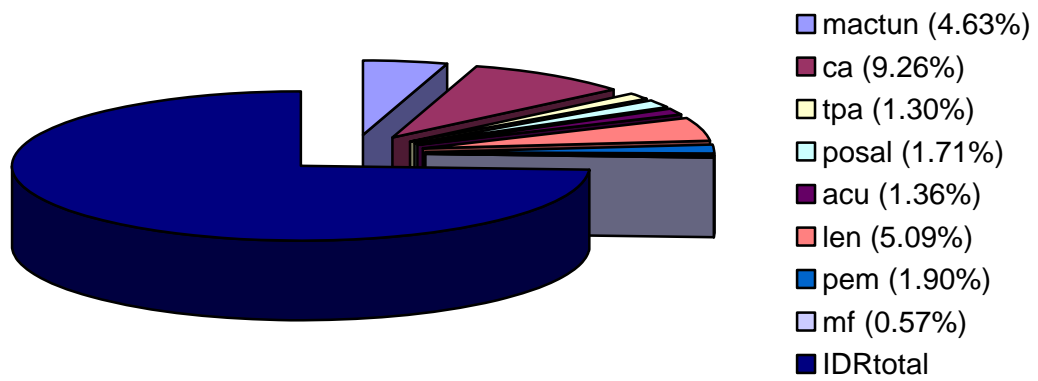


Figura 8.- Porcentaje del aporte diario de zinc para los platos seleccionados

Niños/as 4-9 años



Niños/as 10-12 años



**mactun:** macarrones con atún; **ca:** cocido andaluz; **tpa:** tortilla de patatas; **posal:** pollo en salsa; **acu:** arroz a la cubana; **len:** lentejas; **pem:** pollo empanado con menestra; **mf:** merluza frita

### Cobre

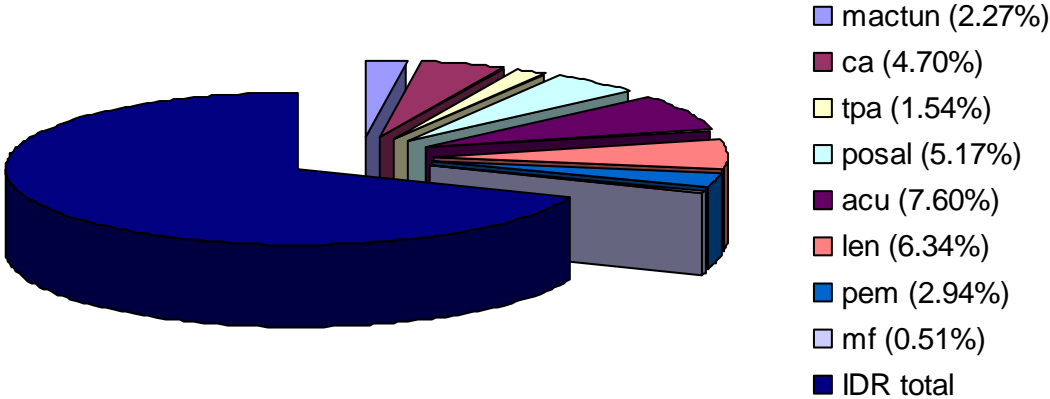
Se trata de un elemento traza con un amplio rango de seguridad, por lo que es extraño que ocasione síntomas tanto por exceso como por defecto. Las “Tablas Recomendadas de Energía y Nutrientes para la Población Española” (Moreiras et al., 2004) no proponen requerimientos nutricionales para este elemento. Para la población norteamericana se fija una DRI de 440  $\mu\text{g}/\text{día}$  para niños/as de 4-8 años y de 700  $\mu\text{g}/\text{día}$  para 9-13 años (Food and Nutrition Board, 2001).

De acuerdo con estas referencias, las contribuciones a la ingesta de cobre para los distintos platos se muestran en la figura 9. Los platos que más contribuyeron a la DRI de cobre fueron los platos de cereales y leguminosas como arroz a la cubana, lentejas y cocido. Estos resultados están de acuerdo con señalados por Garmendia (2003) según los cuales los cereales constituyen el principal aporte de cobre de la dieta con un 25%. Le siguen los grupos de pasta y las legumbres, con un 13% cada uno, y las carnes y pescados, con un 9%.

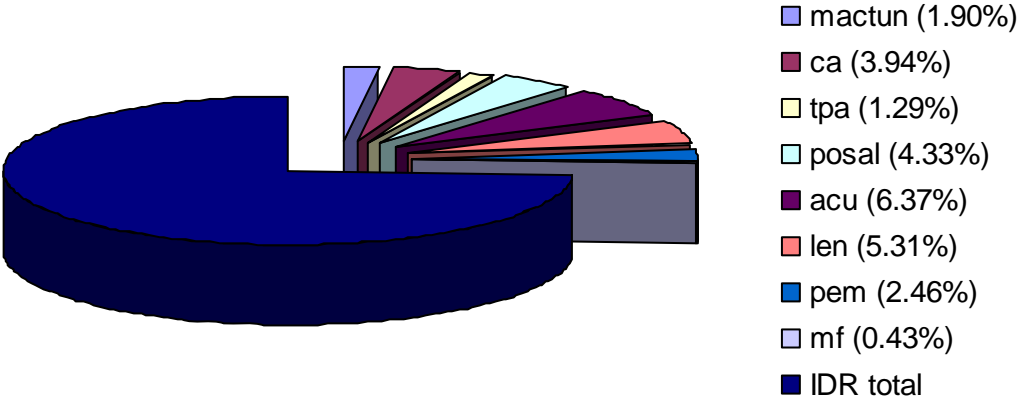
De modo general, se concluye que los platos estudiados contribuyen a la ingesta recomendada de los elementos minerales objeto de estudio en base a su biodisponibilidad, de forma variable en función del elemento mineral considerado. No obstante, cabe señalar que estas contribuciones se han calculado a partir de la cantidad de mineral biodisponible (captado y transportado por la línea celular Caco-2) y constituyen tan sólo una aproximación a la situación *in vivo*.

Figura 9.- Porcentaje del aporte diario de cobre para los platos seleccionados

Niños/as 4-8 años



Niños/as 9-13 años



## IV. METODOLOGÍA

#### **IV.1. Muestras**

Se seleccionan trece platos habitualmente incluidos en los menús escolares con distinta formulación y en diferentes formas de preparación: cuatro con base cereal (arroz a la cubana, arroz con magro, espaguetis con chorizo y macarrones con atún), dos con base de leguminosas (lentejas con chorizo y cocido), un tubérculo (estofado de patatas), dos con base cárnica (pollo empanado con menestra y pollo en salsa), dos pescados (merluza frita y merluza empanada precocinada) y finalmente dos que tuvieron como ingrediente principal el huevo (tortilla de patatas y tortilla de espinacas). La descripción de los ingredientes de los diferentes platos estudiados se indican en la tabla 1.

Las muestras fueron proporcionadas por una empresa de restauración colectiva que elabora los menús a distintos colegios de la ciudad de Córdoba (España). Todos los platos fueron homogeneizados por trituración, almacenados en botes de polipropileno y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

#### **IV.2. Determinación de proteínas**

Para la determinación del contenido en proteínas se aplicó el método de Kjeldahl de referencia (AOAC, 1990) utilizando 2 g de muestra.

### IV.3. Determinación del contenido en humedad

El contenido en humedad se determinó por desecación en estufa de aire caliente ( $105 \pm 1^{\circ}$  C) hasta peso constante.

Tabla 1.- **Ingredientes de los platos estudiados**

Plato	Ingredientes
Lentejas con chorizo	Lentejas, aceite de girasol, tomate triturado, sal, colorante, laurel, caldo de pollo, zanahoria, longaniza, cebolla, pimiento, ajo, patatas
Cocido	Garbanzos, judías verdes, zanahoria, hueso, gallina, patata, ragout de ternera, tocino, caldo de pollo y sal
Arroz cubana	Arroz, caldo de pollo, tomate frito, huevo, salchichas, aceite de girasol, ajos y sal
Arroz con magro	Arroz, magro, champiñones, pimientos, guisantes, tomate, cebolla, aceite de girasol, ajo y sal
Pollo con menestra	Pollo empanado, verdura y aceite de girasol
Pollo en salsa	Pechuga de pollo, caldo de pollo, harina, cebolla, almendras, aceite de girasol, patatas, colorante y sal
Tortilla de patatas	Patatas, huevo, aceite de girasol y sal
Tortilla de espinacas	Espinacas, huevo, aceite de girasol y sal
Macarrones con atún	Macarrones, atún, tomate, aceite de girasol y sal
Espaguetis con chorizo	Espaguetis, longaniza, tomate, aceite de girasol y sal
Filete de merluza	Merluza empanada y aceite de girasol
Merluza frita	Filete de merluza y aceite de girasol
Estofado de patatas	Patatas, ragout de ternera, vino blanco, tomate triturado, zanahoria, caldo de pollo, cebolla, pimientos, aceite de girasol, laurel, colorante y sal

#### **IV.4. Métodos *in vitro* de estimación de la biodisponibilidad mineral**

Se utilizan la solubilidad, diálisis y ensayos de captación y transporte con células Caco-2.

Las disoluciones enzimáticas se preparan inmediatamente antes de su uso. La disolución de pepsina es preparada disolviendo 16 g de pepsina de estómago porcino (Sigma, P-7000) en 100 mL de HCl 0.1 M.

Para la preparación de la disolución de pancreatina-sales biliares, 0.4 g de pancreatina porcina (Sigma Chemical Co. P-170) y 2.5 g de sales biliares (Sigma, B-8631) se disuelven en 100 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M.

La membrana de diálisis utilizada presenta un tamaño de poro (MMCO) de >12.000 Å ( Dia. Inf. 36/32"-28,6 mm, 30 m, Bestl n° 1063F09, Medicell Int. LTD, England) y es enjuagada varias veces con agua desionizada antes de su utilización.

##### **Ensayo de diálisis**

La proporción de mineral dializado en los platos seleccionados se determina siguiendo la técnica descrita por Miller et al. (1981) modificada posteriormente por Jovai et al. (2001).

### Etapa gástrica

Se pesa en un erlenmeyer 40 g alimento y se mezclan con 60 g de agua destilada-desionizada (ADD) hasta 100 g. Las muestras se ajustan a pH 2.0 con HCl 6M. Se adicionan 0.5 g de pepsina por 100g de muestra. La mezcla se incuba en un baño de agua con agitación a 37° C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, los erlenmeyers se sacan del baño e inmediatamente se sumergen en hielo durante 5-10 minutos. A continuación se procede a la valoración de la acidez.

### Valoración de la acidez

Se determina el título de acidez que se define como el n° de equivalentes de NaOH necesarios para llevar a pH 7.5 alícuotas de 30g del digerido gástrico adicionadas de pancreatina-extracto biliar.

### Etapa intestinal

Alícuotas de 30 g de digerido gástrico se transfieren a un matraz erlenmeyer de 250 mL y segmentos de tubo de diálisis, conteniendo 25 mL de agua desionizada y una cantidad de NaHCO<sub>3</sub> equivalente a la medida en la acidez titulable, se introducen junto a las muestras. Las muestras se colocan en un baño de agua con agitación a 37° C durante 45 min. Para llevar a cabo la digestión pancreática se añaden 7.5 mL de la disolución de pancreatina-



sales biliares a cada matraz y la digestión se continua a 37°C durante 2 horas más.

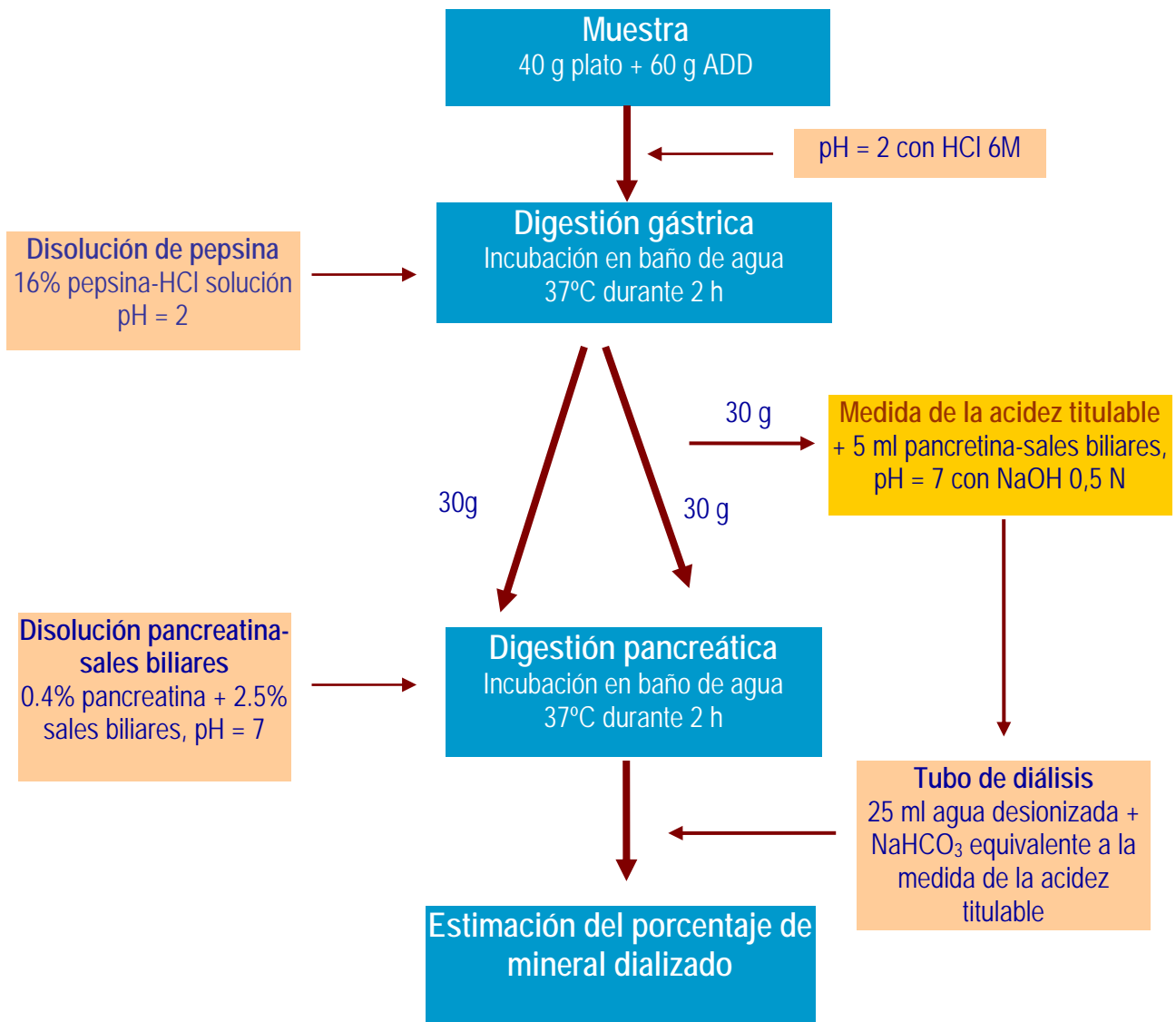
Después de la incubación, los tubos de diálisis se enjuagan con ADD, se secan cuidadosamente, se pesan y los contenidos se trasvasan a tubos de polipropileno para posteriormente determinar el contenido mineral presente en el dializado por espectrofotometría de absorción atómica.

El porcentaje de mineral dializado es calculado como sigue:

$$\% \text{ diálisis} = 100 \times D/C$$

donde  $D$  = mineral dializado ( $\mu\text{g/g}$  muestra) y  $C$  es el contenido de mineral total en la muestra ( $\mu\text{g/g}$  muestra). El esquema del ensayo de diálisis se muestra en la figura 1.

Figura 1.- Esquema del ensayo de diálisis



## **Ensayo de solubilidad**

Se determina la disponibilidad mineral mediante ensayo de solubilidad descrito por Crews et al. (1983) y modificado por Sauquillo et al. (2003).

### Etapa gástrica

Partiendo de 30g de muestra y 70 mL de ADD, para la digestión con pepsina-HCl se aplica el mismo procedimiento descrito en el ensayo de diálisis.

### Etapa intestinal

El pH de los digeridos gástricos se ajusta a 5 adicionando NaHCO<sub>3</sub> 1 M. Se adicionan 18,8 mL de la disolución de pancreatina-sales biliares y se continúa la digestión en baño de agua con agitación a 37 °C durante 2 horas. El pH se ajusta a 7,2 con NaOH 0,5M.

En tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL se pesan alícuotas del digerido intestinal y se centrifugan a 4000 rpm a 4°C durante 1 hora. Los sobrenadantes (fracción soluble) se recogen con una pipeta “pasteur” y se determina el contenido mineral de dichas fracciones por espectrofotometría de absorción atómica, previa destrucción de la materia orgánica por vía seca.

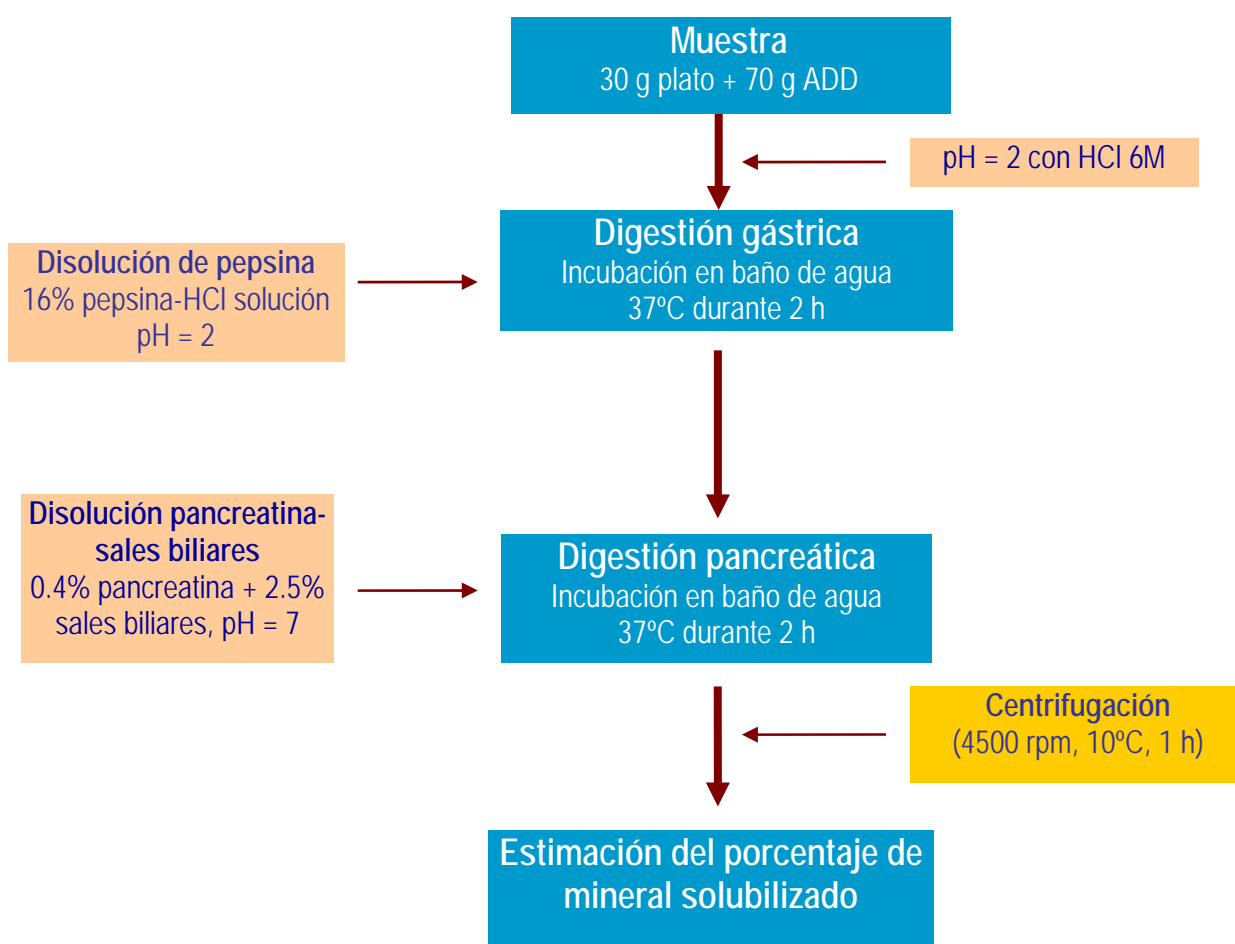
El porcentaje de mineral solubilizado se calcula como sigue:

$$\% \text{ solubilidad} = 100 \times S/C$$

donde  $S$  = mineral solubilizado ( $\mu\text{g/g}$  muestra) y  $C$  es el contenido de mineral total en la muestra ( $\mu\text{g/g}$  muestra).

En la figura 2 se muestra el esquema seguido en el ensayo de solubilidad

Figura 2.- Esquema del ensayo de solubilidad



## **Preparación de la muestra previa a la adición de la monocapa celular**

### **Ensayo de actividad proteolítica (endopeptidasas)**

Los enzimas proteolíticos de la fracción soluble de los digeridos de platos, obtenida por centrifugación, se inactivan por calentamiento a 100° C para preservar la integridad de la monocapa celular en el ensayo.

Se ensayan distintos tiempos de calentamiento (0, 4, 10 y 15 minutos) y a continuación se determina la actividad proteolítica por el método de Sarath et al. (1989) que se basa en la determinación espectrofotométrica (440 nm) de los aminoácidos libres procedentes de la hidrólisis de la azocaseína (utilizada como sustrato) por los enzimas proteolíticos de la fracción soluble de los digeridos. Los ensayos se realizan por triplicado.

La preparación de los reactivos utilizados se describe a continuación:

sustrato (azocaseína) (5mg/ mL) en tampón Tris-HCl 100 mM pH 8.

Ácido tricloroacético (TCA) al 25% en ADD.

Se pipetea 400 µL de sustrato (azocaseína) en un vial Eppendorf. La reacción se inicia añadiendo 200 µL de fracción soluble de los platos digeridos. Paralelamente se hace un blanco que contiene 400 µL de azocaseína y 200 µL de tampón Tris-HCl. Se incuba en un baño a 37° C durante 1 hora. La reacción se detiene añadiendo 200 µL de ácido tricloroacético. Se deja en baño de hielo

durante 15 minutos y se centrifuga a 8500 rpm durante 10 minutos a 20°C. Alícuotas de 750  $\mu\text{L}$  del sobrenadante (muestra o blanco) se transfieren a una cubeta de espectrofotómetro y se adicionan 600  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M. Se mide la absorbancia a 440 nm frente al blanco.

### **Ajuste de la osmolalidad y pH**

Las disoluciones a adicionar a la monocapa celular deben tener un pH y una osmolalidad compatibles con el cultivo celular. Las células deben estar bañadas por un líquido cuya concentración de electrolitos y de otros solutos sea relativamente constante. De ahí que la concentración de sodio del líquido extracelular y la osmolalidad están, en gran parte, reguladas por la cantidad de agua extracelular.

El término osmolalidad se define como la concentración osmolal expresada en osmoles por Kg de disolución acuosa (1 mol de partículas del soluto/ kg de solución acuosa). La osmolalidad determina la presión osmótica, su regulación está estrechamente relacionada con la concentración de sodio del líquido (Guyton et al., 2001).

Antes de determinar la osmolalidad se debe calibrar el osmómetro, para ello se utiliza agua desionizada y una disolución de NaCl de 300 mosmol / Kg. Se introducen en un vial Eppendorf 50  $\mu\text{L}$  (teniendo cuidado que no queden gotas adheridas a las paredes) de cada una de las disoluciones. Una vez calibrado, se procede a la lectura de la muestra. Los resultados se expresan en osmol / Kg.

Los intervalos de pH y osmolalidad que se consideran óptimos son de 7.2 – 7.5 y de 280 – 320 osmol / kg respectivamente (Davis, 1994). Tampón de captación (blanco), disoluciones patrón y muestras deben tener un pH y una osmolalidad similar.

La osmolalidad y el pH de las disoluciones a adicionar a la monocapa celular se determinan una vez se les ha adicionado glucosa y HEPES a concentraciones de 5 y 50 mM respectivamente. La osmolalidad se debe reajustar con NaCl o por dilución de la muestra, en el caso que no esté en el intervalo que se considera óptimo.

### **Desmineralización de las enzimas**

Debido al contenido mineral que llevan *per sé* las enzimas utilizadas en el proceso de digestión gastrointestinal y que podrían introducir fuentes de error en los ensayos de captación y transporte, se lleva a cabo un proceso de desmineralización de las enzimas.

Para ello, antes de añadir la pepsina en la etapa gástrica, ésta es tratada con 16 g de resina Chelex y 48 mL de HCl 0.1N manteniéndose en agitación suave durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, separamos la resina de la disolución de pepsina a través de una columna de vidrio con una bolita de algodón en la punta y la llave abierta y esta disolución de pepsina será la que utilizaremos para realizar la etapa gástrica.

De igual modo la pancreatina y la sales biliares son tratadas para su desmineralización, siguiendo el mismo procedimiento anterior, con 12.5 g de resina Chelex y 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0.1N.

## **Ensayo de captación y transporte mineral con células Caco-2**

Los ensayos de captación y transporte mineral con cultivos celulares se realizaron en la unidad de cultivos celulares dependiente del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (S.C.S.I.E) situada en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia.

Las células Caco-2 utilizadas en este trabajo proceden de la European Collection of Cell Cultures (ECACC; número 86010202, Salisbury, UK) y fueron usadas entre los pases 50 y 60. El mantenimiento de las células se realiza en frascos de 75 cm<sup>2</sup> sobre los que se adiciona 5 mL de medio de cultivo MEM enriquecido con 10% de suero bovino fetal (SBF), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 1% antibióticos (penicilina / estreptomycin), 1% glutamina, 1% HEPES, 1% piruvato sódico y 0.4% fungizona. Las células se incuban a 37°C, en atmósfera húmeda y con un flujo del 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambia cada 2 días.

El cultivo se mantiene hasta que alcanza el 70% de confluencia (tiempo promedio: 5-7 días). A continuación se decanta el medio de cultivo y la monocapa celular se lava con 5 mL de PBS (Phosphate buffer sodium) para eliminar los restos de medio y de células muertas. La monocapa celular es



recogida con 5 mL de una solución de tripsina-EDTA (2.5 g/L tripsina, 0.2 g/L EDTA) atemperada a 37° C. Se deja actuar durante 1 minuto a temperatura ambiente y se decanta, dejando unas gotitas en el frasco. Se incuba a 37° C / 5% CO<sub>2</sub> / 95% humedad, durante 10-15 minutos. Transcurrido ese tiempo se sacan los frascos del incubador y se comprueba que las células se han despegado del sustrato.

Una vez que las células han sido separadas de los frascos, son resuspendidas en medio de cultivo. Para realizar estudios de captación y transporte las células se siembran en pocillos bicamerales (24 mm de diámetro, 0.4 µm de tamaño de poro; Transwell, Costar Corp., NY, USA) a una densidad de 35x10<sup>4</sup> células por pocillo, con 2.5 mL de medio en la cámara basal y 1.5 mL de células resuspendidas en la cámara apical. Cada placa transwell esta compuesta de seis pocillos bicamerales con una cámara apical que actúa de compartimento donador de una cámara basal. Los ensayos de captación y transporte se llevan a cabo a los 19-21 días después de la siembra celular.

Una vez el cultivo ha alcanzado la diferenciación celular (19-21 días postsiembra), se aspira el medio de ambas cámaras y se deshecha. La monocapa celular y la cámara basal se lavan 3 veces con PBS a 37° C. Se adiciona, a 37° C, 1.5 mL de la fracción soluble de los digeridos de los platos en la cámara apical y 2.5 mL de tampón de captación en la cámara basal. Las placas se incuban 2 horas a 37°C / 5% CO<sub>2</sub> / 95 % humedad relativa.

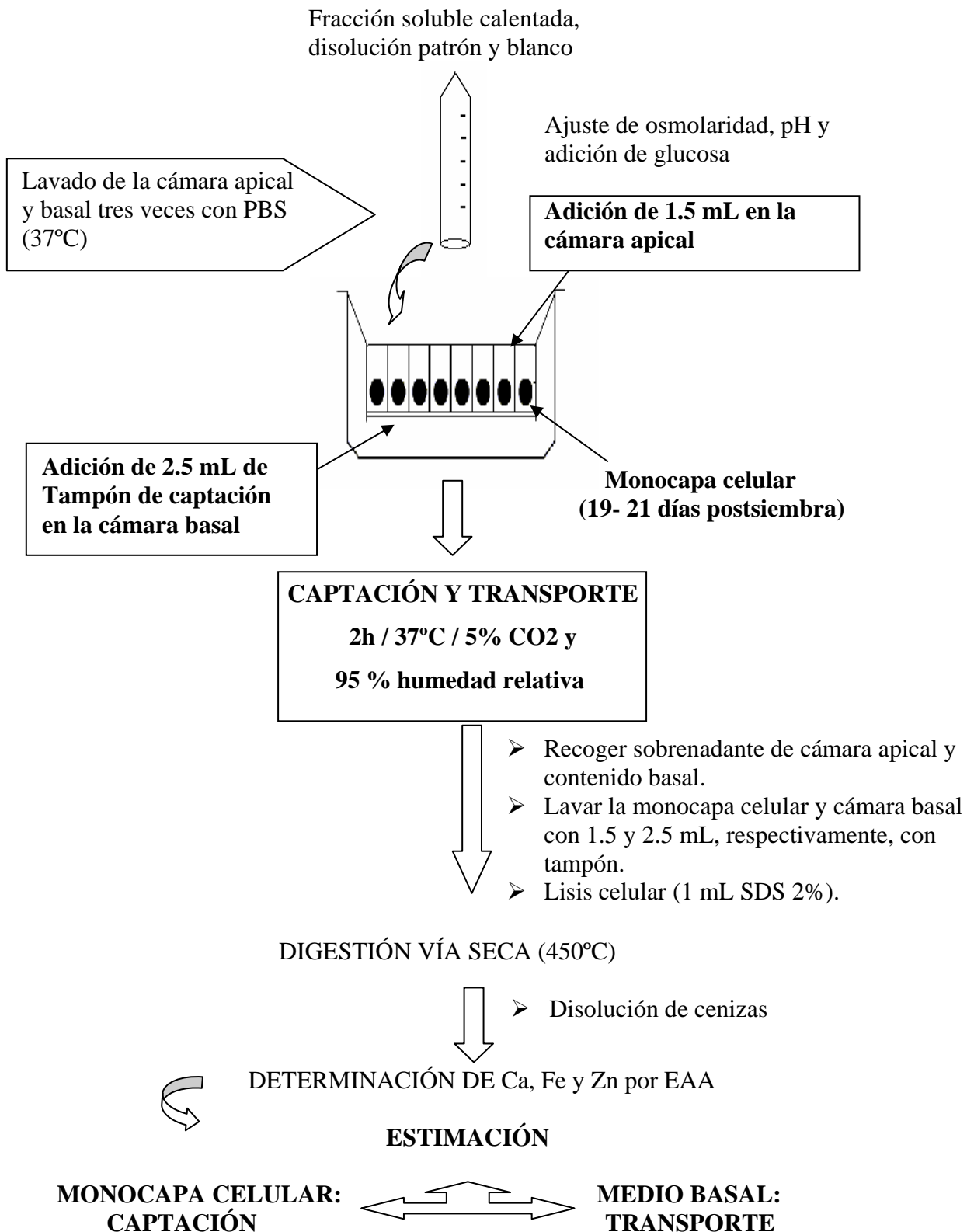
Transcurrido ese tiempo se desecha el sobrenadante de la cámara apical, el contenido de la cámara basal se recoge en vasos de precipitados de 100 mL y la superficie celular se lava, tres veces, con una disolución tampón (150 mmol / L NaCl, 1 mmol / L EDTA, 10 mmol / L HEPES) a 4°C, para retirar el medio residual y los metales unidos de forma inespecífica a la monocapa celular.

La monocapa celular se lisa con 1 mL de dodecil sulfato sódico (2% SDS) con ayuda de un rascador de células y se trasvasa a vasos de precipitados de 100 mL. El contenido de la cámara basal y las células lisadas se llevan a sequedad en una placa calefactora y se introducen en la mufla para destruir la materia orgánica vía seca (450°C), según el procedimiento descrito en el apartado de contenido mineral.

Los contenidos de calcio, hierro y cinc se determinan por espectrofotometría de absorción atómica (EAA-llama) y el contenido de cobre por espectrofotometría de absorción atómica-cámara de grafito (EAA-CG).

La captación de calcio, hierro cinc y cobre se estima por diferencia entre el contenido mineral en las células adicionadas de muestra y el blanco de células. El transporte de calcio, hierro cinc y cobre se estima por diferencia con el blanco del contenido mineral en la cámara basal (tampón de captación). El ensayo de captación y transporte mineral se representa en la figura 3.

Figura 3.- Ensayo de captación y transporte mineral por células Caco-2



Cortesía de B. Viadel. Tesis Doctoral (2002)

## **IV.5. Determinación del contenido mineral**

El análisis de los elementos estudiados en los platos seleccionados, fracciones solubles, dializadas y monocapas celulares se realiza mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) de llama, salvo la determinación de cobre en dializados y mocapas celulares que se lleva a cabo mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) con horno de grafito y efecto Zeeman.

### **Destrucción de la materia orgánica: modo operatorio**

Para la destrucción de la materia orgánica de las muestras mediante mineralización por vía seca se sigue el procedimiento descrito por Jovaní (2001).

Vasos de precipitado de 100 mL que contienen 10 g de muestra fresca, fracciones solubles o monocapa celular se llevan a sequedad en una placa calefactora se tapan con vidrios de reloj y se introducen en la mufla a 50°C. Se aplica una rampa de temperatura hasta alcanzar 450° C, según el programa de calentamiento indicado en la tabla 2.

Transcurridas 24 horas, se sacan los vasos de la mufla, se dejan enfriar a temperatura ambiente, se les adiciona 1 mL de HNO<sub>3</sub> 65% ( $\rho = 1.40$ ) y se llevan a sequedad en una placa calefactora a aproximadamente 200° C. A

continuación, los vasos se llevan de nuevo a la mufla a 450° C hasta obtención de cenizas blancas

Tabla 2.- **Destrucción de la materia orgánica. Programa de calentamiento de la mufla**

<b>Rampa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Velocidad de calentamiento (°C/min)</b>	<b>Tiempo de permanencia (min)</b>
1	100	1	5
2	150	2	10
3	200	2	5
4	250	2	10
5	300	2	10
6	350	2	10
7	400	1	10
8	450	1	Aprox. 24 horas

Las cenizas se disuelven con 2 mL de HCl fumante ( $\rho = 1.19$ ), tras tapar los vasos con un vidrio de reloj, se colocan en la placa calefactora a una temperatura inferior a 70° C durante unas 3 horas y media. Posteriormente, se adicionan otros 2 mL de HCl, se retiran los vidrios de reloj y los vasos se mantienen en placa calefactora hasta que el volumen se reduzca aproximadamente a 1 mL, completando entonces con agua destilada desionizada (ADD) hasta 10 mL.

## Determinación de calcio, hierro, cinc y cobre

Los contenidos de calcio, hierro y cinc en los platos seleccionados, fracciones solubles y dializadas y suspensiones celulares, así como los contenidos de cobre en los platos y fracciones solubles, se determinan por aspiración de la disolución obtenida después de la destrucción de la materia orgánica en un espectrofotómetro de absorción atómica con llama (Perkin-Elmer Model 2380), directamente o previa dilución. En la tabla 3 se indican las condiciones instrumentales para la determinación de calcio, hierro, cinc y cobre.

Para eliminar la interferencia química del fosfato sobre el calcio se utiliza lantano. Se adiciona a las muestras y a disoluciones patrón óxido de lantano en cantidad suficiente para obtener una concentración final de lantano del 0.1%.

Tabla 3.- **Condiciones instrumentales para la determinación de calcio, hierro, cinc y cobre por EAA de llama**

	<b>Calcio</b>	<b>Hierro</b>	<b>Cinc</b>	<b>Cobre</b>
Longitud de onda (nm)	422.7	248.3	213.9	324.8
Rendija (nm)	0.7	0.2	0.7	0.7
Intensidad lámpara (mA)	15	30	15	15
Flujo de acetileno (L·min <sup>-1</sup> )	2.5	2.0	2.0	2.0
Flujo de aire (L·min <sup>-1</sup> )	15.5	15.5	15.5	15.5
Nebulizador	Spoiler	Bola de impacto	Bola de impacto	Bola de impacto

Debido al bajo contenido de cobre en la fracción dializada y monocapa celular, los contenidos de este elemento se determinan por espectrofotometría de absorción atómica-horno de grafito (EAA) con efecto Zeeman (Perkin Elmer Analyst 600). Las condiciones instrumentales para la determinación de cobre se indican en la tabla 4.

Tabla 4.- **Condiciones instrumentales para la determinación de cobre por EAA de horno de grafito**

Longitud de onda (nm)	324.8	Tubo de grafito pirolítico
Rendija (nm)	0.7	Lámpara de cátodo hueco
Intensidad de lámpara (mA)	15	Medida por área de pico
Tiempo de lectura (s)	5	Gas inerte: Argón
Volumen inyectado (µL)	30	Pureza del Argón 99.99%

El programa de temperaturas para la determinación de cobre por espectrofotometría de absorción atómica de horno de grafito se indica en la tabla 5.

Tabla 5.- **Programa de temperaturas para la determinación de cobre por EAA de horno de grafito**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura (° C)</b>	<b>Tiempo de rampa (s)</b>	<b>Tiempo permanencia (s)</b>
Pre-secado	110	1	30
Secado	130	15	30
Mineralización	1200	10	20
Atomización*	2000	0	5
Limpieza	2450	1	3

\*Stop-flow

## Control de contaminación a partir del material de laboratorio

Para evitar cualquier contaminación en el material utilizado, tras lavar éste, con agua y detergente, se deja en contacto con HNO<sub>3</sub> ( $\rho = 1.40$ ) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se enjuaga varias veces con ADD.

## IV.6. Especiación de hierro en la fracción soluble

Para el análisis de las distintas especies de hierro, se parte de la fracción soluble de este mineral obtenida en el ensayo de solubilidad descrito. Se determina el contenido de hierro hemo, ferroso y férrico presente en dicha fracción soluble. Los reactivos utilizados en este procedimiento se detallan a continuación:

- Disolución precipitante de proteínas, 10 g de ácido tricloroacético y 10 mL de HCl concentrado ( $\rho = 1.19$ ) en 100 mL de ADD.
- Solución reductora, se disuelven 6.25 g de hidroxilamina hidroclorehidra (Aldrich, 15.941-7) en 25 mL de ADD.
- Solución cromógena: se pesan 8.203 g de acetato de sodio anhidro y 0.0125 g de batofenantrolina (Sigma, B-1375) y se completa a 50 mL con ADD. La disolución es estable a temperatura ambiente durante una semana.
- Disolución de nitrito sódico 0.39% (w/v) : se disuelven 0.39 g de nitrito sódico en 100 mL de ADD



### **Determinación de hierro total**

El contenido de hierro en la fracción soluble se determina por espectrofotometría de absorción atómica de llama, según el procedimiento descrito en el apartado de determinación de contenido mineral.

### **Determinación de hierro iónico**

Sobre una alícuota de 2.5 g de fracción soluble, obtenida en el ensayo de solubilidad, se adiciona 0.2 mL de nitrito sódico 0.39% (w/v) y ADD en suficiente cantidad hasta completar a 5g. Se añade 1.25 g de solución precipitante de proteínas y transcurridos 5 minutos 1.25 g de solución reductora. Se tapan los tubos y se introducen en un baño a 100° C.

A continuación, se centrifuga a 3000 rpm y 20° C durante 10 minutos. Una alícuota del sobrenadante de 2 mL se transfiere a una cubeta espectrofotométrica y se le adiciona 1 mL de solución cromógena. Transcurridos 10 minutos, se mide mediante espectrofotometría UV-visible la absorbancia a 535 nm.

### **Determinación de hierro ferroso**

Sobre otra alícuota de 2.5 g de fracción soluble se repite el procedimiento anterior sustituyendo los 1.25 g de solución reductora por agua destilada desionizada.

## Deerminación de hierro férrico

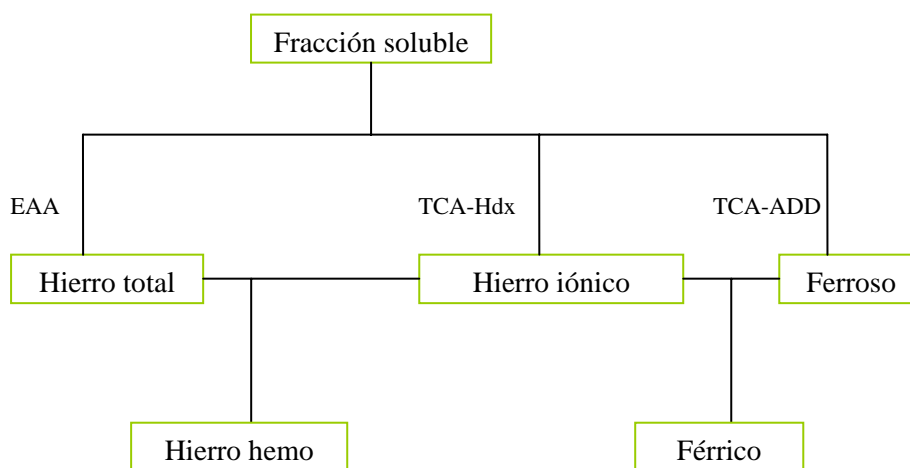
Se realiza por diferencia entre el contenido de hierro iónico y el hierro en estado ferroso.

## Determinación de hierro hemo

El contenido de hierro hemo se determina por diferencia entre el contenido de hierro total y el contenido de hierro iónico

El esquema del procedimiento de especiación de hierro se detalla en la Figura 4.

Figura 4.- Procedimiento de especiación de hierro



EAA: Espectrofotometría de absorción atómica TCA-Hdx: Ácido tricloroacético-hidroxilamina;

TCA-ADD: Ácido tricloroacético-agua desionizada

## V. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral han conducido a la realización de seis artículos (dos publicados, tres enviados para su publicación y uno en fase última de redacción descrito en el apartado de Unidad Temática). Con el fin de unificar la presentación de los resultados con el resto de las secciones de la tesis, se ha adaptado la presentación de cada publicación al formato del manuscrito de tesis, en lo referente a tipo de letra y márgenes.

---

Reference	Subject (ISI Journal Citation Reports)	Impact Factor (2002)
Biological Trace Element Research (2002) 89, 43-52	Endocrinology & Metabolism	0.871

## **Influence of dietary factors on calcium bioavailability: a brief review**

**Cámara Martos F. and Amaro López M.A**

Department of Food Science and Nutrition. University of Córdoba (Spain)

**Sumario:** Existen distintos factores que afectan a la biodisponibilidad de calcio tanto de tipo fisiológico como dietético. Sobre estos últimos es posible actuar y conseguir un apropiado status de calcio para una correcta mineralización ósea. En este sentido han sido descubiertos en la leche determinados compuestos, como lactosa y ciertos caseinofosfopéptidos formados durante la digestión de las caseinas, que parecen mejorar la absorción de calcio. Por otro lado un posible efecto inhibitor de la fibra ha sido estudiado sin resultados concluyentes entre estudios *in vivo* e *in vitro*. Asimismo, el papel del ácido fítico como inhibitor de la absorción de calcio podría prevenirse mediante el uso de determinados fructooligosacáridos que al no ser digeridos en el intestino delgado, llegan prácticamente intactos al colon donde son fermentados. Finalmente la fortificación con calcio debe realizarse con compuestos apropiados que tengan una alta biodisponibilidad, buenas propiedades tecnológicas y un correcto ratio fósforo:calcio. Por todas estas razones, el

objetivo de este trabajo es revisar y profundizar en todos los conocimientos sobre estos factores que condicionan la biodisponibilidad de calcio.

**Abstract:** There are several factors that affected calcium bioavailability, such as physiological and dietary factors. These dietary factors help to achieve an appropriate status of calcium for a correct bone mineralization. In this pathway, recently some compounds present in milk that seem improve calcium absorption such as lactose and certain caseinophosphopeptides formed during digestion of caseins have been studied. On the other hand, the possible inhibitory effect of fiber has been also studied, without conclusive results between in vitro and in vivo studies and the role of phytic acid on impairs calcium bioavailability could be prevented by using fructooligosaccharides, which cannot be digested in the small intestine and arrive practically intact to the colon, where are fermented. Finally, calcium fortification must be executed by suitable compounds with high bioavailability, better technological properties, and a correct calcium:phosphorus ratio. For that reason, the objective of the present article is to review the influence of all these conditional factors on calcium bioavailability.

## **Introduction**

Because of its structural function as a provider of resistance and rigidity to bone mass and teeth, calcium is essential for optimal growth and development (1,2). Effective absorption occurs principally in the intestine, at the level of ileum and involves two mechanisms: passive diffusion and active transport. In passive diffusion, calcium crosses the intestinal mucus by diffusion depending on the concentration gradient of the cation and is a non-saturable process (3). Active transport is a saturable process that requires the presence of vitamin D, as well as transport proteins and the subsequent use of energy (4). However, calcium retention in the organism can also be conditioned by other factors in addition to mechanisms of absorption. These can be of two kinds: individual and physiological factors or extrinsic and dietary factors (5). The aim of this article is to analyze the main dietary factors that currently affect calcium bioavailability.

## **Milk proteins and calcium bioavailability**

Variations in calcium bioavailability of milk because of its protein composition has been demonstrated in several studies about the influence of casein and serum proteins and the effect of certain phosphopeptides formed during the digestion of casein.

### **Distribution of calcium in relation to casein and serum proteins**

In breast milk, calcium is fundamentally related to serum proteins and calcium complexes of low molecular weight, while in cow's milk this cation is

principally associated with casein (6). The serum proteins:casein ratio also varies according to the type of milk; 60:40 for human milk and 20:80 for cow's milk. In cow's milk, casein forms large micelles and contains calcium phosphate in a colloidal state, whereas in breast milk the casein forms small micelles (7). It is thought that the type of micelle formed affects the digestibility and precipitation of calcium in the gastrointestinal tract and, subsequently, its bioavailability (8).

It has been indicated that higher calcium bioavailability in cow's milk versus human milk and fortified infant formulas probably is the result of higher calcium content in cow's milk, and to this calcium is associated to caseins as well. In this case, the size of cow's milk micelle and phosphate in a colloidal state presented in these micelles barely influence on calcium bioavailability and it is more important than the effect of protein composition and particularly cation-caseins relation. In this respect, when calcium dialyzed of several infant formulas was compared according to the principal protein composition (serum, casein, 50% serum-50% casein, hydrolyzed protein and soy), a greater percentage was found in formulas where casein and hydrolyzed protein were the principal protein (9), demonstrating the positive effect of caseins in the absorption of calcium. However, these formulas also contained the highest content of calcium, which may be another of the factors which most influences its bioavailability (10).



### **Effect of caseinphosphopeptides**

Phosphopeptides formed during the digestion of casein improve calcium absorption by binding with the calcium and maintaining the cation in a soluble form, thus making it bioavailable and inhibiting its precipitation in the intestine in the form of calcium phosphate (11-14). Erba et al. (15) studied the intestinal absorption of calcium from two sources of this cation: Ca-caseinphosphopeptides and  $\text{CaCl}_2$  in the absence and presence of phosphate. They found that the absorption of calcium from  $\text{CaCl}_2$  solutions decreased by 90 and 97% with respect to absorption in the absence of phosphate when the Ca:P ratios were 1:1 and 1:2 respectively. However, with the Ca-caseinphosphopeptides, absorption decreased by only 25-50% and 55-60% respectively for the same Ca:P ratios.

The positive effect of caseinphosphopeptides could not only be the result of enhancement of calcium solubility in the lumen intestinal but also to the possible protector effect of these caseinphosphopeptides against antagonist interactions between calcium and other mineral elements. In the case of iron, caseinphosphopeptides enhance its bioavailability and decrease iron-zinc interaction when both elements are bound by these caseinphosphopeptides (16). This positive effect of caseinphosphopeptides needs further investigations in the future to clarify their role on mineral bioavailability.

## **Carbohydrates and calcium absorption**

The type of carbohydrate (lactose, sucrose, glucose polymers, maltodextrines, etc) of the infant foods can affect calcium bioavailability in different ways. Moya et al (17) compared two infant formulas with two types of carbohydrates: lactose and polyose (glucose polymer). Higher percentages of calcium absorption in children fed formulas containing lactose were observed. With respect to other carbohydrates, significant differences were not found in serum levels of calcium and alkaline phosphatase, or in the mineral content of bone, in children fed with two kinds of soy-based formulas; one with only glucose polymers and the other with a mixture of glucose and sucrose polymers in equal parts (18). Nevertheless, other studies have demonstrated a higher absorption of calcium from soy formulas with lactose compared to formulas containing polyose:sucrose (19).

It seems that lactose improves calcium absorption. This positive effect of lactose has been also observed in other minerals such as zinc (20). Thus, lactose effects on uptake mineral may be attributed primarily to the disaccharide, because glucose and galactose do not increase or slightly increase the uptake of the mineral; however performance mechanism remains unknown. To determine the influence of carbohydrate type on calcium bioavailability, it is essential to standardize the calcium content in the formulas studied. Differences in calcium concentration can make interpretation of data difficult regarding the influence of other factors such as the presence of lactose.

## Dietary fiber and calcium bioavailability

Calcium bioavailability can also be conditioned by the presence of fiber in foods (21) which seems to have a negative effect on calcium absorption. This effect, however, should be looked at in great detail in terms of the role played by the different fibre fractions for binding cations (22). Thus, in rats fed with two sources of lignin from wheat bran and kale, significant differences were not observed in the absorption of  $^{45}\text{Ca}$  when compared to the control group (23). In an *in vitro* study with polyanionic polysaccharides classified as soluble fiber, the polysaccharides with a low content in sulphate and carboxyl groups (i.e. guar gum and agar) presented a low response for binding cations, and the response was greater in polysaccharides with a high content of sulphate or carboxyl groups (pectin, carrageenan and xanthan gum). This effect can be explained by the fact that all these groups are deprotonated to the intestinal pH and can interact electrostatically with the mineral cations (24). A similar behavior *in vivo* was suggest according to the conditions found in the small intestine when, after neutralizing the gastric juice in the duodene, the pH increases to as much as 6.5-7. However, other experiments with pectin and guar gum in human models and animals (25, 26) concluded that soluble dietary fiber does not have a significant effect on mineral bioavailability.

The differences between the *in vivo* and *in vitro* studies are the result of the fact that the response of the polysaccharide for cation uptake was measured in solutions in which ionic strength was low, far from the physiological conditions in which ionic strength is high. In addition, many of the minerals that

are chelated by the pectin are gradually freed in the colon when the pectins are degraded by the bacterial enzymes found there. This fact is corroborated as cecal fermentation of dietary fiber results in an increase in calcium and magnesium absorption in the large intestine (27, 28). In short, the response of some fiber components for binding cations is the result of the polyanionic nature of fiber, although many dietary components in physiological conditions can interfere in this process (24). Also, we must differentiate possible depressant effect of dietary fiber on mineral bioavailability from the influence of other components abundant in fiber materials, such as phytic acid.

### **Effects of phytic acid and fructooligosaccharides**

The reduction of the mineral bioavailability by phytic acid is widely recognized (29-31) and is based on the fact that it is a molecule charged with six phosphate groups that have shown a great response for binding to cations like calcium in the gastrointestinal tract, causing the non-bioavailability of the element for its absorption and also for later reabsorption from calcium excreted endogenously (32, 33). Phytic acid could condition calcium-zinc interaction (34, 35), because excessive calcium in the diet could imply lower solubility for Ca-phytate-Zn complexes and subsequently reduce zinc bioavailability, aspect corroborated by the inverse correlation between phytase activity and intraluminal concentrations of calcium. (36,37). However, the inhibiting effect of phytic acid on mineral absorption can be prevented by adding fructooligosaccharides to the diet, which not only increased the absorption of calcium and other minerals, but also inhibited the negative effects of phytic acid on mineral absorption (38).

This effect increase can be explained by the fact that the fructooligosaccharides can not be degraded by the enzymes present in the small intestine and therefore arrive practically intact to the colon where they are fermented by the bacterial flora present there, with developing gases, lactose and organic acids such as acetate, propionate and butyrate that lower the pH and make the calcium more soluble (38). These organic acids improve the absorption of calcium (39-45) in the colon of rats by forming low-charged mineral complexes (43), thus facilitating the transport by passive diffusion of these mineral complexes because the cell membranes have low permeability to highly charged ions like calcium (39). This effect varies according to the concentrations of calcium and organic acids present in the colon, indicating a higher effect to propionate probably because propionate is more lipid soluble and, therefore, crosses the cell membrane more easily (42, 44).

Another hypothesis to explain the beneficial effect of fructooligosaccharides as fermentable carbohydrates is the stimulation of bacterial proliferation in the colon, with a subsequently greater secretion of phytase, which would enhance the hydrolysis of phytate to phosphate and inositol (45), preventing the binding of phytate to mineral cations like calcium.

## **Calcium fortification of foods**

The most widely used salts for calcium fortification are calcium glycerophosphate, calcium gluconate and/or calcium lactate. The type of

calcium salt used does not seem to greatly affect the bioavailability of this mineral according to a study of two calcium-fortified breast milks: one with calcium gluconate and calcium glycerophosphate and the other with tribasic calcium phosphate (46). Studies on calcium-fortified infant formulas have obtained similar results (47) and concluded that the positive effects of calcium salt supplements (gluconate and/or glycerophosphate) could be attributed exclusively to the higher content of calcium present in food (48).

Other studies performed on rats fed an calcium supplement in the form of carbonate, lactate, and calcium phosphate have demonstrated that supplementation with calcium carbonate over a long period of time produced hypercalcemic, hypomagnesemic and hypophosphatemic, and calcium phosphate supplements obtained the best results for phosphorus and calcium without altering the stores of magnesium. This demonstrates the importance of calcium and phosphorus combination for proper bone mineralization (49). The solubility of calcium salt and the calcium:phosphorus ratio are important factors to manufacture infant foods enriched in calcium.

Use of calcium lactate to fortification improved the calcium balance in preterm infants with low-weight at birth (50, 51); however, this improvement is more a consequence of a higher intake of calcium derived from the addition of salt than from the effect of the calcium lactate per se (52). The possible beneficial effect of calcium lactate should be determined by taking into account such factors as the concentration of calcium in the supplement itself or the type

of milk, by comparing other types of similar salts such as calcium phosphate, calcium chloride or calcium carbonate and the established ratio of calcium:phosphorus (48).

Calcium salts used as supplements present some problems related to solubility and flavor. Calcium carbonate and calcium phosphate salts are flavorless since they are insoluble in water and watery mediums. Calcium lactate and calcium gluconate salts are soluble in water but lend foods a very strong flavor and are, thus, rejected by the consumer. Other alternative compounds have appeared such as calcium gluconate stabilized with glycine and liquid whey. Sarabia et al (53), using  $^{45}\text{Ca}$  as a marker, found that the total amount of calcium excreted in urine is ten times greater for calcium gluconate stabilized with glycine than for calcium gluconate only. The high solubility of this salt in alkaline solutions makes it easily absorbable in the intestine and subsequently highly bioavailable. With respect to the whey fraction compared to other calcium salts (carbonate, lactate and citrate), a high level of bioavailability for calcium in the whey have been found (54).

Finally, calcium supplementation must be done with a correct heat treatment of food, which involves a lower protein denature and Maillard reaction, resulting from the reaction of lactose with lysine (55) producing furosine, because Maillard reaction compounds are able to bind cations and possibly condition their bioavailability (56). Moreover, it must be considered that calcium fortification can also affect to bioavailability of other mineral

elements as magnesium (57-59), indicating a high Ca/Mg ratio as a factor of risk of cardiovascular diseases (60, 61), and iron (36).

## **Conclusions**

All those aspects which improve calcium bioavailability in infant foods are essentials to obtain a correct bone mineralization in this life period. To achieve this aim, the study of the enhancement and protection role of caseinophosphopeptides origin in caseins digestion, the real valuation of the inhibition effect of fiber, the addition to some fructo-oligosaccharides with the prebiotic effect to counteract negative influence of phytic acid, the improvement of calcium bioavailability by the formation of a complex with short-chain fatty acids, and the design of top-quality calcium supplements to fortified meals are alternatives that will allow one to tackle new strategies in the infant diet.

## **Acknowledgements**

Research work was funded by Andalusian Regional Government, Department of Education and Science, group PAI AGR-170



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- M. Hernández-Rodríguez, In *Pediatría*, ed., Díaz de Santos 2nd ed, Madrid, pp 389-393; 402-413 (1994).
- 2.- J.R. Turnlund, Future directions for establishing mineral/trace element requirements, *J. Nutr.*124, 1765s-1770s (1994).
- 3.- F. Bronner, Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications, *J. Nutr.*,117, 1347-1352 (1987).
- 4.- P. Aranda and J. Llopis, Minerals, in *Nutrición y Dietética: Aspectos Sanitarios*, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmaceúticos, ed., Madrid, España, pp. 179-240 (1993).
- 5.- R. Barberá and R. Farré, Revisión: Biodisponibilidad de los elementos traza, *Rev. Esp.Cienc.Tecnol.Aliment*, 32, 381-399 (1992).
- 6.- G.B. Fransson and B. Lönnerdal, Distribution of trace elements and minerals in human and cow's milk, *Pediatr. Res.*17, 912-915 (1983).
- 7- C.Kunz and B. Lönnerdal, Casein micelles and casein subunits in human milk, in *Protein and non-protein nitrogen in human milk*, S.A. Atkinson & B.Lönnerdal, eds., Boca Ratom, pp.9-27 (1989).
- 8.- B. Lönnerdal, Effects of milk and milk components on calcium, magnesium and trace element absorption during infancy. *Physiol. Rev.* 77, 643-669 (1997).
- 9.- M.J. Roig, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré and M.J.Lagarda, Calcium dialysability as an estimation of bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas, *Food Chem.* 64, 403-409 (1999).

- 10.- K.Cashman and A.Flynn, Effect of dietary calcium intake and meal calcium content on calcium absorption in the rat, Br. J. Nutr. 76, 463-470 (1996).
- 11.- H.M. Mykkanen and R.H. Wasserman, Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptides in rachitic and normal chicks, J. Nutr. 110, 2141-2148 (1980).
- 12.- Y.Li, D.Tome and J.F. Desjeux, Indirect effect of casein phosphopeptides on calcium absorption in rat ileum in vitro, Reprod. Nutr. Develop. 29, 227-233 (1989)
- 13.- H. Naito, H. Gunshin and T.Noguchi, Bioavailability of calcium affected by luminal and mucosal factors in the small intestine, In Nutrient Availability: chemical and biological aspects, D.Southgate, I. Johnson and G.R. Fenwick, eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 253-255 (1989).
- 14.- R. Berrocal, S. Chanton, M.A. Juillerat, B. Pavillard, J.C. Scherz y R. Jost, Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium, J. Dairy Res. 56, 335-341 (1989).
- 15.- D. Erba, S. Ciapellauo, and G. Testolin. Effect of casein phosphopeptides on inhibition of calcium intestinal absorption due to phosphate, Nutrition Research 28, 649-656 (2001)
- 16.- J.M. Pérès, S. Bouhallab, F. Bureau, J.L. Maubois, P. Arhan and D. Bouglé, Reduction of iron/zinc interactions using metal bound to the casein phosphopeptide 1-25 of  $\beta$ -casein, Nutr. Res, 19, 1655-1663 (1999).

- 17.- M. Moya, E. Cortés, M.I. Ballester, M.Y. Vento and M. Juste, Short-term polycose substitution for lactose reduces calcium absorption in healthy term babies, *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 14, 57-61 (1992).
- 18.- G.M.Chan, L. Leeper and L.S.Book, Effect of soy formulae on mineral metabolism in term infants. *Am. J. Dis. Child.* 141, 527-530 (1987).
- 19.- E.E. Ziegler and S.J. Fomon, Lactose enhances mineral absorption in infancy, *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 2, 288-294 (1983).
- 20- R.F.P. Bertolo, W.J. Bettger and S.A. Atkinson, Divalent metals inhibit and lactose stimulates zinc transport across brush border membrane vesicles from piglets, *J. Nutr. Biochem.* 12, 73-80 (2001).
- 21.- C. Brett and K. Waldron, K, *Physiology and biochemistry of plant cell walls*, 2nd ed., Chapman & Hall, London (1996).
- 22.- J.A. Rendleman, Cereal complexes:binding of calcium by bran and components of bran, *Cereal Chem.* 59, 302-309 (1982).
- 23.- X. Shen, C.M. Weaver, B.R.Martin and R.P. Heany, Lignin effect on calcium absorption in rats, *J. Food Sci.*63, 165-167 (1998).
- 24.- S.J.J. Debon and R.F.Tester, In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-starch polysaccharides, *Food Chem*, 73, 401-410 (2001).
- 25.- J.M Muñoz & B.F. Harland, Overview of the effects of dietary fiber on the utilization of minerals and trace elements, in *Handbook of Dietary Fiber in Human nutrition* 2nd ed, G.A. Spiller, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 245-252 (1993).
- 26.- M. Torre, A.R. Rodríguez and F. Saura-Calixto, Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability, *Crit. Rev. Food Sci.Nutr.* 1, 1-22 (1991).

- 27- H. Hara, M. Nagata, A. Ohta, T. Kasai, Increases in calcium absorption with ingestion of soluble dietary fibre, guar-gum hydrolysate, depend on the caecum in partially nephrectomized and normal rats, *Br. J. Nutr.* 76, 773-784 (1996).
- 28- A. Ohta, S. Baba, M. Ohtsuki, T. Takizawa, T. Adachi and H. Hara, In vivo absorption of calcium carbonate and magnesium oxide from the large intestine in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 43, 35-46 (1997)
- 29.- P.R. Saha, C.M. Weaver and A.C. Mason, Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels, *J. Agri. Food Chem.* 42, 2531-2535 (1994).
- 30.- W.R.Proulx, C.M. Weaver and M.A. Bock, Trypsin inhibitor activity and tannin content do not affect calcium bioavailability of three commonly consumed legemus, *J. Food Sci.* 58, 382-384 (1993).
- 31.- C.M. Weaver, R.P. Heany, W.R.Proulx, S.M. Hinders and P.T. Packard, Absorbability of calcium from common beans, *J. Food Sci.* 58, 1041-1043 (1993).
- 32.- J.A. Maga, Phytate: Its chemistry, occurrence, nutritional significance and methods of analysis, *J. Agric. Food Chem.* 30, 1-9 (1982)
- 33.- B.F. Harland and D. Oberleas, Phytate in foods, *Wld Rev. Nutr. Diet.*, 52, 235-259 (1987).
- 34.- H.Spencer, L. Kramer, C. Norris and D.Osis, Inhibitory effects of zinc on the intestinal absorption of calcium, *Clin. Res.* 33, 72A (abs)(1985)

- 35.-H. Spencer, C. Norris and D.Osis, Further studies on the effect of zinc on intestinal absorption of calcium in man, *J. Am. Coll. Nutr.* 11, 561-566 (1992).
- 36.- F. Couzy, C. Keen, M.E. Gershwin, J.P. Mareschi, Nutritional implications of the interactions between minerals, *Progress in food and nutrition science*,17, 65-87 (1993).
- 37.- C.F. Mills, Dietary interactions involving the trace elements, *Ann. Rev. Nutr.* 5, 173-193 (1985).
- 38.- H.W. López, C. Coudray, M.A. Levrat-Verny, C. Feillet-Coudray, C. Demigné, and C. Rémésy, Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats, *J. Nutr. Biochem.* 11, 500-508 (2000).
- 39.- T.P.Trinidad, T.M.S. Wolever and L.U. Thompson, Interactive effects of Ca and SCFA on absorption in the distal colon of man, *Nutr. Res.* 13, 417 (1993).
- 40.- L.U. Thompson, T.P.Trinidad, and T.M.S. Wolever, Ca absorption in the colon of man, *Trace Elements Man Anim* 97, 30 (1991).
- 41.- T.P.Trinidad, T.M.S. Wolever and L.U. Thompson, Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans, *Am.J.Clin.Nutr.* 63, 574 (1996).
- 42.- T.P.Trinidad, T.M.S. Wolever and L.U. Thompson, Effect of calcium concentration, acetate and propionate on calcium absorption in the human distal colon, *Nutrition* 15, 529-533 (1999).

- 43.-T. Lutz and F.Scharrer, Effect of short chain fatty acids on calcium absorption in the rat colon, *Exp Physiol.* 76, 615-618 (1991).
- 44.- W. von. Engerhardt, Absorption of short chain fatty acids from the large intestine, in *Physiological and clinical aspects of short chain fatty acids*, J.H.Cummings, J.L.Rombeau, T. Sakata, eds., Cambridge: Cambridge University Press, pp.149 (1995).
- 45.- A.Wise, and D.J. Gilbert, Caecal microbial phytate hydrolysis in the rat, *Hum. Nutr. Food Sci. Nutr.* 41F, 47-54 (1987).
- 46.- R.J.Schanler and S.A. Abrams, Postnatal attainment of intrauterine macromineral accretion rates in low birth weight infants fed fortified human milk, *J. Pediatr.* 113, 441-447 (1995).
- 47.- R.A.Ehrenkranz, P.A. Gettner, and C.M.Nelli, Nutrient balance studies in premature infants fed premature formula or fortified preterm human milk, *J. Pediatr. Gastr. and Nutr.* 8, 58-67, (1989).
- 48.- S.M. Kaup, Aspects of mineral bioavailability in infant nutrition, *Int. Dairy Journal*, 8, 435-441 (1998).
- 49.- U.N. Patwardhan, D.N. Pahuja and A.M. Samuel, Calcium bioavailability: an in vivo assessment, *Nutr Res.* 21, 667-675 (2001).
- 50.- S.A. Atkinson, J.E. Chappell, and M.T.Clandinin, Calcium supplementation of mothers milk for low birth weight infants: problems related to absorption and excretion, *Nutr. Res.*7, 813-823 (1987).
- 51.- F. Manz, L. Diekmann and G.J. Stock, Effect of calcium supplementation on calcium and phosphorus balance and renal net acid excretion in

- preterm infants fed a standard formula, *Acta Paediatr.Scand.* 78, 525-531 (1989).
- 52.- R.J.Schanler and C.Garza, Improved mineral balance in very low birth weight infants fed fortified human milk, *J. Paediatr*112, 452-456 (1988).
- 53.- M.I. Sarabia, M. Zubillaga, J. Salgueiro, A. Lysionek, T. De Paoli, A.Hager, E. Ettlin, R.Caro, R.Weill and J. Boccio, Bioavailability, biodistribution and toxicity of biocal, a new calcium source. Comparative studies in rats, *Nutr Res.* 19, 1223-1231 (1999).
- 54.-G.S.Ranhotra, M.S. Gelroth, S.D. Leinen and A. Rao, Bioavailability of calcium in a high calcium whey fraction, *Nutr. Res.*17, 1663-1670 (1997).
- 55.- R.F. Hurrell, Influence of the Maillard reaction on the nutritional value of foods, in *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*, P.A. Finot, H.U. Aeschbacher, R.F. Hurrell RF, R. Liardon, eds., Basel: Birkhäuser-Verlag, 245. (1990).
- 56.- J. O'Brien and R. Walker, Toxicological effect of dietary Maillard reaction product in the rat, *Food Chem. Toxic.* 26, 775 (1988).
- 57.- Y. Kim and H.Linkswiller, Effect of level of calcium and of phosphorus intake on calcium, phosphorus and magnesium metabolism in young adult males, *Fed Proc.* 39, 895 (1980).
- 58.- J.L. Greger, S.A. Smith and S.M. Snedeker, Effect of dietary calcium and phosphorus levels on the utilization of calcium, phosphorus, magnesium, manganese and selenium in adult males, *Nutr.Res*, 1, 315-325 (1981).

- 59.- N.M. Lewis, M.S.K. Marcus, A.R. Behling, and J.L. Greger, Calcium supplements and milk: effect on acid-base balance and on retention of calcium, magnesium and phosphorus, *Am.J.Clin.Nutr.* 49, 527-533 (1989).
- 60.- H. Karppanen, Epidemiological studies on the relationship between magnesium intake and cardiovascular diseases, *Artery*, 9,190-199 (1981).
- 61.- J. Durlach, Magnesium, in *Clinical Practice*, John Libbey and Company Ltd, pp, 1-349 (1988).



---

Reference	Subject (ISI Journal Citation Reports)	Impact Factor (2003)
International Journal of Food Science and Nutrition (2003) 54, 143-151	Food Science and Technology	0.827

## **.Nutritional aspects of zinc availability**

**Cámara F. and Amaro M.A**

Department of Food Science and Nutrition. University of Córdoba (Spain)

**Sumario:** Zinc es un elemento esencial en la nutrición humana y su deficiencia constituye un problema nutricional a nivel mundial. Sin embargo el contenido en zinc de los alimentos es bajo y su disponibilidad esta condicionado por diversos factores de tipo fisiológico y dietético. Por esta razón el objetivo del presente trabajo es recopilar información pasada y presente sobre la influencia de estos factores que condicionan la disponibilidad de este elemento.

**Abstract:** Zinc is an essential trace element in human nutrition and its deficiency is a world nutritional problem. However, the zinc content of foods is low and its availability is conditioned by several physiologic and dietary factors. For that reason, the objective of the present work is to compile past and present information about the influence of these factors on zinc availability to try to improve this availability.

## Introduction

Zinc is an essential mineral nutrient (Hambidge et al, 1986), with a complex biology, highlighting its great ubiquity and versatility. It plays an essential role in gene expression and in the regulation of cellular growth and differentiation (Hambidge, 2000) since it participates as a cofactor of more than 120 enzymes implied in the metabolism of nucleic acids, carbohydrates and proteins. Therefore, it is necessary for the DNA, RNA and proteins synthesis (Michaelson, 1997) and it plays an important role in the immunologic system and in the masculine reproductive function because it participates in the mechanism of action of testosterone (Prasad, 1982; Prasad, 1984; Forbes, 1984).

Owing to zincs ubiquity and versatility in cellular metabolism, zinc deficiency should take a deterioration of many metabolic functions (Williams, 1989). For this reason, it must be necessary for appropriate contributions of zinc in life periods during which growth and cellular differentiation is a maximum, such as pregnancy and childhood. Poor zinc status when pregnant can have adverse effects in the cerebral function of the fetus (Merialdi et al, 1998), and zinc deficiency in children has been associated with growth retardation, impaired cognitive functions, hypogonadism in males and cell-mediated immune disorders (Prasad,2001). Suplementación or fortification with zinc allows one to increase linear growth (Brown et al, 1998), to reduce diarrheal disease (Bhutta

et al. 1999; Black, 1998), to improve pregnancy outcome (Goldenberg et al, 1995) and to enhance immune function (Shankar and Prasad, 1998).

Due to these causes, it is necessary therefore deepen the study of all those factors on which we can act to achieve a correct zinc status, and that is the focus of the present review.

## **Dietary factors affecting zinc availability**

Zinc absorption at intestinal level takes place as much for active transport as for passive non-saturable diffusion (Aranda and Llopis, 1993; Steel and Cousins, 1985). The first pathway of absorption is saturable to high zinc concentrations in lumen. In relation, to second absorption pathway depends on the concentration gradient of the cation and is a non-saturable process. There are several factors, among them dietary factors, which can affect zinc absorption. There are some compounds that enhance zinc absorption, such as picolinic acid secreted by the pancreas, vitamin B<sub>6</sub> that increases picolinic acid secretion, citrate and aminoacids such as glycine, histidine, lysine, cysteine and methionine (Sandstead and Smith, 1996; Turnlund et al., 1991, Salgueiro et al, 2000). The presence of animal proteins could improve zinc absorption as demonstrated by several studies carried out with humans in which the fractional zinc absorbed increased in a linear model when increasing protein intake (Sandström, 1992). Moreover, considering that proteins are one of the main dietary sources of zinc, not only is it increasing zinc availability, but it is also increasing the presence of zinc in the diet (Lönnerdal, 2000; Sandström et al,

1980). This effect is due to intermediate products formed during digestion of these proteins that bind zinc and facilitate its absorption, although, this influence will depend on the grade of digestion of the proteins, of the composition of peptides and, in turn, of the composition in amino acids of the protein, especially sulfur-containing amino acids as cysteine.

In this pathway, similar *in vitro* studies with other elements as iron (Mulvihill and Morrisey, 1998) have found that the intake of dialyzed iron non-heme is directly related with the content in sulphhydryl groups on protein systems, showing the importance of the content in sulfurated amino acids of the meat on the increase of mineral bioavailability. Lombardi-Boccia et al (1994), studying the effect of some protein components of leguminous plants as beans on zinc and iron dialyzability, showed that the highest mineral percentage dialyzed corresponded to the globulin fraction with the highest content in cysteine as well.

Regarding compound inhibitors of zinc absorption, the following have been indicated: selenium (House and Welch, 1989), iron (Solomons and Jacob, 1981), calcium (Argiratos and Samman, 1994; Mkenna et al, 1997; Wood and Zheng, 1997), folic acid (Ghishan et al. 1986), phytic acid (Turnlund et al., 1984; House et al, 1982), tannins and fibre, (Salgueiro et al, 2000).

### Zinc corporal content

One of the main conditioning factors of zinc availability is the status of this trace element of an individual. Studies about zinc absorption carried out in children, using meals labeled with the stable isotopes  $^{67}\text{Zn}$  and  $^{70}\text{Zn}$ , indicated that the fraction of zinc absorbed was dependent on the previous diet of the child, and the percentage of zinc absorption was higher in children who had been fed previously with smaller levels of zinc (Serfass et al., 1989; Ziegler et al., 1989). Wada et al (1985) made similar studies with stable isotopes in young men and found that zinc percentage absorption was 53% when the zinc intake in the diet was 5,5 mg per day and that it decreased to 25% when was 16.5 mg per day and August et al (1989) found in young adult subjects that zinc percentage absorption was about 64% when the zinc content in the diet was 2.8-5 mg per day, but only 39% when it contained 12.8-15 mg per day. Other experiences point out that homeostasis regulation of zinc during low zinc intake periods is due to a marked decrease of endogenous zinc secretion instead of an increase in absorption of this element (Lee et al,1993; Sian et al, 1996).

In this respect, one of the main problems is to determine the corporal status of zinc, because there is not an universally accepted indicator. In epidemiological studies to determine the individual status of zinc, the plasmatic fraction of this element has been used as an indicator, despite it being known that this element trace is mainly situated inside the cell. This plasma zinc content is homeostatically regulated and also affected by others factors (diurnal

rhythm, stress, infection, starvation, plasma protein levels...) which make biochemical valuation of plasma zinc levels are not to be considered an accurate reflection of zinc status of an individual. The alternative seems that it is the determination of the metallothionein level, a zinc storage protein (Wood, 2000) whose levels diminished in young men fed a zinc-deficient diet for several days and was rapidly increased after supplementation with 50 mg of zinc per day (Grider et al., 1990). Although there is yet not enough data that identify to metallothionein as a reliable indicator to detect marginal deficiencies of zinc, and it would be necessary further investigations in the future, we can say that subjects with low metallothionein concentrations may suffer a zinc deficiency with a higher probability.

### **Zinc-mineral elements interactions**

The mechanisms involved in these interactions between zinc and other mineral nutrients are current investigation topics. In fact, the existence of a divalent cation transporter with broad specificity has recently been described at the brush border membrane level (Gunshin et al, 1997). This transporter is probably a multivalent metal channel that could justify numerous interactions between zinc and other divalent metallic cations, due to competition for this common transport. The effect of  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  and  $\text{Mn}^{+2}$  on zinc absorption has been studied. All of these metals were capable of inhibiting  $\text{Zn}^{+2}$  uptake at various concentrations, and the results suggest that these metals may compete with  $\text{Zn}^{+2}$  for transport across the brush border membrane.

Nevertheless, this antagonistic effect depends on the cation concentration in question and it is coincident with the affinity of these cations by this metallic channel of transport ( $\text{Cu}^{+2} \gg \text{Zn}^{+2} > \text{Fe}^{+2} > \text{Mn}^{+2} \gg \text{Ca}^{+2} > \text{Mg}^{+2}$ ). Independently of these highly specific interactions, this could not preclude the possibility that multiple transporters are involved in the various metal-metal interactions observed (Bertolo et al, 2001).

Other studies inform about the negative effect on copper absorption and retention of high levels of zinc. The mechanism of this zinc-copper interaction can be explained by two hypothesis. One on the existence of a competitive antagonistic direct interference between both minerals at level of absorption, derived from their similar chemical/biochemical properties and in agreement with that described previously in relation to the metal channel transporter. The second hypothesis is based in an increase of metallothionein synthesis by the intestinal cells owing to higher zinc levels in the diet (Mills, 1985; August et al., 1989; Castillo-Durán et al., 1990; Sandstead 1995). Metallothioneins are cytosolic proteins with high cysteine content that can bind seven atoms of zinc per molecule of protein and it represents the form in which the zinc is stored in the liver, once it has been absorbed and transported by albumin in the blood. On the contrary, metalothioneins can also bind copper with higher affinity, thus an increase in metalothioneins synthesis due to high intakes of zinc in the diet will favor a sequestrate action of copper, reducing its absorption and its availability (Couzy et al,1993; Salgueiro et al. 2000). Nevertheless, other

investigations point to no clear interaction between zinc and copper to nutritional dose (Lönnerdal 1996).

It has been indicated that a zinc-iron interaction can affect mineral availability of both elements. However, controversy exists to this respect, since certain studies have demonstrated, using isotopes of zinc, that iron fortification did not suppose any negative effect on zinc absorption (Davidsson et al,1995; Fairweather - Tait et al,1995). Considering this possible interaction, it could be prevented when zinc or iron is binding to certain caseinophosphopeptides, such as 1-25 of  $\beta$ -casein, also improving iron absorption (Pérès et al, 1997). This 1-25-caseinophosphopeptide, a product of  $\beta$ -casein hydrolysis in human intestinal lumen after ingestion of milk or yogurt (Chabancey et al, 1998), has four or five phosphoserine residues of native protein that can bind divalent cations such as zinc, iron or calcium (Bouhallab et al, 1991; West, 1986). Iron absorption was studied in rats fed with ferrous gluconate or iron bind to 1-25- $\beta$ -caseinophosphopeptide in presence of zinc sulphate or zinc also bind to 1-25- $\beta$ -caseinophosphopeptide to different ratios of Fe:Zn (Pérès et al, 1999a). Inhibition of ferrous gluconate absorption by zinc sulphate occurred to a ratio 1:1.5. However, when iron was bound to 1-25- $\beta$ -caseinophosphopeptide inhibition was not observed until a ratio of 1:5. When the zinc was bound to 1-25- $\beta$ -caseinophosphopeptide, any inhibition on iron absorption was observed inside ratios Fe:Zn studied neither with ferrous gluconate nor iron bound to caseinophosphopeptide. Protection offered for binding of trace elements to this



kind of caseinophosphopeptide could explain the decreasing of interactions between both minerals. Moreover, phosphoserine residues are strong ligands for divalent cations (Bouhallab et, 1991), keeping them in a soluble state in the intestinal lumen and increasing their availability. Another hypothesis to explain decrease in zinc-iron interactions points to these trace elements, when they are binding to 1-25- $\beta$ -caseinophosphopeptide they are partly absorbed by specific pathways, including endocytosis, which do not share the same transport mechanism as free ions (Pérès et al, 1999b).

Another aspect of zinc-iron interaction is the synthesis of zinc protoporphyrin in erythrocytes like a substrate alternative to ferrochelatase in group heme formation. During group hemo biosynthesis, ferrochelatase catalyzes the chelation ferrous ion by protoporphyrin, as the final reaction in formation of this group (figure 1). Later, the group heme formed will unite with globin forming hemoglobin. Since ferrochelatase can catalyze as much iron chelation as zinc to protoporphyrin (Bloomer, 1983) a small fraction of zinc protoporphyrin will be formed in trace quantities on erythrocytes in states of iron sufficiency. However during periods of iron insufficiency or impaired iron utilization in which there is a protoporphyrin excess free of iron, the quantity of zinc protoporphyrin formed will be considerably larger (Labbé et al, 1999). For this reason, the zinc protoporphyrin/ heme ratio could be a good parameter to diagnose states of iron deficiency (Rettmer et al, 1999; Labbé et al, 1999) much better than other biochemical indicators traditionally used as hemoglobin

concentration and hematocrit measures that are especially poor diagnostic tests in preanemic states (Kazal, 1996). This zinc protoporphyrin with diagnostic properties would also have therapeutic properties in hyperbilirubinemia state prevention (Labbé et al, 1999). This substance will not be able to be formed in high quantities as a consequence of the degradation of the heme group by heme oxygenase to carbon monoxide and biliverdin (Tenhunen et al, 1969), with the later reduction of this biliverdin to bilirubin (Vreman et al, 1988).

Finally, calcium excess (>1 g.) in the diet can also impairs zinc availability and, reciprocally, zinc suplementación reduces calcium absorption to Zn/Ca relationships higher than 0.7 (Spencer et al, 1985; Spencer et al, 1992). Nevertheless, the degree of calcium-zinc interaction seems to be conditioned by the presence of phytic acid in the diet. Excessive calcium in the diet could imply lower solubility for Ca-phytate-Zn complexes and subsequently reduce zinc availability, an aspect corroborated by the inverse correlation between phytase activity and intraluminal concentrations of calcium. (Mills et al, 1985).

### **Other dietary factors**

Fiber has been frequently related with a negative effect on zinc absorption, however several experiences carried out in past years have questioned this effect, and authors indicate that, in fact, many foods rich in fiber also contain some impurities such as phytic acid, and that fiber in itself has no or little effect on zinc absorption (Lönnerdal, 2000; Nävert et al, 1985). Hara et al (2001)

studied zinc absorption as zinc carbonate in the presence of several fibre sources, and observed that some of these sources, such as corn husk fibre improved zinc absorption in front of a fiber-free diet, when fiber intake in the diet was low. However, when increased fiber intake in the diet, zinc absorption diminished. This performance was justified, arguing that zinc ions released from zinc carbonate by gastric acid remain bound to uronic acid residues of fiber without precipitation as insoluble salts and the zinc bound to the fiber is absorbed after passing into the small intestine. However, in the case of high intakes of this kind of fiber, this effect cannot be explained and zinc absorption is diminished, highlighting the dual effects of some kind of fiber on zinc absorption. In other investigations, there is not agreement between studies *in vivo* and *in vitro*. Debon and Tester (2001) studied *in vitro* binding of zinc and other minerals by polyanionic polysaccharides classified as soluble fiber. The polysaccharides with a high content of sulphate or carboxyl groups as pectin, carrageenan and xanthan gum presented a great response for binding cations because all these groups are deprotonated to the intestinal pH and can interact electrostatically with mineral cations. At a pH of the small intestine of about 6.5-7, a similar performance *in vivo* was expected; however, other experiments with pectin and guar gum in human and animals models ( Muñoz and Harland, 1993; Torre et al, 1991) have concluded that soluble dietary fiber does not have a significant effect on mineral bioavailability. The differences between *in vivo* and *in vitro* studies are due to the polysaccharides response to bind cations measured in solutions where the ionic strength was low, far to the physiological conditions in which ionic strength is high.

More clear and widely accepted is the role of phytic acid to impair absorption of several essential minerals (López et al, 2000; Harland and Narula, 1999; Lombardi-Boccia et al, 1991; Oberleas, 1983). It is a very ubiquitous molecule in legumes, cereals, fruits and vegetables, and it contains six charged phosphate groups that have shown great response for binding to cations such as zinc in the gastrointestinal tract, causing the non-bioavailability of the element for its absorption. For that reason, phytic acid is considered one of the main antinutritional factors of vegetable foods. Furthermore, as has already been mentioned, phytic acid enhances zinc-calcium interactions.

However, studies of performance in rats have shown that this effect could be prevented by use of some saccharides such as fructooligosaccharides (Lopez et al, 2000) which cannot be digested and therefore arrive practically intact to the colon where they are fermented by the bacterial flora present there, with developing gases, lactose and organic acids such as acetate, propionate and butyrate. This organic acids forms soluble ligands with zinc, preventing the formation of insoluble zinc phytates. Another possibility is that fructooligosaccharides stimulate bacterial proliferation in the cecum, consequently producing phytase enzyme that catalyzes the stepwise hydrolysis of phytate to phosphate and inositol.

On the other hand, it has been indicated that some saccharides, such as lactose and glucose polymers, could improve zinc absorption at the brush border membrane level (Bertolo et al, 2001). However, this effect of lactose is not observed in the presence of its monosaccharides components (galactose + glucose), which is why lactose disaccharide is the only possible stimulative effect on zinc absorption. In the same way, the inductive effect of glucose polymers is not observed in the presence of maltose, the mechanism by which lactose and glucose polymers improve zinc availability being unknown (Bertolo et al, 2001). Many infant formulas and fortified human milk use glucose polymers to reduce osmolarity and to compensate for low lactase activity in premature infants (Shulman et al, 1995). Further investigations are needed to clarify the effect of glucose polymers and other saccharides in the mechanism of zinc absorption.

### **Effect of technological factors on zinc availability**

Thermal treatments carried out in the manufacture of infant formulas could impair zinc availability as consequence the formation of Maillard reaction products due to the reaction of lysine with lactose (Sarriá and Vaquero, 2001). Maillard browning products bind zinc forming an insoluble complex that diminish zinc availability (Furniss et al, 1989), although this decrease will depend on the intensity and numbers of stages of thermal treatment (Sarriá and Vaquero 2001). In addition, thermal treatment produces protein denaturing of proteins

involved in the trace element absorption mechanism (Tancent et al., 1993; Pérez-Llamas et al, 1996).

Processing of some vegetable foods, however, leads to hydrolysis of phytic acid to penta, tetra and tri- inositol phosphate with a low capacity for binding minerals, and reduce its bioavailability. Penta-inositol also reduces zinc bioavailability (Lönnerdal et al, 1989) but not tetra- and tri-inositol (Sandberg et al, 1989). Thus, cooking of white beans reduced the inositol hexaphosphate content and increased the penta, tetra and tri-inositol content. Although zinc dialyzability from cooked beans was not higher than from raw beans, albumin deriving from cooked beans showed a significant increase in zinc dialyzability and that is due, in part, to the presence of inositols, mono- and diphosphates (Lombardi-Boccia et al, 1998).

Fermentation of milk with *S. termophilus* and *L. bulgaricus* yielding yogurt increases zinc availability compared with raw milk, justified by several possible reasons; i) zinc is associated mainly with casein molecules, which are thermoresistant to industrial treatments; ii) fermentation of milk by homofermentative bacterias produces lactic acid, which reduces pH leading to coagulation of casein micelles; iii) the zinc-binding capacity of casein micelles diminishes and zinc is not bound by their phosphate groups, enhancing zinc availability. Some authors indicate lactic acid generated during the fermentation as the main factor responsible for this effect (Van Dael et al, 1993).

In relation to zinc fortification of foods, it is necessary to mention that the zinc content of foods is low, even in those foods considered sources of zinc (Johnson et al., 1996; Sandstead and Smith 1996) and that zinc in meals, to high pH, forms hydroxides which precipitate and diminish its availability (Shen et al 1994). These facts of zinc nutritional physiology force one to fortify foods with this trace element, especially those foods dedicated to the feeding of groups whose zinc requirement is essential for an appropriate development, such as infant community. Zinc compounds commonly used in food fortification are zinc sulphate and zinc oxide (Johnson et al., 1998), stressing the first is a consequence of an appropriate availability, although it interacts with the food matrix producing a non-desirable food flavour and zinc oxide is insoluble in liquid foods so its use is restricted to solid foods. Moreover, of these supplements, at the present time, a new compound is being investigated; zinc gluconate stabilized with glycine which presents the same availability as zinc sulfate, has high solubility, soft taste, no modification of sensorial food characteristics and low cost (Salguero et al, 2000).

## **Conclusions**

Due to zinc being essential in maintenance of many metabolic functions, it is necessary for an appropriate contribution of this element, especially in periods of life when growth and cellular differentiation is at a maximum (childhood and pregnancy). Considering that zinc content in foods is low, it is

necessary to go into the study of all those factors that improve its availability. In this sense, certain components of milk and infant formulas such as lactose, glucose polymers, and caseinophosphopeptides may improve zinc absorption and, in the case of caseinophosphopeptides, diminish interactions with other mineral elements as well. This positive effect of caseinophosphopeptides could be attributed to an increase in zinc solubility when it is bound to phosphoserine residues or to zinc-caseinophosphopeptide complex that is absorbed by a pathway different as the free ion from which there is no interaction with other divalent cations at brush border membrane level. A positive effect has also been observed on zinc absorption to low intakes of some kind of fiber; as a consequence this element is bound by uronic acid residues, keeping it soluble in lumen intestinal. This effect is not observed for high intakes of fiber, from which it is necessary future investigations that clarify whether the traditional negative effect of fiber on mineral absorption is due itself to fiber fractions or to some impurities in fiber materials such as phytic acid. Formulation foods with compounds that improve zinc availability must be accompanied by an appropriate manufacture that reduces the negative effect of some thermal treatments and of fortification with salts, which not only increases availability, but rather are also soluble and do not modify sensorial food characteristics.

### **Acknowledgements**

Research work was funded by Andalusian Regional Government, Department of Education and Science, group PAI AGR-170



**References:**

- Aranda P and Llopis J (1993): Minerales. In *Nutrición y Dietética, Aspectos Sanitarios*, ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, pp. 179-240. Madrid, España.
- Argiratos V and Samman S (1994): The effect of calcium carbonate and calcium citrate on the absorption of zinc in healthy female subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **48**, 198-204.
- August D, Janghorbani M and Young VR (1989): Determination of zinc and copper absorption at three dietary Cu-Zn ratios by using stable isotope methods in young adult and elderly subjects. *Am.J.Clin.Nutr.* **50**, 1457-1463.
- Bertolo RFP, Bettger WJ and Atkinson SA (2001): Divalent metals inhibit and lactose stimulates zinc transport across brush border membrane vesicles from piglets. *J. Nutr. Biochem.* **12**, 73-80.
- Bhutta ZA, Black RE, Brown KH, Gardner JM, Gore S, Hidayat A, Khatun F, Mortorell R, Ninh NX, Penny ME, Rosado JL, Roy SK, Ruel M, Sazawall S, and Shankar A. (1999): Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *J. Pediatr.* **135**, 689-697.
- Black RE (1998): Therapeutic and preventive effects of zinc on serious childhood infectious diseases in developing countries. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**(suppl), 476S-479S.
- Bloomer JR, Reuter RJ, Morton KO and Wehner JM (1983): Enzymatic formation of zinc-protoporphyrin by rat liver and its potential effect on hepatic heme metabolism. *Gastroenterology.* **85**, 663-668.

- Bouhallab S, Leonil J and Maubois JL (1991): Complexation du Fer par le phosphopeptide (1-25) de la caséine  $\beta$ : actino de l'alcalase et de la phosphatase acide. *Lait* **71**, 173-180.
- Brown KH, Peerson JM and Allen LH (1998): Effect of zinc supplementation on children's growth: a meta-analysis of intervention trials. *Bibl. Nutr. Dieta.* **54**, 76-83.
- Castillo-Durán C, Vial P and Uauy R (1990): Oral copper supplementation effect on copper and zinc balance during acute gastroenteritis in infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **51**, 1088-1092.
- Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jollès P and Fiat AM (1998): Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yoghurt. *Biochimie.* **80**, 155-165.
- Couzy F, Keen C, Gershwin ME, Mareschi JP (1993): Nutritional implications of the interactions between minerals. *Progress in food and nutrition science.***17**. 65-87.
- Davidsson L, Almgren A, Sandstrom B and Hurrell RF (1995): Zinc absorption in adult humans: the effect of iron fortification. *Br. J. Nutr.***74**. 417-425.
- Debon SJJ and Tester RF (2001): In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-starch polysaccharides. *Food Chem.* **73**, 401-410
- Fairweather-Tait SJ, Wharf SG and Fox TE (1995): Zinc absorption in infants fed iron-fortified weaning food. *Am.J.Clin.Nutr.* **62**. 785-789.
- Forbes RM (1984): Use of laboratory animals to define physiological functions and availability of zinc. *Fed. Proc.* **43**, 2835-2839.

- Furniss DE, Vuichoud J, Finot PA and Hurrell RF (1989): The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat. *Br. J. Nutr.* **62**, 739-749.
- Ghishan FK, Said HM, Wilson P, Murrell JE, and Greene HL (1986): Intestinal transport of zinc and folic acid: a mutual inhibitory effect. *Am. J. Clin. Nutr.* **43**, 258-262.
- Goldenberg RL, Tamura T, Neggers Y, Haghsherass M, Amerhakemi GH, Barakat R.M and Reinhold JG (1995): The effect of zinc supplementation on pregnancy outcome. *J. Am. Med. Assoc.* **274**, 463-468.
- Grider A, Bailey LB, and Cousins RJ (1990): Erythrocyte metallothionein as an index of zinc status in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 1259-1262.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL and Hediger MA (1997): Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* **388**, 482-488.
- Hambidge KM, Casey CE and Krebs NF (1986): Zinc. In. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, ed .W Mertz, pp. 1-137. Academic Press: Orlando, Florida.
- Hambidge M (2000): Human zinc deficiency. *J.Nutr.* **130**,1344S-1349S.
- Hara H, Hayashi K and Aoyama Y (2001): Intestinal absorption of zinc is promoted by low-level intake but inhibited by high-level intake of corn husk fiber in rats. *Nutr. Res.* **21**, 627-637.
- Harland BF and Narula G (1999): Food phytate and its hydrolysis products. *Nut. Res.* **19**, 947-961.

- House WA, Welch RM and Van Campen DR (1982): Effect of phytic acid on the absorption , distribution and endogenous excretion of zinc in rats. *J. Nutr.* **112**, 941-953.
- House WA and Welch RM (1989): Availability of and interactions between zinc and selenium in rats fed wheat grain intrinsically labeled with Zn<sup>65</sup> and Se<sup>75</sup>. *J.Nutr.* **119**, 916-921.
- Johnson PE (1996): New approaches to establish mineral element requirements and recommendations: an introduction. *J.Nutr.* **126**, 2309s-2311s.
- Johnson MA, Smith MM and Edmons JT (1998): Copper, iron, zinc and manganese in dietary supplements, infant formulas and ready-to-eat-breakfast cereals. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 1035s-1040s.
- Kazal LA (1996): Failure of hematocrit to detect iron deficiency in infants. *J.Fam.Pract.* **42**, 237-240.
- Labbé RF, Vreman HJ and Stevenson DK (1999): Zinc protoporphyrin: a metabolite with a mission. *Clin. Chem.* **45(12)**, 2060-2072.
- Lee DY, Prasad AS, Hydric-Adair C, Brewer G and Johnson PE (1993): Homeostasis of zinc in marginal human deficiency: role of absorption and endogenous excretion of zinc. *J.Lab. Clin.Med.* **122**. 549-556.
- Lombardi-Boccia G, Di Lullo G and Carnovale E (1991): In vitro iron dialisability from legumes:influence of phytate and extrusion-cooking. *J. Sci. Food Agric.* **56**, 599-605.
- Lombardi-Boccia G, Carbonaro M, Di Lullo G and Carnovale E (1994): Influence of protein components (G1, G2 and albumin) on Fe and Zn dialysability from bean . *Int. J. Food Sci. Nutr.***45**. 183-190.

- Lombardi-Boccia G, Schlemmer U, Cappelloni, M and 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 Chem.* **63**, 1-7.
- Lönnerdal B, Sandberg AS, Sandstrom B and Kurtz C (1989): Inhibitory effect of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *J. Nutr.* **119**, 211-214
- Lönnerdal B (1996): Availability of copper. *Am.J.Clin.Nutr.* **126**, 821s-829s.
- Lönnerdal B (2000): Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr.* **130**, 1378S-1383S.
- Lopez HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, Demigné C and Rémesy C (2000): Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J. Nutr. Biochem.* **11**, 500-508.
- Meriardi M, Caulfield LE, Zavaleta N, Figueroa A and DiPietro JA (1998): Adding zinc prenatal iron and folate tablets improves fetal neurobehavioral development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**, 483-490.
- Michaelsen KF (1997): Nutrition and growth during infancy. *Acta Paediatr.* **86**(Suppl 420), 1-36.
- Mills CF (1985): Dietary interactions involving the trace elements. *Ann. Rev. Nutr.* **5**, 173-193.
- Mkena AA, Ilich JZ, Andon MB, Wang CH and Matkovic V (1997): Zinc balance in adolescent females consuming a low-or-high-calcium zinc diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**, 1460-1464.

- Mulvihill B and Morrisey P (1998): Influence of the sulphhydryl content of animal proteins on in vitro bioavailability of non-heme iron. *Food Chem.* **61**, 1-7.
- Muñoz JM and Harland BF (1993): Overview of the effects of dietary fiber on the utilization of minerals and trace elements. In Spiller GA *CRC Handbook of dietary fiber in human nutrition 2<sup>nd</sup> ed.* CRC Press, Boca Raton, pp. 245-252.  
Florida
- Nävert B, Sandström B and Ceberblad Å (1985): Reduction of the phytate content of bran by leavening in bread and its effect on absorption of zinc in man. *Br. J. Nutr.* **53**, 47-53.
- Oberleas D (1983): Phytate content in cereals and legumes and methods of determination. *Cereal Foods World.* **28**, 352-357.
- Pérès JM, Bouhallab S, Bureau F, Maubois JL, Arhan P, Bouglé D (1997): Absorption digestive du fer lié au caséinophosphopeptide 1-25 de la  $\beta$ -caséine. *Lait* **77**, 433-440.
- Pérès JM, Bouhallab S, Bureau F, Maubois JL, Arhan P, Bouglé D (1999a): Reduction of iron/zinc interactions using metal bound to the caseinphosphopeptide 1-25 of  $\beta$ -casein. *Nutr. Res.* **19**, 1655-1663.
- Pérès JM, Bouhallab S, Bureau F, Neuville D, Maubois JL, Arhan P, Bouglé D (1999b): Mechanism of absorption of caseinophosphopeptide bound iron. *J. Nutr. Biochem.* **10**, 215-222.
- Pérez-Llamas F, Diepenmaat-Wolters MGE and Zamora S (1996): In vitro availability of iron and zinc: effects of the type, concentration, and fractions of digestion products of the protein. *Br. J. Nutr.* **76**, 727-741.

- Prasad AS (1982): Clinical and biochemical spectrum of zinc deficiency in human subjects. In *Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements. Current Topics in Nutrition and Disease*, ed. A.S. Prasad, vol 6, pp. 3-62. New York
- Prasad AS (1984): Discovery and importance of zinc in human nutrition. *Fed. Proc.* **43**, 2829-2834.
- Prasad AS (2001): Discovery of human zinc deficiency: impact on human health. *Nutrition.* **17**, 685-686.
- Rettmer RL, Carlson TH, Origenes ML, Jack RM and Labbé RF (1999): Zinc protoporphyrin / Heme ratio for diagnosis of preanemic iron deficiency. *Pediatrics.* **104(3)**, 37-41.
- Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R and Boccio J (2000): Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr Res.* **20(5)**, 737-755.
- Sandsberg AS, Carlsson NG and Svanberg U (1989): Effects of inositol Tri, Tetra Penta and Hexaphosphates on *in vitro* of iron availability. *J. Food Sci.* **54**, 159-161.
- Sandstead HH (1995): Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 621s-624s.
- Sandstead HH and Smith Jr. J (1996): Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradigms for determining zinc dietary recommendations. *J. Nutr.* **126**, 2410s-2418s.
- Sandström B, Arvidsson B, Cederblad A and Bjorn-Rasmussen E (1980): Zinc absorption from composite meals. I. The significance of wheat extraction

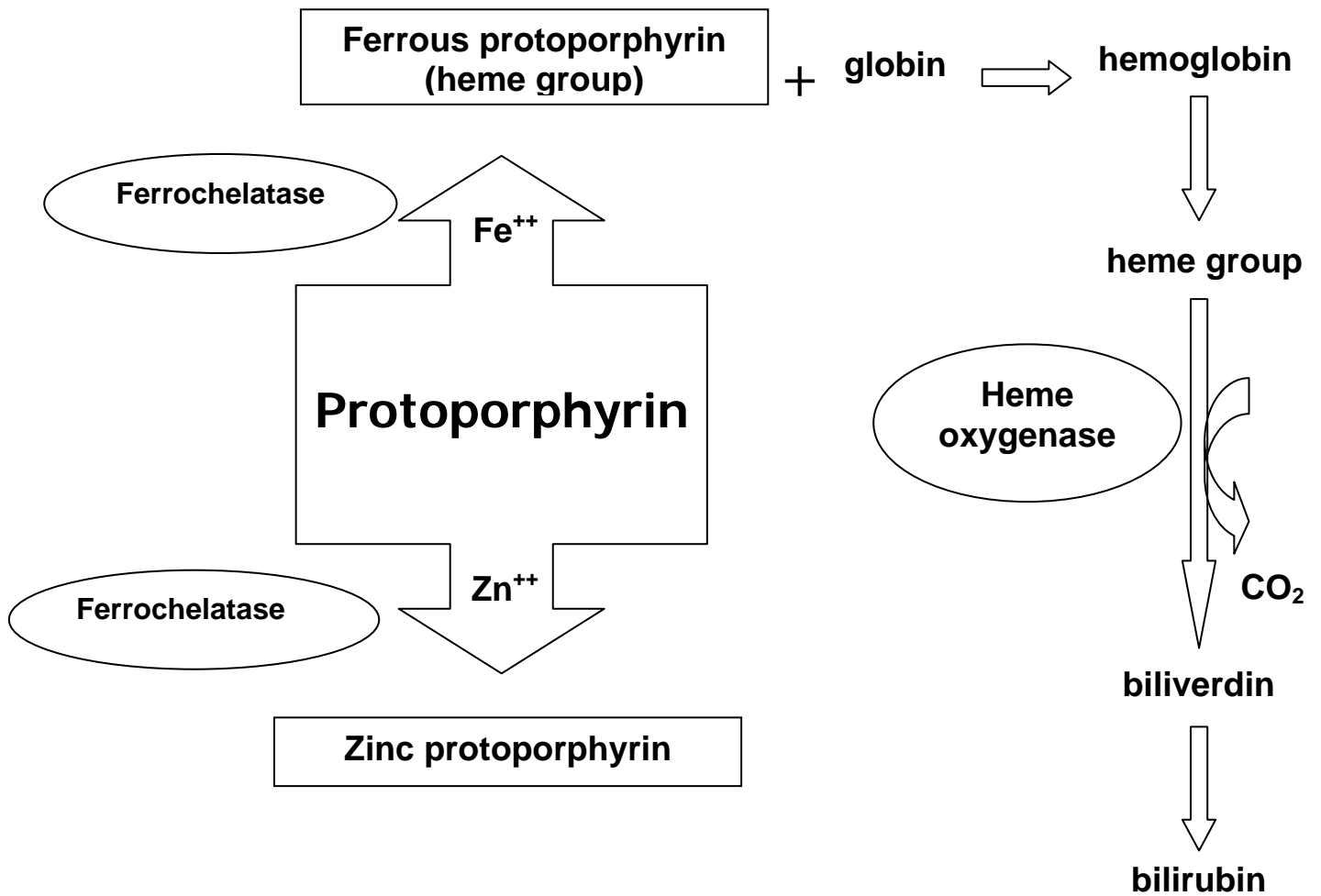
- rate, zinc, calcium, and protein content in meals based on bread. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 739-745.
- Sandström B (1992): Dose dependence of zinc and manganese absorption in man. *Proc. Nutr. Soc.* **51**, 211-218.
- Sarriá B and Vaquero M<sup>a</sup>P (2001): Zinc and iron availability in a powder or in-bottle-sterilized infant formula estimated by in vitro and in suckling rats. *J. Nutr. Biochem.* **12**. 266-273.
- Serfass, R.E., Ziegler, R.R., Edwards, B.B., Houk, R.S. (1989) Intrinsic and extrinsic stable isotopic zinc absorption by infants from formulas. *J.Nutr.***119**. 1661-1669.
- Shankar AH and Prasad AS (1998): Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**(suppl), 447S-463S.
- Shen L, Luten J, Robberecht H, Bindels J y Deelstra H (1994): Modification of an in-vitro method for estimating the availability of zinc and calcium from foods. *Z. Lebensm Unters Forsch.* **199**, 442-445.
- Shulman RJ, Feste A and Ou C (1995): Absorption of lactose, glucose polymers, or combine in premature infants. *J. Pediatr.* **127**, 626-631.
- Sian L, Mingyian X, Miller LV, Tong L, Krebs NF and Hambidge KM (1996): Zinc absorption and intestinal losses of endogenous zinc in young Chinese women with marginal zinc intakes. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**, 348-353.
- Solomons NW and Jacob RA (1981): Studies on the availability of zinc in humans: effects of heme and nonheme iron on the absorption of zinc. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 475-482.



- Spencer H, Kramer L, Norris C and Osis D (1985): Inhibitory effects of zinc on the intestinal absorption of calcium. *Clin. Res.* **33**, 72A (abs).
- Spencer H, Norris C and Osis D (1992): Further studies on the effect of zinc on intestinal absorption of calcium in man. *J. Am. Coll. Nutr.* **11**, 561-566.
- Steel L and Cousins R J (1985): Kinetics of zinc absorption by luminally and vascularly perfused rat intestine. *Am. J. Physiol.* **248**, G46-G53.
- Tancet F, Lauthier F and Ripoche P (1993): Mechanisms of zinc transport into pig small intestine brush-border membrane vesicles. *J.Physiol.* **465**, 57-72.
- Tenhunen R, Marver HS and Schmid R (1969): Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J.Biol.Chem.* **244**, 6388-6394.
- Torre M, Rodríguez AR and Saura-Calixto F (1991): Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Crit. Rev. Food Sci.Nutr.* **1**, 1-22.
- Turlund JR, King JC, Keyes WR, Gong B and Michel MC (1984): A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and alpha-cellulose. *Am. J. Clin. Nutr.* **40**, 1071-1077.
- Turlund JR, Keyes WR, Hudson CA, Betschart AA, Kretsch MJ, Sauberlich HE (1991): A stable-isotope study of zinc, copper and iron absorption and retention by young women feed vitamin B6-deficient diets. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1059-1064.
- Van Dael P, Shen LH and Deelstra H (1993): Influence of milk processing on the in vitro availability of zinc and selenium from milk. *Availability*.322-325
- Vreman HJ, Stevenson DK, Henton D and Rosenthal P (1988): Correlation of carbon monoxide and bilirubin production by tissue homogenates. *J. Chromatogr.* **427**, 315-319.

- Wada L, Turnlund JR and King JC (1985): Zinc utilization in young men fed adequate and low zinc intakes. *J. Nutr.* **115**, 1345-1354.
- West DW (1986): Structure and function of the phosphopyrilated residues of casein. *J. Dairy Sci.* **53**, 333-352.
- Williams RJP (1989): An introduction to the biochemistry of zinc. *In Zinc in Human Biology* ed. Mills CF, pp. 15-31. Springer-Verlang Berlín, Germany.
- Wood RJ and Zheng JJ (1997): High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**, 1803-1809.
- Wood RJ (2000) Assessment of marginal zinc status in humans. *J. Nutr.* **130**, 1350s-1354s.
- Ziegler EE, Serfass RE, Nelson SE, Figueroa-Colón R, Edwards BB, Houk RS and Thompson JJ (1989): Effect of low zinc intake on absorption and excretion of zinc by infants studied with <sup>70</sup>Zn as extrinsic tag. *J. Nutr.* **119**, 1661-9.

Figure 1.- Relations between ferrous and zinc protoporphyrin.



Reference	Subject (ISI Journal Citation Reports)	Impact Factor (2003)
International Journal of Food Science and Nutrition	Food Science and Technology	0.827

## **Iron availability: an update review**

**Amaro López M.A and Cámara Martos F.**

Department of Food Science and Nutrition. University of Córdoba (Spain)

**Sumario:** El hierro es un elemento esencial en la nutrición humana y su deficiencia constituye un problema nutricional a nivel mundial. Debido a la alta prevalencia de anemia en países industrializados y en vías de desarrollo, es necesario mantener una adecuada cantidad de hierro a través de la dieta para conseguir unos niveles apropiados de este elemento en el organismo. Por esta razón, un profundo conocimiento sobre la biodisponibilidad de hierro en los alimentos es esencial para diseñar estrategias de intervención destinadas a mejorar las situaciones de deficiencia en este elemento. Respecto a las dos formas en las que se puede encontrar el hierro en los alimentos, el hierro hemo tiene una mayor biodisponibilidad que el hierro no hemo. Junto a esto, la biodisponibilidad del hierro no hemo está condicionada por diversos factores dietéticos, algunos bien conocidos, como ácido ascórbico, carne, fibra, ácido fólico, polifenoles, y otros más recientes como caseinofosfopéptidos y fructooligosacáridos. Por esta razón, el objetivo de este artículo es una profunda revisión sobre todas las investigaciones realizadas en la década pasada relacionadas con los factores dietéticos que influyen en la biodisponibilidad de las diferentes formas de hierro

**Summary:** Iron is an essential trace element in human nutrition and its deficiency is a world nutritional problem. Due to high prevalence of anaemia in developing and industrialized countries, it is necessary to maintain a suitable iron intake through diet in order to achieve an appropriate status of this element in body. For this reason, accurate knowledge of iron availability of foods is essential in order to plan intervention strategies which improve deficient situations of this nutrient. Regarding to the two forms of iron present in foods, heme iron has greater availability than non heme iron. Beside this, non heme iron availability is conditioned by several dietary factors, such as classic factors (meat, ascorbic acid, fiber, phytic acid, polyphenols) and new factors (caseinophosphopeptides and fructooligosaccharides with prebiotic characteristics). For that reason, the aim of this paper is to accurately review all investigations reported in the last decade related to dietetic factors which influence the bioavailability of different iron forms.

## Introduction

Iron is the most abundant trace element of human organism, where takes part mainly of hemoglobin and mioglobin. Physiologic function of iron is to participate in oxide-reduction reactions which take place in the process of electrons transfer of respiratory chain (Aranda & Llopis, 1993). Iron deficiency is a serious health problem that affects a great part of population all around the world (MacPhail & Bothwell, 1992) especially that located in developed countries (WHO, 1992); thus, iron deficiency is the most common in these countries.

On the other hand, poor status of iron is associated with diminished worker productivity (Scholz *et al*, 1997), lowered immunity and reduced of cognitive development (Scrimshaw, 1991). Maternal anemia during the first months of pregnancy has been associated with an increased risk of preterm delivery (Scholl & Reilly, 2000) and severe iron deficiencies produce impaired neuropsychologic function (Pollit, 1993; Sandstead, 2000). Recently, some studies have showed that iron deficiency during brain development resulted in residual abnormalities (Roncagliolo *et al*, 1998) and a study found a improved verbal learning and memory in nonanemic iron high deficient school girls after iron supplementation (Bruner *et al*, 1996).

There are two types of iron in diet; heme iron derived from hemoglobin and mioglobin, which represents a small fraction of total iron in diet and it is absorbed very well, and non heme iron that would be inorganic iron, very abundant in vegetable foods and it is used for fortification of foods. Non-heme

iron bioavailability is much smaller than heme iron and it depends on several dietary and physiologic factors. As a consequence of this, we can think that heme and non-heme iron are absorbed by two totally different pathways; the first one, i.e. heme group, enters intact in the mucous cell and once inside the cell, it is separated from protoporphyrin by the action of hemoxygenase (Carpenter & Mahoney, 1992). Nevertheless, the mechanism by which non-heme iron is captured and transported through intestinal mucous as well as its controlling regulatory mechanism, remain without clarifying (Benito & Miller, 1998).

Due to physiological factors are hardly controlled, an extensive study of dietetic factors should be taken into account. The aim of this paper is to accurately review all the investigations reported in the last decade related to dietetic factors which influence the bioavailability of different iron forms.

### **Heme-iron availability**

Heme iron is absorbed by mucus intestinal cells as an intact metaloporphyrin after having been separated from globin by several digestive enzymes (Grasbeck *et al*, 1982). It seems that this porphyrin ring is responsible for the high absorption of heme iron in comparison to nonheme iron (South *et al*, 2000). However, other authors (Fly & Czarnecki-Maulden, 2000) attribute this effect to the protein portion of hemoglobin molecule since it is possible that peptides from globin digestion may improve iron bioavailability through an increase on its solubility. Once inside enterocyte, iron is liberated from porphyrin

ring by hemeoxygenase enzyme action entering to sanguine torrent together with nonheme as an iron pool (Carpenter & Mahoney, 1992).

Heme iron is principally provided by meat, fish and blood-derived foods (table 1). A higher amount of heme iron in red meat products compared with poultry products can be observed. Dietary heme iron is important in iron nutrition because factors like phytates and fiber do not interfere with its absorption and it is much better absorbed (>15%) than nonheme iron (<5%) (Kalpalathika *et al.*, 1991). Heme iron absorption is only conditioned by meat presence (Carpenter & Mahoney, 1992) and in smaller degree by presence of calcium (Pallares *et al.*, 1996; Hallberg *et al.*, 1992).

Heme iron absorption is higher in meat presence. Although the mechanism is not very clear, it seems that the enhancing effect of meat is similar to globin, stimulating the solubilization of heme group. Moreover, the best form to take this heme iron in diet is through meat foods since they are the main source of this iron form, thus not only meat improves heme iron absorption, but it also provides a high content of it.



Table 1.- Heme iron content in foods

Food	Heme iron content in cooked food ( $\mu\text{g/g}$ )	References
<b>Lamb</b>		
Chop lamb	$22,5 \pm 2,0$	Lombardi-Boccia et al. (2002)
<b>Beef</b>		
Beef loin	$26,0 \pm 4,0$	Carpenter & Clark. (1995).
Beef steak	$21,0 \pm 1,0$	Kalpalathika et al. (1991)
Beef burger	$20,0 \pm 0,4$	Kalpalathika et al. (1991)
Roast beef	$16,8 \pm 0,5$	Kalpalathika et al. (1991)
Beef doners	$15,98 \pm 2,86$	Turhan et al. (2004)
Frankfurter	$10,4 \pm 0,5$	Kalpalathika et al. (1991)
<b>Pork</b>		
Loin pork	$2,1 \pm 1,0$	Lombardi-Boccia et al. (2002)
<b>Poultry</b>		
Chicken breast	$1,6 \pm 1,0$	Lombardi-Boccia et al. (2002)
Chicken leg	$4,2 \pm 1,0$	Lombardi-Boccia et al. (2002)
Chicken doners	$4,49 \pm 1,95$	Turhan et al. (2004)
Chicken dark meat	$4,9 \pm 1,0$	Clark et al. (1997)
Chicken light meat	$1,7 \pm 0,5$	Clark et al. (1997)

It would be useful to take into account that heme iron is transformed into non heme iron as a consequence of heat treatment or storage (Lombardi-Boccia *et al.* 2002; Purchas *et al.* 2003). This can lead to mistakes when evaluating the content of heme iron in foods, because in most cases, data provided in literature are yielded from raw food, without considering loss of heme iron during cooking. In general, the more intensive the heat treatment is, the more degree of transformation from heme iron to non heme iron occurs.

Finally, with respect to calcium, some studies have shown that calcium chloride inhibits heme iron absorption in the same extension as non heme iron (Hallberg *et al.*, 1991). This shows that calcium may interact with iron absorption in a step during absorption common to heme and non heme iron (Hallberg *et al.*, 1992) and it has a direct effect on heme iron absorption, counteracting the enhancing effect of meat (Bendich, 2001). It has been demonstrated that this inhibitory effect depends on the dose, so dose below 40 mg does not have inhibitory effect, while maximum inhibition is reached with intakes around 300 mg where it ends up being of 50-60% suggesting an incomplete blockade of iron absorption (Hallberg *et al.*, 1991; Gleerup *et al.*, 1995; Hallberg, 1998).

### **Non-heme iron availability: dietary factors**

Non heme iron absorption is conditioned by multitude of factors as the chemical form in which is present in the food (in ferrous state it is absorbed much better than in ferric state), iron intake present in the food, as well as by the presence of certain enhancers and inhibitors. Non heme iron absorption will be conditioned by its solubility in intestinal lumen (Kim *et al.*, 1995), so all those substances that increase this solubility would be considered as enhancers whereas compounds that diminish solubility of this element would be considered as inhibitors.

**Meat factor**

Equally to heme iron, non heme iron absorption is favoured in presence of meat (Engelmann *et al.*, 1998). Studies in humans have shown that this increment is between 2- to 3-fold (South *et al.*, 2000). This is called "meat factor", and although it still remains unclear, it seems that peptides liberated during digestion of proteins, bind iron forming complexes in intestinal lumen and would increase its solubility (Berner & Miller, 1985). In this pathway, extension and degree of protein digestion have special importance; formation of high molecular weight peptides formed as a consequence of partial or non-digestion of proteins, could bind iron tightly hampering its transport through the intestinal mucosa, whereas formation of low molecular weight peptides could facilitate this transport. Importance of protein digestibility in promotion of iron bioavailability has been documented by many investigators (Kane & Miller, 1984; Slatkavitz & Clydesdale, 1988).

Beside this, meat and especially sulphhydryl groups of certain amino acids like cysteine are capable of reducing ferric iron to ferrous at low pH preventing formation of insoluble ferric hydroxide (Berner & Miller 1985; Mulvihill *et al.*, 1998). It lead to state by others authors that the denominated "meat factor" may be attributed to some components of myofibrillar fractions of meat, in particular, the heavy meromyosin fraction, rich in sulphhydryl groups (Kirwan *et al.*, 1993). Thus, in an *in vitro* study with different protein systems (Mulvihill & Morrissey, 1998) it was corroborated that intake of dialysable iron (II), is directly related to intake of ferric iron reduced that, at the same time, it depended on the

content in sulphhydryl groups of protein system, highlighting the influence of the content in sulphured amino acids (such as cysteine) of meat on the increase of non heme iron bioavailability. This hypothesis seems to be confirmed when adding N-ethylmaleimide; intake of dialysable iron diminished as N-ethylmaleimide intake increased, because sulphhydryl groups are blocked by this inhibitor.

The importance of content in sulphured amino acids of protein has also been demonstrated for vegetal proteins. Lombardi-Boccia *et al.* (1994) studied the effect of some protein components of beans on iron dialysability, showing that the highest mineral percentage dialyzed corresponded to globulin fraction, which presented the highest content in cysteine dialyzed as well, instead of albumin fraction with a higher mineral content but a lower cysteine dialyzed content.

### **Caseinophosphopeptides**

Contrary to meat proteins, other proteins coming from egg, milk and dairy products impair iron absorption (Wapnir, 1990; Beard *et al.*, 1996; Conrad, 1993;). For instance, caseins from milk inhibit iron absorption in humans. It seems that their phosphorylated serine and threonine residues bind iron and other minerals by ionic interactions and this iron would be released too far down the intestine for an efficient absorption (West, 1986). Other authors point out that a barrier effect of mucus against large peptides occur (Miller & Berner, 1989). Nevertheless, this effect can be diminished by enzymatic hydrolysis of

casein before its ingestion, which would increase solubility of iron in the intestine and, because of iron absorption is related to its intestinal solubility (Kim *et al.*, 1995), this may be the reason for the enhancing effect of casein hydrolysis on iron bioavailability (Hurrell *et al.*, 1989). It has been observed that these caseinophosphopeptides have a high capacity to bind tri- and divalent cations and keep them soluble at intestinal pH (Galdi & Valencia, 1988) and in particular, 1,25- $\beta$ -caseinophosphopeptide coming from tryptic hydrolysis of  $\beta$ -casein contains four out of the five phosphoserine residues present in the native protein located at positions 15, 17, 18 and 19 so one mole of 1,25- $\beta$ -caseinophosphopeptide could bind up to four moles of iron.

Nevertheless, improvement on iron bioavailability by these caseinophosphopeptides cannot be justified simply by an increase of iron solubility and absorption; this must be accompanied by an efficient use of iron in erythropoiesis or a adequate storage in liver in the ferritin form. In this way, several experiments (Aït-oukhatar *et al.*, 1997; Aït-oukhatar *et al.*, 1999) in iron-deficient rats fed with different iron supplements (ferrous sulphate, iron bound to intact  $\beta$ -casein, iron bound to hydrolyzed  $\beta$ -casein and iron bound to 1,25- $\beta$ -caseinophosphopeptide) have showed that caseinophosphopeptides, and specially 1,25- $\beta$ -caseinophosphopeptide produced the best results on hemoglobin levels and iron storage in tissues.

Some theories point out, as a consequence of the presence of biologically active peptides issued from milk proteins in plasma (Mahé *et al.*,

1989; Chabance *et al.*, 1998) that iron bound to  $\beta$ -caseinophosphopeptides could be absorbed by a different pathway from that observed with non-heme iron. Pérès *et al.* (1999b) studied iron bound to  $\beta$ -caseinophosphopeptides or iron gluconate absorption by using a perfused vascularized duodenal rat loop model. In order to see how these compounds were absorbed, experiments were carried out in the presence of an inhibitor of endocytosis, i.e. phenylarsine oxide, an inhibitor of oxidative phosphorylation, i.e. 2, 4-dinitrophenol and both inhibitory agents. The results showed that 2, 4-dinitrophenol inhibited oxidative phosphorylation in both gluconate and caseinophosphopeptide, proving that these salts are absorbed through active transport. After energy-dependent processes were abolished, passive absorption could be of physiologic importance because it depends on intraluminal concentrations and escapes from homeostatic control, however passive iron absorption was not enhanced by  $\beta$ -caseinophosphopeptide. Finally, phenylarsine oxide inhibited iron absorption bound to  $\beta$ -caseinophosphopeptide but not to gluconate, so only part of  $\beta$ -caseinophosphopeptide-ion is absorbed by endocytosis, in addition to the usual passive and active transport; it may be the reason to explain the enhance on iron bioavailability.

This specific pathway absorption could also justify previous studies which have pointed out that iron bound to caseinophosphopeptides also prevents from interactions between iron and other minerals such as calcium and zinc (Pérès *et al.*, 1997; Aït-oukhatar *et al.*, 1997; Pérès *et al.*, 1999a). This effect has been observed in rats; a lower interaction Fe-Zn than usual was observed when iron

was bound to 1, 25- $\beta$ -caseinophosphopeptide (1:5 ratio of Fe:Zn), and even no interactions Fe-Zn were observed when both minerals were bound to this caseinophosphopeptide (Pérès *et al.*, 1999a). The bind of these minerals produces trace element-peptides complexes in lumen and, enhancing absorption of these minerals through a different pathway from that followed as free ions, and therefore diminishing minerals interactions.

In short, good bioavailability of iron bound to caseinophosphopeptides as a consequence of either increase on its solubility, or prevention of iron interactions with other minerals or specific pathway of absorption, lets dairy peptides become into suitable supplements for fortification of human food. Therefore, it is necessary further investigations in the future to extrapolate all these results from animal experiments to human models.

### **Vitamins and organic acids**

Another factor that also promotes iron absorption is the presence of certain vitamins and organic acids such as ascorbic acid, citric acid and vitamin A (Table 2).

In the same manner as meat, the enhancing effect of ascorbic acid on iron absorption is believed to be due to its ability to reduce ferric iron to ferrous iron, or to the possibility of forming soluble complex with ferric ion (Van Dyck *et al.*, 1996; Davidsson *et al.*, 1998,). Furthermore, as can be read later on, ascorbic acid can counteract the inhibitory effect of phytic acid. Citric acid can

also improve iron solubilization by reduction of ferric ion to ferrous, and for this reason some authors (Kapsokefalou & Miller, 1991) have pointed out that enhancers of non heme iron bioavailability such as ascorbic acid, cysteine and glutathione are able to reduce high intakes of ferric iron, whereas traditional inhibitors like casein, serum bovine albumin and egg albumin have not this capacity.

In the last years, vitamin A and  $\beta$ -carotene have been also involved in enhancing iron absorption. A national fortification program carried out in Venezuela in 1993 where next to iron supplements were added some vitamins like riboflavin, niacin, thiamin and vitamin A, achieved a reduction in prevalence of anemia of 9,3% and iron deficiency of 15,8% compared to the prevalence found one year before (Layrisse *et al.*, 1996). García-Casal *et al.* (2000) found an improvement on iron uptake from ferrous fumarate in presence of  $\beta$ -carotene by using Caco-2 cells, and, at the same time, an overcoming of the inhibitor effect of tannic acid and phytic acid. This interaction between vitamin A and inhibitors of iron absorption such as polyphenols and phytates has also been documented in studies about breakfast in humans (Layrissee *et al.*, 1997). Although the action mechanism of vitamin A and  $\beta$ -carotene to enhance iron absorption is not clear, it is believed that these compounds could act as quelating agents, keeping iron soluble and preventing from its capture by polyphenols and phytates.



Table 2.- Effects of vitamins and organic acids on iron availability

Study/ Factor	Effects on iron availability	Range	References
<b><i>In vitro</i></b>			
Ascorbic acid	Enhanced iron dialysability from a composed meal	about 5%	Van Dyck et al. (1996)
Citric acid	Significant correlation between citric acid content and % iron dialysability of soy-based formulas		Jovaní et al. (2000)
$\beta$ -carotene	Increased iron uptake by Caco-2 cells	$114.9 \pm 6.3$ and $47.2 \pm 5.9$ mol/mg cell protein	García-Casal et al. (2000)
<b><i>In vivo (humans)</i></b>			
Limeade (ascorbic acid)	Increased iron absorption in iron deficient women fed with a rural diet	from $6.6 \pm 3.0\%$ to $22.9 \pm 12.6\%$	Diaz et al. (2003)
Apple juice (ascorbic acid)	Increased on iron bioavailability in different weaning foods	2-fold increase	Fairweather-Tait et al. (1995)
Ascorbic acid	Addition of ascorbic acid to the ferrous fumarate-fortified cereal increased iron absorption significantly	from 6,3 to 10,4% iron absorption	Fidler et al. (2003)
Ascorbic acid	Addition of ascorbic acid to chocolate-flavored milk drink increased iron absorption	from 1,6 to 5,1% iron absorption	Davidsson et al. (1998)
Vitamin A	Rapid improvement of the iron status of Venezuelan population		García-Casal et al. (1998)

## **Fibre**

Traditionally a negative effect on mineral absorption has been attributed to fibre due to its capacity to bind cations. Debon & Tester (2001) studied *in vitro* binding of iron and other minerals by polyanionic polysaccharides classified as soluble fibre. The polysaccharides with a high content of sulphate or carboxyl groups such as pectin, carrageenan and xanthan gum presented a great response for binding cations because all these groups are deprotonated when pH is close to neutrality and can interact electrostatically with mineral cations. At a pH of the small intestine of about 6.5-7, a similar performance *in vivo* was expected; however, other experiments with pectin and guar gum in human and animal models (Torre *et al.*, 1991; Muñoz & Harland, 1993) have concluded that soluble dietary fiber does not significant effect on mineral bioavailability. The differences on mineral bioavailability between *in vivo* and *in vitro* studies are due to the polysaccharide response to bind cations measured in solutions where the ionic strength was low, far to the physiological conditions in which ionic strength is high.

These discrepancies in the role of fiber on mineral availability between *in vitro* and *in vivo* studies have been also found in other papers. Van Dyck *et al.* (1996) reported that a reduction of dialysability of iron was observed as an increasing quantity of wheat bran was included in a composed meal. However, a study about the effect of fiber on mineral absorption in rats fed with wholewheat flour or white wheat flour, it was found apparent iron absorption (%), plasma iron level, transferrin saturation (%), liver and tibia iron levels,

significantly higher in the rats fed on the wholewheat flour diet than in the other group (Levrat-Verny *et al.*, 1999).

In the same way, Kim *et al.* (1996) also demonstrated in rats that certain types of pectin, with low-molecular-weight and a high degree of esterification, increase iron absorption. Although rats have a high capacity to hydrolyse phytic acid, compared with human subjects, who have practically no intestinal phytase activity and in consequence these results cannot be directly extrapolated to human nutrition, some authors (Brune *et al.*, 1992; Larsson *et al.*, 1996) set out that depression on mineral absorption by foods rich in fiber may be related more to some impurities present in these meals like phytates than to the fiber content of food products.

### **Phytic acid and fructooligosaccharides**

It seems clearer the role of phytic acid on mineral absorption (Table 3). Phytic acid is a molecule very ubiquitous, presented in cereals, legumes and oleaginous seeds, representing its main phosphorus storage compound, and it contains six phosphate groups with high capacity to bind cations such as iron, so its absorption is decreased. This effect can be mitigated by the presence of iron absorption enhancers like meat (Baech *et al.*, 2003) and ascorbic acid (Davidsson *et al* 2001, Jovaní *et al*, 2000, Davidsson *et al* 1994) or through degradation process of phytic acid (Davidsson *et al.*, 2001).

In parallel, in the last years, some studies have revealed that several indigestible carbohydrates, like fructooligosaccharides, seem to have a stimulatory effect on mineral absorption against phytic acid. Fructooligosaccharides are natural diet components that escape hydrolysis by mammalian digestive enzymes but are largely fermented by colonic bacteria to produce a wide variety of compounds that may affect gut as well as systemic physiology in both humans and rats (Gibson & Roberfroid, 1995). Lopez *et al.* (2000) have observed in rats that presence of fructooligosaccharides in diets with phytic acid, neutralized all the inhibitory effects associated to this acid on iron status.

Several hypothesis have been proposed to explain the effect of fructooligosaccharides against phytic acid. Firstly, fructooligosaccharides cannot be digested by intestinal enzymes present in small intestine of monogastric animals and arrive to colon practically intact, where are fermented by the bacterial flora present there, with development of organic acids such as acetate, propionate and butyrate which form soluble complex with iron, thereby preventing the formation of insoluble iron phytates. On the other hand, another hypothesis is the stimulation of bacterial growth in the colon, with a subsequently secretion of phytase that would enhance the hydrolysis of phytate to phosphate and inositol (Lopez *et al.*, 2000).

Table 3.- Effects of phytic acid on iron availability

Study/ Factors	Effects on iron availability	References
<b><i>In vitro</i></b>		
Phytate	Strong interaction of phytate with iron at any pH	Notan et al. (1987)
Phytate	Inhibition of iron uptake in Caco-2 cells	Glahn et al. (2002) Skoglund et al. (1999)
White beans	Low iron dialisability due to protein-mineral-phytate complexes	Lombardi-Boccia et al. (1998)
Vegetarian diet	Negative correlation between phytic acid and iron availability ( $r \sim -0,9$ )	Pushpanjali & Khokhar (1996)
Infant formulas	No effect is observed due to low phytic acid and high ascorbic acid content	Jovaní et al. (2000)
<b><i>In vivo (humans)</i></b>		
Vegetarian diet	Inadequate for maintaining iron balance	Shaw et al. (1995)
Bread	Inbition of iron absorption is closely related to the content of phytate	Brune et al. (1992)
Phytate-rich meal	Addition of small amounts of pork (50 and 75 g) meat increased iron absorption (44% and 57% respectively)	Baech et al. (2003)
Infant formulas	Increase in iron absorption after doubling the concentration of ascorbic acid (from 14,8% to 22,1%)	Davidsson et al. (1994) Davidsson et al. (2001)
Infant formulas	Iron absorption increased significantly after the degradation of phytic acid (from 20,7% to 33,1%)	Davidsson et al. (2001)

Other studies have found that fructooligosaccharides improved recovery from anemia due to iron deficiency as a consequence of an increase in soluble iron in the cecal content in rats and consequently an increase in net iron

absorption (Ohta *et al.*, 1995). Similarly, it has also confirmed that fructooligosaccharides prevent anemia iron deficiency in gastrectomized rats (Ohta *et al.*, 1998), attributing this effect to an absorption of iron in the large intestine. In this sense, Sakai *et al.* (2000) observed a significant increase of hemoglobin regeneration efficiency (HRE) in gastrectomized rats fed with fructooligosaccharides; however, this was not observed in gastrectomized rats with cecectomy, suggesting a stimulatory effect on iron absorption of these indigestible carbohydrates in the large intestine, mainly in the cecum.

Because monogastric animals do not have capacity to digest and hydrolyze this kind of saccharides by intestinal enzymes present in small intestine, a fermentation of them takes place in the large intestine, producing an unusual iron absorption in the cecum and colorectum. The additional effect of these fructooligosaccharides against phytic acid as a result of the formation of complex soluble, or as a result of bacterial growth producing phytate hydrolysis to phosphate and inositol, could make of these fructooligosaccharides a correct alternative to prevent the adverse effects of phytic acid on mineral absorption. Nevertheless, all these studies have been performed in animal models (rats) and need to be carried out in humans in future research.

### **Polyphenols**

Other common inhibitors of iron absorption are polyphenols (Table 4). Polyphenols are associated with beneficial health effects such as prevention of cardiovascular diseases and cancer, mainly due to their antioxidative and

hypocholesterolemic activity (De Vos & De Schrijver, 2003). One of the postulated mechanisms of action of polyphenols is chelation of prooxidant metals like iron. However, although the antioxidative effect is desirable, this mechanism may impair the utilization of dietary iron. The galloyl group of phenolic compounds has been implicated as the structure responsible of such inhibition (Brune *et al.*, 1991).

Experiences made in Caco-2 cell culture model (Glahn *et al.*, 2002) have showed that a molar ratio 1: 0,1 of iron: tannic acid produces a 92% inhibition of iron uptake, indicating that tannic acid is a more potent inhibitor than phytic acid. Boato *et al.* (2002) studied iron availability of several fruit juices in Caco-2-cell culture model, reporting a 31 and 67 % decrease of ferritin formation in prune juice and red grape juice, respectively, due to the great content of polyphenols in these juices; the remaining juices studied, with lower content in polyphenols, did not present this inhibitory effect. Similarly, a study performed in humans by Cook *et al.* (1995), showed that an iron absorption was 2 to 3-fold higher from white wine containing a low concentration of polyphenols than from red wine containing a 10-fold higher concentration of polyphenols.

Table 4.- Effects of polyphenols on iron availability

Study/ Factors	Effects on iron availability	Range	References
<b><i>In vitro</i></b>			
Tannic acid	Inhibition of iron uptake in Caco-2 cell model	92% to 1:0,1 iron-tannic acid ratio	Glahn et al. (2002)
Red grape and prune juice	Inhibition of iron uptake in Caco-2 cell model	67% y 31% respectively	Boato et al. (2002)
Red wine	Decrease in iron dialysability from vegetables and composite dishes		Lucarini et al. (2000)
Coffee	Significant decrease on iron dialisability from a composed meal	From 13% to 8%	Van Dyck et al. (1996)
<b><i>In vivo (humans)</i></b>			
Red wine	Decrease in iron absorption against white wine with a low concentration of polyphenols	2 to 3 fold higher from white wine	Cook et al. (1995)
Green tea or rosemary	The presence of the phenolic-rich extracts resulted in decreased nonheme-iron absorption in young women	From 12,1 ± 4,5% to 8,9± 5,2 % (green tea) and from 7,5 ± 4,0% to 6,4± 4,7 % (rosemary)	Samman et al. (2001)
Black tea, herb teas, coffee and cocoa	All of them have a potent inhibitory effect on iron absorption namely black tea	from 28,5% to 0,75%	Hurrell et al. (1999)
Tea and coffee	Negative association between consumption and serum ferritin in women	r = - 0,19	Pate et al. (1993)



It seems that the content and type of polyphenols present in foods will determine this inhibitory effect. Hurrell *et al.* (1999) reported in humans this effect in non-haem iron absorption by some polyphenolic-containing beverages (black tea, cocoa, coffee and herb teas), finding the highest reduction in black tea. Dietary polyphenols can be divided into three main groups: the phenolic acids (present frequently in coffee), flavonoids (present in herb teas, green tea leaves and cocoa bean) and complex polymerization products formed from flavonoids alone or from combination of flavonoids and phenolic acids (present in black tea). According to Hurrell *et al.* (1999), black tea polyphenols are more inhibitory than herb teas, coffee, and cocoa polyphenols, probably due to its polymeric structure, with a high content of galloyl esters.

## **Conclusions**

Due to high prevalence of anaemia in developing and industrialized countries, it is necessary to maintain a suitable iron intake through diet in order to achieve an appropriate status of this element in body. Regarding to the two forms of iron present in foods, heme iron has greater bioavailability and it does not depend on so many dietary factors as non heme iron. The best way to provide heme iron is by means of meat; meat not only has a high content of this form of iron but it also increases heme and non heme iron absorption through solubilization of this element.

Nevertheless iron present in vegetal food and that employed as fortificant have the non heme form, with a smaller bioavailability and a greater

dependence on other dietary factors. Thus it is necessary to control all dietetic factors in order to improve bioavailability of this element.

In this pathway the use of caseinophosphopeptides coming from enzymatic hydrolysis of casein has demonstrated in animal experimentation improvement on iron absorption and bioavailability either because of an increase on its solubility or because of the existence of an specific pathway of absorption which would also diminish interactions with other minerals. Beside this, presence of certain vitamins (vitamin A and C) has demonstrated to improve availability of this element as well as counteract the action of well known iron inhibitors such as polyphenols and phytic acid. Although unfortunately, information about fructooligosaccharides effect is limited in humans, some works performed in rats show that fructooligosaccharides would produce an unusual iron absorption in the large intestine, and, at the same time, act against phytic acid due to fructooligosaccharides are not digested by monogastric animals. This fact would be a good reason to use them as enhancers of iron absorption principally in vegetable foods, which contains high quantities of phytic acid.

All these results highlight the necessity to deeply study these factors in order to decrease iron deficiency and anaemia in population so that it will not be considered a serious nutritional problem in many countries.

**Acknowledgements.**- This research work was funded by the Andalusian Regional Government, Department of Education and Science, group PAI AGR-170. Fernando Cámara benefits from a grant given by the Ministry of Education and Culture (Spain).

## **References**

- Aît-oukhatar N, Bouhallab S, Arhan P, Maubois JL, Drosdowsky M & Bouglé D (1999): Iron tissue storage and hemoglobin levels of deficient rats repleted with iron bound to the caseinophosphopeptide 1-25 of  $\beta$ -casein. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2786-2790.
- Aît-oukhatar N, Bouhallab S, Bureau F, Arhan P, Maubois JL, Drosdowsky M & Bouglé D. (1997): Bioavailability of caseinophosphopeptide bound iron in the young rat. *J. Nutr. Biochem.* **8**, 190-194.
- Aranda P & Llopis J (1993): Minerales. In *Nutrición y Dietética, Aspectos Sanitarios*, ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, pp. 179-240. Madrid, España.
- Baech SB, Hansen M, Bukhave K, Jensen M, Sorensen SS, Kristensen L, Purslow PP, Skibsted LH & Sandström B (2003): Nonheme-iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat. *Am. J Clin. Nutr.* **77**, 173-179.
- Beard JL (1998): Weekly iron intervention: the case for intermittent iron supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 209-212.
- Beard JL, Dawson H & Pinero DJ (1996): Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr. Rev.* **54**, 295-317.
- Bendich A (2001): Calcium supplementation and iron status of females. *Nutrition* **17**, 46-51.
- Benito P & Miller D (1998): Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutr. Res.* **18(3)**, 581-603.

- Berner LA & Miller DD (1985): Effects of dietary proteins on iron availability- A review. *Food Chem.* **18**, 47-69.
- Björn-Rasmussen E & Hallberg L (1979): Effect of animal proteins on the absorption of food in man. *Nutr. Metab.* **23**, 192-202
- Boato F, Wortley GM, Hai Lu R & Glahn RP (2002): Red grape juice inhibits iron availability : application of an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *J. Agric Food Chem.* **50**, 6935-6938.
- Brulé G & Fauquant J (1982): Interactions des protéines du lait et des oligoéléments. *Lait.* **62**, 323-331.
- Brune M, Rossander L & Hallberg L (1989): Iron absorption and phenolic compounds: Importance of different phenolic structures. *Eur. J. Clin. Nutr.* **43**, 547-558.
- Brune M, Hallberg L & Skanberg A (1991): Determination of iron binding by phenolic groups in foods. *J. Food Sci* **56**, 128-167.
- Brune M, Rossander-Hulté L, Hallberg L, Gleerup A & Sandburg AS (1992): Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J. Nutr.* **122**, 442-449.
- Bruner AB, Joffe A, Duggan AK, Casella JF & Brandt J (1996): Randomized study of cognitive effects of iron supplementation in non-anemic iron-deficient adolescent girls. *Lancet* **348**, 992-996.
- Campos MS, Pallarés I, Moratalla A, López-Aliaga I, Gómez-Ayala AE, Hartiti S, Alférez MJM, Barrionuevo M & Lisbona F (1996): Bioavailability of Fe, Ca, P,

- Mg in Fe-deficient rats treated with different sources of dietary iron. *Nutr. Res.* **16**, 683-696.
- Carlson BL & Miller DD (1983): Effects of product formulation processing and meal composition on *in vitro* estimated iron bioavailability from cereal containing breakfast meals. *J. Food Sci.* **48**, 1211-1216.
- Carpenter C & Clark E (1995): Evaluation of methods used in meat iron analysis and iron content of raw and cooked meats. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1824-1827
- Carpenter CE & Mahoney AW (1992): Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **31(4)**, 333-367.
- Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jollès P & Fiat AM (1998): Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yoghurt. *Biochimie.* **80**, 155-165.
- Champagne ET (1989): Low gastric hydrochloric acid secretion and mineral bioavailability. In *Mineral Absorption in the Monogastric GI Tract, Advances in Experimental Medicine and Biology*, FR Dintizs, JA Laszlo eds., vol. 249, pp. 173-184, New York: Plenum Press.
- Clark EM, Mahoney AW & Carpenter CE (1997): Heme and total iron in ready-to-eat chicken. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 124-126.
- Conrad ME, Umbreit JN & Moore EG (1993): Regulation of iron absorption: proteins involved in duodenal mucosal uptake and transport. *J. Am. Coll. Nutr.* **12**, 720-728.

Conrad ME & Umbreit JN (1993): A concise review: Iron absorption-the mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. *Am. J. Hematol.* **42**, 67-73.

Conrad ME (1993): Regulation of iron absorption. In *Essential Toxic Trace Elements in Human Health and Disease: An Update*, pp. 203-219, Wiley-Liss, Inc.

Conrad ME, Umbreit JN & Moore EG (1991): A role for mucin in the absorption of inorganic iron and other metals cations. *Gastroenterology* **100**, 129-136.

Conrad ME, Cortell S, Williams HF & Foy A (1966): Polymerization and intraluminal factors in the absorption of hemoglobin iron. *J. Lab. Clin. Med.* **68**, 659-668.

Cook JD, Reddy MB & Hurrell RF (1995): The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am.J. Clin. Nutr.* **61**, 800-804.

Cook JD (1990): Adaptation in iron metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **51**, 301-308.

Cook JD & Monsen ER (1976): Food iron in human subjects. III. Comparison of the effect of animal proteins on nonheme iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* **29**, 859-867.

Dallman PR (1992): Changing iron needs from birth through adolescence. In: *Nutritional Anemias*, Fomon SJ, Zlotkin S eds., pp. 29-36, Nestlé Nutrition Workshop Series. New York: Raven Press.

Davidsson L, Dimitrion T, Walczyk T & Hurrell RF (2001): Iron absorption from experimental infant formulas based on pea (*Pisum sativum*)-protein isolate: the effect of phytic acid and ascorbic acid. *Br. J Nutr.* **85**, 59-63.

Davidsson L, Galan P, Kastenmayer P, Cherouvrier F, Juillerat MA, Hercberg S & Hurrell RF (1994): Iron bioavailability studied in infants: the influence of phytic acid and ascorbic acid in infant formulas based on soy isolate. *Pediatr. Res.* **36**, 816-822.

Davidsson L, Walczyk T, Morris A & Hurrell RF (1998): Influence of acid ascorbic on iron absorption from an iron-fortified, chocolate-favored milk drink in Jamaican children. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 873-877.

Debon SJJ & Tester RF (2001): In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-starch polysaccharides. *Food Chem.* **73**, 401-410.

De Vos S & De Schrijver R (2003): Lipid metabolism, intestinal fermentation and mineral absorption in rats consuming black tea. *Nutr. Res.* **23**, 527-537.

Diaz M, Rosado JL, Allen LH, Abrams S & García OP (2003): The efficacy of a local ascorbic acid-rich food in improving iron absorption from Mexican diets: a field study using stable isotopes. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 436-440.

Engelmann MDM, Davidsson L, Sandström B, Walczyk T, Hurrell RF & Michaelsen KF (1998): The influence of meat on nonheme iron absorption in infants. *Pediatr. Res.* **43(6)**, 768-773.

Fairweather-Tait SJ & Wright AJA (1991): Small intestinal transit time and iron absorption. *Nutr. Res.* **11**, 1465-1468.

Fairweather-Tait S, Fox T, Wharf GS & Eagles J (1995): The bioavailability of iron in different weaning foods and the enhancing effect of a fruit drink containing ascorbic acid. *Pediatr. Res.* **37(4)**, 389-394.



- Fidler MC, Davidsson L, Zeder C, Walczyk T & Hurrell RF (2003): Iron absorption from ferrous fumarate in adult women is influenced by ascorbic acid but not by Na<sub>2</sub>EDTA. *Br. J. Nutr.* **90**, 1081-1085.
- Fly AD & Czarnecki-Maulden GL (2000): Iron bioavailability from hemoglobin and hemin in chick, rat, cat, and dog: a comparative study. *Nutr. Res.* **20(2)**, 237-248.
- Galdi M & Valencia ME (1988): Stability of iron (III) chelates of nutritional interest. *J. Food Sci.* **53**, 1844-1847.
- García-Casal M, Layrisse M, Solano L, Barón MA, Arguello F, Llovera D, Ramírez J, Leets I & Tropper E (1998): Vitamin A and  $\beta$ -carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *J. Nutr.* **128**, 646-650.
- García-Casal M<sup>a</sup>N, Leets I & Layrisse M (2000):  $\beta$ -carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J. Nutr.* **130**, 5-9.
- Gibson GR & Roberfroid MB (1995): Dietary modulation of the colonic microbiota introducing the concept of prebiotic. *J. Nutr.* **125**, 140-141.
- Glahn RP, Wortley GM, South PK & Miller DD (2002): Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid and ZnCl<sub>2</sub>: studies using an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 390-395.
- Gleerup A, Rossander-Hulthen L & Gramatkovski E (1995): Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 97.

- Grasbeck R, Majuri R, Kouvonen I & Tenhunen R (1982): Spectral and other studies on the intestinal haem receptor of the pig. *Biochem. Biophys. Acta.* **700**, 137-142.
- Hall MJ, Downs L, Ene MD & Farah D (1989): Effect of reduced phytate wheat bran on zinc absorption. *Eur. J. Clin. Nutr.* **43**, 431-440.
- Hallberg L (1998): Does calcium interfere with iron absorption?. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 3.
- Hallberg L, Hultén L & Gramatkovski E (1997): Iron absorption from the whole diet in men: How effective is the regulation of iron absorption?. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 347-356.
- Hallberg L, Rossander-Hulthen L, Brune M & Gleerup A (1992): Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *Br. J. Nutr.* **69**, 533-540.
- Hallberg L, Brune M & Erlandsson M (1991). Calcium: effect of different amounts on nonheme and heme iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 112.
- Hallberg L (1987): Wheat fiber, phytates and iron absorption. *Scand. J. Gastroent. Suppl.* **129**, 73-79.
- Hallberg L (1981): Bioavailability of dietary iron in man. *Ann. Rev. Nutr.* **1**, 123-147.
- Hallberg L, Bjorn-Rasmussen E, Howard L & Rossander L (1979): Dietary heme iron absorption. A discussion of possible mechanism for the absorption promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. *Scand. J. Gastroent.* **14**, 769.

- Hamed MY, Silver J & Wilson MT (1983): Studies of the reaction of ferric iron with glutathione and some related thiols. *Inorg. Chim. Acta* **78**, 1-11.
- Hara H, Hayashi K & Aoyama Y (2001): Intestinal absorption of zinc is promoted by low-level intake but inhibited by high-level intake of corn husk fiber in rats. *Nutr. Res.* **21**, 627-637.
- Harland BF & Narula G (1999): Food phytate and its hydrolysis products. *Nutr. Res.* **19**, 947-961.
- Huebers HA, Csiba E, Josephson B & Finch CA (1990): Iron absorption in the iron-deficient rat. *Blut.* **60**, 345-351.
- Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA & Cook, JD (1988): Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. *Am. J. Clin. Nutr.* **47**, 102-107.
- Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA & Cook JD (1989): Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**, 546-552.
- Hurrell RF, Reddy M & Cook JD (1999): Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br. J Nutr.* **81**, 289-295.
- Jovaní M, Alegría A, Barberá R, Farré 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)**, 114-117
- Kalpalathika PV, Clark EM & Mahoney AW (1991): Heme iron content in selected ready-to-serve beef products. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1091-1093.

- Kanani, SJ & Poojara R (2000): Supplementation with iron and folic acid enhances growth in adolescent Indian girls. *J. Nutr.* **130**, 452S-455S.
- Kane AP & Miller DD (1984): In vitro estimation of the effects of selected proteins on iron bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**, 393-401.
- Kapsokefalou M & Miller DD (1991): Effects of meat and selected food components on the valence of non-haem iron during in vitro digestion. *J. Food Sci.* **56**, 352-358.
- Kaup SM (1998): Aspects of mineral bioavailability in infant nutrition. *Int. Dairy J.* **8**, 435-441.
- Kim M, Atallah MT, Amarsiwardena C & Barnes R (1996); Pectin with low molecular weight and high degree of esterification increases absorption of <sup>59</sup>Fe in growing rats. *J. Nutr.* **126**, 1883-1890.
- Kim M, Lee DT & Lee YS (1995): Iron absorption and intestinal solubility in rats are influenced by dietary proteins. *Nutr. Res.* **15**, 1705-1716.
- Kirwan FM, O'Connor I, Morrissey PA & Flynn A (1993): Effect of myofibrillar muscle proteins on in vitro bioavailability of iron. *Proc. Nutr. Soc.* **52**, 21<sup>a</sup>.
- Larsson M, Rossander-Hulthen L, Sandstrom B & Sandsberg AS (1996): Improved zinc and iron absorption from breakfast meals containing malted oats with reduced phytate content. *Br. J. Nutr.* **76**, 677-688.
- Layrisse M, García-Casal M, Solano L, Barón MA, Arguello F, Llovera D, Ramírez J, Leets I & Tropper E (1997): The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: Preliminary studies. *J. Nutr. Biochem.* **8**, 61-67.

- Layrisse M, Chavez JF, Méndez-Castellano H, Bosch V, Tropper E, Bastardo B & González E (1996): Early response to the impact of iron fortification in the Venezuelan population. *Am. J. Clin. Nutr.* **64**, 903-907.
- Levrat-Verny MA, Coudray C, Bellanguer J, Lopez HW, Demigné C, Rayssiguier Y & Rémesy C (1999): Wholewheat flour ensures higher mineral absorption and bioavailability than white wheat flour in rats. *Br. J. Nutr.* **82**, 17-21.
- Lombardi-Boccia G, Di Lullo G & Carnovale E (1991): In vitro iron dialisability from legumes: influence of phytate and extrusion-cooking. *J. Sci. Food Agric.* **56**, 599-605.
- Lombardi-Boccia G, Carbonaro M, Di Lullo G & Carnovale E (1994): Influence of protein components (G1, G2 and albumin) on Fe and Zn dialysability from bean. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **45**. 183-190.
- Lombardi-Boccia G, Martínez-Domínguez B & Aguzzi A (2002): Total heme and non-heme iron in raw and cooked meats. *J. Food Sci.* **67(5)**, 1738-1741.
- Lombardi-Boccia G, Schlemmer U, Cappelloni M & Di Lullo G (1998): The inhibitory effect of albumin extracts from white beans (*Phaseolus vulgaris*) on in vitro iron and zinc dialisability: role of phytic acid. *Food Chem.* **63(1)**, 1-7.
- Lopez HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, Demigné C & Rémesy C (2000): Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J. Nutr. Biochem.* **11**, 500-508.
- Lucarini M, Di Lullo G, Cappelloni M & Lombardi-Boccia G (2000): In vitro estimation of iron and zinc dialysability from vegetables and composite

dishes commonly consumed in Italy: effect of red wine. *Food Chem.* **70**, 39-44

MacPhail AP & Bothwell TH (1992): The prevalence and causes of nutritional iron deficiency anemia. In: *Nutritional anemias*. SJ Fomon & S Zlotkin eds., series 30, pp. 1-12, Nestlé nutritional workshop NewYork: Raven Press.

Mahé S, Tomé D, Dumontier AM & Desjeux JF (1989): Absorption of intact  $\beta$ -casomorphins ( $\beta$ -CM) in rabbit ileum in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* **29**, 725-732.

Maubois JL & Léonil J (1989): Peptides du lait à activité biologique. *Lait.* **69**, 245-269.

Miller DD & Berner LA (1989): Is solubility in vitro a reliable predictor of iron bioavailability?. *Biol. Trace Elem. Res.* **19**, 11-24.

Mulvihill B & Morrissey P (1998): Influence of the sulphhydryl content of animal proteins on in vitro bioavailability of non-heme iron. *Food Chem.* **61**, 1-7.

Mulvihill B, Kirwan FM, Morrissey PA & Flynn A (1998): Effect of myofibrillar muscle proteins on the in vitro bioavailability of non-haem iron. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **49**, 187-192.

Muñoz JM & Harland BF (1993): Overview of the effects of dietary fiber on the utilization of minerals and trace elements. In *CRC Handbook of dietary fiber in human nutrition*, 2<sup>nd</sup> ed., Spiller GA, pp. 245-252, CRC Press, Boca Raton, Florida

Nolan KB, Duffin PA & McWeeny DJ (1987): Effects of phytate on mineral bioavailability on  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  (also  $Cd^{+2}$ ) solubilities in the presence of phytate. *J. Sci. Food Agric.* **40**, 79-85.

- 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. Vitamol.* **41**, 281-291.
- Ohta A, Ohtsuki M, Uehara M, Ozono S, Hirayama M, Adachi T & Hara H (1998): Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. *J. Nutr.* **128**, 485-490.
- Pallarés I, Campos MS, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Gómez-Ayala AE, Alferez, MJ, Hartiti S & Lisbona F (1996): *Ann. Nutr Metab.* **40**, 81-90.
- Pate RR, Miller BJ, Davis JM, Slentz CA & Klingshirn LA (1993): Iron status of female runners. *Int. J. Sport Nutr.* **3**, 222-231
- Pérès JM, Bouhallab S, Bureau F, Maubois JL, Arhan P & Bouglé D (1999a): Reduction of iron/zinc interactions using metal bound to the caseinphosphopeptide 1-25 of  $\beta$ -casein. *Nutr. Res.* **19**, 1655-1663.
- Pérès JM, Bouhallab S, Bureau F, Neuville D, Maubois JL, Devroede, G., Arhan P, Bouglé D (1999b): Mechanism of absorption of caseinphosphopeptide bound iron. *J. Nutr. Biochem.* **10**, 215-222.
- Pérès JM, Bouhallab S, Bureau F, Maubois JL, Arhan P & Bouglé D (1997): Absorption digestive du fer lié ai caséinophosphopeptide 1-25 de la  $\beta$ -caséine. *Lait.* **77**, 433-440.
- Pizarro, F, Uicich R, Olivares M, Almeida C, Díaz ML, Carmuega E, O'Donnell A & Valencia ME (1998): Iron absorption of ferric glycinate is controlled by iron stores. *Nutr. Res.* **18(1)**, 3-9.

- Pizarro F, Olivares M, Arredondo M, Hertrampf E & Walter T (1997): Does daily iron administration produce a mucosal blockade?. *Wageningen, Holland: European Academy of Nutritional Sciences.*
- Pollit E (1993): Iron deficiency and cognitive function. *Annu. Rev. Nutr.* **13**, 521-537.
- Powell JJ, Whitehead MW, Lee S & Thompson RPH (1994) Mechanisms of gastrointestinal absorption: Dietary minerals and the influence of beverage ingestion. *Food Chem.* **51**, 381-388.
- Purchas RW, Simcock DC, Knight TW & Wilkinson BHP (2003): Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. *Int. J. Food Sci. Tech.* **38**, 827-837.
- Pushpanjali F. & Khokhar S (1996): In vitro availability of iron and zinc from some Indian vegetarian diets: correlations with dietary fibre and phytate. *Food Chem.* **56**(2), 111-114.
- Raffin SB, Woo CH, Roost KT, Price DC & Schmid R (1974): Intestinal absorption of hemoglobin heme iron cleavage by mucosal heme oxygenase. *J. Clin. Invest.* **54**, 1344.
- Ridwan E, Schultink W, Dillon D & Gross R (1996): Effects of weekly iron supplementation on pregnant Indonesian women are similar to those of daily supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**, 884-890.
- Roncagliolo M, Garrido M, Walter T, Peirano P & Lozoff B (1998): Evidence of altered central nervous system development in infants with iron deficiency anemia at 6 months: delayed maturation of auditory brainstem responses. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 683-690.



- Sakai K, Ohta A, Shiga K, Takasaki M, Tokunaga T & Hara H (2000): The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. *J. Nutr.* **130**, 1608-1612.
- Samman S, Sandstrom B, Toft MB, Bukhave K, Jensen M, Sorensen SS & Hansen M (2001): Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *Am. J Clin. Nutr.* **73(3)**, 607-612.
- Sandsberg AS, Brune M, Carlsson NG, Hallberg L, Skoglund E & Rossander-Hulthen L (1999): Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 240-246.
- Sanstead HH (2000): Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *J. Nutr.* **130**, 347S-349S.
- Scholl TO & Reily T (2000): Anemia, iron and pregnancy outcome. *J. Nutr.* **130**, 443S-447S.
- Scholz B, Gross R & Sastroamidjojo S (1997): Anemia is associated with reduced productivity of women workers even in less physically strenuous tasks. *Br. J. Nutr.* **77**, 147-157.
- Scrimshaw N (1991). Iron deficiency. *Sci. Am.* **265**, 46-52.
- Shaw NS, Chin CJ & Pam WH (1995): A vegetarian diet rich in soybean products compromises iron status in young students. *J. Nutr.* **125**, 212-219.
- Skikne BS, Lynch SR & Cook JD (1981): Role of gastric acid in food iron absorption. *Gastroenterology* **81**, 1068-1071.
- Skoglund E, Lönnerdal B & Sandberg AS (1999): Inositol phosphates influence iron uptake in Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1109-1113.

- Slatkavitz CA & Clydesdale FM (1988): Solubility of inorganic iron as affected by proteolytic digestion. *Am. J. Clin. Nutr.* **47**, 487-495.
- Solomons NW (1997): Daily versus weekly iron: we still might not be asking the right questions. *Nutr. Rev.* **55**, 141-142
- South PK, Lei X & Miller DD (2000). Meat enhances nonheme iron absorption in pigs. *Nutr. Res.* **20(12)**, 1749-1759.
- South PK & Miller DD (1998): Iron binding by tannic acid: effects of selected ligands. *Food Chem.* **63**, 167-172.
- Torre M, Rodríguez AR & Saura-Calixto F (1991): Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1**, 1-22.
- Turhan S, Altunkaynak TB & Yazici F (2004): A note on the total and hem iron contents of ready-to-eat doner kebabs. *Meat Sci.* **67**, 191-194.
- 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.
- Wapnir RA (1990): Nutritional factors, proteins and the absorption of iron and cobalt. In *Protein Nutrition and Mineral Absorption*, Wapnir RA ed., chap. 6, 99-129, CRC Press: Boca Raton.
- Viteri FE, Xunian L, Tolomei K & Mai A (1995): True absorption and retention of supplemental iron is more efficient when iron is administration every three days rather than daily to iron-normal and iron deficient rats. *J. Nutr.* **125**, 82-91.

- Vonk AD, Schaafsma G, Dekker PR & de Waard H (1988): Relationship between intestinal transit time and iron absorption from milk and yogurt in rats. *Neth. Milk Dairy J.* **42**, 147-154.
- West DW (1986): Structure and function of the phosphorylated residues of casein. *J. Dairy Sci.* **53**, 333-352.
- WHO (1992): *National strategies for overcoming micronutrient malnutrition: document A. 45/3*, Geneva.
- Wien EM & Van Campen DR (1991): Mucus and iron absorption regulation in rats fed various levels of dietary iron. *J. Nutr.* **121**, 92-100.
- Yip R (1996): Iron supplementation during pregnancy: is it effective?. *Am. J. Clin. Nutr* **63**, 853-856.
- Zijp-Itske M, Korver O & Tijburg-Lilian BM (2000): Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **40**, 371-398.

Reference	Subject (ISI Journal Citation Reports)	Impact Factor (2003)
Food Chemistry	Food Science and Technology	1.204

## Bioaccessibility of minerals in school meals.

### Comparison between dialysis and solubility methods

F. Cámara<sup>a</sup>, M.A. Amaro<sup>a</sup>, R. Barberá<sup>b</sup> and G. Clemente<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science and Nutrition. University of Córdoba (Spain)

<sup>b</sup>Department of Nutrition and Food Chemistry. University of Valencia (Spain)

<sup>c</sup>Department of Statistics. University Polytechnical of Valencia (Spain)

**Sumario:** Se determinó el contenido mineral y bioaccesibilidad de Ca, Fe, Zn y Cu de trece platos habitualmente consumidos en un comedor escolar. La bioaccesibilidad se estimó por medida de la fracción soluble o dializable resultante de un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* del alimento. El contenido mineral de los platos analizados ( $\mu\text{g/g}$ ) estuvo entre los siguientes rangos: Ca (74.1- 913.1), Fe (2.8- 17.9), Zn (2.8- 13.1), Cu (0.28- 1.90). Los porcentajes de solubilidad y diálisis mineral fueron los siguientes: Ca (1.7- 96.2; 0.75- 61.3), Fe (16.0- 97.8; 0.23- 19.0), Zn (22.6- 93; 5.78- 31.45), Cu (35.68- 92.29; 0.66- 24.99). El mayor contenido de Ca bioaccesible correspondió a los platos de pescado, mientras que los vegetales fueron pobres fuentes de este elemento. Los menores porcentajes de Fe y Zn bioaccesible fue para los platos vegetales, particularmente tortilla de espinacas, mientras que los platos que contenían carne como ingrediente principal exhibieron los mayores

porcentajes de Fe y Zn bioaccesible. Para el caso del Cu, los platos de alimentos vegetales podrían ser considerados las mejores fuentes.

**Abstract:** Determinations have been made of content and bioaccessibility (BA) of Ca, Fe, Zn and Cu in 13 dishes collected from a catering service delivering to a school. BA was estimated by measuring the soluble or dialyzable mineral fraction resulting from *in vitro* gastrointestinal digestion of the meal. The analyzed dishes had mineral contents ( $\mu\text{g/g}$ ) in the following ranges: Ca (74.1-913.1), Fe (2.8-17.9), Zn (2.8-13.1), Cu (0.28-1.90). Mineral solubility and dialysis percentages were as follows: Ca (1.7- 96.2; 0.75- 61.3), Fe (16.0- 97.8; 0.23- 19.0), Zn (22.6- 93; 5.78- 31.45), Cu (35.68- 92.29; 0.66- 24.99). The highest bioaccessible Ca content corresponded to fish-based dishes, while vegetables were poor sources of Ca. The lowest Fe and Zn bioaccessible percentages corresponded to vegetable-based dishes, particularly spinach omelette, whereas dishes having meat as the main ingredient exhibited the highest bioaccessible percentages. In the case of Cu, vegetable-based dishes could be considered the best sources.

## **Introduction**

It is widely accepted that in childhood and adolescence diet influences not only the immediate health of children, but may also have an important impact on adult health. The childhood diet must be adequate to support normal growth and development, and appropriate amounts of minerals are required since a deficient intake of certain minerals can produce diseases and lead to abnormal development. Mineral deficiency is usually caused by a low mineral content in the diet when rapid body growth is occurring and/or when there is poor absorption of minerals from the diet (Favier, 1993). However, even in the “affluent” diet found in western societies, intakes of some minerals such as Ca, Fe and Zn are often marginal in certain population groups, e.g., toddlers or female adolescents (Southon, Bailey, Wright, Belsten & Finglas, 1993; Räsänen & Ylönen, 1992).

Calcium is an essential element. A good Ca intake during childhood is associated with increased peak bone mass during adolescence, reduced development of precancerous cells in colonic mucosa, breast cancer, bone fragility and hip fracture, with a possible delay in the development of high blood pressure and a reduction in the prevalence of osteoporosis (Hallfrisch et al., 2000; Barrer-Lux & Heany, 1994).

Iron serves metabolic and enzymatic functions (e.g., Fe for the synthesis of hemoglobin or myoglobin, and Fe-containing enzymes which participate in

electron transfer and redox reactions) (Yip, 2001). Iron deficiency is the most prevalent single nutritional deficiency in the world (worldwide prevalence being about 30%, WHO/UNICEF, 1998), and is the main cause of anemia in infants, children, adolescents, and women of childbearing age. Iron deficiency anemia is related to delayed cognitive development and intellectual impairment in children (Grantham-McGregor & Ani, 2001), reduced work capacity (Haas & Brownlie, 2001), an increased risk of maternal and neonatal mortality (Allen, 2002), and altered immune function (Cook & Lynch, 1986).

Zinc in turn is essential for normal growth and development, because it plays an important role in gene expression, regulation of cellular growth and differentiation (Hambidge, 2000), and development of the immune response. It has a recognized action on more than 300 enzymes implied in the metabolism of nucleic acids, carbohydrates and proteins, participating as a cofactor (Salguero, Zubilaga, Lysionek, Caro, Weill, & Boccio, 2002). Marginal Zn deficiency is a common nutritional problem in developing and developed countries (Michelson, Samuelson, Graham, & Lonnerdal, 1994). Among children, it produces serious consequences for health such as retarded growth, an increase in infectious diseases, and impaired cognitive function (Rosado, 1998).

Copper play a pivotal role in cell physiology as a catalytic cofactor in the redox chemistry of enzymes for proteins that carry out fundamental biological

functions required for growth and development (Linder, 1991). It is needed for mitochondrial respiration, Fe absorption, free radical scavenging and elastin cross-linking (Tapiero, Townsend, & Tew, 2003). Copper deficiency is less frequent than other element deficiencies and has been described mainly in premature infants and children recovering from malnutrition (Cordano, 1998), or who change to a poor intake of this mineral in the diet.

To estimate the quality of a dietetic source of a given mineral, it is necessary to precisely define the amount of mineral available for absorption and utilization, i.e., its bioavailability (BA) (Barberá & Farré, 1992). The bioavailability of minerals and trace elements has generated increasing interest in the field of nutrition.

Bioavailability should be determined by *in vivo* measurements (Van Dyck, Tas, Robberecht, & Deelstra, 1996). Ideally, this kind of research should have been performed in humans; however, such studies are difficult, expensive, and provide limited data with each experiment (Hansen, Sandstrom, & Lonnerdal, 1996). While animal assays are less expensive, they are somewhat limited by uncertainties with regard to differences in metabolism between animals and humans. As an alternative to human and animal *in vivo* studies, the availability of minerals or trace elements has also been estimated based on simple, rapid and inexpensive *in vitro* methods (Miller, Schricker, Rasmussen, & Van Campen, 1981).



*In vitro* estimation of the bioavailability of minerals and trace elements from foods involves the simulation of gastrointestinal digestion and measurement of the mineral soluble fraction or the mineral fraction that dialyses across a semipermeable membrane of a certain pore size (Wienk, Marx, & Beynen, 1999). In fact, these methods measure only the amount of mineral available in the gastrointestinal tract for absorption, i.e., its so-called bioaccessibility (Salovaara, Sandberg, & Andlid 2002)). However, these methods are widely used because of their good correlation with *in vivo* studies (Roig, Alegría, Barberá, Farré, & Lagarda, 1999; Wienk et al, 1999). Bioaccessibility values must be taken as relative indexes for bioavailability, which means that the method used provides a good basis for establishing tendencies, comparisons and the determination of effects caused by different factors (Azenha & Vascondeclos, 2000).

In recent years, the mentioned *in vitro* methods have been used to estimate the BA of minerals from different foods (Roig et al, 1999; Jovaní, Alegría, Barberá, Farré, Lagarda, & Clemente, 2000; Sebastiá, Barberá, Farré, & Lagarda, 2001; Bosscher, Van Cauwenbergh, Van der Auwera, Robberecht, & Deelstra, 2002; Sahuquillo, Barberá, & Farré, 2003;) and also from dishes and composite diets (Van Dyck et al. 1996; Pushpanjali & Khokhar, 1996; Luccarini, Canali, Cappelloni, Di Lullo & Lombardi-Boccia, 1999; Kennefick & Cashman, 2000).

A great majority of school age children and adolescents have their main meal of the day in the school lunchroom, and this meal often constitutes the principal mineral contribution to the daily recommended intake.

The present study uses two *in vitro* methods (solubility and dialysis) to assess the bioaccessible amounts of Ca, Fe, Zn and Cu provided by different dishes usually distributed to a Spanish school lunchroom.

## **Material and methods**

Digestive enzymes and bile salts were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The working solutions of these enzymes were prepared immediately before use.

Pepsin solution was obtained by dissolving 1.6 g of pepsin (P-7000 from porcine stomach) in 10 ml of HCl (0.1 M). The solution of pancreatin and bile salts was prepared by dissolving 0.4 g of pancreatin (P-170 from porcine pancreas) and 2.5 g of bile salt (B-8631 of porcine origin) in 100 ml of 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>.

The dialysis membranes, with a pore size (MMCO) of >12,000 Å (Dia. Inf. 36/32"-28.6 mm, 30 m, Bestl no. 1063F09, Medicell Int. LTD, England), were rinsed several times with deionized water before use.

Standard Ca, Fe, Zn and Cu solutions were prepared immediately before use by dilution with deionized water of a 1000 mg/l standard solution (Titrisol, Merck, Darmstadt, Germany). The lanthanum solution (5 g/100 ml) was prepared with La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Merck).

All reagents used were of analytical grade, and Millipore-MilliQ distilled deionized water was used throughout. Glass and polyethylene material was soaked in HNO<sub>3</sub> (sp. gr. 1.38) for 15 min and then rinsed three times with deionized water.

### **Samples**

Thirteen dishes habitually included in the monthly program of the school menu with different formulation and forms of preparation were supplied by a catering establishment (Table 1).

Aliquots of dishes were frozen in a still-air freezer at –18°C until required for analyses and processing.

Table 1.- **Description of the dishes of the school menu**

<b>Plato</b>	<b>Ingredientes</b>
Lentejas con chorizo	Lentejas, aceite de girasol, tomate triturado, sal, colorante, laurel, caldo de pollo, zanahoria, longaniza, cebolla, pimiento, ajo, patatas
Cocido	Garbanzos, judías verdes, zanahoria, hueso, gallina, patata, ragout de ternera, tocino, caldo de pollo y sal
Arroz cubana	Arroz, caldo de pollo, tomate frito, huevo, salchichas, aceite de girasol, ajos y sal
Arroz con magro	Arroz, magro, champiñones, pimientos, guisantes, tomate, cebolla, aceite de girasol, ajo y sal
Pollo con menestra	Pollo empanado, verdura y aceite de girasol
Pollo en salsa	Pechuga de pollo, caldo de pollo, harina, cebolla, almendras, aceite de girasol, patatas, colorante y sal
Tortilla de patatas	Patatas, huevo, aceite de girasol y sal
Tortilla de espinacas	Espinacas, huevo, aceite de girasol y sal
Macarrones con atún	Macarrones, atún, tomate, aceite de girasol y sal
Espaguetis con chorizo	Espaguetis, longaniza, tomate, aceite de girasol y sal
Filete de merluza	Merluza empanada y aceite de girasol
Merluza frita	Filete de merluza y aceite de girasol
Estofado de patatas	Patatas, ragout de ternera, vino blanco, tomate triturado, zanahoria, caldo de pollo, cebolla, pimientos, aceite de girasol, laurel, colorante y sal

### **Analytical procedure**

**a) Dialysis method.** The method described by Jovani et al. (2000) with slight modifications was applied to estimate dialyzable minerals. Forty grams of each dish were homogenized with 60 g of deionized-distilled water, and the pH was adjusted to 2.0 with 6 N HCl. To carry out pepsin-HCl digestion, 0.5 g of pepsin solution per 100 g of sample were added. The mixture was then incubated for 2 h at 37°C in a shaking water bath. A dialysis bag (molecular

mass cut-off value 10-12,000 Da) containing 25 ml of water and an amount of  $\text{NaHCO}_3$  equivalent to the titrable acidity (previously measured) was placed in the flasks together with 30 g aliquots of the pepsin digest. Incubation was continued for 45 min, the pancreatic-bile salt mixture (7.5 ml) was added, and incubation was continued up to 2 h.

After incubation, the segments of dialysis tubes were removed from the flasks, washed and weighed. The mineral contents of the dialysis tubes were analyzed by flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS) (Perkin-Elmer. Model 2380) for Ca, Fe and Zn elements and by graphite furnace-atomic absorption spectrophotometry (GFAAS) with Zeeman effect (Perkin Elmer Analyst 600) in the case of Cu.

**b) Solubility Method.** The method described by Sahuquillo et al. (2003) with slight modifications was applied. Thirty grams of each dish were homogenized with 70 ml of deionized distilled water, and the pH was adjusted to 2.0 with 6 N HCl. Pepsin-HCl digestion was carried out as mentioned in the dialysis method.

Prior to the intestinal digestion step, the pH of the gastric digests was raised to 5 by drop-wise addition of 1 M  $\text{NaHCO}_3$ . Then 18.8 ml of the pancreatin-bile salt mixture was added and incubation continued for an additional 2 h. To stop intestinal digestion, the sample was maintained for 10 min in an ice bath. The pH was adjusted to 7.2 by drop-wise addition of 0.5 M

NaOH. Aliquots of 20 g of the digested sample were transferred to polypropylene centrifuge tubes (50 ml, Costar Corning Europe, Badhoevedorp, The Netherlands) and centrifuged (3500 g) for 1 h at 4°C. Then, the supernatant (soluble fraction) was collected, its organic matter destroyed by dry ashing, and the mineral content measured by FAAS.

### **Mineral content determination**

Calcium, Fe, Zn and Cu total contents and Ca, Fe and Zn in soluble and dialyzed fractions were measured by FAAS. The Cu content of the dialysates was determined by (GFAAS) with Zeeman effect. Previously reported instrumental conditions were applied (García, Alegría, Barberá, Farré, & Lagarda, 1998; Roig et al., 1999).

Prior to the atomic absorption spectrophotometry (AAS) determination of Ca, Fe, Zn and Cu from dishes and mineral soluble fractions, the organic matter was destroyed by ashing in a temperature-programmed furnace (Heraeus M1100/3, Hanau, Germany) at 450°C for 48 h (the temperature being slowly increased at a rate of 50°C/h). To the black ashes, 3 ml of HNO<sub>3</sub> were added, heated until dryness and introduced in a muffle furnace at 450°C for 24 h. The process was repeated as many times as necessary to obtain a white residue. After cooling, the residue was dissolved with 1 ml of HCl (sp. gr. 1.19) and 10 ml of water.

Dialysis mineral percentages were calculated as follows:  $\text{Dialysis (\%)} = 100 * D/C$ , where  $D$  = dialyzed mineral content ( $\mu\text{g/g}$  sample) and  $C$  = total mineral content ( $\mu\text{g/g}$  sample). Soluble mineral percentages were calculated as follows:  $\text{Solubility (\%)} = 100 * S/C$ , where  $S$  = soluble mineral content ( $\mu\text{g/g}$  sample) and  $C$  = total mineral content of the sample ( $\mu\text{g/g}$  sample).

### **Statistical analysis**

A simple regression analysis (Statgraphics Plus 4.0 for Microsoft Windows) was applied between Ca, Fe, Zn and Cu contents and their solubility and dialysis percentages.

## **Results and discussion**

Total Ca, Fe, Zn and Cu contents in the analyzed dishes are reported in Table 2. Values found for the four measured minerals were in the ranges given by other authors for composite dishes (Table 3). In 5 of the analyzed dishes (rice with lean meat, chicken with vegetables, potato omelet, macaroni and potato stew), two different mean contents are mentioned, because two samplings in different seasons (spring and autumn) were carried out. The differences found could be due to the ingredients or food origin (Gibson, 1994), and even in the case of the same ingredients and recipes, to preparation on different days and by different people (Torelm, Danielsson, Appelqvist, & Bruce, 1997).

Table 2.- **Total mineral content ( $\mu\text{g/g}$ )** (mean  $\pm$  standard deviation, n=3)

	<b>Ca</b>	<b>Fe</b>	<b>Zn</b>	<b>Cu</b>
Lentils with sausage (chorizo)	184.05 $\pm$ 15.80	10.71 $\pm$ 1.15	7.81 $\pm$ 0.76	1.48 $\pm$ 0.25
Stew	139.86 $\pm$ 13.39	9.79 $\pm$ 2.18	7.11 $\pm$ 0.70	1.90 $\pm$ 0.18
Cuban style rice	85.60 $\pm$ 3.86	7.56 $\pm$ 0.30	4.35 $\pm$ 0.13	1.05 $\pm$ 0.03
Rice with lean meat*	89.86 $\pm$ 1.44 102.23 $\pm$ 4.61	15.87 $\pm$ 0.17 2.92 $\pm$ 0.07	7.60 $\pm$ 0.16 7.03 $\pm$ 0.13	1.14 $\pm$ 0.02 1.46 $\pm$ 0.03
Chicken with vegetable stew*	114.02 $\pm$ 9.26 323.44 $\pm$ 4.82	8.15 $\pm$ 1.60 7.14 $\pm$ 1.96	6.59 $\pm$ 0.83 5.13 $\pm$ 0.09	0.69 $\pm$ 0.02 0.75 $\pm$ 0.05
Chicken in sauce	106.10 $\pm$ 3.22	10.53 $\pm$ 0.86	13.1 $\pm$ 0.66	0.76 $\pm$ 0.04
Potato omelet*	315.40 $\pm$ 6.58 293.91 $\pm$ 7.67	13.70 $\pm$ 0.20 8.92 $\pm$ 0.93	7.01 $\pm$ 0.17 6.53 $\pm$ 0.19	0.63 $\pm$ 0.01 1.01 $\pm$ 0.02
Spinach omelet	913.14 $\pm$ 31.14	17.93 $\pm$ 0.51	9.00 $\pm$ 0.27	0.79 $\pm$ 0.01
Macaroni with tuna*	108.50 $\pm$ 3.83 136.61 $\pm$ 8.50	6.48 $\pm$ 0.56 6.28 $\pm$ 0.65	3.27 $\pm$ 0.08 4.68 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.04 1.16 $\pm$ 0.01
Spaghetti with sausage	144.88 $\pm$ 1.53	7.03 $\pm$ 0.31	6.29 $\pm$ 0.46	0.99 $\pm$ 0.02
Pre-cooked hake filet	189.57 $\pm$ 17.95	4.40 $\pm$ 0.51	3.70 $\pm$ 0.19	0.61 $\pm$ 0.01
Fried hake	357.10 $\pm$ 51.98	3.95 $\pm$ 0.08	3.88 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.01
Potato stew*	74.10 $\pm$ 1.85 99.04 $\pm$ 1.84	2.82 $\pm$ 0.30 4.85 $\pm$ 0.09	3.12 $\pm$ 0.07 2.82 $\pm$ 0.17	0.76 $\pm$ 0.01 0.80 $\pm$ 0.02

\* Dishes samples in two different time periods (spring-autumn)



Table 4.- Solubility mineral (SM) and dialyzed mineral (DM) percentage (%) (mean  $\pm$  standard deviation of n= 6 )

	Ca		Fe		Zn		Cu	
	SM	DM	SM	DM	SM	DM	SM	DM
Lentils with sausage	35.26 $\pm$ 3.15	10.32 $\pm$ 1.32	16.03 $\pm$ 2.89	3.43 $\pm$ 0.35	69.93 $\pm$ 3.61	25.34 $\pm$ 1.38	70.92 $\pm$ 4.12	24.99 $\pm$ 3.42
Stew	91.72 $\pm$ 9.83	30.52 $\pm$ 4.18	49.71 $\pm$ 0.91	2.14 $\pm$ 0.31	37.10 $\pm$ 0.52	26.08 $\pm$ 0.99	35.68 $\pm$ 4.76	13.88 $\pm$ 4.03
Cuban style rice	67.57 $\pm$ 7.47	23.82 $\pm$ 3.94	81.65 $\pm$ 4.88	8.17 $\pm$ 0.79	58.85 $\pm$ 5.92	20.86 $\pm$ 2.79	70.99 $\pm$ 4.70	19.09 $\pm$ 2.63
Rice with lean meat	32.80 $\pm$ 5.70	29.29 $\pm$ 1.70	97.08 $\pm$ 0.98	1.62 $\pm$ 0.08	45.45 $\pm$ 2.63	7.45 $\pm$ 0.83	42.45 $\pm$ 3.47	3.53 $\pm$ 0.97
Chicken vegetable stew	38.03 $\pm$ 3.01	24.77 $\pm$ 2.76	53.78 $\pm$ 6.03	8.29 $\pm$ 0.99	66.98 $\pm$ 4.21	19.11 $\pm$ 1.68	60.10 $\pm$ 6.07	1.58 $\pm$ 0.17
Chicken in sauce	26.46 $\pm$ 1.89	61.32 $\pm$ 2.06	55.13 $\pm$ 2.98	5.12 $\pm$ 0.41	39.22 $\pm$ 6.98	12.03 $\pm$ 1.72	57.16 $\pm$ 4.57	0.66 $\pm$ 0.10
Potato omelet	35.85 $\pm$ 4.77	11.32 $\pm$ 2.68	73.66 $\pm$ 1.48	1.95 $\pm$ 0.19	66.87 $\pm$ 12.54	8.53 $\pm$ 1.16	92.29 $\pm$ 4.38	21.98 $\pm$ 0.51
Spinach omelet	1.73 $\pm$ 0.29	0.75 $\pm$ 0.14	45.44 $\pm$ 2.44	0.23 $\pm$ 0.01	46.71 $\pm$ 1.64	5.78 $\pm$ 1.11	88.31 $\pm$ 5.70	7.64 $\pm$ 1.11
Macaroni with tuna	40.80 $\pm$ 3.84	11.96 $\pm$ 0.47	79.96 $\pm$ 10.99	2.31 $\pm$ 1.01	61.63 $\pm$ 3.18	7.64 $\pm$ 1.00	64.40 $\pm$ 2.14	14.76 $\pm$ 0.92
Spaghetti with sausage	44.96 $\pm$ 2.59	17.52 $\pm$ 1.46	59.85 $\pm$ 4.95	3.39 $\pm$ 0.25	22.64 $\pm$ 2.55	9.57 $\pm$ 0.55	92.16 $\pm$ 7.47	3.70 $\pm$ 0.41
Pre-cooked hake filet	47.66 $\pm$ 3.82	21.11 $\pm$ 4.23	79.13 $\pm$ 4.83	15.51 $\pm$ 2.97	58.69 $\pm$ 3.97	8.98 $\pm$ 0.93	87.47 $\pm$ 3.71	N.D.
Fried hake	46.77 $\pm$ 7.41	17.40 $\pm$ 0.83	97.85 $\pm$ 3.65	3.39 $\pm$ 0.84	29.79 $\pm$ 9.20	7.67 $\pm$ 1.45	87.03 $\pm$ 6.09	N.D.
Potato stew	96.24 $\pm$ 7.95	28.12 $\pm$ 2.98	96.47 $\pm$ 9.20	19.03 $\pm$ 0.93	92.99 $\pm$ 5.52	31.45 $\pm$ 1.61	66.48 $\pm$ 8.04	15.69 $\pm$ 0.99

ND Non detectable

Table 3.- Calcium, Fe, Zn and Cu contents ( $\mu\text{g/g}$ ) of different types of diet

Sample	Ca	Fe	Zn	Cu	Reference
Kuwaiti composite dishes	1230-99.7	51.2-1.7	41.6-1.0	12.5-0.3	Dashti et al. (2004)
French dishes	1594-85	20.6-1.28	26.6-0.160	1.22-0.046	Noël et al. (2003)
Oman dishes	345-41	16.0-0.5	22.5-0.5	2.9-0.2	Musaiger et al.(1998)
Western dishes	2684-40.1	-	79.9-0.17	7.39-0.12	Ekmekcioglu (1999)
Polish fast food	2481-95	27-5.9	-	-	Grajeta et al. (2002)

---

The best models obtained in the correlation of each total mineral content (Ca, Fe, Zn and Cu) to the corresponding soluble and dialyzable fractions are reported in Table 4.

In the multiple regression analysis applied to evaluate the relationship between Ca, Fe, Zn and Cu total content, and mineral solubility and dialysis, no statistically significant correlations were found.

### **Calcium**

The total Ca content in the analyzed dishes ranged from 74.1 to 913.1  $\mu\text{g/g}$ , the lowest and highest content corresponding to potato stew and spinach omelet, respectively (Table 2). Solubility and dialysis percentages ranged from 1.7 to 96.2%, and from 0.75 to 61.3%, respectively (table 4).

Solubility and dialysability, expressed as  $\mu\text{g/g}$ , showed a significant ( $p < 0.05$ ) correlation to Ca content - soluble Ca ( $r = 0.76$ ) and dialyzable Ca ( $r = 0.72$ ) - the value being greater with increasing total Ca content (Table 4). Values corresponding to spinach omelet were not included. However, when Ca solubility and dialysability were expressed as percentages, negative correlations were found ( $r = -0.88$  and  $r = -0.91$ ) for solubility and dialysability, respectively (Table 4).

Spinach omelet, the dish with the highest Ca content, yielded the lowest Ca solubility and dialysability percentages (Table 5). The high oxalic acid content in spinach (6.62 g/ kg; Chawla, Saxena, & Seshadri, 1988) favors Ca precipitation and thus decreases its bioaccessibility. Kennefick & Cashman (2000) observed that oxalate addition to semisynthetic diets decreases Ca dialysability in a dose-dependent manner.

Vegetable components such as fiber and phytic acid negatively affect Ca dialysability (Periago, Ros, Rincón, & Martínez, 1997; Kennefick & Cashman, 2000). The presence of these inhibitors could explain the relatively low dialysis percentages obtained for pasta dishes (12.0% and 17.5% for macaroni and spaghetti, respectively) and lentils (10.3%) - these values being similar to those reported by Luccarini et al. (1999) for macaroni with broccoli (18.07%), and for macaroni with cauliflower (19.0%), where the Ca dialysis percentages were lower than those corresponding to broccoli (22.9%) and cauliflower (23.4%).

Table 5.- Regression analysis: Models and correlation coefficients

Element	Factor	Model	p	r
<b>Total Ca µg/ g</b>	Soluble Ca µg/ g	$y = 24.24+0.36x$	0.0042	0.76
	Soluble Ca %	$y = \exp (4.52-3.93 \cdot 10^{-3}x)$	0.0001	-0.88
	Dialyzed Ca µg/ g	$y = 1/ (2.16 \cdot 10^{-2}+1.11 \cdot 10^{-4}x)$	0.0053	0.72
	Dialyzed Ca %	$y = \exp (3.70-4.18 \cdot 10^{-3}x)$	0.0000	-0.91
<b>Total Fe µg/ g</b>	Soluble Fe µg/ g	$y = 2.49+0.32x$	0.0002	0.87
	Soluble Fe %	$Y = 101.16-3.77x$	0.0024	-0.79
	Dialyzed Fe µg/ g	$y = 1/(-1.40+0.71x)$	0.0618*	0.53
	Dialyzed Fe %	$y = \exp (3.09-0.20x)$	0.0009	-0.80
<b>Total Zn µg/ g</b>	Soluble Zn µg/ g	$y = 1.06+0.34x$	0.0077	0.70
	Soluble Zn %	$y = 30.73+122.28/x$	0.0907*	0.48
	Dialyzed Zn µg/ g	$y = 0.16X^{0.88}$	0.0496	0.55
	Dialyzed Zn %	$y = 17.44-0.44x$	0.6466*	-0.14
<b>Total Cu µg/ g</b>	Soluble Cu µg/ g	$y = 0.66X^{0.64}$	0.0016	0.78
	Soluble Cu %	$y = 1/(6.61 \cdot 10^{-3}+8.78 \cdot 10^{-3}x)$	0.0060	0.72
	Dialyzed Cu µg/ g	$y = -8.46 \cdot 10^{-2}+0.21x$	0.0032	0.75
	Dialyzed Cu %	$y = 0.96 + 9.66x$	0.1263*	0.45

r = Correlation coefficient

\*  $p > 0.05$

Calcium dialysabilities (µg/g) of pre-cooked (40.0) and fried hake (62.2) were in the lowest end of the range of dialysability percentages (63.6-83.1%) reported by Martínez, Santaella, Ros, & Periago (1998) in fish-based infant food. It has been reported that different fish species are a good dietetic source of Ca (Larsen, Thilsted, Kongsbak, & Hansen, 2000; Losso, Munene, &

Moody, 2003), and the data obtained in the present study suggest both fish Ca content and bioaccessibility to be good.

## **Iron**

Iron contents in the analyzed dishes ranged from 2.8 to 17.9- $\mu\text{g/g}$ , corresponding to potato stew and spinach omelet, respectively. Solubility and dialysability percentages ranged from 16.0 to 97.8%, and from 0.23 to 19.0%, respectively (Table 5).

A linear positive correlation ( $p < 0.05$ ) was found between Fe content and Fe soluble fraction content ( $\mu\text{g/g}$ ) ( $r = 0.87$ ; Table 4) when values corresponding to lentils were excluded from the model, since the high Fe content of lentils was associated to a low soluble Fe content. Lentils yielded lower soluble Fe contents than chick peas or white beans (Sahuquillo et al., 2003), despite the higher Fe content of lentils. This could be explained by the higher phytate content of lentils (Mañez, Alegría, Farré, & Frígola, 2002).

Negative correlations between Fe content and Fe solubility percentage ( $r = -0.79$ ) or Fe dialysis percentage ( $r = -0.80$ ) (Table 4) were found. A similar correlation coefficient ( $r = -0.72$ ) between total Fe content and dialysis Fe percentage was reported in a dialysis assay of Fe from weaning dishes containing different vegetable ingredients (Bosscher et al., 2002).

The highest Fe contents corresponded to spinach omelet, potato omelet, rice with lean meat, chicken in sauce, lentils and stew (Table 2) and - with the exception of chicken in sauce - these dishes yielded the lowest dialyzable Fe percentages (Table 4).

Spinach has a high Fe content (Chiplonkar et al. 1999), but also contains oxalic acid (Yadav & Segal, 2003) that affects Fe bioaccessibility. This could explain why spinach omelet presented one of the lowest percentages of soluble Fe (45.4%), and the lowest percentage of dialyzable Fe (0.23%) - despite having the highest Fe content (17.9 µg/g) of among the dishes analyzed. Similar results were reported by Chawla et al. (1988), who indicated that among the analyzed foods, spinach presented the lowest solubility (2.8%) percentage and the highest oxalic acid content (6.62 g/kg).

The low solubility and dialysability of Fe from spinach omelet could also be related to the egg used as additional ingredient. The low dialysability percentage of Fe (1.95%) from potato omelet, whose main ingredient is egg, would support this assertion. The negative effect of egg proteins upon Fe bioavailability has been reported elsewhere (Fairweather-Tait, 1989; Kapsokefalou & Miller, 1995; Beard, Dawson, & Pinero, 1996). Some egg proteins (ovotransferrin from egg white and phosphovitin from yolk) form complexes with Fe. Phosphovitin bind more than 50% of Fe (III) in yolk, thus reducing Fe bioavailability (Thapon, Audiot, Proteis, & Sauveur, 1994).

Iron dialysis percentages of pasta dishes are low (2-3%)(Table 4), in agreement with the low Fe bioavailability (3%) obtained by Galán, Cherouvier, Fernández-Ballart, Marti-Henneberg, & Hercberg (1990) in a study among volunteers fed Spanish dishes labeled with Fe radioisotopes.

The highest Fe dialysis percentages corresponded to dishes having meat as the main ingredient, such as breadcrumb chicken with vegetables (15.5%) or potato stew (19.0%). Similar dialysis percentages have been reported for meat-based beikost (4.9-8.6%) (Santaella, Martínez, Ros, & Periago, 1997) and fish-based beikost (9.3-11.6%) (Martínez et al., 1998).

Meat protein favors Fe bioavailability (Engelmann, Davidsson, Sandström, Walczyk, Hurrell, & Michaelsen, 1998) – this effect having been observed in *in vitro* (Mulvihill & Morrisey, 1998; Kapsokefalou & Miller, 1991) and *in vivo* (Baech et al., 2003; Kapsokefalou & Miller, 1995) - and this could be related to the Fe (III) to Fe(II) reducing ability of sulfhydryl groups in sulfur-containing amino acids from meat proteins (Mulvihill, Kirwan, Morrisey, & Flynn, 1998).

## **Zinc**

In the analyzed dishes, zinc contents ranged from 2.8 to 13.1  $\mu\text{g/g}$  (Table 2), these values corresponding to potato stew and chicken in sauce, respectively. Solubility and dialysability percentages (Table 4) ranged from 22.6 to 93.0%, and from 5.78 to 31.4%, respectively.

Significant correlations ( $p < 0.05$ ) between Zn content and Zn soluble ( $r = 0.70$ ) and Zn dialyzable fractions ( $r = 0.55$ ) were found, showing soluble and dialyzable Zn to increase with the Zn content of the meal.

The highest Zn dialysis percentages corresponded to dishes having tubers or legumes as the main ingredient, but containing also meat - such as potato stew, lentils and stew, followed by dishes having meat as the main ingredient (chicken with vegetables, chicken in sauce). The latter yielded Zn dialysis percentages similar to those reported for meat-based weaning foods (13.7-16.1-%) (Santaella et al., 1997). Several studies have shown Zn absorption to increase with the animal protein intake (Sandström, 1992).

Zinc dialysis percentages in cereal-based dishes (rice with lean meat, macaroni and spaghetti) were low, with the exception of Cuban style rice (20.9%), in which the presence of egg as a main ingredient could explain the higher Zn bioaccessibility.



## Copper

Copper contents were in a narrow range in the analyzed dishes, from 0.28 to 1.90  $\mu\text{g/g}$ , corresponding to fried hake and stew, respectively (Table 2). Copper solubility and dialysis percentages ranged from 35.9 to 92.3%, and from non-detectable to 25.0%, respectively (Table 4). The lowest dialysis percentages correspond to dishes having meat as the main ingredient, dialyzable Cu being non-detectable in hake. On the other hand, the latter yielded Cu solubility percentages of over 80%, thus showing Cu to be bound to compounds larger than the pore of the dialysis membrane used.

Significant correlations between Cu content and Cu soluble ( $r = 0.78$ ) and Cu dialyzable fractions ( $r = 0.75$ ) were found (Table 4).

Available information on the solubility and dialysability of Cu from foods is scarce, particularly in reference to Cu from dishes and menus. According to the results obtained, meat and fish were poorer Cu dietetic sources than vegetable-based foods, since low dialysis percentages must be added to the low Cu contents (Tables 2 and 5).

## Conclusions

The mineral contents of the analyzed dishes usually found in Spanish school lunchrooms, can be ranked as follows: calcium > iron = zinc > copper.

An increase in solubility ( $\mu\text{g/g}$ ) with increasing element content was observed for all four minerals in the analyzed dishes. When Ca and Fe content increased, the corresponding dialysis amount and percentage decreased. In the case of Zn and Cu, increased mineral content implied a larger dialyzed amount.

In the analyzed dishes, no significant correlations were found between the Ca, Fe, Zn and Cu solubility and dialysis percentages. 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. Only for Ca in chicken in sauce was the dialysis percentage seen to be greater than the solubility percentage.

The main dietetic Ca sources, on considering Ca content and dialysability, were fish dishes. The negative effect of oxalates on Ca bioaccessibility was evident in spinach omelet, where a high Ca content was nevertheless associated to the lowest Ca soluble and dialyzable percentages.

The highest Fe contents corresponded to cereal, legumes and spinach omelet dishes. However, the dialysability percentages were low and unrelated to the Fe contents. The low solubility percentage of Fe from lentils, and the low dialysis percentage of Fe from spinach omelet were salient findings – particularly considering that the corresponding Fe contents were high.

The highest Zn dialysis percentage corresponded to legume-based dishes, despite their high phytic acid contents; however, heat treatment was applied to legumes, thus reducing their phytic acid content (Mañez et al., 2002).

Finally, Cu showed opposite behavior to Ca, Fe, Zn and Cu, in the sense that vegetable-based foods had higher mineral bioaccessibility (solubility and dialysability) percentages than meat-based dishes - even dialyzable Fe being non-detectable in fish. This implies that phytic acid and other well known inhibitors of Ca, Fe and Zn absorption would not affect Cu bioaccessibility.

### **Acknowledgments**

F. Cámara benefits from a grant given by the Ministry of Education and Culture (Spain).

## **References**

- Allen, L.H. (2002). Iron supplements: scientific issues concerning efficacy and implications for research and programs. *Journal of Nutrition*, 132, 813S–819S.
- Azenha, M., & Vascondeclos, M. (2000). Assessment of the Pb and Cu in vitro availability in wines by means of speciation procedures. *Food Chemical Toxicology*, 38, 899-912.
- Baech S. B., Hansen, M., Bukhave, K., Jensen, M., Sorensen, S.S., Kristensen, L., Purslow, P.P., Skibsted, L.H., & Sandström, B. (2003). Nonheme-iron absorption of small amounts of pork meat. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 173-179.
- Barberá, R. & Farré, R. (1992). Biodisponibilidad de los elementos traza. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 32(4), 381-399.
- Barrer-Lux, M.J. & Heany, R.P. (1994). The role of calcium intake in preventing bone fragility, hypertension and certain cancers. *Journal of Nutrition*, 124, 1406S-1411S.
- Beard, J.L., Dawson, H., & Pinero, D.J. (1996). Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutrition Review*, 54, 295-317.
- Bosscher D., Van Cauwenbergh, R., Van der Auwera, J.C., Robberecht, H. & Deelstra, H. (2002). Calcium, iron and zinc availability from weaning meals. *Acta Paediatrica*, 91, 761-768.

- Chawla, S., Saxena, A., & Seshadri, S. (1988). In vitro availability of iron in various green leafy vegetables. *Journal of Science Food and Agriculture*, *46*, 125-127.
- Chiplonkar, S.A., Tarwadi, K.V., Kavedia, R.B., Mengale, S.S., Paknikar, K.M., & Agte, V.V. (1999). Fortification of vegetarian diets for increasing bioavailable iron density using green leafy vegetables. *Food Research International*, *32*, 169-174.
- Cook, J.D., & Lynch, S.R. (1986). The liabilities of iron deficiency. *Blood*, *68*, 803–809.
- Cordano, A. (1998). Clinical manifestations of nutritional copper deficiency in infants and children. *American Journal of Clinical Nutrition*, *67*, 1012S-1016.
- Dashti, B., Al-Awadi, F., Alkandari, R., Ali, A., & Al-Otaibi, J. (2004). Macro- and microelements contents of 32 Kuwaiti composite dishes. *Food Chemistry*, *85*, 331-337.
- Ekmekcioglu, C., Anderle, H., Strauss-Blasche, G., Steffan, I., Feyertag, J., & Marktl, W. (1999). Calcium, magnesium, copper and zinc content of menu components: Comparison of analysed with calculated values. *Nahrung*, *43*, 311-316.
- Engelmann, M.D.M., Davidsson, L., Sandström, B. Walczyk, T. Hurrell, R.F. & Michaelsen, K.F.(1998). The influence of meat on nonheme iron absorption in infants. *Pediatric Research*, *43(6)*. 768-773.

- Favier, A.E. (1993). In U. Schlemmer (Ed.), Bioavailability '93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability.
- Fairweather-Tait, S.J. (1989). Iron in food and its availability. *Acta Paediatrica Scandinavia Supplement*, 361, 12-20
- Galán P., Cherouvier, F., Fernández-Ballart, J., Marti-Henneberg, C. & Hercberg, S. (1990). Bioavailable iron density in French and Spanish meals. *European Journal of Clinical Nutrition*. 44, 157-163.
- García, R.,Alegria A., Barberá R., Farré R; Lagarda MJ (1998). Dialyzability of iron zinc and copper of different types of infant formulas marketed in Spain. *Biological Trace Element Research*, 65, 7-17.
- Gibson, R.S. (1994). Content and bioavailability of trace elements in vegetarian diets. *American Journal of Clinical Nutrition*. 59, 1223S-32S.
- Grajeta, H., Prescha, A., & Biernat, J. (2002). Fe, Ca and Mg contents in selected fast food products in Poland. *Nahrung*, 1, 7-10.
- Hambidge, M. (2000). Human zinc deficiency. *Journal of Nutrition*, 130, 1344S-1349S.
- Hallfrisch, J., Veillon, C., Patterson, K., Hill, A.D., Benn, I., Holiday, B., Burns, R., Zhonnie, S., Price, F., & Sorenson, A. (2000). Bone-related mineral content of water samples collected on the Navajo reservation. *Toxicology*, 149, 143-148.

- Haas, J.D., & Brownlie, T. (2001). Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *Journal of Nutrition*, 131, 676S–688S.
- Hansen, M., Sandstrom, B., & Lonnerdal, B. (1996). The effect of caseinphosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in rat pups and Caco-2 cells. *Pediatric Research*, 40(4), 547-552.
- Jovaní M., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Lagarda, M.J., & 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), 114-117.
- Kapsokefalou M. & Miller, D.D. (1991). Effects of meat and selected food components on the valence of nonheme iron during *in vitro* digestion. *Journal of Food Science*, 56, 352-355.
- Kapsokefalou M. & Miller, D.D. (1995). Iron speciation in intestinal contents of rats fed meals composed of meat and nonmeat sources of protein and fat. *Food Chemistry*, 52, 47-56.
- Kennefick S., & Cashman, K. D. (2000). Investigation of an *in vitro* model for predicting the effect of food components on calcium availability from meals. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51, 45-54.
- Larsen T., Thilsted, S.H., Kongsbak, K. & Hansen, M. (2000). Whole small fish as a rich calcium source. *British Journal of Nutrition*. 83, 191-196.

- Linder, M.C. (1991). *Biochemistry of copper*. New York : Plenum Press.
- Losso J. N., Munene, C.N., & Moody, M.W. (2003). Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of minerals in catfish frame. *Nahrung*, 47, 309-311.
- Luccarini, M., Canali, R., Cappelloni, M., Di Lullo, G. & Lombardi-Boccia, G. (1999). In vitro calcium availability from brassica vegetables (*Brassica oleracea* L.) and as consumed in composite dishes. *Food Chemistry*, 64, 519-523.
- Máñez, G., Alegría, A., Farré, R., & Frigola, A. (2002). Effect of traditional, microwave and industrial cooking on inositol phosphate content in beans, chickpeas and lentils. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 53, 503-508.
- Martínez, I., Santaella, M., Ros, G., & Periago, M.J. (1998). Content and in vitro availability of Fe, Zn, Mg, Ca and P in homogenized fish-based weaning foods after bone addition. *Food Chemistry*. 63. 299-305.
- McGregor, G. & Ani, C. (2001). A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *Journal of Nutrition*, 131, 649S–666S.
- Michelson, K.F., Samuelson, G., Graham, T.W., & Lonnerdal, B. (1994). Zinc intake, zinc status and growth in a longitudinal study of healthy Danish infants. *Acta Paediatrica*, 83, 1115.



- Miller, D.D., Schricker, B.R., Rasmussen, B.S. & Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34, 2248-2256.
- Mulvihill, B., & Morrisey, P.A. (1998). Influence of the sulphhydryl content of animal proteins on in vitro bioavailability of non-haem iron. *Food Chemistry*, 61, 1-7.
- Mulvihill B., Kirwan, F.M., Morrisey, P.A. & Flynn, A. (1998). Effect of myofibrillar muscle proteins on the in vitro bioavailability of non-haem iron. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 49, 187-192.
- Musaiger, A.O., Ahmed, M.O., & Rao, M.V. (1998). Chemical composition of some dishes of Oman. *Food Chemistry*, 61, 17-22.
- Noël L., Leblanc, J.C. & Guérin, T. (2003). Determination of several elements in duplicate meals from catering establishments using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass spectrometry detection: estimation of daily dietary intake. *Food Additives and Contaminants*, 20(1), 44-56.
- Periago M. J., Ros, G., Rincón, F. & Martínez, C. (1997). Nutritional meaning of dietary fibre and phytic acid in meat-based homogenised weaning foods. *Food Research International*, 30(3). 223-230.
- Pushpanjali y Khokhar, S. (1996). In vitro availability of iron and zinc from some Indian vegetarian diets: correlations with dietary fibre and phytate. *Food Chemistry*, 56, 111-114.

Räsänen, L. & Ylönen, K. (1992). Food consumption and nutrient intake of one- to two-year-old Finnish children. *Acta Paediatrica*, 81, 7-11.

Roig, M.J., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., & Lagarda, M.J. (1999). Calcium bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas- comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chemistry*, 65, 353-357.

Rosado, J.L. (1998). Zinc deficiency and its functional implications. *Salud Publica Mexicana*, 40, 181-191.

Salgueiro, M.J., Zubilaga, M.B., Lysionek, A.E., Caro, R.A., Weill, R. & Boccio, J.R. (2002). The role of zinc in the growth and development of children. *Nutrition*, 18, 510-519.

Salovaara, S., Sandberg, A.S., Andlid, T. (2002) Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6233-6238

Sandström, B. (1992). Dose dependence of zinc and manganese absorption in man. *Proceedings of the Nutrition Society*, 51, 211-218.

Santaella, M., Martínez, I., Ros, G., & Periago, M.J. (1997). Assessment of the role of meat cut on the Fe, Zn, Cu, Ca and Mg content and their *in vitro* availability in homogenised weaning foods. *Meat Science*, 45(4), 473-483.

Sahuquillo, A., Barberá, R. & Farré, R. (2003). Bioaccessibility of calcium, iron and zinc from three legume samples. *Nahrung*, 47(6). 438-441.

- Sebastiá, V., Barberá, R., Farré, R. & Lagarda, M.J. (2001). Effects of legume processing on calcium, iron and zinc contents and dialysabilities. *Journal of Science Food and Agriculture*, 81, 1180-1185.
- Southon, S., Bailey, A.L., Wright, A.J.A., Belsten, J., & Finglas, P.M. (1993). Micronutrient undernutrition in British schoolchildren. *Proceedings of Nutrition Society*, 52, 155-163.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., & Tew, K.D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57, 386-398.
- Thapon, J.L., Audiot, V., Proteis., Y. & Sauveur, J. (1994). Présentation générale de l'oeuf. In: J.L. Thapon & C.M. Bourgeois (Coordonnateurs). *L'oeuf et les ovoproduits*. (pp. 6-15, 21-24). Paris : Lavoisier Tec&Doc.
- Torelm, I., Danielsson, R., Appelqvist, L.A. & Bruce, A. (1997). Variations in major nutrients and minerals due to interindividual preparation of dishes from recipes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 14-27.
- 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. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 47, 499-506.
- WHO/UNICEF (1998). International Nutritional Anemia Consultative Group,. Guidelines for the Use of Iron Supplements To Prevent and Treat Iron Deficiency Anemia. International Life Sciences Institute, Washington, DC.

Wienk, K.J.H., Marx, J.J.M. & Beynen, A.C. (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition*, 38, 51-75.

Yadav, S.K., & Sehgal, S. (2003). Effect of domestic processing and cooking methods on total, HCl extractable iron and in vitro availability of iron in bathua and fenugreek leaves. *Nutrition and Health*, 17, 61-63.

Yip, R. (2001). Iron. In: B.A. Bowman and R.M. Russell, Editors, Present Knowledge in Nutrition, (pp. 311–328), Washington, DC : ILSI Press.

---

Reference	Subject (ISI Journal Citation Reports)	Impact Factor (2003)
European Food Research and Technology	Food Science and Technology	1.220

## Speciation of bioaccessible (heme, ferrous and ferric) iron from school menus

F. Cámara<sup>a</sup>, M.A. Amaro<sup>a</sup>, R. Barberá<sup>b</sup> and M.J. Lagarda<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science and Nutrition. University of Córdoba (Spain)

<sup>b</sup>Department of Nutrition and Food Chemistry. University of Valencia (Spain)

**Sumario:** Un método espectrofotométrico, usando batofenantrolina como reactivo, es optimizado para la especiación de hierro en la fracción soluble (bioaccesible) obtenida a partir de un proceso de digestión *in vitro* de platos de alimentos. La cantidad a añadir de reactivo precipitante, agente reductor y nitrito sódico y su correspondiente efecto es estudiada. El hierro hemo se estima por diferencia entre el hierro total bioaccesible (determinado por espectrofotometría de absorción atómica) y el hierro iónico. El método es aplicado a 13 platos habitualmente consumidos en un comedor escolar. El hierro soluble se encuentra principalmente en forma iónica (49-100%). Con la excepción de tortilla de patatas y tortilla de espinacas, se puede establecer una correlación lineal significativa ( $r = 0.92$ ) entre Fe(II) y Fe bioaccesible. El ratio Fe(II)/Fe(III) incrementa con el incremento del contenido en proteínas del plato. En los platos analizados, el contenido de hierro hemo depende del contenido cárnico y también del procedimiento culinario aplicado.

**Abstract:** A spectrophotometric method using bathophenanthroline as reagent has been optimized for iron speciation [ionic Fe(II) and Fe(III)] in the mineral soluble (bioaccessible) fraction obtained from the in vitro digestion of food dishes. The effect of the precipitant and reducing reagents, and the amount of sodium nitrite added was studied. Heme-Fe was estimated by subtraction of ionic Fe from the total bioaccessible Fe (determined by atomic absorption spectrometry). The method was applied to 13 dishes included in school menus. Soluble Fe was mainly in ionic form (49 - 100%). With the exception of spinach and potato omelets, a significant linear correlation ( $r = 0.92$ ) was obtained between Fe(II) and bioaccessible Fe. The Fe(II)/Fe(III) ratio increased with increasing meat protein content in the dish. In the analyzed dishes, heme-Fe content depended on meat content and also on the processing procedure applied.

## 1. Introduction

Speciation of iron (Fe) in foods is of nutritional interest due to the importance of Fe chemical species in determining bioavailability. It is well-known that the absorption of heme-Fe is more efficient (15%) than that of non-heme Fe (< 5%) (1).

Non-heme Fe can be found in foods as Fe(II) or Fe(III), the availability of the former being greater than that of Fe(III), because the latter is less soluble in the intestinal lumen than Fe(II) (2). Non-heme Fe is reduced within the lumen by dietary or endogenous factors such as ascorbic acid and glutathione, or by ferrireductase at the brush border surface, prior to membrane translocation of Fe(II) (3)

The absorption of non-heme Fe can be affected by compounds released from foods during digestion, that act as enhancers (meat proteins, ascorbic acid) or as inhibitors (phytic acid, fiber, polyphenols) of absorption (4,5).

*In vivo* and *in vitro* methods can be used to estimate iron bioavailability. *In vitro* models include simulated human gastrointestinal digestion and the measurement of mineral elements which, under these conditions, pass into the soluble fraction or are dialyzed through a dialysis membrane of a certain pore size. In fact, these methods measure mineral bioaccessibility i.e., the fraction of total mineral in the food that is available for uptake by the brush border cell membranes. This represents the first step of bioavailability, which furthermore

also comprises metabolization and use for normal body functions. In the case of Fe, such *in vitro* assays are useful for predicting its availability, due to the good correlations obtained between the results of *in vitro* and *in vivo* assays (6), and also for establishing food rankings according to Fe availability.

Different chelating compounds have been used for estimating non-heme Fe from foods, including: ferrozine, bathophenanthroline or  $\alpha$ - $\alpha$  dipyridyl (with prior elimination of interferences by precipitation) followed by spectrophotometric assay. These methods have been used for the speciation of soluble Fe from vegetal foods (7,8), and for measuring non-heme Fe in meat products (1,9,10,11) and also in dishes or meals (12,13). Spectrophotometric methods have also been applied to the speciation of Fe(II) and Fe(III) in beans (14) and in both *in vivo* (15) and *in vitro* (16,17,18,19) assays of Fe availability, to measure non-heme Fe contents.

Although several chromatographic (20,21,22) and spectrophotometric methods (23,24,25) have been proposed to determine heme-Fe in foods, it has also been estimated from differences between the total and non-heme Fe contents (12,26,27).

Several studies have shown that in meat and seafood, cooking, freezing, freeze-thaw cycling, and storage decrease and increase, heme and non-heme Fe contents, respectively (25,28). On the other hand, the changes



experimented by foods during gastrointestinal digestion could affect Fe species in raw and cooked food, upon reaching the small intestine lumen (3).

The present study describes a useful method for Fe speciation [heme and non -heme Fe (ferrous and ferric)] and its application to the bioaccessible Fe fraction of dishes from school menus.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Samples**

Thirteen dishes commonly found on Spanish school menus were analyzed, differing in formulation and preparation methods, and having the following main ingredients: cereals (Cuban style rice, rice with lean meat, spaghetti with sausage and macaroni with tuna), legumes (lentils with chorizo and legume stew), meat (breadcrumb chicken with vegetables, chicken with sauce, potato stew), fish (fried hake and pre-cooked hake in bread-crumbs) and eggs (potato and spinach omelet). The dishes and ingredients are reported in Table 1.

Sampling was carried out in the kitchen of an important catering company in Córdoba (Spain), that cooks and / process meals and distributes them to different schools. Dishes were homogenized with an electric mill to obtain small particles; these were then, transferred to polypropylene flasks, frozen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Table 1.- **Description of the dishes of the school menu**

<b>Plato</b>	<b>Ingredientes</b>
Lentejas con chorizo	Lentejas, aceite de girasol, tomate triturado, sal, colorante, laurel, caldo de pollo, zanahoria, longaniza, cebolla, pimienta, ajo, patatas
Cocido	Garbanzos, judías verdes, zanahoria, hueso, gallina, patata, ragout de ternera, tocino, caldo de pollo y sal
Arroz cubana	Arroz, caldo de pollo, tomate frito, huevo, salchichas, aceite de girasol, ajos y sal
Arroz con magro	Arroz, magro, champiñones, pimientos, guisantes, tomate, cebolla, aceite de girasol, ajo y sal
Pollo con menestra	Pollo empanado, verdura y aceite de girasol
Pollo en salsa	Pechuga de pollo, caldo de pollo, harina, cebolla, almendras, aceite de girasol, patatas, colorante y sal
Tortilla de patatas	Patatas, huevo, aceite de girasol y sal
Tortilla de espinacas	Espinacas, huevo, aceite de girasol y sal
Macarrones con atún	Macarrones, atún, tomate, aceite de girasol y sal
Espaguetis con chorizo	Espaguetis, longaniza, tomate, aceite de girasol y sal
Filete de merluza	Merluza empanada y aceite de girasol
Merluza frita	Filete de merluza y aceite de girasol
Estofado de patatas	Patatas, ragout de ternera, vino blanco, tomate triturado, zanahoria, caldo de pollo, cebolla, pimientos, aceite de girasol, laurel, colorante y sal

## 2.2. Reagents

The digestive enzymes and bile salts were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The working solutions of these enzymes were prepared immediately before use. The pepsin solution was obtained by dissolving 1.6 g of pepsin (P-7000, from porcine stomach) in 10 ml of HCl (0.1 M). The solution of pancreatin and bile salts was prepared by dissolving 0.4 g of pancreatin (P-170, from porcine pancreas) and 2.5 g of bile salt (B-8631 porcine) in 100 ml of 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>.

Standard Fe solutions were prepared immediately before use by dilution of a standard solution of 1000mg Fe /L (Titrisol, Merck, Darmstadt, Germany).

All reagents used were of reagent grade and Millipore-Milli Q (Millipore Ibérica S:A., Barcelona, Spain) distilled-deionized water (DDW) was used throughout.

Bathophenanthroline (4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline disulfonic acid) (Sigma B-1375) was used. A solution was prepared by dissolving in DDW 12.5mg of bathophenanthroline and 8.203 g of sodium acetate, after which the volume was completed to 50 mL with DDW.

The reducing solution was prepared by dissolving 6.25g of hydroxylamine hydrochloride (Aldrich, 15,941-7) in 25 mL of DDW. The precipitation solution was prepared by mixing 10g trichloroacetic acid and 10 mL HCl (sp. gr 1.19) in 100 mL of DDW.

Contamination control: in order to avoid metal contamination glassware was washed and rinsed with water and soaked in concentrated nitric acid (sp.gr.1.40) for 15 min.. Then it was rinsed several times with DDW.

### **2.3. In vitro digestion: Solubility method**

A modification of the method developed by Sauquillo (29) was used. DDW (60mL) was added to 30g of meal, and the pH was adjusted to 2.0 with

6N HCl. After 15 min the pH value was checked, and if necessary readjusted to pH 2. In order to develop the pepsin-HCl digestion, 0.5 g of pepsin solution per 100 g of sample was added. The mixture was then incubated for 2 h at 37°C in a shaking water bath.

Prior to the intestinal digestion step, the pH of the gastric digests was raised to pH 5 by drop-wise addition of 1M NaHCO<sub>3</sub>. Then 18.8 mL of the pancreatin-bile salt mixture was added and incubation was continued for an additional 2 h. To stop the intestinal digestion the sample was kept for 10 min. in an ice bath. The pH was adjusted to 7.2 by drop-wise addition of 0.5 M NaOH. Aliquots of 20 g of the digested sample were transferred to polypropylene centrifuge tubes (50 mL, Costa) and centrifuged at 3500g for 1 h at 4°C. Finally the supernatant (soluble fraction) was collected.

#### **2.4. Bioaccessible Fe determination**

Aliquots of 2.5 g of soluble fraction were dried at 100 °C on a hot plate (Magnetic stirrer hotplate SM6, Bibby Stuart Scientific, UK) and ashed at 450 °C in a muffle furnace (Heraeus M1100/3, Hanau, Germany) during 12 hours, adding concentrated HNO<sub>3</sub> to obtain white ashes. These were dissolved in concentrated HCl and DDW up to a volume of 10 ml. Total soluble Fe was measured by flame atomic absorption spectrophotometry (Perkin-Elmer, Model 2380, Norwalk, CT, USA) under the following instrumental conditions: (wavelength: 248.3 nm; slit width: 0.2 nm; lamp current: 30 mA; acetylene flow: 2.7 l min<sup>-1</sup>; air flow: 17.5 l min<sup>-1</sup>; nebulizer: impact ball).

## 2.5. Nonheme Fe (ionic) determination

Ionic Fe: to 2.5g of soluble fraction, 0.2 mL of 0.39% sodium nitrite, DDW in sufficient amount to complete the weight to 5g, 1.25 g of trichloroacetic acid-HCl 10% (1:1) (TCA-HCl) and 1.25 g of 25% hydroxylamine hydrochloride were added. The global preparation was incubated at 100°C for 10 min and then centrifuged (3300g/ 15 min/ 10°C). Two mL of supernatant aliquot were transferred to a 1-cm spectrophotometric cell and 1 mL of bathophenanthroline reagent was added. The preparation left to stand for 10 min, and absorbance at 535nm was then measured against a reagent blank using an UV-visible spectrophotometer (Perkin-Elmer, Lambda-2, Norwalk, CT,USA).

Fe(II): The procedure described for ionic Fe was applied, though replacing the 1.25g of 25% hydroxylamine hydrochloride with 1.25g of DDW.

Fe(III): This was calculated from the difference between the ionic Fe and Fe(II) contents.

Heme-Fe content in the mineral soluble fraction of the digest was estimated from the difference between total bioaccessible Fe and ionic Fe.

## 2.6. Statistical analysis

A t-test was applied for method optimisation and a linear regression model was used to evaluate the possible relation between different Fe species. A probability level of 95% was used throughout the study

Statistical evaluation of the data was carried out with the Statgraphics Plus 4.0 statistical package for Microsoft Windows.

### **3. Results and discussion**

#### **Optimization of the method**

##### **1. Effect of the protein precipitating solution (TCA-HCl)**

The possible co-precipitation of Fe(III) and proteins when TCA is added was reported by Carter (1971), who proposed using ascorbic acid to ensure complete reduction of Fe(III) to Fe(II) prior to adding TCA. Ascorbic acid addition was not possible in this study, because a differentiation between Fe(II) and Fe(III) was sought. Thus, an assay was carried out to determine whether the addition of TCA-HCl precipitated heme-Fe while ionic-Fe remained soluble.

##### **A) Effect of the joint or sequential addition of TCA and hydroxylamine**

To investigate the possible effect upon Fe(II) and Fe(III) assay of the simultaneous or sequential addition of TCA-HCl and hydroxylamine chloride, both reagents were added simultaneously or with a 5 minute to different Fe(II) and Fe(III) standards, with or without matrix added. Matrix in this case was the soluble mineral fraction of the digest of a) bread crumb chicken with vegetables and b) potato omelet). The results are shown on table 2.

Table 2.- Effect of simultaneous or sequential (5 minute delay) addition of 12.5% hydroxylamine and 10% TCA-HCl (n = 3; mean  $\pm$  standard deviation).

Fe content 1 $\mu\text{g/mL}$	Simultaneous addition	Sequential addition (5 min delay)
	Fe $\mu\text{g/mL}$	Fe $\mu\text{g/mL}$
Fe <sup>+3</sup> aqueous	0.984 $\pm$ 0.017	0.956 $\pm$ 0.022
Fe <sup>+2</sup> aqueous	1.04 $\pm$ 0.05	0.996 $\pm$ 0.033
Fe <sup>+3</sup> aqueous + matrix <sup>a</sup>	2.11 $\pm$ 0.05	1.90 $\pm$ 0.03*
Fe <sup>+3</sup> aqueous+ matrix <sup>b</sup>	1.63 $\pm$ 0.05	1.59 $\pm$ 0.04
Fe <sup>+2</sup> matrix <sup>a</sup>	2.10 $\pm$ 0.01	1.93 $\pm$ 0.03*
Fe <sup>+2</sup> matrix <sup>b</sup>	1.68 $\pm$ 0.05	1.69 $\pm$ 0.15

\*significant differences  $p < 0.05$  within a row

<sup>a</sup> Soluble mineral fraction from potatoes omelette

<sup>b</sup> Soluble mineral fraction from breadcrumb chicken with vegetables

The application of a means comparison test (t-test) showed neither simultaneous nor sequential addition of the reagents (TCA-HCl and hydroxylamine-HCl) to aqueous Fe standard to affect of Fe(II) and Fe(III) assay, though in standards containing added matrix the effect depended on the matrix type, no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) being found in breadcrumb chicken with vegetables, while in the case of potato omelet a statistically significant ( $p < 0.05$ ) decrease was found in Fe(II) and Fe(III) when the reagents were sequentially added. The oxidation state did not seem to affect Fe losses (see Table 2).

#### B) Effect of TCA on heme-Fe

It has been reported that TCA treatment together with the incubation conditions applied could cause the release of Fe bound to the heme group, this phenomenon being responsible for an overestimation of non-heme Fe the

expense of heme-Fe. This can be minimized by adding  $\text{NaNO}_2$  to stabilize the Fe bound to the porphyrin ring of the heme group (Rhee and Ziprin, 1987; Ahn et al., 1993).

To evaluate possible overestimation in the determination of non-heme Fe, two matrixes were selected: the soluble mineral fractions from spaghetti with chorizo and from fried hake. To both of them we added 10 $\mu\text{L}$  of a 5mg/mL hematin solution ([7,12diethenyl-3,8,13,17-tetramethyl-21H,23H-porphine-2,18dipropanoate(4-)-N<sup>21</sup>, N<sup>22</sup>, N<sup>23</sup>, N<sup>24</sup>]-hydroxyferrate(2-)dihydrogen) (Sigma), containing 440  $\mu\text{g}$  heme Fe/ mL, equivalent to 0.88  $\mu\text{g}$  heme Fe/ mL in the assay. Hematin was added because in the gastrointestinal digestion process the heme group is released from the globin protein fraction and therefore only Fe bound to the porphyrin ring reaches the intestinal lumen (30).

In previous assay, the amount of  $\text{NaNO}_2$  to be added was selected, it correspond to 0.078 g in the assay, that is 0.2 mL of a 0.39% w/v  $\text{NaNO}_2$  solution. Contribution of heme-Fe to the non-heme-Fe determination and the effect of  $\text{NaNO}_2$  addition, are reported in Table 3.



Table 3.- Contribution of heme-Fe to nonheme Fe determination and effect of sodium nitrite addition (n = 3; mean  $\pm$  standard deviation)

	Fe $\mu\text{g} / \text{mL}$	%
<b>Spaghetti with chorizo</b>	<b>0.679 <math>\pm</math> 0.039</b>	
+ Hematin <sup>a</sup>	0.797 $\pm$ 0.074	10.2 $\pm$ 2.8%
+ Hematin <sup>a</sup> + NaNO <sub>2</sub> (0.2 mL)	0.727 $\pm$ 0.033	5.45 $\pm$ 1.8 %
<b>Fried hake</b>	<b>0.342 <math>\pm</math> 0.058</b>	
+ Hematin <sup>a</sup>	0.585 $\pm$ 0.079	27.70 $\pm$ 8,93 %
+ Hematin <sup>a</sup> + NaNO <sub>2</sub> (0.2mL)	0.389 $\pm$ 0.010	5.34 $\pm$ 1,08%

<sup>a</sup>-0.88  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Fe from Hematin

The addition of 0.88  $\mu\text{g} / \text{mL}$  Fe from hematin (ratio Fe added/ intrinsic or matrix Fe = 1.18) yielded a 10.2% overestimation of the Fe content of spaghetti with chorizo. In the fried hake matrix (ratio Fe added to intrinsic or matrix Fe = 2.34) overestimation was reached 27.70%, suggesting a linear relationship between added heme-Fe and the overestimation of non-heme Fe. In both cases NaNO<sub>2</sub> addition reduced overestimation to percentage values close to 5%. It has to be noted that the amount of hematin added (0.88  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) corresponded to 50% of Fe as heme-Fe. In the analyzed dishes, containing a large variety of vegetable ingredients, the heme-Fe percentage did not reach 50%.

### C) Matrix interference assays

To evaluate possible matrix interferences in the determination of ionic Fe the addition's method was applied to different soluble mineral fractions of the analyzed dishes. Comparison of the confidence intervals (95% probability level)

of the slopes of the resulting regression equations (Table 4) indicate the absence of interferences.

Table 4.-**Matrix interferences evaluated by the addition method**

Set	Regression equation	r	CI
Aqueous standard	$y = 0.2057x - 0.0008$	0.9997	0.2001-0.2149
+ potatoes omelet	$y = 0.1878x - 0.2572$	0.9983	0.1682-0.2074
+ breadcrumb chicken	$y = 0.2224x - 0.1273$	0.9992	0.2062-0.2386
+ spaghetti	$y = 0.2172x - 0.1474$	0.9997	0.2073-0.2272

r = correlation coefficient

C I = Confidence interval for slope (95% probability level)

### **Application of the proposed method to the samples/ dishes**

Bioaccessible Fe, Fe(II), Fe(III) and heme-Fe contents in the mineral soluble fraction of the analyzed dishes are reported in Table 5.

Soluble ionic Fe (Fe(II) + Fe(III)) percentages in relation to bioaccessible Fe ranged from 49 - 100%, suggesting that most of the bioaccessible Fe was ionic Fe. The latter, with the exception of potato and spinach omelets, was mainly Fe(II), and a statistically significant correlation ( $p < 0.05$ ),  $[\text{Fe(II)}] = 0.4713 + 0.7806 \times [\text{ionic Fe}]$ ;  $r = 0.925$ , was found between soluble ionic Fe and Fe(II) contents (see Figure 1).

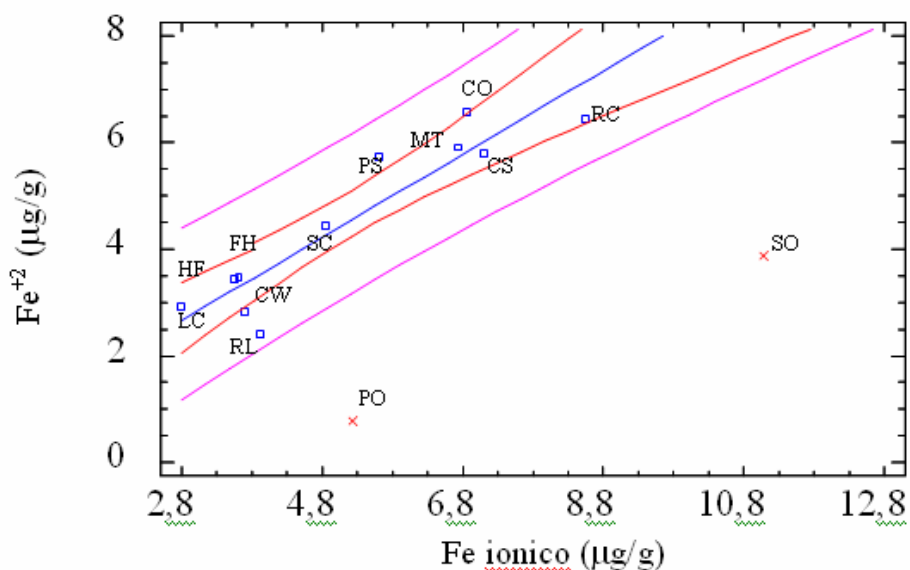
Table 5.-

**Total Fe, ionic Fe, Fe(II), Fe(III) and heme Fe contents in the mineral soluble fraction of in vitro digests of the analyzed dishes (n = 3; mean ± standard deviation)**

Sample	Bioaccessible Fe (µg/ g)	ionic Fe µg/g	Fe(II) µg/g	Fe(III) µg/g	Heme Fe µg/g
Lentils	3.65±0.25	2.81±0.19	2.92±0.28	n.d.	0.84±0.19
Stew	7.60±0.96	6.85±0.21	6.57±0.29	0.28± 0.02	0.75±0.18
Cuban style rice	11.03±0.52	8.55±0.69	6.44±0.85	2.11±0.86	2.48±0.68
Rice with lean meat	5.45±0.83	3.92±0.18	2.41±0.08	1.51±0.08	1.53±0.18
Chicken with vegetables	5.65±0.47	3.71±0.04	2.83±0.13	0.88±0.12	1.94±0.03
Chicken in sauce	7.39±0.84	7.07±0.99	5.80±0.18	1.27±0.18	n.d.
Potato omelet	7.48±0.87	5.23±0.10	0.77±0.13	4.46±0.13	2.25±0.10
Spinach omelet	11.15±0.87	11.08±1.27	3.87±0.14	7.21±0.15	n.d.
Macaroni	7.64±0.58	6.75±0.47	5.90±0.43	0.85±0.21	0.85±0.07
Spaghetti	4.75±0.63	4.86±0.39	4.44±0.14	0.42±0.14	n.d.
Precooked hake filet	6.38±1.79	3.61±0.14	3.48±0.26	0.13±0.04	2.77±0.14
Fried hake	3.46±0.01	3.55±0.10	3.43±0.17	-	n.d.
Potato stew	5.78±0.37	5.60±0.51	5.71±0.19	-	n.d.

- n.d.: not detectable

Figure 1.- Lineal regression ionic Fe versus Fe (II)



CO: Stew

CS: Chicken in sauce

CW: Chicken with vegetables

FH: Fried hake

HF: Hake filet (precooked)

MT: Macaroni with tuna

RL: Rice with lean meat

RM: Rice Cuban style

PO: Potatoes omelet

SO: Spinach omelet

PS: Potatoes stew

SC: Spaguetti with sausage

The ratio between Fe(II) and Fe(III) contents increased with meat protein content in the analyzed dish. This is known as the “meat factor” and seems to be related to the ability of sulfhydryl groups of amino acids such as cysteine to reduce Fe(III) to Fe(II) (31), Fe(II) being more bioavailable than Fe(III) (2). In intestinal rats contents a strong correlation ( $r = 0.980$ ;  $p < 0,001$ ) between Fe absorption and soluble Fe soluble has been reported (15). The Fe(II) percentage with respect to total soluble Fe was found to be higher when meat proteins were present than when proteins came from eggs and milk. The results obtained in the present study agree with this observation.

In potato and spinach omelets Fe(III) was the most abundant Fe species, respectively representing 85 - 63%, of global soluble ionic Fe. Non ionic Fe ( $2.25 \pm 0.10 \mu\text{g/g}$ ) in potato omelette, probably corresponds to Fe bound to peptides originating from egg white proteins, such as ovotransferrin or from yolk (phosvitin), the latter having been shown to bind more than 50% of yolk Fe(III) (32). In the case of spinach omelet, the situation is different due to the high oxalate and phytate contents of spinachs (33, 34), that negatively affect Fe solubility. Spinach omelet presented a total Fe content of  $17.9 \mu\text{g/g}$ , and 62.3% of it was solubilized, while in potato omelet (with a total Fe content of  $8.92 \mu\text{g/g}$ ) 84% was solubilized.

The highest heme-Fe contents corresponded to dishes containing meat as ingredient (Cuban style rice, rice with lean meat, chicken with vegetables and chicken in sauce) though one of Cuban style rice ingredient was egg, and part of Fe determined as heme-Fe thus could correspond to Fe bound to egg peptides, as mentioned above mentioned in relation to omelets.

Differences in heme-Fe content in chicken-based dishes could be explained by differences in meat content between the two analyzed dishes. Thus, chicken was the main ingredient in breadcrumb chicken with vegetables, while in chicken with sauce the meat content was much lower, chicken broth possibly being the main contributor to the higher soluble Fe content. Moreover, chicken in sauce required a long cooking procedure (about 2 hours) that could

have contributed to decrease the heme-Fe content, with a resulting increase in ionic Fe, as has been reported elsewhere (25, 35). The non-detection of heme-Fe in potato stew containing a small portion of veal, could also be explained by the cooking process involve.

Differences in heme-Fe contents between fried and fillet (precooked) hake could likewise be attributed to differences in their preparation. While fried hake consisted of a whole hake fillet, directly fried in oil, so-called hake fillet was a pre-cooked food obtained through an industrial process. With the exception of seafood, fish has a low heme-Fe content (36). The frying process could suffice to destroy the low heme-Fe present. The high non-ionic Fe instead of heme-Fe content found in hake fillets (precooked) could correspond to Fe bound to additives used in formulation of the product.

### **Acknowledgement**

F. Cámara benefits from a grant given by the Ministry of Education and Culture (Spain).

---

**References**

1. Schricker BR, Miller DD, Stouffer JR (1982) *J Food Sci.* 47: 740
2. South PK, Miller DD (1998) *Food Chem* 63(2): 167
3. Han O, Failla M, Hill D, Morris E, Smith C (1995) *J Nutr* 125:1291
4. Carpenter CE, Mahoney AW (1992) *Crit Rev Food Sci Nutr* 31(4): 333
5. Benito P, Miller DD (1998) *Nutr Res* 18(3): 581
6. Wienk KJH, Marx JJM, Beynen AC (1999) *Eur J Nutr* 38: 51
7. Lee K, Clydesdale FM (1979) *J Food Sci* 44: 549
8. Quinteros A, Farré R, Lagarda MJ (2001) *Food Chem* 75: 365
9. Carter P (1971) *Anal Biochem* 40: 450
10. Rhee KS, Ziprin YA (1987) *J Food Sci* 52(5): 1174
11. Ahn DU, Wolfe FH, Sim JS (1993) *J. Food Sci.* 58(2): 288
12. Galán P, Cherouvrier F, Fernández-Ballart C, Marti-Henneberg C, Hercberg S (1990) *Eur J Clin Nutr* 44: 157
13. Baech SB, Hansen M, Bukhave K, Jensen M, Sorensen S, Kristensen L, Purslow P, Skibsted LH, Sandström B (2003) *Am J Clin Nutr* 77: 173
14. Benitez MA, Grijalva MI, Valencia ME (1994) *J Agric Food Chem* 42: 1300
15. Kapsokefalou M, Miller DD (1995) *Food Chem.* 52: 47
16. Kapsokefalou M, Miller DD (1991) *J Food Sci* 56: 352
17. Reddy NS, Sondge CV, Khan TN (1993) *Plant Foods Hum Nutr* 44: 241
18. Jovaní M, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ, Clemente G (2000) *Nahrung.* 44(2): 114
19. Sebastiá V, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ (2001) *J Sci Food Agric* 81: 1180

20. Oellingrath IM, Slinde E (1985) *J Food Sci* 50: 1551
21. Oellingrath IM, Iversen A, Skrede G (1990) *Meat Sci* 28: 313
22. Han D, McMillin KW, Godber JS (1994) *J Food Sci* 59(6): 1279
23. Hong JH, Yasumoto K (1996) *J. Food Compos. Anal.* 9: 127
24. Chen SS, Chang WH, Chou SS (1998) *J Food Drug Anal* 6: 529
25. Lombardi-Boccia G, Martínez-Domínguez B, Aguzzi A, Rincon-León F (2002) *Food Chem* 78: 505
26. Hallberg L, Rossander L (1982) *Scand J Gastroenterol* 17: 151
27. Martínez Graciá C, López Martínez G, Ros Berruezo G, Vidal Guevara ML, Abellán Ballesta P (2000) *J Agric Food Chem* 48: 2930
28. Benjakul S, Bauer F (2001) *Food Chem* 72: 207
29. Sahuquillo A, Barberá R, Farré R (2003) *Nahrung/Food* 47(6): 438
30. Beard JL, Dawson H, Piñero DJ (1996) *Nutr Rev* 54(10): 295
31. Mulvihill B, Kirwan FM, Morrissey PA, Flynn A (1998) *Int J Food Sci Nutr* 49: 187.
32. Thapon JL, Bourgeois CM (1994) (Coordonnateurs) *L'oeuf et les ovoproduits*. Lavoisier Tec&Doc. Paris.
33. Fengwu-Wu, Zhike-He, Quingyao-Luo, Yune-Zeng (1999) *Food Chem* 65: 543
34. Lehrfeld J (1994) *J Agric Food Chem* 42: 2726
35. Purchas RW, Simcock DC, Knight TW, Wilkinson B (2003) *Int J Food Sci Tech* 38: 827
36. Kongkachuichai R, Napatthalung P, Charoensiri R (2002) *J Food Comp Anal* 15: 389



## VI. DISCUSIÓN GENERAL

La discusión de los resultados obtenidos se desarrolla en el orden indicado en el apartado de objetivos:

**Objetivo 1.- Revisión bibliográfica de los factores dietéticos que afectan a la biodisponibilidad de calcio, hierro, cinc y cobre**

Está ampliamente aceptado que la dieta durante la infancia y adolescencia influye, no sólo a corto plazo, sino que también tiene un importante impacto sobre la salud en la edad adulta. Las deficiencias minerales en edad escolar se deben generalmente a un déficit en la ingesta a partir de la dieta en una etapa en la que se produce un crecimiento rápido, o bien a una adecuada ingesta pero una baja absorción mineral (Favier, 1993). En países occidentales donde no hay escasez de alimentos, se señalan ingestas deficientes de calcio, hierro y zinc en determinados grupos de población (Räsänen et al., 1992; Southon et al., 1993)

## Calcio

La principal función fisiológica del calcio es de tipo estructural proporcionando resistencia y rigidez a la masa ósea (Hernández-Rodríguez, 1994; Turlund, 1994). Una adecuada ingesta de calcio durante la infancia se asociada con un incremento, durante la adolescencia, en el pico de masa ósea y una disminución en el riesgo de padecer fracturas y osteoporosis (Barrer-Lux y Heany, 1994).

La mayor biodisponibilidad del calcio de la leche de vaca se debe al contenido en este elemento y a que este calcio se encuentra unido principalmente a caseína. Los caseinofosfopéptidos formados durante la digestión de la caseína mejoran la absorción de calcio, ya que mantienen al catión en una forma soluble, inhibiendo su precipitación en el intestino en forma de fosfato cálcico (Greger, 1988). Este efecto de los caseinofosfopéptidos es contradictorio, recogiendo en la bibliografía por un lado trabajos en los que se indica una mejora de la dializabilidad de calcio en fórmulas infantiles debida a la presencia de caseína (Roig et al., 1999), y por otro lado, estudios recientes en los que no se señala efecto alguno (Drago y Valencia, 2004).

La mejora de la absorción de calcio por influencia de la lactosa ha sido puesto de manifiesto en humanos (Ziegler y Fomon, 1983; Moya et al., 1992), aunque el mecanismo por el cual se justifica permanece sin clarificar. Este efecto puede ser atribuido principalmente al disacárido, ya que glucosa y galactosa por sí solas no aumentan significativamente la captación de mineral.

Por otro lado el efecto de la fibra sobre la biodisponibilidad de calcio es bastante controvertido. Se indica que la fibra dietética afecta negativamente a la biodisponibilidad de calcio (Slavin y Marlett, 1980), posiblemente debido a la capacidad quelante de distintas fracciones de la fibra sobre cationes metálicos. Sin embargo, otros estudios (Shen et al., 1998) con dos fuentes de lignina procedentes de salvado de trigo y col, no se encuentra una disminución en la absorción de  $^{45}\text{Ca}$  frente a un grupo control. Por otro lado, se considera que la

fermentación de determinadas fracciones de la fibra como pectina por las enzimas bacterianas a nivel del colon favorece la absorción de calcio (Hara et al., 1996; Ohta et al., 1997).

El ácido fítico sí afecta a la biodisponibilidad de calcio (Lönnerdal et al., 1989). No obstante, el efecto inhibitorio del ácido fítico sobre la absorción de calcio podría prevenirse con la adición de fructooligosacáridos a la dieta (López et al., 2000). Los fructooligosacáridos no se degradan por las enzimas intestinales y llegan al colon prácticamente intactos, donde son fermentados por la flora bacteriana presente, con producción de ácidos orgánicos de cadena corta (acetato, propionato, butirato), lactosa y gases. Estos ácidos disminuyen el pH intestinal, facilitando la solubilidad del calcio y formando complejos que facilitan su difusión pasiva, ya que las membranas celulares tienen una baja permeabilidad a iones altamente cargados. Además, los fructooligosacáridos estimulan la proliferación bacteriana en el colon con la subsiguiente mayor secreción de fitasa, enzima que hidroliza el ácido fítico a fosfato e inositol.

## Hierro

La principal función fisiológica del hierro es la de formar parte de hemoglobina y mioglobina y participar en los procesos de transferencia de electrones que tienen lugar en la cadena respiratoria (Aranda y Llopis, 1993). Un status bajo en hierro se asocia a una disminución en la productividad laboral (Scholz et al., 1997), y una reducción del desarrollo cognitivo (Schrimshaw, 1991). La deficiencia en este elemento es un serio problema de

salud y afecta a una gran parte de la población mundial (MacPhail y Bothwell, 1992).

En la dieta, el hierro se encuentra presente en dos formas: hierro hemo procedente de mioglobina y hemoglobina e hierro no hemo presente en alimentos vegetales y utilizado usualmente para la suplementación. La biodisponibilidad de hierro hemo es mayor que la del no hemo siendo el anillo de porfirina el responsable de su alta absorción (South et al., 2000). Otros autores (Fly y Czarnecki-Maulden, 2000) atribuyen este efecto a la porción proteica de la molécula de hemoglobina, ya que es posible que los péptidos formados durante la digestión de la globina puedan mejorar la biodisponibilidad aumentando su solubilidad. Una vez en el enterocito, el hierro hemo es liberado del anillo de porfirina por la enzima hemooxigenasa, pasando al torrente sanguíneo junto al hierro no hemo como un pool común.

La biodisponibilidad de hierro no hemo depende de múltiples factores dietéticos y fisiológicos que condicionan su solubilidad en el lumen intestinal (Kim et al., 1995), por lo que las sustancias que aumentan su solubilidad se consideran potenciadoras mientras que los compuestos que la disminuyan se consideran inhibidores.

Entre las sustancias promotoras de la absorción de hierro están las proteínas cárnicas (factor carne) y determinadas vitaminas como ácido ascórbico y vitamina A. El efecto del factor carne se debe a que los péptidos

liberados durante la digestión de las proteínas captan hierro formando complejos de mayor solubilidad en el lumen intestinal (Berner y Miller, 1985) o a la capacidad de los grupos sulfhidrilo de determinados aminoácidos como cisteína, de reducir el hierro (III) a hierro (II) más biodisponible (Kapsokefalou y Miller, 1995; Mulvihill y Morrissey, 1998).

De la misma manera a como ocurre con las proteínas cárnicas, el efecto promotor del ácido ascórbico sobre la absorción de hierro es debido a su capacidad para reducir el hierro férrico a ferroso ó a la posibilidad de formar complejos solubles con el ión férrico (Van Dyck et al., 1996; Davidsson et al., 1998). Además, este ácido ascórbico puede contrarrestar el efecto de inhibidores como el ácido fítico.

Los caseinofosfopéptidos procedentes de la hidrólisis enzimática de la caseína aumentan la solubilidad del hierro en el intestino, favoreciendo la utilización de éste en la eritropoyesis o su almacenamiento en el hígado en forma de ferritina. Además, se produce una disminución de las interacciones entre minerales, ya que el hierro unido a caseinofosfopéptidos es absorbido por un camino distinto (al parecer por endocitosis) al que utilizaría si estuviera como ión libre. (Ait-oukhatar et al., 1997; 1999; Peres et al., 1997).

La influencia de la fibra dietética sobre la biodisponibilidad de hierro permanece sin clarificar con discrepancias entre estudios in vivo e in vitro. Estudios in vitro señalan una disminución en la dializabilidad de hierro (Van

Dyck et al., 1996) debido a la unión del hierro, por interacción electrostática, a polisacáridos con un alto contenido en grupos sulfato y carboxilo (Debon y Tester, 2001). Por el contrario, en modelos animales donde la fortaleza iónica es mayor, esta capacidad para captar cationes no se observa (Torre et al., 1991) e incluso se indica una mejora en la absorción de hierro (Kim et al., 1996; Levrat-Verny et al., 1999).

Mucho más claro es el papel del ácido fítico como depresor de la absorción de hierro (Glahn et al., 2002). Este efecto puede ser mitigado por la presencia de potenciadores de la absorción de hierro como la carne (Baech et al., 2003) y el ácido ascórbico (Jovaní et al., 2000; Davidsson et al., 2001). Paralelamente, se observa que la presencia de fructooligosacáridos en dietas con ácido fítico neutralizan los efectos inhibitorios asociados a este ácido en el status de hierro (López et al., 2000).

Otros inhibidores de la absorción de hierro son los polifenoles (Cook et al., 1995; Boato et al., 2002; Glahn et al., 2002). Al grupo galol de los compuestos fenólicos se le atribuye la inhibición (Brune et al., 1991). Estos polifenoles pueden dividirse en tres grupos principalmente: ácidos fenólicos, flavonoides y polímeros de flavonoides y de flavonoides con ácidos fenólicos. El contenido y tipo de polifenoles presentes en los alimentos determina el efecto inhibitorio.

## Cinc

Este elemento participa como cofactor de más de 120 enzimas implicadas en el metabolismo de ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas, jugando un papel esencial en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Hambidge, 2000) y en la función inmune (Shankar y Prasad, 1998).

Uno de los principales factores que condicionan la disponibilidad de zinc es el status de este elemento en el individuo. En seres humanos, la absorción de zinc aumenta cuando la dieta es pobre en este mineral (Wada et al., 1985; August et al., 1989; Ziegler et al., 1989). Estudios posteriores señalan que la regulación homeostática de zinc durante periodos en los que la ingesta del mismo es baja se debe, mas que a un aumento en su absorción, a una disminución de la excreción endógena (Lee et al., 1993; Sian et al., 1996).

Determinados compuestos aumentan la absorción de cinc como ácido picolínico, cítrico y determinados aminoácidos como glicina, histidina, lisina, cisteina y metionina (Salguero y col., 2000). Al igual que ocurre para hierro, la presencia de proteínas animales podría mejorar la absorción de este elemento. La cantidad de cinc absorbida aumenta de forma lineal cuando se incrementa la cantidad de proteína presente (Sandtröm, 1992). Esta influencia depende del grado de digestión y composición en aminoácidos de la proteína y, en especial, del contenido en aminoácidos azufrados como cisteina. Además, considerando que las proteínas son una de las principales fuentes de cinc, no



solo incrementan la biodisponibilidad sino también la presencia de este elemento en la dieta (Lönnerdal, 2000).

La fibra se ha asociado frecuentemente con un efecto negativo en la absorción de cinc, aunque su efecto contradictorio, e incluso algunos autores (Hara y col., 2001) señalan un incremento en la absorción de este mineral cuando diferentes fuentes de fibra están presentes en bajas cantidades. Posiblemente, la menor biodisponibilidad de cinc de muchos alimentos ricos en fibra se deba más a otros compuestos también presentes en este tipo de alimentos como ácido fítico y no a la fibra por si misma (Lönnerdal, 2000).

Al igual que ocurre para calcio y hierro, el ácido fítico disminuye la absorción de zinc (Harland y Narula, 1999; Adams et al., 2002) y podría condicionar la interacción calcio-cinc (Spencer et al., 1985, 1992). Esta interacción es mucho más acusada en presencia de fitato, ya que una excesiva cantidad de calcio en la dieta podría implicar una disminución en la solubilidad de los complejos cinc-fitato-calcio y, consecuentemente, disminuir la biodisponibilidad de cinc. Este efecto negativo del ácido fítico sobre la absorción de cinc puede prevenirse mediante la adición de fructooligosacaridos a la dieta (López y col., 2000).

Además, el procesado de los alimentos vegetales (cocinado, fermentación, descascarillado, germinación, etc) puede producir la hidrólisis del

ácido fítico a penta-, tetra- y tri inositol fosfatos con una menor capacidad para captar cationes y menor influencia en la disminución de la biodisponibilidad.

## Cobre

Es un mineral esencial para el metabolismo del hierro ya que acelera la biosíntesis de hemoglobina (Mills, 1930). Es considerado también un nutriente antioxidante relacionado con la salud cardiovascular (Allen y Klevay, 1994; Klevay, 2000) e hipertensión (Russo et al., 1998) ya que forma parte de la cobre-cinc superóxido dismutasa, agente protector frente a radicales libres. El colágeno y la elastina de las arterias requieren lisil oxidasa, otra enzima dependiente de cobre, encontrándose una relación entre hipercolesterolemia y deficiencia en este elemento (Klevay, 2000).

La deficiencia en cobre es poco frecuente y su biodisponibilidad se ve menos afectada por factores inhibidores como fibra, ácido fítico y polifenoles. El efecto del ácido fítico sobre la biodisponibilidad de cobre no está suficientemente claro (Turlund et al., 1985; Lee et al., 1988), indicándose un efecto quelante sobre cinc, disminuyendo la interacción Zn-Cu (Champagne y Hinojosa, 1987).

Los polifenoles podrían influir favorablemente en la absorción de cobre. Tanto *in vivo* (Vaquero et al., 1994; De Vos y Schrijer, 2003) como *in vitro* (Vaquero et al., 1994) se pone de manifiesto que la absorción de cobre

aumenta con el consumo de bebidas ricas en polifenoles. Al parecer es posible que algunos taninos y flavonoides formen compuestos de bajo peso molecular con cobre, facilitando su absorción y retención, produciendo un efecto contrario al observado con el hierro.

<p><b>Objetivo 2.- Estudio de la biodisponibilidad de los menús escolares mediante ensayos de solubilidad y diálisis</b></p>
--

Los mayores contenidos de calcio corresponden a los platos de tortilla, merluza y legumbres. La solubilidad y dializabilidad presentan una correlación significativa ( $p < 0.05$ ) con el contenido de calcio si se excluye del modelo a la tortilla de espinacas. A mayor contenido de calcio mayor cantidad de calcio soluble ( $r = 0.76$ ) y dializada ( $r = 0.72$ ). Mientras que si la solubilidad y dializabilidad se expresan en porcentaje, la correlación es negativa ( $r = -0.88$ ,  $r = -0.91$ ) respectivamente.

La tortilla de espinacas presenta el mayor contenido en calcio y al mismo tiempo el menor porcentaje soluble y dializado. El elevado contenido de oxalatos en las espinacas (6.62 g/Kg, Chawla et al., 1988) favorecen la precipitación del mismo. La adición de oxalatos a dietas semisintéticas pone de manifiesto la disminución de la diálisis de calcio, de manera dependiente de la concentración de oxalatos (Kennefick y Cashman 2000).

La dializabilidad de calcio de la merluza precocinada (40.02  $\mu\text{g/g}$ ) y merluza frita (62.15  $\mu\text{g/g}$ ) se sitúa en el extremo inferior de los valores (63.6-83.1  $\mu\text{g/g}$ ) obtenidos por Martínez et al. (1998) en potitos a base de pescado, utilizando un método similar. Se señala a diversas especies de pescado como una buena fuente dietética de calcio, tanto por su alto contenido en este mineral (Losso et al., 2003), como por la buena biodisponibilidad demostrada frente a otras fuentes de calcio como la leche (Larsen et al., 2000).

De los trece platos estudiados, los alimentos de origen vegetal, las espinacas, las leguminosas y, en menor medida, los cereales presentan los mayores contenidos de hierro. Sin embargo, debido a la presencia de sustancias inhibidoras como oxalatos y fitatos, los porcentajes de biodisponibilidad son bajos. Así, la tortilla de espinacas presenta el mayor contenido de hierro y al mismo tiempo el porcentaje de diálisis más bajo y uno de los menores de solubilidad. De igual modo, las lentejas es uno de los platos con mayor contenido en este elemento y con una baja solubilidad de hierro debido, probablemente, a su alto contenido en fitatos (Mañez et al., 2002)

Por el contrario, los platos de carne (pollo en salsa, pollo menestra y merluza precocinada) presentaron los mayores porcentajes de hierro dializado. Tal y como se comenta en la revisión bibliográfica, la presencia de proteínas cárnicas favorece la biodisponibilidad de hierro (Engelmann et al, 1998), efecto potenciador que se ha observado tanto en estudios *in vitro* (Mulvihill & Morrissey, 1998; Kapsokefalou & Miller, 1991) como *in vivo* (Baech et al., 2003;

Kapsokefalou & Miller, 1995), y parece estar relacionado con la capacidad que tiene los péptidos de mantener el hierro soluble en el lumen intestinal o reducir el Fe (III) a Fe (II) por los grupos sulfhidrilo de aminoácidos azufrados de las proteínas cárnicas (Mulvihill et al, 1998).

En comparación con los platos anteriores, merluza frita presenta un porcentaje de diálisis de hierro más bajo, pero mayor porcentaje de hierro soluble. Este efecto podría deberse a que, aunque las proteínas cárnicas solubilizan el hierro presente, los compuestos formados son de tamaño superior al poro de la membrana utilizada. Junto a los platos de carne, el estofado de patatas también presenta un porcentaje de diálisis elevado que puede deberse al efecto de la ternera presente en éste como uno de los ingredientes principales.

Los contenidos de cinc más altos corresponden a tortillas, legumbres, pollo en salsa y arroz con magro. Los platos de carne, pollo en salsa y pollo con menestra, presentan unos de los mayores porcentajes de cinc dializado. La presencia de proteínas animales puede mejorar la absorción de cinc como se indica en estudios llevados a cabo en humanos en los que la fracción de cinc absorbida aumenta en un modelo lineal cuando se incrementa la cantidad de proteína presente (Sandström, 1992). El estofado de patatas presenta el mayor porcentaje de cinc dializado debido a la presencia de ternera como uno de los ingredientes principales y al bajo contenido en ácido fítico de las patatas.

Los menores porcentajes de diálisis de cinc corresponden a platos a base de cereales, mientras que las legumbres presentan mayores porcentajes. En estos platos, uno de los componentes es el ácido fítico conocido inhibidor de la biodisponibilidad del cinc. Las diferencias observadas entre cereales y leguminosas podrían deberse al diferente cocinado de los platos. Las legumbres se someten a un tratamiento térmico más intenso, lo que facilitaría la disminución del contenido de ácido fítico, mejorando la biodisponibilidad. Además, las proteínas vegetales de las leguminosas favorecerían la biodisponibilidad de este elemento Lombardi-Boccia et al. (1994) señalan un aumento en la dializabilidad de cinc en presencia de globulinas de judías, con un alto contenido en cisteína.

Los contenidos de cobre en los distintos platos fueron más homogéneos que para el resto de los elementos analizados. Los contenidos más altos corresponden a leguminosas y cereales y los menores porcentajes de cobre dializado a los platos a base de carne, siendo incluso no detectable en platos de pescado.

Como ya se ha mencionado, la biodisponibilidad de cobre se ve menos afectada por inhibidores como el ácido fítico, la fibra y los polifenoles. Estudios realizados en mujeres (Hunt y Vanderpool, 2001) que ingieren dietas vegetarianas o no vegetarianas, señalan una menor absorción de cobre (33.0%) *versus* dieta no vegetariana (42,1%). Sin embargo, como el contenido de cobre fue mayor en las dietas vegetarianas, es mayor la absorción aparente

de cobre de las mismas y no se observan diferencias significativas en los niveles de cobre plasmático y ceruloplasmina de las mujeres que ingieren ambos tipos de dietas.

La cantidad de cobre que se solubiliza y dializa aumenta con el contenido en cobre de los platos de acuerdo con un modelo multiplicativo ( $r = 0.78$ ) y lineal ( $r = 0.72$ ) respectivamente. El porcentaje de cobre solubilizado mantiene una relación inversa con el contenido mineral ( $r = 0.75$ ), a mayor contenido en cobre menor porcentaje de elemento se solubiliza.

<p><b>Objetivo 3.- Desarrollo de un método analítico para determinar las diferentes formas químicas de hierro en la fracción soluble de los platos</b></p>
--

El estudio de las diferentes formas químicas en las que se encuentra el hierro en los alimentos es de interés ya que va a condicionar su biodisponibilidad. La biodisponibilidad de hierro hemo es superior a la del hierro no hemo (Schriker et al., 1982) y a su vez dentro de este último el Fe (III) es menos disponible que Fe (II), ya que se solubiliza menos en el intestino (South y Miller, 1998). A su vez, las diferentes transformaciones que sufren los alimentos en el proceso de digestión gastrointestinal podrían modificar el estado del hierro presente inicialmente en el alimento crudo ó cocinado cuando éste alcanza el intestino delgado (Han et al., 1995).

Diferentes métodos se han utilizado para la determinación de hierro hemo, tanto cromatográficos (Oellingrath et al., 1990; Han et al., 1994) como espectrofotométricos (Chen et al., 1998; Lombardi-Boccia et al., 2002). Los primeros encaminados a la separación completa de mioglobina y hemoglobina para su cuantificación, requieren un material caro como un HPLC. Los segundos tienen el inconveniente de que sólo pueden utilizarse para muestras en la que los únicos pigmentos presentes sean mioglobina y hemoglobina y no en muestras más complejas, en las que la carne se mezcla con otros ingredientes (platos preparados, weaning foods), ya que daría una sobreestimación de la medida. Una alternativa para estos casos consiste en la determinación de hierro no hemo mediante un método espectrofotométrico (Carter, 1971; Schricker et al., 1982; Rhee y Ziprin, 1987) y, por diferencia con el hierro total, calcular el hierro hemo. En algunos casos, estos métodos espectrofotométricos para la determinación de hierro no hemo, se han utilizado también para la especiación de Fe ferroso y férrico (Benitez et al., 1994; Quinteros et al., 2001).

Se ha optimizado un método espectrofotométrico utilizando batofenantrolina como complejante del hierro y clorhidrato de hidroxilamina como reductor y se aplica a la especiación de hierro en los distintos platos muestreados. Uno de los problemas que podría plantearse era que al añadir la mezcla ácido tricloroacético-HCl, el hierro férrico coprecipitase con el hierro hemo (Carter, 1971), impidiendo la especiación. Sin embargo, tras una serie



de ensayos en los que la hidroxilamina se añade conjunta o separadamente de la mezcla ácida, se observa que esta coprecipitación no se produce.

Otros autores (Rhee y Ziprin, 1987; Ahn et al., 1993) indican que el tratamiento con ácido tricloroacético junto a las condiciones de incubación del procedimiento podrían provocar una ruptura del hierro asociado al grupo hemo transformándolo en hierro no hemo y produciendo una sobreestimación de éste en detrimento del hemo. Este hecho puede minimizarse con la adición de nitrito sódico para estabilizar el hierro unido al anillo de porfirina en el grupo hemo. Se selecciona la cantidad y concentración de nitrito sódico; 0.2 mL de nitrito sódico 0.39% reduce esta sobreestimación.

La mayor parte del hierro bioaccesible de los platos se encuentra en forma iónica y, a su vez, dentro de este hierro iónico, excepto en tortilla de patatas y de espinacas, predomina la forma ferrosa, existiendo una correlación significativa entre hierro iónico y ferroso ( $r = 0.93$ ). La relación entre Fe (II) / Fe (III) es tanto mayor cuanto mayor contenido de proteínas cárnicas tiene el plato analizado, lo que pone de manifiesto la capacidad que tienen los grupos sulfhidrilo de determinados aminoácidos de las proteínas cárnicas, como cisteína, de reducir el Fe (III) a Fe (II) mejorando así su biodisponibilidad (Mulvihill et al., 1998).

Para tortilla de patatas y de espinacas la especie de hierro mayoritaria es la forma férrica. En la tortilla de patatas el hierro cuantificado como hierro no

iónico probablemente corresponde a hierro unido a péptidos procedentes de proteínas de la clara de huevo como ovotransferrina ó de la yema como fosvitina. Esta última fija más del 50% del Fe (III) de la yema (Thapon et al., 1994). Para tortilla de espinacas, la alta presencia de oxalatos y fitatos (Chawla et al., 1988; Fengwu et al., 1999) justificaría la baja dializabilidad (0.23%) y solubilidad (45.44%).

El contenido de hierro no iónico presente en arroz a la cubana (2.48  $\mu\text{g/g}$ ) corresponde en parte a hierro hemo y, teniendo en cuenta que uno de los ingredientes principales de este plato es el huevo, parte del hierro cuantificado como hemo puede corresponder a hierro unido a los péptidos del huevo, hecho anteriormente mencionado para los platos de tortilla.

De igual modo, las diferencias entre los platos de pescado, merluza frita y merluza precocinada podrían deberse a las distintas formas de preparación de ambos platos. Mientras que merluza frita es un filete entero de pescado, frito directamente en aceite, el filete de merluza es un alimento precocinado que ha sufrido un procesado industrial. A excepción del marisco, el pescado presenta un bajo contenido en hierro hemo (Kongkachuichai et al., 2002). La fritura pudo ser suficiente para destruir el bajo contenido de hierro hemo presente y el alto contenido de hierro en forma no iónica presente en filete de merluza precocinada puede deberse a complejos del hierro con otros componentes del plato.

**Objetivo 4.- Evaluación de la biodisponibilidad mineral de los menús escolares mediante ensayos de captación y transporte con células Caco-2**

La línea celular Caco-2 es un modelo válido para estudiar la captación de minerales por el intestino humano (Alvárez- Hernández et al., 1991; Han et al., 1995). En un intento de avanzar un paso más en los estudios *in vitro* de estimación de la biodisponibilidad, se incorpora la utilización de cultivos celulares ya que permiten estimar captación y transporte de nutrientes.

No se conocen estudios de biodisponibilidad mineral con células Caco-2 en una comida compuesta como pueden ser platos con distintos ingredientes. El objetivo es estudiar la captación y transporte de calcio, hierro, zinc y cobre en menús seleccionados, así como el efecto de las proteínas, y las posibles interacciones minerales existentes entre ellos sobre los resultados obtenidos.

Los platos de leguminosas y cereales presentan los mejores porcentajes de calcio captado y transportado mientras que los platos de carne y pescado presentan una menor biodisponibilidad para este mineral. En el caso de merluza frita, el bajo porcentaje de mineral captado (1.09%) y transportado (2.18%) está de acuerdo con el obtenido en los ensayos de diálisis (17.40%), donde merluza frita presentó uno de los menores porcentajes de calcio dializado. Aunque no se puede establecer una correlación entre porcentaje de captación de calcio y contenido en proteínas, si se observa una tendencia a disminuir la cantidad de calcio captada con el aumento del contenido proteico.

Los platos con un alto contenido en proteínas presentan los mayores porcentajes de captación de hierro (pollo empanado, pollo en salsa y merluza frita) y transportado (pollo en salsa, pollo empanado), pudiendo establecerse una correlación lineal positiva entre porcentaje de captación de hierro y contenido en proteínas ( $r = 0.87$ ) para todos los platos estudiados, a excepción del plato macarrones con atún cuyo elevado porcentaje de captación probablemente se debe a una alta relación Fe(II)/Fe(III). Este hecho pone de manifiesto el efecto potenciador de las proteínas de la carne sobre la biodisponibilidad de hierro y coincide con los resultados obtenidos en los ensayos de solubilidad y diálisis para los platos de carne y pescado.

Para todos los platos estudiados se obtiene una correlación negativa entre porcentaje de hierro captado y contenido en zinc ( $r = -0.64$ ), lo que indicaría una posible interacción Fe-Zn. No se observa, a partir de los datos de captación y transporte de cinc, un efecto potenciador de las proteínas sobre la biodisponibilidad de este mineral. Los porcentajes de cinc captado más elevados corresponden a platos con un contenido proteico más bajo como cocido (33.96%) y macarrones (16.94%), así como los de cinc transportado para macarrones (30.68%) y lentejas (23.77%).

Las leguminosas presentan una buena biodisponibilidad en cinc, a pesar de contener un inhibidor bien conocido de la misma como es el ácido fítico. El tratamiento térmico al que se someten estos platos podría ser el responsable

de una disminución en el contenido del inhibidor, además del efecto potenciador, indicado ya anteriormente, de las proteínas vegetales.

Por otro lado, se observa una correlación positiva entre contenido de cobre y porcentaje de zinc captado ( $r = 0.72$ ) y transportado ( $r = 0.88$ ) para los platos analizados, lo que indica que no parece existir una interacción negativa del cobre sobre la captación de zinc.

Finalmente, en relación al cobre, no existe una relación entre contenido proteico y cobre captado ó transportado. De igual modo, tampoco se observa una mayor biodisponibilidad de cobre en platos de origen animal frente a los de origen vegetal.

<p><b>Objetivo 5.- Valoración nutricional de los aportes minerales de los menús escolares en función de su biodisponibilidad</b></p>
--

Las contribuciones a la ingesta recomendada de un elemento mineral se calculan, generalmente, a partir del contenido total del mismo presente en el alimento o dieta. Sin embargo, no todo el mineral presente será absorbido y utilizado eficientemente y, aunque muchas de estas recomendaciones parecen tener en cuenta este aspecto, resultaría más conveniente calcularlas a partir de datos de mineral biodisponible.

Teniendo en cuenta que los resultados de biodisponibilidad mineral obtenidos en este trabajo, y que incorporan la línea celular Caco-2, permiten una mejor aproximación a la situación *in vivo*, se han utilizado dichos datos para estimar los aportes a la ingesta recomendada de los platos seleccionados. Para ello, se considera como cantidad de mineral que se absorbe la correspondiente a la suma de la cantidad captada por la célula más la transportada al medio basal.

De acuerdo con esto, las contribuciones de los platos analizados a la ingesta recomendada de calcio es baja, inferior al 1% en la mayoría de los casos, lo que sugiere, teniendo en cuenta la gran importancia de este mineral en la edad escolar, la necesidad de aportar dicho elemento a través de otros alimentos como leche y productos lácteos a lo largo de otras comidas del día como el desayuno y la merienda.

Como es de esperar, las principales contribuciones a la ingesta recomendada de hierro la constituyen el grupo de la carne y pescado, siendo las principales fuentes dietéticas de este elemento, mientras que para zinc los alimentos que más contribuyen a la ingesta recomendada son los platos de leguminosas. De igual modo, los platos de cereales y leguminosas se presentan en este estudio como las mejores fuentes de cobre.

Así pues, una combinación de un primer plato de legumbres seguido de un segundo con base cárnica ó pescado constituiría una apropiada estrategia para conseguir el aporte dietético de estos tres elementos esenciales.

## VII. CONCLUSIONES



- PRIMERA La revisión de los factores dietéticos que condicionan la biodisponibilidad mineral pone de manifiesto la complejidad de su estudio y la necesidad de profundizar en investigaciones futuras que aclaren efectos clásicos, como los de la fibra y ácido fítico, y expliquen el papel sobre la biodisponibilidad mineral de nuevos componentes de la dieta como fructooligosacáridos y caseinofosfopéptidos.
- SEGUNDA No se establecen correlación entre los ensayos de solubilidad y de diálisis para la estimación de la biodisponibilidad mineral
- TERCERA Para los cuatros elementos estudiados, el contenido de mineral solubilizado aumenta al incrementarse la cantidad de mineral presente en el plato. Este efecto del contenido mineral del menú sobre la dializabilidad se ajusta a diferentes modelos, en algunos caso no significativos, no pudiendo establecerse ninguna tendencia general.
- CUARTA En los ensayos de solubilidad y diálisis, las mejores fuentes de calcio biodisponible se corresponde con platos a base de pescado. Los platos a base de huevo y vegetales son los que aportan hierro y calcio menos biodisponible, a pesar de su alto contenido en ambos minerales.

- QUINTA El zinc más biodisponible lo aportan los platos a base de carne y leguminosas. Las mejores fuentes de cobre corresponden a platos a base de legumbres y cereales, tanto por su contenido mineral, como por su elevado porcentaje biodisponible lo que indica que aunque el ácido fítico puede afectar a la bioaccesibilidad de calcio, hierro y zinc, no ocurre lo mismo en el caso del cobre
- SEXTA Los platos a base de carne presentaron los mejores porcentajes de hierro biodisponible, tanto en la diálisis como en los ensayos de captación y transporte con células Caco-2, poniendo de manifiesto el papel de las proteínas cárnicas en la biodisponibilidad de hierro.
- SEPTIMA El método espectrofotométrico basado en la utilización de batofenantrolina permite el estudio de la especiación de hierro en la fracción soluble de los platos analizados. Los platos investigados aportan bajos contenidos de hierro hemo.
- OCTAVA Los estudios de captación con células Caco-2 ponen de manifiesto una interacción negativa hierro-zinc en los platos analizados, así como un mayor porcentaje de hierro biodisponible cuando este elemento se encuentra en estado ferroso.

NOVENA                    Las contribuciones de los menús a la ingesta recomendada son bajas para calcio y más elevadas para hierro, zinc y cobre, siendo la combinación de platos de legumbres con platos a base de carne la más apropiada para satisfacer las recomendaciones de estos tres elementos.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Adams C, Hambidge M, Raboy B, Dorsch JA, Sian L, Wescott J, and Krebs NF. (2002). Zinc absorption from a low phytic-acid maize. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 556-559.
- 2- Ahn DU, Wolfe FH, and Sim JS. (1993). Three methods for determining nonheme iron in turkey meat. *Journal of Food Science*, **58(2)**, 288-291.
- 3- Aît-oukhatar N, Bouhallab S, Arhan P, Maubois JL Drosdowsky M and Bouglé D. (1999). Iron tissue storage and hemoglobin levels of deficient rats repleted with iron bound to the caseinophosphopeptide 1-25 of  $\beta$ -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 2786-2790.
- 4- Aît-oukhatar N, Bouhallab S, Bureau F, Arhan P, Maubois JL, Drosdowsky M and Bouglé D. (1997). Bioavailability of caseinophosphopeptide bound iron in the young rat. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **8**, 190-194.
- 5- Alimentaria (2004). V Foro Internacional de la Alimentación. [www.alimentaria.com/cas04/activida/3101b.htm](http://www.alimentaria.com/cas04/activida/3101b.htm).
- 6- Allen KG and Klevay LM. (1994). Copper: an oxidant nutrient for cardiovascular health. *Curr. Opin. Lipidol.* **5**, 22-28.
- 7- Allen LH. (2002). Iron supplements: scientific issues concerning efficacy and implications for research and programs. *Journal of Nutrition*, **132**, 813S-819S.
- 8- Allender, P.S., Cutler, J.A., Follman, D., Cappuccio, F.P., Pryer, J., & Elliot, P. (1996). Dietary Ca and blood pressure: a metaanalysis of randomised clinical trials. *Annals of Internal Medicine*, **124**, 825-831.
- 9- Álvarez-Hernández X, Smith M, and Glass J. (1994). Regulation of iron uptake and transport by transferring in Caco-2 cells, an intestinal cell line. *Biochimica Biophysica Acta*, **1192**, 215-222.
- 10- AOAC (1990). Oficial Methods of Análisis (15<sup>th</sup> ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- 11- Aranda P and Llopis J (1993). Minerales. In *Nutrición y Dietética, Aspectos Sanitarios*, ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, pp. 179-240. Madrid, España.
- 12- Argiratos V and Samman S. (1994). The effect of calcium carbonate and calcium citrate on the absorption of zinc in healthy female subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, **48**, 198-204.
- 13- Atkinson SA, Chappell JE, and Clandinin MT. (1987). Calcium supplementation of mothers milk for low birth weight infants: problems related to absorption and excretion. *Nutrition Research*, **7**, 813-823.
- 14- August D, Janghorbani M and Young VR. (1989). Determination of zinc and

- copper absorption at three dietary Cu-Zn ratios by using stable isotope methods in young adult and elderly subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, **50**, 1457-1463.
- 15- Allen KG and Klevay LM. (1994). Copper: an oxidant nutrient cardiovascular health. *Curr. Opin. Lipidol.* **5**, 22-28.
- 16- Azenha M and Vascondeclos M. (2000). Assessment of the Pb and Cu in vitro availability in wines by means of speciation procedures. *Food Chemical Toxicology*, **38**, 899-912.
- 17- Baech SB, Hansen M, Bukhave K, Jensen M, Sorensen SS, Kristensen L, Purslow PP, Skibsted LH & Sandström B. (2003). Nonheme-iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat. *American Journal of Clinical Nutrition*, **77**, 173-179.
- 18- Barberá R and Farré R. (1992). Biodisponibilidad de los elementos traza. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, **32(4)**, 381-399.
- 19- Barr SI, Murphy SP, and Poos, MI. (2002). Interpreting and using the Dietary Reference Intakes in dietary assessment of individuals and groups. *Journal of the American Dietetic Association*, **102**, 780-788.
- 20- Barrant MA, Hider RC, and Callingham BA. (1990). The importance of reductive mechanism for intestinal uptake of iron from ferric maltol and ferric nitrilotriacetic acid (NTA). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **42**, 279-282.
- 21- Barrer-Lux MJ and Heany RP. (1994). The role of calcium intake in preventing bone fragility, hypertension and certain cancers. *Journal of Nutrition*, **124**, 1406S-1411S.
- 22- Beard JL, Dawson H and Pinero DJ. (1996). Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutrition Review*, **54**, 295-317.
- 23- Beard JL. (1998). Weekly iron intervention: the case for intermittent iron supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition*, **68**, 209-212.
- 24- Behall K, Scholfield D, Lee K, Powell A, and Moser P. (1987). Mineral balance in adult men: effect of four refined fibers. *American Journal of Clinical Nutrition*, **46**, 307-314.
- 25- Bender AE. (1989). Nutritional significance of bioavailability. En: Southgate, D., Johnson, I. and Fenwick, G.R. (Eds.), *Nutrient availability: chemical and biological aspects*. London: Royal Society of Chemistry, pp. 3-9.
- 26- Bendich A (2001): Calcium supplementation and iron status of females. *Nutrition* **17**, 46-51.
- 27- Benitez MA, Grijalva MI, and Valencia ME. (1994). Total and soluble iron content and effect of certain inhibitors present in selected varieties of tepary bean. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 1300-1302.
- 28- Benito P and Miller D. (1998). Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutrition Research*, **18(3)**, 581-603.
- 29- Benjakul S and Bauer F. (2001). Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis*) muscle as influenced by different freeze-thaw cycles. *Food Chemistry*, **72**, 207-217.
- 30- Berner LA and Miller DD. (1985). Effects of dietary proteins on iron availability- A review. *Food Chemistry*, **18**, 47-69.
- 31- Berrocal R, Chanton S, Juillerat MA, Pavillard B, Scherz JC, and Jost R. (1989). Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium, *Journal of Dairy Research*, **56**, 335-341.
- 32- Bertolo RFP, Bettger WJ and Atkinson SA. (2001). Divalent metals inhibit and lactose stimulates zinc transport across brush border membrane vesicles from piglets. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **12**, 73-80.
- 33- Bhutta ZA, Black RE, Brown KH, Gardner JM, Gore S, Hidayat A, Khatun F, Mortorell R, Ninh NX, Penny ME, Rosado JL, Roy SK, Ruel M, Sazawall S, and Shankar A. (1999). Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *Journal of Pediatrics*, **135**, 689-697.
- 34- Björn-Rasmussen E and Hallberg L. (1979). Effect of animal proteins on the absorption of food in man. *Nutr. Metab.* **23**, 192-202
- 35- Black RE (1998). Therapeutic and preventive effects of zinc on serious childhood infectious diseases in developing countries. *American Journal of Clinical Nutrition*, **68(suppl)**, 476S-479S.
- 36- Blais A, Aymard P, and Lacour B. (1997). Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers. *European Journal of Physiology*, **434**, 300-305.
- 37- Bloomer JR, Reuter RJ, Morton KO and Wehner JM (1983). Enzymatic formation of zinc-protoporphyrin by rat liver and its potential effect on hepatic heme metabolism. *Gastroenterology*. **85**, 663-668.
- 38- Boato F, Wortley GM, Hai Lu R and Glahn RP. (2002). Red grape juice inhibits iron availability : application of an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6935-6938.
- 39- Bocca A, DiFava RC, and Gaudiano A. (1984). La biodisponibilità negli alimenti di alcuni elementi in traccia: Ferro, zinco, rame, selenio, cromo, piombo, cadmio, mercurio. *Ann. Ist. Super. Sanita*, **20**, 149-170.
- 40- Bosscher D, Van Cauwenbergh R, Van der Auwera JC, Robberecht H,

- and Deelstra, H. (2002). Calcium, iron and zinc availability from weaning meals. *Acta Paediatrica*, **91**, 761-768.
- 41- Bothwell TH, Charlton RW, Cook JD, and Finch CA. (1979). Iron metabolism in man. Oxford, England, Blackwell Scientific Publications.
- 42- Bouhallab S, Leonil J and Maubois JL (1991). Complexation du Fer par le phosphopeptide (1-25) de la caséine  $\beta$ : actino de l'alcalase et de la phosphatase acide. *Lait*, **71**, 173-180.
- 43- Brett C and Waldron K. (1996). Physiology and biochemistry of plant cell walls, 2nd ed., Chapman & Hall, London.
- 44- Briones E. (1989). España se acerca peligrosamente al norte, *Salud para todos*, 41, 4.
- 45- British Nutrition Foundation. (1987). Nutrition in Catering. Cottrel R., editor. The Parthenon Publishing Group. Lancs.
- 46- Brittin HC and Nossaman CE. (1986). Iron content of food in iron utensils. *Journal American Dietetic Association*, **86**, 897-901.
- 47- Bronner F. (1987). Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications, *Journal of Nutrition*, **117**, 1347-1352.
- 48- Brown KH, Peerson JM and Allen LH. (1998). Effect of zinc supplementation on children's growth: a meta-analysis of intervention trials. *Bibl. Nutr. Dieta*. **54**, 76-83.
- 49- Brulé G and Fauquant J (1982). Interactions des protéines du lait et des oligoéléments. *Lait*, **62**, 323-331.
- 50- Brune M, Rossander L and Hallberg L. (1989). Iron absorption and phenolic compounds: Importance of different phenolic structures. *European Journal of Clinical Nutrition*, **43**, 547-558.
- 51- Brune M, Hallberg L and Skanberg A. (1991). Determination of iron binding by phenolic groups in foods. *Journal of Food Science*, **56**, 128-167.
- 52- Brune M, Rossander-Hulté L, Hallberg L, Gleerup A and Sandburg AS. (1992). Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *Journal of Nutrition*, **122**, 442-449.
- 53- Bruner AB, Joffe A, Duggan AK, Casella JF and Brandt J (1996). Randomized study of cognitive effects of iron supplementation in non-anemic iron-deficient adolescent girls. *Lancet*, **348**, 992-996.
- 54- Campos MS, Pallarés I, Moratalla A, López-Aliaga I, Gómez-Ayala AE, Hartiti S, Alférez MJM, Barrionuevo M and Lisbona F (1996). Bioavailability of Fe, Ca, P, Mg in Fe-deficient rats treated with different sources of dietary iron. *Nutrition Research*, **16**, 683-696.
- 55- Carlson BL and Miller DD. (1983). Effects of product formulation processing and meal composition on



- in vitro* estimated iron bioavailability from cereal containing breakfast meals. *Journal of Food Science*, **48**, 1211-1216.
- 56- Carpenter CE and Mahoney AW (1992). Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **31(4)**, 333-367.
- 57- Carpenter C and Clark E. (1995). Evaluation of methods used in meat iron analysis and iron content of raw and cooked meats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 1824-1827
- 58- Carter P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, **40**, 450-458.
- 59- Cashman K and Flynn A. (1996). Effect of dietary calcium intake and meal calcium content on calcium absorption in the rat, *British Journal of Nutrition*, **76**, 463-470.
- 60- Castillo-Durán C, Vial P and Uauy R. (1990). Oral copper supplementation effect on copper and zinc balance during acute gastroenteritis in infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, **51**, 1088-1092.
- 61- Castillo Sánchez MD y León Espinosa de los Monteros, M<sup>a</sup>.T. (2002). Evolución del consumo de alimentos en España, *Medicina de Familia*, **4**, 269-273.
- 62- Cervera P, Clapes J, and Rigolfas R. (1993). *Alimentación y dietoterapia*. Interamericana-Mc Graw-Hill.
- 63- Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jollès P and Fiat AM (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yoghurt. *Biochimie*. **80**, 155-165.
- 64- Champagne ET and Hinojosa O. (1987). Independent and mutual interactions of copper (II) and zinc (II) ions with phytic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **30**, 15-22.
- 65- Champagne ET. (1989). Low gastric hydrochloric acid secretion and mineral bioavailability. In *Mineral Absorption in the Monogastric GI Tract, Advances in Experimental Medicine and Biology*, FR Dintizs, JA Laszlo eds., vol. 249, pp. 173-184, New York: Plenum Press.
- 66- Chan GM, Leeper L, and Book LS. (1987). Effect of soy formulae on mineral metabolism in term infants. *American Journal of Disease Child*. **141**, 527-530 (1987).
- 67- Chawla S, Saxena A, and Seshadri S. (1988). In vitro availability of iron in various green leafy vegetables. *Journal of Science Food and Agriculture*, **46**, 125-127.
- 68- Chen SS, Chang WH, and Chou SS. (1998). A new method for determining heme iron in pork using solid phase extraction and graphite furnace atomic absorption

- spectrophotometer. *Journal of Food Drug Analysis*, **6**, 529-536.
- 69- Chiplonkar SA, Tarwadi KV, Kavedia RB, Mengale SS, Paknikar KM, and Agte VV. (1999). Fortification of vegetarian diets for increasing bioavailable iron density using green leafy vegetables. *Food Research International*, **32**, 169-174.
- 70- Clark EM, Mahoney AW and Carpenter CE (1997). Heme and total iron in ready-to-eat chicken. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 124-126.
- 71- Conrad ME, Cortell S, Williams HF and Foy A. (1966). Polymerization and intraluminal factors in the absorption of hemoglobin iron. *J. Lab. Clin. Med.* **68**, 659-668.
- 72- Conrad ME, Umbreit JN and Moore EG (1991). A role for mucin in the absorption of inorganic iron and other metals cations. *Gastroenterology*, **100**, 129-136.
- 73- Conrad ME, Umbreit JN and Moore EG. (1993). Regulation of iron absorption: proteins involved in duodenal mucosal uptake and transport. *Journal of the American College and Nutrition*, **12**, 720-728.
- 74- Conrad ME and Umbreit JN (1993). A concise review: Iron absorption-the mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. *American Journal of Hematology*, **42**, 67-73.
- 75- Conrad ME (1993). Regulation of iron absorption. In *Essential Toxic Trace Elements in Human Health and Disease: An Update*, pp. 203-219, Wiley-Liss, Inc.
- 76- Cook J, Layrisse M, Martínez-Torres C, Walker R, Monsen E, and Finch C. (1972). Food iron absorption measured by an extrinsic tag. *Journal of Clinical Investigation*, **51**, 805-815.
- 77- Cook JD and Monsen ER. (1976). Food iron in human subjects. III. Comparison of the effect of animal proteins on nonheme iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, **29**, 859-867.
- 78- Cook JD and Lynch SR. (1986). The liabilities of iron deficiency. *Blood*, **68**, 803-809.
- 79- Cook JD. (1990). Adaptation in iron metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, **51**, 301-308.
- 80- Cook JD, Reddy MB and Hurrell RF (1995). The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **61**, 800-804.
- 81- Cordano A. (1998). Clinical manifestations of nutritional copper deficiency in infants and children. *American Journal of Clinical Nutrition*, **67**, 1012S-1016S.
- 82- Couzy F, Keen C, Gershwin ME, Mareschi JP (1993). Nutritional implications of the interactions between minerals. *Progress in food and nutrition science*. **17**. 65-87.
- 83- Crews HM, Burrell JA, and McWeeny DJ. (1983). Preliminary enzymolysis studies on trace element extractability

- from food. *Journal of Food Science and Agriculture*, **34**, 997-1004.
- 84- Cumming RG, Cummings SR, Nevitt MC, Scott J, Ensrud KE, Vogt TM, and Fox K. (1997). Calcium intake and fracture risk: results from the study of osteoporotic fractures. *American Journal Epidemiology*, **145**, 926-934.
- 85- Curtay JP, and Lyon J. (2000). La enciclopedia práctica de las vitaminas, sales minerales y oligoelementos. Madrid. Salvat
- 86- Dallman PR (1992). Changing iron needs from birth through adolescence. In: *Nutritional Anemias*, Fomon SJ, Zlotkin S eds., pp. 29-36, Nestlé Nutrition Workshop Series. New York: Raven Press.
- 87- Dashti B, Al-Awadi F, Alkandari R, Ali A, and Al-Otaibi J. (2004). Macro- and microelements contents of 32 Kuwaiti composite dishes. *Food Chemistry*, **85**, 331-337.
- 88- Davidsson L, Galan P, Kastenmayer P, Cherouvrier F, Juillerat MA, Hercberg S & Hurrell RF (1994). Iron bioavailability studied in infants: the influence of phytic acid and ascorbic acid in infant formulas based on soy isolate. *Pediatrics Research*, **36**, 816-822.
- 89- Davidsson L, Almgren A, Sandstrom B and Hurrell RF. (1995). Zinc absorption in adult humans: the effect of iron fortification. *British Journal of Nutrition*, **74**. 417-425.
- 90- Davidsson L, Walczyk T, Morris A & Hurrell RF (1998): Influence of acid ascorbic on iron absorption from an iron-fortified, chocolate-favored milk drink in Jamaican children. *American Journal of Clinical Nutrition*, **67**, 873-877.
- 91- Davidsson L, Dimitrion T, Walczyk T & Hurrell RF. (2001). Iron absorption from experimental infant formulas based on pea (*Pisum sativum*)-protein isolate: the effect of phytic acid and ascorbic acid. *British Journal of Nutrition*, **85**, 59-63.
- 92- Davis GK, and Mertz W. (1987). Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 5th edn, ed. W. Mertz, 2. Academia Press, Orlando, USA.
- 93- Davis J.M. (1994). "Basic cell culture. A practical approach". The Practical Approach Series.; D. Rickwood and B.D. Hames., Eds. IRL, Oxford.
- 94- Debon SJJ and Tester RF (2001). In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-starch polysaccharides. *Food Chemistry*, **73**, 401-410.
- 95- De Vos S and De Schrijver R. (2003). Lipid metabolism, intestinal fermentation and mineral absorption in rats consuming black tea. *Nutrition Research*, **23**, 527-537.
- 96- Diaz M, Rosado JL, Allen LH, Abrams S and García OP. (2003). The efficacy of a local ascorbic acid-rich food in improving iron absorption from Mexican diets: a field study using stable isotopes. *American*

- Journal of Clinical Nutrition*, **78**, 436-440.
- 97- Drago SR and Valencia ME. (2004). Influence of components of infant formulas on in vitro iron, zinc and calcium availability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 3202-3207.
- 98- Durlach J. (1988). Magnesium, in Clinical Practice, John Libbey and Company Ltd, pp, 1-349.
- 99- Ehrenkranz RA, Gettner PA, and Nelli CM. (1989). Nutrient balance studies in premature infants fed premature formula or fortified preterm human milk, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **8**, 58-67.
- 100- Ekmekcioglu C, Pomazal K, Steffan I, Schweiger B, and Marktl W. (1999a). Calcium transport from mineral waters across Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 2594-2599
- 101- Ekmekcioglu C, Anderle H, Strauss-Blasche G, Steffan I, Feyertag J, and Marktl W. (1999b). Calcium, magnesium, copper and zinc content of menu components: Comparison of analysed with calculated values. *Nahrung*, **43**, 311-316.
- 102- Ekmekcioglu C. (2000). Intestinal bioavailability of minerals and trace elements from milk and beverages in humans. *Nahrung*, **44**, 390-397.
- 103- Engelmann MDM, Davidsson L, Sandström B, Walczyk T, Hurrell RF and Michaelsen KF (1998): The influence of meat on nonheme iron absorption in infants. *Pediatrics Research*, **43(6)**, 768-773.
- 104- Engerhardt von W. (1995). Absorption of short chain fatty acids from the large intestine, in Physiological and clinical aspects of short chain fatty acids, J.H.Cummings, J.L.Rombeau, T. Sakata, eds., Cambridge: Cambridge University Press, pp.149.
- 105- Erba D, Ciapellauo S, and Testolin G. (2001). Effect of caseinphosphopeptides on inhibition of calcium intestinal absorption due to phosphate, *Nutrition Research*, **28**, 649-656.
- 106- Fairweather-Tait SJ. (1987). The concept of bioavailability as it relates to iron nutrition. *Nutrition Research*, **7**, 319-325.
- 107- Fairweather-Tait SJ. (1989). Iron in food and its availability. *Acta Paediatrica Scandinavia Supplement*, **361**, 12-20
- 108- Fairweather-Tait SJ and Wright AJA (1991). Small intestinal transit time and iron absorption. *Nutrition Research*, **11**, 1465-1468.
- 109- Fairweather-Tait SJ, Wharf SG and Fox TE (1995a): Zinc absorption in infants fed iron-fortified weaning food. *American Journal of Clinical Nutrition*, **62**, 785-789.
- 110- Fairweather-Tait S, Fox T, Wharf GS and Eagles J (1995b): The bioavailability of iron in different weaning foods and the enhancing

- effect of a fruit drink containing ascorbic acid. *Pediatric Research*, **37(4)**, 389-394.
- 111- Fairweather-Tait SJ and Hurrell RF. (1996). Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutrition Research Reviews*, **9**, 295-324.
- 112- Farré R, Frasquet I, Martínez I, Romá R. (1999). Dieta habitual de un grupo de adolescentes valencianos. *Nutrición Hospitalaria*, **14(6)**, 223-230
- 113- Favier AE. (1993). In U. Schlemmer (Ed.), Bioavailability '93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability.
- 114- Fengwu-Wu, Zhike-He, Quingyao-Luo, Yune-Zeng. (1999). HPLC determination of oxalic acid using tris (1,10-phenantroline)ruthenium(II) chemiluminescence application to the analysis of spinach. *Food Chemistry*, **65**, 543-546.
- 115- Fidler MC, Davidsson L., Zeder C, Walczyk T and Hurrell RF (2003). Iron absorption from ferrous fumarate in adult women is influenced by ascorbic acid but not by Na<sub>2</sub>EDTA. *British Journal of Nutrition*, **90**, 1081-1085.
- 116- Finley JW, Briske-Anderson M, Reeves PG, and Johnson LK. (1995). Zinc uptake and transcellular movement by Caco-2 cells: Studies with media containing fetal bovine serum. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **6**, 137-144.
- 117- Fly AD and Czarnecki-Maulden GL (2000). Iron bioavailability from hemoglobin and hemin in chick, rat, cat, and dog: a comparative study. *Nutrition Research*, **20(2)**, 237-248.
- 118- Forbes RM. (1984). Use of laboratory animals to define physiological functions and availability of zinc. *Fed. Proc.* **43**, 2835-2839.
- 119- Food and Nutrition Board (1997). Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Institute of Medicine, National Academic Press, Washington.
- 120- Food and Nutrition Board (2001), Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Institute of Medicine. National Academic Press, Washington.
- 121- Forbes A, Adams C, Arnaud M, Chichester C, Cook J, Harrison B, Hurrell R, Kahn S, Morris E, Tanner J, and Whittaker P. (1989). Comparison of in vitro, animal and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, **49**, 225-238.
- 122- Forth W. and Schafer SG. (1987). Absorption of di- and trivalent iron. Experimental evidence. *Arzneim-Forsch/ Drug Research*, **37**, 96-101.

- 123- Fransson GB and Lönnerdal B. (1983). Distribution of trace elements and minerals in human and cow's milk, *Pediatric Research*, **17**, 912-915.
- 124- Fung E, Ritchie L, Woodhouse L, Roehl R, and King JC. (1997). Zinc absorption in women during pregnancy and lactation: a longitudinal study. *American Journal of Clinical Nutrition*, **66**, 80-88.
- 125- Furniss DE, Vuichoud J, Finot PA and Hurrell RF (1989). The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat. *British Journal of Nutrition*, **62**, 739-749.
- 126- Galán P, Cherouvier F, Fernández-Ballart J, Marti-Henneberg C and Hercberg S. (1990). Bioavailable iron density in French and Spanish meals. *European Journal of Clinical Nutrition*. **44**, 157-163.
- 127- Galdi M and Valencia ME. (1988). Stability of iron (III) chelates of nutritional interest. *Journal of Food Science*. **53**, 1844-1847.
- 128- Ganji V and Kies CV. (1994). Zinc bioavailability and tea consumption. Studies in healthy humans consuming self-selected and laboratory-controlled diets. *Plant Foods for Human Nutrition*. **46**, 267-276.
- 129- García R, Alegria A, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ. (1998). Dialyzability of iron zinc and copper of different types of infant formulas marketed in Spain. *Biological Trace Element Research*, **65**, 7-17.
- 130- García-Casal M, Layrisse M, Solano L, Barón MA, Arguello F, Llovera D, Ramírez J, Leets I and Tropper E. (1998). Vitamin A and  $\beta$ -carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *Journal of Nutrition*, **128**, 646-650.
- 131- García-Casal M<sup>a</sup>N, Leets I and Layrisse M (2000).  $\beta$ -carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, **130**, 5-9.
- 132- Garmendia Iruretagoyena, M<sup>a</sup> Izaskun. (2003). Análisis de macronutrientes y elementos traza en platos cocinados por empresas de restauración colectiva. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra (España).
- 133- Ghishan FK, Said HM, Wilson P, Murrel JE, and Greene HL (1986). Intestinal transport of zinc and folic acid: a mutual inhibitory effect. *American Journal of Clinical Nutrition*, **43**, 258-262.
- 134- Gibson RS. (1994). Content and bioavailability of trace elements in vegetarian diets. *American Journal of Clinical Nutrition*. **59**, 1223S-32S.
- 135- Gibson GR and Roberfroid MB (1995). Dietary modulation of the colonic microbiota introducing the concept of prebiotic. *Journal of Nutrition*, **125**, 140-141.
- 136- Giuliano AR and Wood RJ. (1991). Vitamin D regulated calcium transport

- in Caco-2 cells: unique in vitro model. *The American Journal of Physiology*, **260**, G207-G212.
- 137- Glahn RP, Wien E, Van Campen R, and Miller DD. (1996). Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability. *Journal of Nutrition*, **126**, 332-339.
- 138- Glahn RP, Lai C, Hsu J, Thompson JF, Guo M, and Van Campen DR. (1998a). Decreased citrate improves iron availability from infant formula: application of an in vitro digestion/caco-2 cell model. *Journal of Nutrition*, **128**, 257-264.
- 139- Glahn RP, Olivia AL, Yeung A, Goldman MI, and Miller DD. (1998b). Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Nutrition*, **128**, 1555-1561.
- 140- Glahn RP, Wortley GM, South PK, and Miller DD. (2002a). Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid and ZnCl<sub>2</sub> : studies using an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 390-395.
- 141- Glahn RP, Cheng Z, Welch RM, Gregorio GB. (2002b). Comparison of iron bioavailability from 15 rice genotypes: studies using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3586-3591.
- 142- Gleerup A, Rossander-Hulthen L and Gramatkovski E (1995). Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. *American Journal of Clinical Nutrition*, **61**, 97.
- 143- Goldenberg RL, Tamura T, Neggers Y, Haghsheras M, Amerhakemi GH, Barakat R.M and Reinhold JG (1995). The effect of zinc supplementation on pregnancy outcome. *Journal of American Medical Association*, **274**, 463-468.
- 144- Gómez-Basauri JV and Regenstein JM. (1992a). Processing and frozen storage effects on the iron content of cod and mackerel. *Journal of Food Science*, **57**, 1332-1336.
- 145- Gómez-Basauri JV and Regenstein JM. (1992b). Vacuum packaging, ascorbic acid and frozen storage effects on heme and nonheme iron content of mackerel. *Journal of Food Science*, **57**, 1337-1339.
- 146- Gracia M. (1997). La transformación de la cultura alimentaria. Cambios y permanencias en un contexto urbano. Ministerio de Educación y Cultura. Secretaria de Estado de Cultura. Madrid.
- 147- Grajeta H, Prescha A, and Biernat J. (2002). Fe, Ca and Mg contents in selected fast food products in Poland. *Nahrung*, **1**, 7-10.
- 148- Grasbeck R, Majuri R, Kouvonen I and Tenhunen R. (1982). Spectral and other studies on the intestinal

- haem receptor of the pig. *Biochimica et Biophysica Acta*, **700**, 137-142.
- 149- Greger JL, Smith SA and Snedeker SM. (1981). Effect of dietary calcium and phosphorus levels on the utilization of calcium, phosphorus, magnesium, manganese and selenium in adult males. *Nutrition Research*, **1**, 315-325.
- 150- Greger JL. (1988). Calcium availability. *Cereal Food World*, **33**, 796-800.
- 151- Grider A, Bailey LB, and Cousins RJ (1990). Erythrocyte metallothionein as an index of zinc status in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 1259-1262.
- 152- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL and Hediger MA (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. **388**, 482-488.
- 153- Guyton AC and Hall J.E. (2001). "Tratado de fisiología médica" 10ª edición. McGrawHill –Interamericana, Madrid.
- 154- Haas JD, and Brownlie T. (2001). Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *Journal of Nutrition*, **131**, 676S–688S.
- 155- Hakala P, Marniemi J, Knuts L, Kumpulainen J, Tahvonen R, and Plaami S. (1996). Calculated vs analysed nutrient composition of weight reduction diets. *Food Chemistry*, **57**, 71-75.
- 156- Hall MJ, Downs L, Ene MD and Farah D. (1989). Effect of reduced phytate wheat bran on zinc absorption. *European Journal of Clinical Nutrition*, **43**, 431-440.
- 157- Hallberg L, Bjorn-Rasmussen E, Howard L & Rossander L. (1979). Dietary heme iron absorption. A discussion of possible mechanism for the absorption promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. *Scandinavia Journal of Gastroenterology*, **14**, 769.
- 158- Hallberg L (1981) Bioavailability of dietary iron in man. *Annual Review of Nutrition*, **1**, 123-147.
- 159- Hallberg L and Rossander L. (1982). Bioavailability of iron from western-type whole meals. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **17**, 151-160.
- 160- Hallberg L (1987): Wheat fiber, phytates and iron absorption. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, **129**, 73-79.
- 161- Hallberg L, Brune M and Erlandsson M (1991). Calcium: effect of different amounts on nonheme and heme iron absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **53**, 112-119.
- 162- Hallberg L, Rossander-Hulthen L, Brune M and Gleerup A (1992): Inhibition of haem-iron absorption in



- man by calcium. *British Journal of Nutrition*, **69**, 533-540.
- 163- Hallberg L, Hultén L and Gramatkovski E (1997). Iron absorption from the whole diet in men: How effective is the regulation of iron absorption?. *American Journal of Clinical Nutrition*, **66**, 347-356.
- 164- Hallberg L. (1998). Does calcium interfere with iron absorption?. *American Journal of Clinical Nutrition*, **68**, 3.
- 165- Hallfrisch J, Veillon C, Patterson K, Hill AD, Benn I, Holiday B, Burns R, Zhonnie S, Price F, and Sorenson A. (2000). Bone-related mineral content of water samples collected on the Navajo reservation. *Toxicology*, **149**, 143-148.
- 166- Hamed MY, Silver J and Wilson MT. (1983). Studies of the reaction of ferric iron with glutathione and some related thiols. *Inorganica Chimica Acta*, **78**, 1-11.
- 167- Hambidge KM, Casey CE and Krebs NF. (1986). Zinc. In. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, ed .W Mertz, pp. 1-137. Academic Press: Orlando, Florida.
- 168- Hambidge M. (2000). Human zinc deficiency. *Journal of Nutrition*, **130**, 1344S-1349S.
- 169- Hansen M, Sandstrom B, and Lonnerdal B. (1996). The effect of caseinphosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in rat pups and Caco-2 cells. *Pediatric Research*, **40(4)**, 547-552.
- 170- Han D, McMillin KW and Godber JS. (1994). Hemoglobin, myoglobin, and total pigments in beef and chicken muscles: chromatographic determination. *Journal of Food Science*, **59(6)**, 1279-1282.
- 171- Han O, Failla M, Hill D, Morris E, and Smith C. (1995). Reduction of Fe(III) is required for uptake of nonhem iron by Caco2 cells. *Journal of Nutrition*, **125**, 1291-1299.
- 172- Hara H, Nagata M, Ohta A, and Kasai T. (1996). Increases in calcium absorption with ingestion of soluble dietary fibre, guar-gum hydrolysate, depend on the caecum in partially nephrectomized and normal rats. *British Journal of Nutrition*, **76**, 773-784.
- 173- Hara H, Hayashi K and Aoyama Y. (2001). Intestinal absorption of zinc is promoted by low-level intake but inhibited by high-level intake of corn husk fiber in rats. *Nutrition Research*, **21**, 627-637.
- 174- Harland BF and Oberleas D. (1987). Phytate in foods, *Wld Rev. Nutr. Diet.*, **52**, 235-259.
- 175- Harland BF and Narula G. (1999). Food phytate and its hydrolysis products. *Nutrition Research*, **19**, 947-961.
- 176- Harris ED. (2001). Copper and iron: a landmark connection of two essential metals. *The Journal of Trace*

- Elements in Experimental Medicine*, **14**, 207-210.
- 177- Hazell T and Johnson IT. (1987). In vitro estimation of iron availability from a range of plant foods: influence of phytate, ascorbate, and citrate. *British Journal of Nutrition*, **57**, 223-233.
- 178- Henry CJK and Heppell N. (2002). Nutritional losses and gains during processing: future problems and issues. *Proceedings of the Nutrition Society*, **61**, 145-148.
- 179- Hernández-Rodríguez, M. (1994). In *Pediatría*, ed., Díaz de Santos 2nd ed, Madrid, pp 389-393; 402-413.
- 180- Hidalgo IJ, Raub TJ, and Borchardt RT. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, **96**, 736-749.
- 181- Hong JH and Yasumoto K. (1996). Near-infrared spectroscopic analysis of heme and nonheme iron in raw meats. *Journal of Food Composition and Analysis*, **9**, 127-134.
- 182- House WA, Welch RM and Van Campen DR (1982): Effect of phytic acid on the absorption, distribution and endogenous excretion of zinc in rats. *Journal of Nutrition* **112**, 941-953.
- 183- House WA and Welch RM (1989). Availability of and interactions between zinc and selenium in rats fed wheat grain intrinsically labeled with Zn<sup>65</sup> and Se<sup>75</sup>. *Journal of Nutrition*, **119**, 916-921.
- 184- Huebers HA, Csiba E, Josephson B and Finch CA. (1990). Iron absorption in the iron-deficient rat. *Blut*. **60**, 345-351.
- 185- Hunt JR and Vanderpool RA. (2001). Apparent copper absorption from a vegetarian diet. *American Journal of Clinical Nutrition*. **74**, 803-7.
- 186- Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA and Cook, JD (1988). Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. *American Journal of Clinical Nutrition*, **47**, 102-107.
- 187- Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA and Cook JD (1989). Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *American Journal of Clinical Nutrition*, **49**, 546-552.
- 188- Hurrell RF. (1990). Influence of the Maillard reaction on the nutritional value of foods, in *The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology*, P.A. Finot, H.U. Aeschbacher, R.F. Hurrell RF, R. Liardon, eds., Basel: Birkhäuser-Verlag, 245.
- 189- Hurrell RF, Reddy M and Cook JD (1999). Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *British Journal of Nutrition*, **81**, 289-295.
- 190- Jorhem L, Becker W, Slorach S. (1998). Intake of 17 elements by

- Swedish women determined by a 24 h duplicate portion study. *Journal of Food Composition and Analysis*, **11**, 32-36.
- 191- Johnson PE (1996). New approaches to establish mineral element requirements and recommendations: an introduction. *Journal of Nutrition*, **126**, 2309s-2311s.
- 192- Johnson MA, Smith MM and Edmons JT (1998). Copper, iron, zinc and manganese in dietary supplements, infant formulas and ready-to-eat-breakfast cereals. *American Journal of Clinical Nutrition*, **67**, 1035s-1040s.
- 193- Jovaní Duatis, Mónica. (2001). Evaluación in vitro de biodisponibilidad mineral en fórmulas para lactantes. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia
- 194- Jovaní M, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ and 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)**, 114-117
- 195- Jovaní M, Barberá R, Farré R, and Martín de Aguilera, E. (2001). Calcium, iron and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3480-3485.
- 196- Joyanes M, González-Gross M, and Marcos A. (2002). The need to review the Spanish recommended dietary energy and nutrient intakes. *European Journal of Clinical Nutrition*, **56**, 899-905.
- 197- Kalpalathika PV, Clark EM and Mahoney AW (1991). Heme iron content in selected ready-to-serve beef products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 1091-1093.
- 198- Karppanen K. (1981). Epidemiological studies on the relationship between magnesium intake and cardiovascular diseases. *Artery*, **9**, 190-199 (1981).
- 199- Kanani, SJ & Poojara R (2000): Supplementation with iron and folic acid enhances growth in adolescent Indian girls. *Journal of Nutrition* **130**, 452S-455S.
- 200- Kane AP and Miller DD (1984). In vitro estimation of the effects of selected proteins on iron bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, **39**, 393-401.
- 201- Kapsokefalou M and Miller DD (1991). Effects of meat and selected food components on the valence of non-haem iron during in vitro digestion. *Journal of Food Science*, **56**, 352-358.
- 202- Kapsokefalou M and Miller DD. (1995). Iron speciation in intestinal contents of rats fed meals composed of meat and nonmeat sources of protein and fat. *Food Chemistry*, **52**, 47-56.
- 203- Kaup SM (1998). Aspects of mineral bioavailability in infant nutrition. *International Dairy Journal*, **8**, 435-441.

- 204- Kazal LA (1996). Failure of hematocrit to detect iron deficiency in infants. *J.Fam.Pract.* **42**, 237-240.
- 205- Keane LA, Potter NN, and Sherbon JW. (1988). Estimation of calcium status in selected food systems. *Journal of Food Science*, **53**. 1111-1112
- 206- Kelloff GJ, Crowell JA, Steele VE, Lubet RA, Malone WA, Boone CW, Kopelovich L, Hawk ET, Lieberman R, Lawrence JA, Ali I, Viner JL, and Sigman CC. (2000). Progress in cancer chemoprevention: development of diet-derived chemopreventive agents. *Journal of Nutrition*, **130**, 467S-471S.
- 207- Kenefick S and Cashman KD. (2000a). 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**, 12-17.
- 208- Kenefick S and Cashman KD. (2000b). Investigation of an in vitro model for predicting the effect of food components on calcium availability from meals. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **51**, 45-54.
- 209- Kies C and Harms J. (1989). Copper absorption as affected by supplemental calcium, magnesium, manganese, selenium and potassium. *Advances Experimental Medicine and Biology*.
- 210- Kim Y and Linkswiller H. (1980). Effect of level of calcium and of phosphorus intake on calcium, phosphorus and magnesium metabolism in young adult males, *Fed Proc.* **39**, 895.
- 211- Kim M, Lee DT and Lee YS. (1995). Iron absorption and intestinal solubility in rats are influenced by dietary proteins. *Nutrition Research*, **15**, 1705-1716.
- 212- Kim M, Atallah MT, Amarsiwardena C and Barnes R (1996); Pectin with low molecular weight and high degree of esterification increases absorption of <sup>59</sup>Fe in growing rats. *Journal of Nutrition*, **126**, 1883-1890.
- 213- Kimura M and Itokawa Y. (1990). Cooking losses of minerals in foods and its nutritional significance. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **36**, S25-S33.
- 214- Kirwan FM, O'Connor I, Morrissey PA and Flynn A (1993). Effect of myofibrillar muscle proteins on in vitro bioavailability of iron. *Proceeding of Nutrition Society*, **52**, 21<sup>a</sup>.
- 215- Klevay LM. (2000). Cardiovascular disease from copper deficiency- a history. *Journal of Nutrition*, **130**, 489S-492S.
- 216- Kollipara UK and Brittin HC. (1996). Increased iron content of some Indian foods due to cookware. *Journal American Dietetic Association*, **96**, 508-510.
- 217- Kongkachuichai R, Napatthalung P, and Charoensiri R. (2002). Heme and

- nonheme iron content of animal products commonly consumed in Thailand. *Journal of Food Composition and Analysis*, **15**, 389-398.
- 218- Kumari M, Gupta S, Lakshmi J, and Prakash J. (2004). Iron bioavailability in green leafy vegetables cooked in different utensils. *Food Chemistry*, **86**, 217-222.
- 219- Kunz C and Lönnnerdal B. (1989). Casein micelles and casein subunits in human milk, in Protein and non-protein nitrogen in human milk, S.A. Atkinson & B.Lönnnerdal, eds., Boca Raton, pp.9-27.
- 220- Labbé RF, Vreman HJ and Stevenson DK (1999). Zinc protoporphyrin: a metabolite with a mission. *Clinical Chemistry*, **45(12)**, 2060-2072.
- 221- Larsen T, Thilsted SH, Kongsbak K & Hansen M. (2000). Whole small fish as a rich calcium source. *British Journal of Nutrition*, **83**, 191-196.
- 222- Larsson M, Rossander-Hulthen L, Sandstrom B & Sandsberg AS (1996). Improved zinc and iron absorption from breakfast meals containing malted oats with reduced phytate content. *British Journal of Nutrition*. **76**, 677-688.
- 223- Layrisse M, Chavez JF, Méndez-Castellano H, Bosch V, Tropper E, Bastardo B and González E. (1996). Early response to the impact of iron fortification in the Venezuelan population. *American Journal of Clinical Nutrition*, **64**, 903-907.
- 224- Layrisse M, García-Casal M, Solano L, Barón MA, Arguello F, Llovera D, Ramírez J, Leets I and Tropper E. (1997). The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption: Preliminary studies. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **8**, 61-67.
- 225- Lee K and Clydesdale FM. (1979). Quantitative determination of the elemental, ferrous, ferric, soluble and complexed iron in foods. *Journal of Food Science*, **44**, 549-554.
- 226- Lee DY, Schroeder J and Gordon D. (1988). Enhancement of copper bioavailability in the rat by phytic acid. *Journal of Nutrition*, **118**, 712-717.
- 227- Lee DY, Prasad AS, Hydrick-Adair C, Brewer G and Johnson PE. (1993). Homeostasis of zinc in marginal human deficiency: role of absorption and endogenous excretion of zinc. *J.Lab. Clin.Med.* **122**, 549-556.
- 228- Lehrfeld J. (1994). HPLC separation and quantification of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 2726-2731.
- 229- Levrat-Verny MA, Coudray C, Bellanguier J, Lopez HW, Demigné C, Rayssiguier Y and Rémésy C. (1999). Wholewheat flour ensures higher mineral absorption and bioavailability than white wheat flour in rats. *British Journal of Nutrition*, **82**, 17-21.

- 230- Lewis NM, Marcus MSK, Behling AR and Greger JL. (1989). Calcium supplements and milk: effect on acid-base balance and on retention of calcium, magnesium and phosphorus. *American Journal of Clinical Nutrition*, **49**, 527-533 (1989).
- 231- Li Y, Tome D, and Desjeux JF. (1989). Indirect effect of casein phosphopeptides on calcium absorption in rat ileum in vitro. *Reprod. Nutr. Develop.* **29**, 227-233.
- 232- Linder MC. (1991). Biochemistry of copper. New York : Plenum Press.
- 233- Lombardi-Boccia G, Di Lullo G and Carnovale E. (1991). In vitro iron dialisability from legumes: influence of phytate and extrusion-cooking. *Journal of Science Food and Agriculture*, **56**, 599-605.
- 234- Lombardi-Boccia G, Carbonaro M, Di Lullo G and Carnovale E. (1994). Influence of protein components (G1, G2 and albumin) on Fe and Zn dialysability from bean . *International Journal of Food Science and Nutrition*, **45**. 183-190.
- 235- Lombardi-Boccia G, Schlemmer U, Cappelloni M and Di Lullo G (1998). The inhibitory effect of albumin extracts from white beans (*Phaseolus vulgaris*) on in vitro iron and zinc dialisability: role of phytic acid. *Food Chemistry*, **63(1)**, 1-7.
- 236- Lombardi-Boccia, G, Martínez-Domínguez B, Aguzzi A, and Rincon-León F. (2002a). Optimization of heme iron analysis in raw and cooked red meat. *Food Chemistry*, **78**, 505-510.
- 237- Lombardi-Boccia G, Martínez-Domínguez B and Aguzzi A. (2002b). Total heme and non-heme iron in raw and cooked meats. *Journal of Food Science*, **67(5)**, 1738-1741.
- 238- Lönnerdal B, Sandberg AS, Sandstrom B and Kurtz C. (1989). Inhibitory effect of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *Journal of Nutrition*, **119**, 211-214
- 239- Lönnerdal B. (1996). Availability of copper. *American Journal of Clinical Nutrition*, **126**, 821s-829s.
- 240- Lönnerdal B. (1997). Effects of milk and milk components on calcium, magnesium and trace element absorption during infancy. *Physiology Review*, **77**, 643-669 (1997).
- 241- Lönnerdal B. (2000). Dietary factors influencing zinc absorption. *Journal of Nutrition*, **130**, 1378S-1383S.
- 242- Lopez HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, Demigné C and Rémesy C. (2000). Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **11**, 500-508.
- 243- López Nomdedeu C. (2002). Educación nutricional de niños/as y adolescentes. En Alimentación Infantil y juvenil, Estudio en Kind. Directores; Serra LI. y Arancenta J.,

- ed. Masson S.A, pp. 61-67, Barcelona, España
- 244- Losso JN, Munene CN, and Moody MW. (2003). Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of minerals in catfish frame. *Nahrung*, **47**, 309-311.
- 245- Luccarini M, Canali R, Cappelloni M, Di Lullo G and Lombardi-Boccia G. (1999). In vitro calcium availability from brassica vegetables (*Brassica oleracea* L.) and as consumed in composite dishes. *Food Chemistry*, **64**, 519-523.
- 246- Luccarini M, Di Lullo G, Cappelloni M and Lombardi-Boccia G (2000). In vitro estimation of iron and zinc dialysability from vegetables and composite dishes commonly consumed in Italy: effect of red wine. *Food Chemistry*, **70**, 39-44
- 247- Lutz T and Scharrer F. (1991). Effect of short chain fatty acids on calcium absorption in the rat colon. *Exp Physiol*. **76**, 615-618.
- 248- MacPhail AP and Bothwell TH. (1992). The prevalence and causes of nutritional iron deficiency anemia. In: *Nutritional anemias*. SJ Fomon & S Zlotkin eds., series 30, pp. 1-12, Nestlé nutritional workshop NewYork: Raven Press.
- 249- Maga JA. (1982). Phytate: Its chemistry, occurrence, nutritional significance and methods of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**, 1-9.
- 250- Mahé S, Tomé D, Dumontier AM and Desjeux JF. (1989). Absorption of intact  $\beta$ -casomorphins ( $\beta$ -CM) in rabbit ileum in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* **29**, 725-732.
- 251- Manz F, Diekmann L and Stock GJ. (1989). Effect of calcium supplementation on calcium and phosphorus balance and renal net acid excretion in preterm infants fed a standard formula, *Acta Paediatrica Scandinavica*, **78**, 525-531 (1989).
- 252- Máñez G, Alegría A, Farré R and Frigola A. (2002). Effect of traditional, microwave and industrial cooking on inositol phosphate content in beans, chickpeas and lentils. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **53**, 503-508.
- 253- Martín Cerdeño V. (2003). El sector de la restauración en España: situación y factores explicativos. Distribución y consumo, Mayo-Junio, 5-25.
- 254- Martínez I, Santaella M, Ros G, and Periago MJ. (1998). Content and in vitro availability of Fe, Zn, Mg, Ca and P in homogenized fish-based weaning foods after bone addition. *Food Chemistry*. **63**. 299-305.
- 255- Martínez Gracia C, López Martínez G, Ros Berruezo G, Vidal Guevara ML, and Abellán Ballesta P. (2000). Use of heme iron concentrate in the fortification of weaning foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2930-2936.

- 256- Maubois JL and Léonil J. (1989). Peptides du lait à activité biologique. *Lait*. **69**, 245-269.
- 257- McGregor G and Ani C. (2001). A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *Journal of Nutrition*, **131**, 649S–666S.
- 258- Merialdi M, Caulfield LE, Zavaleta N, Figueroa A and DiPietro JA. (1998). Adding zinc prenatal iron and folate tablets improves fetal neurobehavioral development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**, 483-490.
- 259- Michaelsen KF. (1997). Nutrition and growth during infancy. *Acta Paediatrica*, **86**(Suppl 420), 1-36.
- 260- Michelson KF, Samuelson G, Graham TW, and Lonnerdal B. (1994). Zinc intake, zinc status and growth in a longitudinal study of healthy Danish infants. *Acta Paediatrica*, **83**, 1115.
- 261- Miller DD, Schricker BR, Rasmussen BS and Van Campen D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition*, **34**, 2248-2256.
- 262- Miller DD and Berner LA. (1989). Is solubility in vitro a reliable predictor of iron bioavailability?. *Biological Trace Element Research*, **19**, 11-24.
- 263- Mills ES. (1930). The treatment of idiopathic (hypochromic) anaemia with iron and copper. *Can. Med. Assn. J.* **22**, 175-178.
- 264- Mills CF. (1985). Dietary interactions involving the trace elements. *Ann. Rev. Nutr.* **5**, 173-193.
- 265- Minihane AM, Fox TE, and Fairweather-Tait SJ. (1993). A continuous flow in vitro method to predict bioavailability of iron from foods. In U.Schlemmer (Ed.), *Bioavailability'93. Nutritional, chemical and food processing implications of nutrient availability*, (pp. 175-179). Proceedings, part 2: Ettlingen. Karlsruhe: Bundesforschungsanstalt für Ernährung.
- 266- Mkenaa AA, Ilich JZ, Andon MB, Wang CH and Matkovic V. (1997). Zinc balance in adolescent females consuming a low-or-high-calcium zinc diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, **65**, 1460-1464.
- 267- Moak S, Pearson N, Shin K. (1987). The effect of oat and wheat bran fibers on mineral metabolism in adult males. *Nutr. Rep. Int.*, **36**, 1137.
- 268- Moje M. (1993). A HPLC-method for the simultaneous quantification of hemoproteins in porcine muscles. *Int. Congress Meat Sci. Technol. Proc.* **39**, S4P17.
- 269- Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. *Ingestas Recomendadas de energía y nutrientes (Revisadas 2002)*. En: *Tablas de composición de alimentos*. Ediciones Pirámide. Madrid. 2004. pp: 127-131.



- 270- Moser-Veillon PB, Patterson KY, and Veillon C. (1996). Zinc absorption is enhanced during lactation. *FASEB J.* 10, A729 (abs).
- 271- Moya M, Cortés E, Ballester MI, Vento MY, and Juste M. (1992). Short-term polycose substitution for lactose reduces calcium absorption in healthy term babies. *Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition*, **14**, 57-61.
- 272- Mulvihill B and Morrisey P. (1998). Influence of the sulphhydryl content of animal proteins on in vitro bioavailability of non-heme iron. *Food Chemistry*, **61**, 1-7.
- 273- Mulvihill B, Kirwan FM, Morrisey PA and Flynn A. (1998). Effect of myofibrillar muscle proteins on the in vitro bioavailability of non-haem iron. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **49**, 187-192.
- 274- Muñoz JM and Harland BF. (1993). Overview of the effects of dietary fiber on the utilization of minerals and trace elements. In *CRC Handbook of dietary fiber in human nutrition*, 2<sup>nd</sup> ed., Spiller GA, pp. 245-252, CRC Press, Boca Raton, Florida
- 275- Musaiger AO, Ahmed MO, and Rao, M.V. (1998). Chemical composition of some dishes of Oman. *Food Chemistry*, **61**, 17-22.
- 276- Mykkanen HM and Wasserman RH. (1980). Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptides in rachitic and normal chicks. *Journal of Nutrition*, **110**, 2141-2148.
- 277- Naito H, Gunshin H and Noguchi T. (1989). Bioavailability of calcium affected by luminal and mucosal factors in the small intestine, In *Nutrient Availability: chemical and biological aspects*, D.Southgate, I. Johnson and G.R. Fenwick, eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 253-255.
- 278- Nävert B, Sandström B and Ceberblad Å (1985). Reduction of the phytate content of bran by leavening in bread and its effect on absorption of zinc in man. *British Journal of Nutrition*, **53**, 47-53.
- 279- Narasinga Rao BS. and Prabhavathi T. (1978). An in vitro method for predicting the bioavailability of iron from foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, **31**, 169-175.
- 280- Noël L, Leblanc JC and Guérin T. (2003). Determination of several elements in duplicate meals from catering establishments using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass spectrometry detection: estimation of daily dietary intake. *Food Additives and Contaminants*, **20(1)**, 44-56.
- 281- Nolan KB, Duffin PA & McWeeny DJ (1987). Effects of phytate on mineral bioavailability on  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  (also  $Cd^{+2}$ ) solubilities in the presence of phytate. *Journal of Science Food and Agriculture*, **40**, 79-85.
- 282- Oberleas D (1983). Phytate content in cereals and legumes and methods

- of determination. *Cereal Foods World*. **28**, 352-357.
- 283- Oellingrath IM and Slinde E. (1985). Color, pigment and iron content of meat loaves with blood, blood emulsion or mechanically deboned meat added. *Journal of Food Science*, **50**, 1551-1555.
- 284- Oellingrath IM, Iversen A and Skrede G. (1990). Quantitative determination of myoglobin and haemoglobin in beef by high-performance liquid chromatography. *Meat Science*, **28**, 313-320.
- 285- 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. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **41**, 281-291.
- 286- Ohta A, Baba S, Ohtsuki M, Takizawa T, Adachi T and Hara H. (1997). In vivo absorption of calcium carbonate and magnesium oxide from the large intestine in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **43**, 35-46 (1997)
- 287- Ohta A, Ohtsuki M, Uehara M, Ozono S, Hirayama M, Adachi T and Hara H (1998). Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. *Journal of Nutrition*, **128**, 485-490.
- 288- Oikeh S, Menkir A, Maziya-Dixon B, Welch R, and Glahn R. (2003). Assessment of concentrations of iron and zinc and bioavailable iron in grains of early-maturing tropical maize varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 3688-3694.
- 289- Pallarés I, Campos MS, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Gómez-Ayala AE, Alferez, MJ, Hartiti S and Lisbona F (1996). *Ann. Nutr Metab.* **40**, 81-90.
- 290- Panwar B and Punia D. (2000). Analysis of composite diets of rural pregnant women and comparison with calculated values. *Nutrition and Health*, **14**, 217-223.
- 291- Pate RR, Miller BJ, Davis JM, Slentz CA and Klingshirm LA (1993). Iron status of female runners. *Int. J. Sport Nutr.* **3**, 222-231
- 292- Pérès JM, Bouhallab S, Bureau F, Maubois JL, Arhan P, Bouglé D (1997). Absorption digestive du fer lié au caséinophosphopeptide 1-25 de la  $\beta$ -caséine. *Lait* **77**, 433-440.
- 293- Pérès JM, Bouhallab S, Bureau F, Maubois JL, Arhan P & Bouglé D (1999a). Reduction of iron/zinc interactions using metal bound to the caseinphosphopeptide 1-25 of  $\beta$ -casein. *Nutrition Research*, **19**, 1655-1663.
- 294- Pérès JM, Bouhallab S, Bureau F, Neuville D, Maubois JL, Devroede, G., Arhan P, Bouglé D (1999b): Mechanism of absorption of caseinophosphopeptide bound iron. *Journal of Nutritional Biochemistry* **10**, 215-222.

- 295- Pérez-Llamas F, Diepenmaat-Wolters MGE and Zamora. S (1996). In vitro availability of iron and zinc: effects of the type, concentration, and fractions of digestion products of the protein. *British Journal of Nutrition*, **76**, 727-741.
- 296- Periago MJ, Ros G, Rincón F and Martínez C. (1997). Nutritional meaning of dietary fibre and phytic acid in meat-based homogenised weaning foods. *Food Research International*, **30(3)**, 223-230.
- 297- Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, and Zweibaum A. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of Cell*, **47**, 323-330.
- 298- Pizarro F, Olivares M, Arredondo M, Hertrampf E and Walter T. (1997). Does daily iron administration produce a mucosal blockade?. *Wageningen, Holland: European Academy of Nutritional Sciences*.
- 299- Pizarro, F, Uicich R, Olivares M, Almeida C, Díaz ML, Carmuega E, O'Donnell A and Valencia ME (1998): Iron absorption of ferric glycinate is controlled by iron stores. *Nutrition Research*, **18(1)**, 3-9.
- 300- Pollit E. (1993). Iron deficiency and cognitive function. *Annu. Rev. Nutr.* **13**, 521-537.
- 301- Powell JJ, Whitehead MW, Lee S & Thompson RPH (1994) Mechanisms of gastrointestinal absorption: Dietary minerals and the influence of beverage ingestion. *Food Chemistry*, **51**, 381-388.
- 302- Prasad AS (1982): Clinical and biochemical spectrum of zinc deficiency in human subjects. In *Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements. Current Topics in Nutrition and Disease*, ed. A.S. Prasad, vol 6, pp. 3-62. New York
- 303- Prasad AS (1984): Discovery and importance of zinc in human nutrition. *Fed. Proc.* **43**, 2829-2834.
- 304- Prasad AS (2001): Discovery of human zinc deficiency: impact on human health. *Nutrition*. **17**, 685-686.
- 305- Purchas RW, Simcock DC, Knight TW & Wilkinson BHP. (2003). Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. *International Journal of Food Science and Technology*, **38**, 827-837.
- 306- Pushpanjali F. and Khokhar S. (1996). In vitro availability of iron and zinc from some Indian vegetarian diets: correlations with dietary fibre and phytate. *Food Chemistry*, **56(2)**, 111-114.
- 307- Quinteros A, Farré R, and Lagarda MJ. (2001). Optimization of iron speciation (soluble, ferrous and ferric) in beans, chickpeas and lentils. *Food Chemistry*, **75**, 365-370.
- 308- Raffaniello RD, Lee S, Teichberg S, and Wapnir RA. (1992). Distinct

- mechanisms of zinc uptake at the apical and basolateral membranes of Caco-2 cells. *Journal of Cell Physiology*, **152**, 356-361.
- 309- Raffin SB, Woo CH, Roost KT, Price DC & Schmid R. (1974). Intestinal absorption of hemoglobin heme iron cleavage by mucosal heme oxygenase. *J. Clin. Invest.* **54**, 1344.
- 310- Raja KB, Simpson RJ, and Peters TJ. (1992). Investigation of a role for reduction in ferric iron uptake by mouse duodenum. *Biochimica et Biophysica Acta* **1135**, 141-146.
- 311- Ranhotra GS, Gelroth MS, Leinen SD and Rao A. (1997). Bioavailability of calcium in a high calcium whey fraction. *Nutrition Research*, **17**, 1663-1670.
- 312- Räsänen L. and Ylönen K. (1992). Food consumption and nutrient intake of one- to two-year-old Finnish children. *Acta Paediatrica*, **81**, 7-11.
- 313- Reddy NS, Sondge CV and Khan TN. (1993). In vitro bioavailability of iron from spinach (*spinacea oleracea*) cultivated in soil fortified with graded levels of iron and zinc. *Plant Foods for Human Nutrition*, **44**, 241-247.
- 314- Rendleman JA. (1982). Cereal complexes: binding of calcium by bran and components of bran. *Cereal Chemistry*, **59**, 302-309.
- 315- Rettmer RL, Carlson TH, Origenes ML, Jack RM and Labbé RF (1999): Zinc protoporphyrin / Heme ratio for diagnosis of preanemic iron deficiency. *Pediatrics*. **104(3)**, 37-41.
- 316- Rhee KS and Ziprin YA. (1987). Modification of the Schriker nonheme iron method to minimize pigments effects for red meats. *Journal of Food Science*, **52(5)**, 1174-1176.
- 317- Ridwan E, Schultink W, Dillon D & Gross R (1996): Effects of weekly iron supplementation on pregnant Indonesian women are similar to those of daily supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition*, **63**, 884-890.
- 318- Roig MJ, Alegría A, Barberá R, Farré R, and Lagarda MJ. (1999). Calcium bioavailability in human milk, cow milk and infant formulas- comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chemistry*, **65**, 353-357.
- 319- Roncagliolo M, Garrido M, Walter T, Peirano P and Lozoff B (1998). Evidence of altered central nervous system development in infants with iron deficiency anemia at 6 month: delayed maturation of auditory brainstem responses. *American Journal of Clinical Nutrition*, **68**, 683-690.
- 320- Rosado JL, Lopez P, Morales M, Muñoz E, and Allen LH. (1992). Bioavailability of energy, nitrogen, fat, zinc, iron and calcium from rural and urban Mexican diets. *British Journal of Nutrition*, **68**, 45-58.
- 321- Rosado JL. (1998). Zinc deficiency and its functional implications. *Salud Publica Mexicana*, **40**, 181-191.

- 322- Rossander-Hulten L, Brune M, Sandström B, Lönnerdal B, and Hallberg L. (1991). Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **54**, 152-156.
- 323- Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombardi S, and Corrocher R. (1998). Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *Journal Hypertension*, **16**, 1267-1271.
- 324- Saha PR, Weaver CM and Mason AC. (1994). Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 2531-2535.
- 325- Sakai K, Ohta A, Shiga K, Takasaki M, Tokunaga T and Hara H (2000). The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. *Journal of Nutrition*, **130**, 1608-1612.
- 326- Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R and Boccio J (2000). Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutrition Research*, **20(5)**, 737-755.
- 327- Salgueiro MJ, Zubilaga MB, Lysionek AE, Caro RA, Weill R and Boccio JR. (2002). The role of zinc in the growth and development of children. *Nutrition*, **18**, 510-519.
- 328- Salovaara S, Sandberg A, Andlid T. (2002). Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6233-6238
- 329- Samman S, Sandstrom B, Toft MB, Bukhave K, Jensen M, Sorensen SS & Hansen M (2001). Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, **73(3)**, 607-612.
- 330- Sandsberg AS, Brune M, Carlsson NG, Hallberg L, Skoglund E & Rossander-Hulthen L (1999). Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **70**, 240-246.
- 331- Sandstead HH (1995): Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *American Journal of Clinical Nutrition* **61**, 621s-624s.
- 332- Sandstead HH and Smith Jr. J (1996): Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradigms for determining zinc dietary recommendations. *Journal of Nutrition*. **126**, 2410s-2418s.
- 333- Sandstead HH (2000). Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *Journal of Nutrition*, **130**, 347S-349S.
- 334- Sandström B, Arvidsson B, Cederblad A and Bjorn-Rasmussen E (1980): Zinc absorption from

- composite meals. I. The significance of wheat extraction rate, zinc, calcium, and protein content in meals based on bread. *American Journal Clinical Nutrition* **33**, 739-745.
- 335- Sandström B. (1992). Dose dependence of zinc and manganese absorption in man. *Proceedings of Nutrition Society*, **51**, 211-218.
- 336- Sandström B. (2001). Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *British Journal of Nutrition*, **85**, S181-S185.
- 337- Santaella M, Martínez I, Ros G, and Periago MJ. (1997). Assessment of the role of meat cut on the Fe, Zn, Cu, Ca and Mg content and their in vitro availability in homogenised weaning foods. *Meat Science*, **45(4)**, 473-483.
- 338- M.I. Sarabia, M. Zubillaga, J. Salgueiro, A. Lysionek, T. De Paoli, A.Hager, E. Ettlin, R.Caro, R.Weill and J. Boccio, Bioavailability, biodistribution and toxicity of biocal, a new calcium source. Comparative studies in rats. *Nutrition Research*. **19**, 1223-1231 (1999).
- 339- Sarriá B and Vaquero M<sup>a</sup>P (2001): Zinc and iron availability in a powder or in-bottle-sterilized infant formula estimated by in vitro and in suckling rats. *Journal of Nutrition Biochemistry* **12**. 266-273.
- 340- Sauquillo A, Barberá R and Farré R. (2003). Bioaccessibility of calcium, iron and zinc from three legume samples. *Nahrung*, **47(6)**. 438-441.
- 341- Schanler RJ and Garza C. (1988). Improved mineral balance in very low birth weight infants fed fortified human milk. *Journal of Pediatrics*, **112**, 452-456.
- 342- Schanler RJ and Abrams SA. (1995). Postnatal attainment of intrauterine macromineral accretion rates in low birth weight infants fed fortified human milk. *Journal of Pediatrics*, **113**, 441-447.
- 343- Schlemmer, U. (1989). Studies of the binding of copper, zinc and calcium to pectin, alginate, carrageenan and guar gum in HCO<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub> buffer. *Food Chemistry*, **32**, 223-231.
- 344- Scholl TO and Reily T. (2000). Anemia, iron and pregnancy outcome. *Journal of Nutrition*, **130**, 443S-447S.
- 345- Scholz B, Gross R and Sastroamidjojo S (1997). Anemia is associated with reduced productivity of women workers even in less physically strenuous tasks. *British Journal of Nutrition*, **77**, 147-157.
- 346- Schricker BR, Miller DD and Stouffer JR. (1982). Measurement and content of nonheme and total iron in muscle. *Journal of Food Science*, **47**, 740-743.
- 347- Scrimshaw N (1991). Iron deficiency. *Science American*, **265**, 46-52.
- 348- Sebastiá V, Barberá R, Farré R and Lagarda MJ. (2001). Effects of legume processing on calcium, iron and zinc contents and dialysabilities.

- Journal of Science Food and Agriculture*, **81**, 1180-1185.
- 349- Seiquer I, Valverde A, Delgado-Andrade C, and Navarro MP. (2000). Influence of heat treatment of casein in presence of reducing sugars on Zn solubility and Zn uptake by Caco-2 cells after in vitro digestion. *Journal of Physiologic Biochemistry*, **56**, 237-246.
- 350- Serfass, R.E., Ziegler, R.R., Edwards, B.B., Houk, R.S. (1989) Intrinsic and extrinsic stable isotopic zinc absorption by infants from formulas. *Journal of Nutrition*, **119**. 1661-1669.
- 351- Shankar AH and Prasad AS (1998): Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**(suppl), 447S-463S.
- 352- Shaw NS, Chin CJ and Pam WH (1995): A vegetarian diet rich in soybean products compromises iron status in young students. *Journal of Nutrition*, **125**, 212-219.
- 353- Shen L, Luten J, Robberecht H, Bindels J and Deelstra H (1994): Modification of an in-vitro method for estimating the availability of zinc and calcium from foods. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*. **199**, 442-445.
- 354- Shen X, Weaver CM, Martin BR and Heany RP. (1998). Lignin effect on calcium absorption in rats. *Journal of Food Science*, **63**, 165-167.
- 355- Shulman RJ, Feste A and Ou C (1995): Absorption of lactose, glucose polymers, or combine in premature infants. *Journal of Pediatrics* **127**, 626-631.
- 356- Sian L, Mingyian X, Miller LV, Tong L, Krebs NF and Hambidge KM (1996): Zinc absorption and intestinal losses of endogenous zinc in young chinese women with marginal zinc intakes. *American Journal of Clinical Nutrition*, **63**, 348-353.
- 357- Skikne BS, Lynch SR and Cook JD (1981). Role of gastric acid in food iron absorption. *Gastroenterology* **81**, 1068-1071.
- 358- Skoglund E, Lönnerdal B and Sandberg AS (1999). Inositol phosphates influence iron uptake in Caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1109-1113.
- 359- Slatkavitz CA and Clydesdale FM. (1988). Solubility of inorganic iron as affected by proteolytic digestion. *American Journal of Clinical Nutrition*, **47**, 487-495.
- 360- Slavin SL and Marlett JA. (1980). Influence of refined cellulose on human bowel function and calcium and magnesium balance. *American Journal of Clinical Nutrition*, **33**, 1932-1939.
- 361- Solomons NW and Jacob RA (1981): Studies on the availability of zinc in humans: effects of heme and nonheme iron on the absorption of zinc. *American Journal of Clinical Nutrition* **34**, 475-482.
- 362- Solomons NW (1997). Daily versus weekly iron: we still might not be

- asking the right questions. *Nutrition Review*, **55**, 141-142
- 363- Solomons NW and Ruz M. (1997). Zinc and iron interaction: concepts and perspectives in the developing world. *Nutrition Research*, **17**, 177-185.
- 364- South PK and Miller DD (1998). Iron binding by tannic acid: effects of selected ligands. *Food Chemistry*, **63**, 167-172.
- 365- South PK, Lei X and Miller DD (2000). Meat enhances nonheme iron absorption in pigs. *Nutrition Research*, **20(12)**, 1749-1759.
- 366- Southon S, Fairweather-Tait SJ, and Hazell T. (1988). Trace element availability from the human diet. *Proceedings of Nutrition Society*, **47**, 27-35.
- 367- Southon S, Bailey AL, Wright AJA, Belsten J, and Finglas PM. (1993). Micronutrient undernutrition in British schoolchildren. *Proceedings of Nutrition Society*, **52**, 155-163.
- 368- Southon PA and Powis G. (1988). Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.* **63**, 381-389.
- 369- Spencer H, Kramer L, Norris C and Osis D. (1985) Inhibitory effects of zinc on the intestinal absorption of calcium. *Clinical Research*, **33**, 72A (abs).
- 370- Spencer H, Norris C and Osis D (1992). Further studies on the effect of zinc on intestinal absorption of calcium in man. *Journal of American College of Nutrition*, **11**, 561-566.
- 371- Steel L and Cousins R J (1985): Kinetics of zinc absorption by luminally and vascularly perfused rat intestine. *American Journal of Physiology* **248**, G46-G53.
- 372- Tapiero H, Townsend DM, and Tew, K.D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **57**, 386-398.
- 373- Taylor A, Wallis E, and Morgan JB. (2004). Influence of diet on iron, copper and zinc status in children under 24 months of age. *Biological Trace Element Research*, **97**, 197-214.
- 374- Thapon JL, Audiot V, Proteis Y and Sauveur J. (1994). Présentation générale de l'oeuf. In: J.L. Thapon & C.M. Bourgeois (Coordonnateurs). L'oeuf et les ovoproduits. (pp. 6-15, 21-24). Paris : Lavoisier Tec&Doc.
- 375- Thompson LU, Trinidad TP, and Wolever TMS. (1991). Ca absorption in the colon of man, *Trace Elements Man Anim*, **97**, 30.
- 376- Trinidad TP, Wolever TMS and Thompson LU. (1993). Interactive effects of Ca and SCFA on absorption in the distal colon of man. *Nutrition Research*, **13**, 417.
- 377- Trinidad TP, Wolever TMS and Thompson LU. (1996). Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal



- colon of humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, **63**, 574.
- 378- Trinidad TP, Wolever TMS and Thompson LU. (1999). Effect of calcium concentration, acetate and propionate on calcium absorption in the human distal colon. *Nutrition*, **15**, 529-533.
- 379- Torelm I, Danielsson R, Appelqvist LA and Bruce A. (1997). Variations in major nutrients and minerals due to interindividual preparation of dishes from recipes. *Journal of Food Composition and Analysis*, **10**, 14-27.
- 380- Torre M, Rodríguez AR and Saura-Calixto F. (1991). Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **1**, 1-22.
- 381- Turhan S, Altunkaynak TB and Yazici F (2004): A note on the total and hem iron contents of ready-to-eat doner kebabs. *Meat Science*, **67**, 191-194.
- 382- Turlund JR, King JC, Keyes WR, Gong B and Michel MC (1984): A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and alpha-cellulose. *American Journal Clinical Nutrition* **40**, 1071-1077.
- 383- Turlund JR, King JC, Gong B, Keyes W, and Michel MC. (1985). A stable isotope study of copper absorption in young men: effect of phytate and  $\alpha$ -cellulose. *American Journal of Clinical Nutrition*, **42**, 18-23.
- 384- Turlund JR, Keyes WR, Hudson CA, Betschart AA, Kretsch MJ, Sauberlich HE (1991): A stable-isotope study of zinc, copper and iron absorption and retention by young women fed vitamin B6-deficient diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, **54**, 1059-1064.
- 385- Turnlund JR. (1994). Future directions for establishing mineral/trace element requirements. *Journal of Nutrition*, **124**, 1765s-1770s.
- 386- Vachon PH and Beaulieu JF. (1992). Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology*, **103**, 414-423.
- 387- Van Campen DR and Glahn RP. (1999). Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. *Field Crops Research*, **60**, 93-113.
- 388- Van Dael P, Shen LH and Deelstra H (1993): Influence of milk processing on the in vitro availability of zinc and selenium from milk. *Availability*.322-325
- 389- Van Dyck K, Tas S, Robberecht H and Deelstra H (1996). The influence of different food components on the in vitro availability of iron, zinc and calcium from a composed meal. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **47**, 499-506.
- 390- Vaquero P, Veldhuizen M, van Dokkum W, van den Hamer CJ, and Schaafsman G. (1994). Copper bioavailability from breakfasts containing tea. Influence of the

- addition of milk. *Journal of Science Food and Agriculture*, **64**, 475-481.
- 391- Viadel Crespo, Blanca. (2002). Biodisponibilidad de calcio, hierro y zinc en leguminosas mediante ensayos *in vitro* con cultivos celulares. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- 392- Vijay G and Kies CV. (1994). Zinc bioavailability and tea consumption. *Plant Foods Human Nutrition*, **46**, 267-276.
- 393- Viteri FE, Xunian L, Tolomei K and Mai A. (1995). True absorption and retention of supplemental iron is more efficient when iron is administered every three days rather than daily to iron-normal and iron deficient rats. *Journal of Nutrition*, **125**, 82-91.
- 394- Vonk AD, Schaafsma G, Dekker PR and de Waard H (1988). Relationship between intestinal transit time and iron absorption from milk and yogurt in rats. *Neth. Milk Dairy J.* **42**, 147-154.
- 395- Vreman HJ, Stevenson DK, Henton D and Rosenthal P (1988): Correlation of carbon monoxide and bilirubin production by tissue homogenates. *Journal of Chromatography* **427**, 315-319.
- 396- Wada L, Turnlund JR and King JC (1985). Zinc utilization in young men fed adequate and low zinc intakes. *Journal of Nutrition*, **115**, 1345-1354.
- 397- Wapnir RA (1990). Nutritional factors, proteins and the absorption of iron and cobalt. In *Protein Nutrition and Mineral Absorption*, Wapnir RA ed., chap. 6, 99-129, CRC Press: Boca Raton.
- 398- Ward TA and Reichert RD. (1986). Comparison of the effects of cell wall and hull fiber from canola and soybean on the bioavailability for rats of minerals, protein and lipid. *Journal of Nutrition*, **116**, 233-234.
- 399- Watzke HJ. (1998). Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. *Trends in Food Science and Technology*, **9**, 320-327.
- 400- Weaver CM, Heany RP, Proulx WR, Henders SM and Packard PT. (1993). Absorbability of calcium from common beans. *Journal of Food Science*, **58**, 1041-1043 (1993).
- 401- West DW (1986). Structure and function of the phosphorylated residues of casein. *Journal of Dairy Science*, **53**, 333-352.
- 402- WHO (1992). *National strategies for overcoming micronutrient malnutrition: document A. 45/3*, Geneva.
- 403- WHO/UNICEF (1998). International Nutritional Anemia Consultative Group,. Guidelines for the Use of Iron Supplements To Prevent and Treat Iron Deficiency Anemia. International Life Sciences Institute, Washington, DC.
- 404- Wien EM and Van Campen DR (1991). Mucus and iron absorption regulation in rats fed various levels of dietary iron. *Journal of Nutrition*, **121**, 92-100.

- 405- Wienk KJH, Marx JJM and Beynen AC. (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition*, **38**, 51-75.
- 406- Williams RJP (1989): An introduction to the biochemistry of zinc. In *Zinc in Human Biology* ed. Mills CF, pp. 15-31. Springer-Verlang Berlín, Germany.
- 407- Wise A and Gilbert DJ. (1987). Caecal microbial phytate hydrolysis in the rat, *Hum. Nutr. Food Sci. Nutr.* **41F**, 47-54.
- 408- Wolters MG, Schreuder HA, Van den Heuvel G, Van Lonkhuijsen HJ, Hermus RJ, and 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. *British Journal of Nutrition*, **69(3)**, 849-861.
- 409- Wood RJ and Zheng JJ (1997): High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. *American Journal Clinical Nutrition* **65**, 1803-1809.
- 410- Wood RJ (2000) Assessment of marginal zinc status in humans. *Journal Nutrition* **130**, 1350s-1354s.
- 411- Yadav SK and Sehgal S. (2003). Effect of domestic processing and cooking methods on total, HCl extractable iron and in vitro availability of iron in bathua and fenugreek leaves. *Nutrition and Health*, **17**, 61-63.
- 412- Yakushiji I and Kagawa Y. (1975). Changes in potassium contents of therapeutical diets in nephropathy by cooking methods. *Journal Japanese Society Food and Nutrition*, **28**, 67-77.
- 413- Yip R. (1996). Iron supplementation during pregnancy: is it effective?. *American Journal of Clinical Nutrition*, **63**, 853-856.
- 414- Yip R. (2001). Iron. In: B.A. Bowman and R.M. Russell, Editors, Present Knowledge in Nutrition, (pp. 311–328), Washington, DC : ILSI Press.
- 415- Zerounian N, Redekosky C, Malpe R and Linder M. (2003). Regulation of copper absorption by copper availability in the Caco-2 cell intestinal model. *American Journal Physiologic of Gastrointestinal Liver and Physiology*, **284**, G739-G747.
- 416- Zhou YD and Brittin HC. (1995). Vitamin and mineral intakes if anglo-american and mexican-american preschoolers. *Journal American Dietetic Association*, **95**, 329-335.
- 417- Ziegler EE and Fomon SJ. (1983). Lactose enhances mineral absorption in infancy. *Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition*, **2**, 288-294.
- 418- Ziegler EE, Serfass RE, Nelson SE, Figueroa-Colón R, Edwards BB, Houk RS and Thompson JJ. (1989). Effect of low zinc intake on absorption and excretion of zinc by

- infants studied with  $^{70}\text{Zn}$  as extrinsic tag. *Journal of Nutrition*, **119**, 1661-9.
- 419- Zijp-Itske M, Korver O and Tijburg-Lilian BM. (2000). Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Critical Review Food Science and Nutrition*, **40**, 371-398.
- 420- Zöld, B.; Zeiner, M., Marktl, W., Steffan, I., and Ekmekcioglu, C. (2003). Pharmacological levels of copper exert toxic effects in Caco-2 cells. *Biological Trace Element Research*, **96**, 143-152.

IX.ANEXOS

Tabla-. **Contenido en humedad (%) y proteínas (mg/g) de los platos analizados**

Plato	% Humedad	Proteínas (mg/g)
Lentejas con chorizo	75.67 ± 2.99	44.83 ± 2.59
Cocido	74.43 ± 0.12	51.61 ± 4.32
Arroz a la cubana	63.17 ± 0.22	22.93 ± 2.12
Arroz con magro	57.98 ± 0.18	51.99 ± 3.61
Pollo empanado con menestra	65.90 ± 0.41	80.21 ± 5.05
Pollo en salsa con patatas	59.99 ± 0.41	102.06 ± 13.07
Tortilla de patatas	57.85 ± 0.56	54.01 ± 2.44
Tortilla de espinacas	74.36 ± 0.94	76.50 ± 1.11
Macarrones con atún	65.85 ± 0.66	34.86 ± 2.50
Espaguetis con chorizo	70.01 ± 0.19	54.62 ± 10.17
Merluza precocinada	48.26 ± 0.20	100.35 ± 1.59
Merluza frita	67.04 ± 0.54	162.88 ± 3.23
Estofado de patatas	82.15 ± 0.09	11.44 ± 1.71

Los resultados se expresan en media ± desviación standard