

AUTORA: TERESA ASPE CARRANZA

**"INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TERMICO DE LA  
PROTEINA DIETETICA SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD**

Ponante: ~~Sr. Dr. DE ALGUNOS MINERALES~~

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. Benito del Castillo  
 Vocal: Sr. Dr. José Mataix  
 Vocal: Sr. Dr. Agustín Olano  
 Vocal: Sr. Dr. Enrique Tortosa  
 Secretario: Sr. Dr. Gregorio Varela

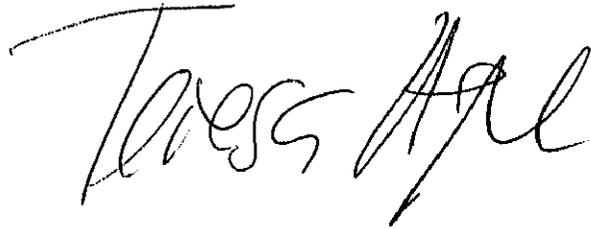
DIRECCION: DRA. M<sup>a</sup> PILAR NAVARRO MARTOS  
 INVESTIGADORA DEL C.S.I.C.

INSTITUTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA (C.S.I.C.-U.C.M)

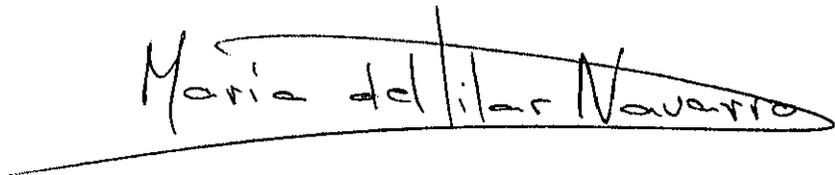
MADRID

1992

**TERESA ASPE CARRANZA,  
LICENCIADA EN FARMACIA,  
ASPIRANTE AL GRADO DE DOCTOR.**

A handwritten signature in black ink, reading "Teresa Aspe". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the top.

**DIRECTORA,**

A handwritten signature in black ink, reading "Maria del Pilar Navarro". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the bottom.

**FDO.: DRA. M<sup>a</sup> PILAR NAVARRO**

**Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Nutrición y Bromatología (C.S.I.C. - U.C.M.) de Madrid durante los años 1988-1992 y está integrado en los Proyectos de Investigación:**

**"Interacciones entre nutrientes producidas en procesos térmicos: modificaciones químicas y repercusiones sobre el valor nutritivo de proteínas y minerales." N° ALI 88-0255 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.**

**"Repercusiones del consumo de aceite de oliva sometido al proceso de fritura sobre el metabolismo lipídico y mineraloproteico en períodos de intenso anabolismo". N° 4-805 de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Nunca imaginé que escribir este pequeño apartado de mi Tesis me fuera a costar tanto y es que no me gustaría que al leer estas palabras, no se les diera la importancia que para mí tienen.*

*Sé que muchos de vosotros, al veros aquí mencionados, os vais a extrañar e incluso pensaréis que no os tengo nada que agradecer, puesto que no sabéis como me habéis ayudado. Es a vosotros, a los que verdaderamente no sólo os agradezco, sino que os debo el que este trabajo haya llegado a su fin, a todos mis amigos, que sin saberlo, me habéis dado las fuerzas necesarias, el apoyo moral y el empuje que tantas veces he necesitado.*

*Por ello, quiero comenzar dando las gracias a mi familia. A mis padres, por vuestro incondicional apoyo y porque os he sentido continuamente a mi lado, a pesar de la distancia. A Gonzalo y Elena, mis hermanos, por vuestra complicidad, cariño y alegría. A mis abuelos y a mi tía Alicia, por vuestra continua y maravillosa preocupación y por no enfadaros por las escasas visitas.*

*Me resulta difícil continuar, no porque no tenga claro quienes sois, sino porque no me gustaría destacar más a unos que a otros, o mejor dicho, dejar de hacerlo. Por ello, creo que a partir de aquí, y cuando no sea así lo señalaré, voy a seguir un orden cronológico, intentando evitar cualquier tipo de susceptibilidad.*

*A Elena Sedano, por tu amistad.*

*A mis amigos de Santiago: Manuel, Juan, Rosa, Rafa y Pepa, porque al comienzo de este trabajo, supisteis hacer de mi estancia en Madrid algo más llevadero, fundamentalmente tú Manuel, y por recibirme con esa alegría cada vez que nos volvimos a ver.*

*No me puedo olvidar de Ana María Torres. Gracias Anita por todo lo que hemos compartido, por lo bien que nos lo hemos pasado y por aconsejarme, tan bien diría yo, cuando lo necesité.*

*A Trini, mi gran confidente, amiga y compañera. No creo que olvide esos maravillosos viajes a León, unos llenos de desesperación, normalmente las vueltas, y otros llenos de optimismo. Gracias por tener un ratito para mí siempre que lo he necesitado.*

*A Esther, por tu paciencia. Así dicho puede parecer poco, pero sólo para el que no me conozca.*

*Para terminar, voy a ser en cierto modo injusta puesto que he empezado diciendo que no quería destacar a nadie, pero quiero dar las gracias de una forma muy especial a Mario, por tu cariño, alegría, paciencia, comprensión, amistad.... la lista sería interminable, pero sobre todo, por enseñarme a apreciar lo que verdaderamente tiene valor en esta vida. Gracias por todo Mario.*

*Espero que no os haya importado el que os mencionara aquí. Quizá hubiera sido más adecuado haberos dado las gracias a cada uno en el momento oportuno, pero no lo hice, no porque no quisiera, sino porque no ha sido hasta ahora, haciendo balance de estos cuatro años, cuando me he dado cuenta de todo lo que habéis sido para mí.*

*Por supuesto que tampoco puedo olvidarme de los compañeros que me habéis ayudado en la realización de este trabajo.*

*A Pilar Navarro, por su eficiente labor como directora de esta Tesis y por su tolerancia con mis muchos defectos.*

*A Ana María Castellón, por su imaginación y generosidad.*

*A Pilar Vaquero, Ana Pérez y Teruca, por su paciente y gran ayuda.*

*A Elena, Ruth y María, por su amistad y por la alegría que han puesto en el trabajo.*

*A Paco, por haber sido un amigo.*

*A Fulgencio, por su ejemplo.*

*A Juan, por haber hecho de la rutina toda una aventura.*

*A Feliciano, María Rosa, Pili y Mari Luz, por su pequeña pero imprescindible ayuda.*

*A Eva, Laura y Rocío, por sus explosiones de júbilo.*

*A Jesús, Pablo, Sara, Carmen, Merce, Paca, M<sup>a</sup> José, Isa y Montse y el resto de mis compañeros de laboratorio, por haber sabido escucharme.*

*A Carmen Bravo, por su asesoramiento en la realización del tratamiento estadístico.*

*Por último, aunque aquí sí que me he saltado todo orden cronológico, puesto que deberían ser los primeros, al Gobierno Vasco. Gracias por la confianza que depositasteis en mí al concederme la beca, sin la cual hubiera sido imposible que realizara este trabajo. Quiero hacer aquí especial mención a Juan Isasi, por haber tenido siempre una respuesta amable a todas mis preguntas. Gracias por tu ayuda.*

*Para terminar, decir que sentiría mucho haber dejado de mencionar a alguien que lo esperara. Si ha sido así, espero que no te ofendas, porque aunque no te encuentres en estas páginas, estarás en mi recuerdo. Estas líneas, aunque muy pensadas, han sido escritas deprisa y no descarto que cuando las relea, dentro de un tiempo, encuentre que falta alguien, porque además, con las cosas buenas solemos darnos cuenta de que las teníamos, en el momento en que nos faltan. Por eso también quiero darte las gracias.*

*A todos, de verdad, gracias.*

*A Antonio y Aurora,  
mis padres.*

# INDICE

## Página

1 - INTRODUCCION Y OBJETIVOS .....	1
2 - REVISION BIBLIOGRAFICA .....	5
2.1. - Interacciones entre nutrientes .....	7
2.1.1. - Concepto de biodisponibilidad .....	7
2.1.2. - Biodisponibilidad de minerales .....	8
2.1.2.1. - Factores que condicionan la biodisponibilidad mineral .....	9
2.1.2.1.1. - Factores dependientes del individuo .....	9
2.1.2.1.1.1. - Factores genéticos .....	10
2.1.2.1.1.2. - Factores fisiológicos .....	10
2.1.2.1.1.3. - Factores dependientes de la situación nutritiva ...	11
2.1.2.1.1.4. - Factores ligados a diversas patologías y a la terapéutica que conllevan .....	11
2.1.2.1.2. - Factores dietéticos .....	12
2.1.2.1.2.1. - Factores dependientes del mineral .....	16
2.1.2.1.2.1.1. - Cantidad .....	16
2.1.2.1.2.1.2. - Forma del elemento .....	16
2.1.2.1.2.2. - Factores dependientes de la proteína .....	17
2.1.2.1.3. - Influencia de los procesos tecnológicos .....	20
2.1.2.1.3.1. - Mecanismo de daño térmico a la proteína .....	21
2.1.2.1.3.1.1. - Estructura y desnaturalización .....	21
2.1.2.1.3.1.2. - Interacciones entre proteínas .....	23
2.1.2.1.3.1.3. - Reacciones con azúcares reductores .....	25
- Química de la reacción .....	25
- Factores que influyen sobre la reacción .....	29
- Consecuencias nutritivas de la reacción .....	31
2.1.2.1.3.2. - Mecanismo de oxidación lipídica e interacción con proteínas .....	38
2.2. - Caseína - Interacciones en las que participa - Influencia	

de los tratamientos térmicos .....	41
2.2.1. - Composición y estructura de la caseína .....	41
2.2.2. - Caseína y disponibilidad de minerales .....	45
2.2.3. - Efecto del calentamiento .....	47
2.3. - Pescado graso (sardina) - Influencia sobre la biodisponibilidad mineral - Fritura .....	52
2.3.1. - Características de la especie .....	53
2.3.2. - Contenido en nutrientes .....	53
2.3.2.1. - Compuestos nitrogenados .....	55
2.3.2.1.1. - Contenido en proteína .....	55
2.3.2.1.2. - Calidad proteica .....	56
2.3.2.2. - Lípidos .....	57
2.3.2.3. - Vitaminas .....	59
2.3.2.4. - Minerales .....	60
2.3.2.4.1. - Calcio y fósforo .....	61
2.3.2.4.2. - Hierro, cobre y zinc .....	62
2.3.2.4.3. - Yodo .....	63
2.3.3. - Procesado de pescado .....	63
2.3.3.1. - Efecto de los tratamientos térmicos .....	64
2.3.3.1.1. - Efecto sobre la proteína .....	64
2.3.3.1.2. - Mecanismo de oxidación lipídica e interacción con proteínas .....	67
2.3.3.1.3. - Efecto sobre los micronutrientes .....	70
2.3.3.1.4. - Efectos no nutritivos .....	72
2.3.3.2. - Fritura .....	73
2.3.3.2.1. - Modificaciones que se producen en el pescado frito .....	75
2.3.3.2.1.1. - Pérdida de agua y de peso .....	75
2.3.3.2.1.2. - Modificaciones en la grasa .....	75
2.3.3.2.1.3. - Modificaciones en la proteína .....	77
2.3.3.2.1.4. - Modificaciones en los micronutrientes .....	79

3 - MATERIAL Y METODOS .....	81
3.1. - Diseño experimental .....	82
3.2. - Muestras objeto de estudio .....	83
3.3. - Metodología empleada .....	89
3.3.1. - Cambios en la forma físico-química del calcio .....	89
3.3.2. - Técnica de digestión "in vitro" .....	90
3.3.3. - Ensayos de balance mineral .....	92
3.3.3.1. - Procedimiento .....	92
3.3.3.2. - Parámetros controlados .....	95
3.4. - Técnicas analíticas empleadas .....	97
3.5. - Tratamiento estadístico .....	97
4 - RESULTADOS .....	110
5 - DISCUSION DE RESULTADOS .....	195
5.1. - Caseína y biodisponibilidad de minerales .....	196
5.1.1. - Influencia de la presencia de caseína, en cantidades variables, sobre la biodisponibilidad del calcio .....	196
5.1.1.1. - Efecto de la cantidad y del tratamiento térmico .....	196
5.1.1.2. - Efecto de la temperatura de calentamiento y de la presencia en la muestra de azúcar y/o aceite sobre la biodisponibilidad del calcio .....	197
5.1.1.2.1. - Influencia sobre las formas del elemento .....	197
5.1.1.2.2. - Influencia sobre la digestibilidad "in vitro" .....	203
5.1.1.2.3. - Influencia sobre la biodisponibilidad .....	209
5.1.2. - Influencia del calentamiento de la caseína sola o en presencia de azúcares y/o aceite sobre la biodisponibilidad del magnesio .....	212
5.1.3. - Influencia del calentamiento de la caseína sola o en presencia de azúcares y/o aceite sobre la biodisponibilidad de los elementos cobre, hierro y zinc .....	214
5.1.3.1. - Utilización del cobre .....	215

5.1.3.2. - Utilización del hierro .....	217
5.1.3.3. - Utilización del zinc .....	220
5.2. - Repercusiones del Consumo de sardinas, fundamentalmente como fuente proteica de la dieta, sobre la biodisponibilidad de minerales .....	226
5.2.1. - Efectos sobre el calcio .....	226
5.2.2. - Efectos sobre el magnesio .....	228
5.2.3. - Efectos sobre el cobre .....	229
5.2.4. - Efectos sobre el hierro .....	231
5.2.5. - Efectos sobre el zinc .....	235
6 - RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	239
7 - BIBLIOGRAFIA .....	246

**1.-        *INTRODUCCION Y OBJETIVOS***

Desde el punto de vista nutricional ha ido tomando cuerpo, en los últimos años, la idea de que no basta conocer la cantidad de nutrientes contenidos en los alimentos, sino que es necesario precisar sus proporciones utilizables. Esta consideración resulta particularmente cierta, referida a vitaminas y minerales.

Hoy se sabe que los requerimientos minerales no pueden fijarse sin conocer la biodisponibilidad de cada uno en los alimentos o, mejor, en las dietas que los aportan, porque la eficacia con la que un determinado mineral de una dieta puede ser absorbido y utilizado varía mucho, en casos excepcionales, tanto como entre el 5 y el 95%. Así, cuando en 1989 los expertos del Grupo de trabajo de Nutrición del International Life Sciences Institute (ILSI) de Europa se reunió en Limelette (Bélgica) para establecer las recomendaciones diarias de los minerales, las cifras se fijaron asumiendo para cada elemento unas biodisponibilidades medias en las dietas europeas y en casos extremos como el del hierro, del que era evidente su variable utilización y se conocían muchas de los factores responsables, se establecieron dos núcleos de recomendaciones en función de la biodisponibilidad de dos tipos de dieta (Nutrition Abstracts and Reviews, 1990).

A la vez, en esa reunión, quedó patente la necesidad de ampliar los estudios en este campo y, a la vista de los resultados, reconsiderar la validez de las recomendaciones.

La idoneidad y conveniencia de tales perspectivas se han generalizado en el ámbito de la nutrición mineral y diversos Programas Europeos han considerado el estudio de biodisponibilidad mineral como objetivo de investigación prioritaria.

La biodisponibilidad de un nutriente es esencialmente fruto de la interacción entre él mismo, la dieta y el individuo que lo ingiere, por ello se comprende que de esos participantes deban proceder los factores que la condicionan.

Las características físico-químicas intrínsecas de la dieta son de extrema importancia ya que entre los nutrientes que la componen pueden producirse interacciones que modulen sus aprovechamientos. En esta línea, entre la proteína y

los minerales dietéticos existe una estrecha relación y la cantidad y calidad proteica pueden modificar el aprovechamiento mineral, favorecer o deprimir la absorción de diversos elementos, potenciar sus eliminaciones urinarias o, incluso, hacer positivos o negativos los balances de algunos de ellos en función del nivel de proteína en la dieta, de la cuantía de algunos aminoácidos, del patrón aminoacídico concreto de cada proteína, etc., en definitiva, de factores ligados a la naturaleza y características individuales de la proteína.

Se comprende, pues, que cualquier acción sobre los alimentos que modifique las características de este nutriente podrá, por una vía indirecta, alterar la interacción proteico-mineral y, en definitiva, cambiar el aprovechamiento nutricional de los elementos.

De acuerdo con este razonamiento, las repercusiones de los procesos térmicos resultan previsibles ya que por la acción del calor se producen cambios en la estructura nativa y la proteína se desnaturaliza. En función del tiempo y de la temperatura alcanzada se rompen determinados enlaces, se originan otros entre funciones reactivas puestas al descubierto por el despliegue de las cadenas polipeptídicas, se racemizan o se destruyen aminoácidos, etc., como resultado, la proteólisis y los productos finales de la digestión pueden variar.

A cuanto antecede deben añadirse las posibles reacciones con otros componentes ya que rara vez la proteína se encuentra sola en los alimentos. De particular interés son las producidas con los lípidos oxidados, de enorme importancia en alimentos ricos en ácidos grasos poliinsaturados, y las desencadenadas entre los azúcares reductores y la proteína, con el desarrollo de la denominada reacción de Maillard. En ambos casos los cambios pueden ser profundos dando lugar a pérdidas de aminoácidos o de su disponibilidad, a diferente sensibilidad al ataque enzimático, a nuevos productos de digestión, etc., cambios que llegan a alterar el valor nutritivo y que, por todas las razones ya expuestas, serían susceptibles de alterar la influencia que, esas proteínas modificadas, ejercen sobre la utilización de los minerales cuando forman parte de la misma dieta.

Concretamente, en los últimos años se ha comenzado a sugerir, no sin cierta controversia, la posibilidad de que algunos de los productos formados en la reacción de Maillard puedan tener un efecto nutritivo negativo, no sólo para la utilización proteica sino también sobre la disponibilidad de ciertos minerales, preferentemente sobre los elementos traza.

Estos hechos, tal vez, sólo sean de menor importancia para los individuos que reciben una alimentación variada, pero parecen esenciales para lactantes o niños pequeños con dieta exclusiva o preferentemente láctea, cuyos preparados, ricos en proteínas, azúcares y grasas, se calientan o mantienen calientes a veces en las condiciones menos idóneas.

Por ello, como parte integrante de esa idea, se inició el trabajo de esta memoria cuyo objetivo global fue ver la influencia del calentamiento de una proteína, de forma aislada o como integrante de un alimento, sobre la biodisponibilidad de los minerales dietéticos. Para realizarlo se eligió la caseína como proteína, por ser mayoritaria en la leche y la proteína patrón de las dietas animales y, como alimento, la sardina, porque en ella la proteína coincide con una grasa de fácil oxidación. En base a ellos se diseñaron secuencialmente los siguientes objetivos:

1º) Conocer si el calentamiento de la caseína, sola o en unión con azúcares y/o aceite, modificaba la forma físico-química de minerales, si los posibles cambios introducidos eran resistentes a la digestión y si repercutían sobre la utilización nutritiva de los minerales calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc.

2º) Estudiar la modulación que el consumo de sardinas ocasionaba sobre la utilización de los citados minerales y ver si esa influencia se mantenía o modificaba por el proceso de fritura.

2.- ***REVISION BIBLIOGRAFICA***

## INTRODUCCION

En los países industrializados más del ochenta por ciento de la cesta de la compra es a base de alimentos procesados (KEUNING y BEEK, 1983). Si a ello se añaden los que se cocinan antes de su consumo, es fácil suponer que la mayoría de los alimentos ingeridos son elaborados.

La elaboración puede suponer un cambio más o menos profundo, más o menos importante, deseado o no, en sus ingredientes, todo lo cual, en definitiva, decide la calidad final del alimento y su valor nutritivo real.

En términos generales, al procesar los alimentos se pretende por una parte su conservación, lo cual supone destruir microorganismos, inactivar enzimas, etc., pero, además, se intenta también mantener o mejorar las propiedades organolépticas y conseguir así un producto más apetecible. Por último, se logra a veces mejorar la digestibilidad y salubridad mediante la modificación de sus componentes, destrucción de sustancias antinutritivas o tóxicas, etc.

Sin embargo, este objetivo tan plural y siempre beneficioso puede ir acompañado de una serie de efectos secundarios negativos no deseados que podrían llevar a una situación final de deterioro. Así, tenemos que los procesos tecnológicos pueden influir positivamente o negativamente sobre el valor nutritivo del alimento. La influencia se produce sobre los nutrientes y sobre los componentes no nutritivos y puede afectar a las fracciones proteicas, lipídicas y glucídicas, así como a las vitaminas, sales minerales o a otras sustancias que contenga el alimento elaborado; lo cual a veces acarrea una serie de interacciones entre ellos con consecuencias sobre su valor nutritivo, por lo que conviene conocerlas para calibrar las secuelas positivas y negativas del procesamiento sobre el valor nutricional global de los alimentos.

De ahí que no baste con conocer las pérdidas de nutrientes que se producen debido a estos procesos, sino que, además, hay que profundizar en los cambios cualitativos que no se acompañan del correspondiente cambio cuantitativo, es decir, en los que tan sólo afectan a la biodisponibilidad pero que también modifican su potencial nutritivo (MAURON, 1977).

## 2.1.- INTERACCIONES ENTRE NUTRIENTES

### 2.1.1.- Concepto de biodisponibilidad

Aunque el término de biodisponibilidad haya sido acuñado recientemente su concepto aparecía ya en las apreciaciones que consideraban a ciertos alimentos como "buenas fuentes" de nutrientes específicos, pues aunque tales consideraciones se basaban fundamentalmente en términos cuantitativos, de riqueza, no estaban exentos de una idea de buena utilización.

A pesar de que fue ya hace más de 90 años cuando ATWATER (1901) utilizó el concepto de disponibilidad referido al metabolismo energético como "capaz de ser usado" y posteriormente McCANCE y LAWRENCE desarrollaron el concepto de "disponibilidad de carbohidratos" y CARPENTER el de aminoácidos, no ha sido hasta la pasada década cuando la idea de biodisponibilidad ha tomado cuerpo en la nutrición, especialmente en lo que a biodisponibilidad de minerales se refiere.

En un principio, podría pensarse que un análisis del contenido en nutrientes de una dieta era suficiente para indicar la adecuación, o no, de un régimen alimentario a las recomendaciones dietéticas. Sin embargo, hoy sabemos que esta aproximación no es exacta, especialmente en lo que a vitaminas y minerales se refiere, y que resulta insuficiente, ya que desconoce si esos nutrientes, bajo su forma específica, en esa dieta concreta, van a ser suficientemente absorbidos y convenientemente metabolizados por el organismo (MAURON, 1977).

En este contexto es necesario tener presente que para que un mineral pueda ser utilizado, debe de hacerse presente en el lumen en una forma conveniente para su absorción y además, apta para ser usada en el metabolismo. Se comprende por lo tanto que la biodisponibilidad es una función con dos actores principales, un sujeto pasivo, el nutriente, que habrá de ser disponible para el proceso nutritivo, y un sujeto activo, el individuo que lo ingiere, que hace efectiva esa utilización, y que se realiza o depende de tres escenarios principales: del alimento, antes de ser ingerido, del lumen durante la digestión y del propio organismo durante el

metabolismo.

El sentido completo del término lo alcanzamos cuando contemplamos conjuntamente todas las vertientes y consideramos que la biodisponibilidad es el resultado de la interacción entre el individuo y la dieta que ingiere, y así, FAIRWEARHER-TAIT (1987) define la biodisponibilidad de un nutriente como la proporción del mismo en un alimento o en una dieta que es digerida, absorbida y metabolizada por un individuo, siguiendo las rutas metabólicas normales.

Sin embargo, para BENDER (1985), no está clara la inclusión de ambos términos, digestión y absorción, pues, según él, si el nutriente está presente en una forma absorbible, no necesitaría digestión y por el contrario, hay materiales que son hidrolizados en el intestino y no son necesariamente absorbidos. Además, hay sustancias que son absorbidas pero no metabolizadas y son subsiguientemente excretadas. Consecuentemente sugiere la definición de biodisponibilidad como "la porción de un nutriente capaz de ser absorbida y disponible para utilizarla o almacenarla" o más brevemente como "la proporción de un nutriente que puede ser utilizada".

En la misma línea SOUTHGATE (1989) define también la biodisponibilidad como "la capacidad que tiene un nutriente de ser usado" para lo cual, debe de estar presente en el lumen en una forma que sea transportable a través de la mucosa, o bien, que las formas ingeridas puedan ser transformadas en formas transportables (digestión en un sentido estricto) y que el nutriente sea absorbido en una forma que pueda ser utilizado en el metabolismo normal.

### 2.1.2.- Biodisponibilidad de minerales

Aunque el concepto de biodisponibilidad es válido para todos los nutrientes, en el caso de los elementos minerales, y de modo particular en los traza, adquiere una importancia capital por ser numerosos los factores que pueden interactuar con ellos y condicionar su absorción y utilización.

Estas interacciones pueden tener lugar en cada uno de los distintos escalones que deben cumplir todos los nutrientes para completar el proceso digestivo. Así, el nutriente mineral se encontrará en unos alimentos o en unas dietas en cuantía variable y bajo formas diversas, acompañado de otros nutrientes y de otras sustancias con los que de alguna forma podrá reaccionar "in situ", como consecuencia de procesos industriales o culinarios, o en el lumen, durante el proceso digestivo.

Estos y otros factores del entorno, contaminantes, aditivos, drogas, etc., podrán incidir también y modular la proporción de mineral que queda en forma disponible para la absorción, es decir, la cantidad absorbible.

A partir de aquí, el que se utilice mejor o peor va a depender en gran medida del propio individuo o animal que la ingiere y de su estadio fisiológico, incluso de factores genéticos (SOUTHON y Col., 1988), pero sin olvidar que los factores extrínsecos, relacionados con la dieta o ambientales, van a seguir ejerciendo su influencia en estas etapas.

Como resultado de este cúmulo de interacciones, sólo una proporción del mineral ingerido servirá para el mantenimiento de las funciones metabólicas normales, es decir, será biodisponible (FAIRWEATHER- TAIT, 1987).

#### 2.1.2.1.- Factores que condicionan la biodisponibilidad mineral

Aun entendiendo que toda división en este campo puede resultar artificial por la estrecha relación de unos factores con otros, podríamos señalar que existen unos factores intrínsecos, inherentes al propio individuo y otros extrínsecos, externos a él, entre los cuales los más importantes serán dependientes de la dieta, a los que se añaden los condicionados por el entorno.

##### 2.1.2.1.1.- Factores dependientes del individuo

Hay que considerar que desde el individuo puede modificarse la utilización

de los nutrientes, en la medida que los cambios fisiológicos, estado nutritivo, edad, sexo, etc., modifican la digestión, absorción, metabolismo, excreción y, por lo tanto, modulan la biodisponibilidad.

De acuerdo con BOYD (1984), estos factores que afectan a la biodisponibilidad son: especie y genotipo, edad, sexo, estado fisiológico (crecimiento, etapa adulta, reproducción, lactación), estado nutricional incluida la adaptación a la dieta, stress fisiológico y microflora intestinal e infección. A todos ellos FERRANDO (1987) añade las interacciones metabólicas droga-nutriente y los estados patológicos.

#### 2.1.2.1.1.1.- Factores genéticos

Aunque se habla de ellos, son poco conocidos. Es sabido que las distintas especies difieren en la utilización de los elementos procedentes de una misma fuente. Así, el hierro es utilizado de forma diferente por el hombre y la rata y el niño utiliza mejor el calcio de la leche de su madre que el de la leche de vaca.

Además, dentro de cada especie existen variaciones individuales, algunas tan exageradas, que caen dentro del campo de las patologías. Piénsese en las mutaciones genéticas, por ejemplo, los pacientes con el síndrome de Menke no pueden absorber el cobre eficazmente.

#### 2.1.2.1.1.2. Factores fisiológicos

Dentro de éstos, el estadio biológico es especialmente importante. Son numerosos los estudios experimentales que muestran cambios en la utilización de minerales en las distintas etapas de la vida, con desviaciones hacia mayores eficacias en crecimiento, gestación y lactación. En la medida que el estadio biológico modifica las necesidades y en virtud de que sus regulaciones se realicen por y para esas necesidades, se comprende que la biodisponibilidad varíe en los distintos estadios.

#### 2.1.2.1.1.3. Factores dependientes de la situación nutritiva

La situación nutritiva, preferentemente referida al elemento concreto, condiciona su biodisponibilidad. En la medida en que muchas veces la absorción y retención dependen de las necesidades, se comprende que el estado nutritivo anterior, según sea normal, de depleción o de repleción, haga que el organismo aproveche mas o menos eficazmente los elementos que le proporciona una misma dieta.

En distintas ocasiones se ha comprobado que un animal que ha sido privado de un elemento traza, se vuelve más eficiente en la absorción de dicho elemento (FERRANDO, 1987).

Hay que hacer notar en este contexto que la capacidad de adaptación de los individuos a la dieta, juega un papel destacado.

#### 2.1.2.1.1.4. Factores ligados a diversas patologías y a la terapéutica que conllevan

Diversas patologías, por los cambios anómalos que conllevan en la digestión, metabolización, etc., pueden condicionar la biodisponibilidad de muchos minerales.

Así por ejemplo, la fibrosis quística, el síndrome de Shwachmans o la cirrosis alcohólica cursan con absorciones de zinc disminuidas.

Otras patologías, por el contrario, incrementan anormalmente la absorción de algunos minerales como el caso de la sarcoidosis y la hipercalcemia idiopática con el calcio (ZERWEKH y Col., 1980).

Pero no es sólo la propia patología la responsable de los cambios que se producen en la biodisponibilidad. A veces la terapia que conlleva puede modificar la utilización de ciertos elementos, como consecuencia de los cambios fisiológicos que introducen o por la aparición de interacciones drogas-nutrientes. Un ejemplo

muy claro son las tetraciclinas y el calcio, si se administran conjuntamente dificultan sus respectivas absorciones al formar compuestos inabsorbibles.

#### 2.1.2.1.2. Factores dietéticos

En el siguiente esquema se muestran los principales factores dependientes del alimento o dieta en la que va incluido el mineral.

Mineral	Cantidad Forma	} Interacciones
Presencia de otros nutrientes	Proteína Grasa Hidratos de Carbono Minerales Vitaminas	
Otras sustancias de los alimentos	Fibra Acidos orgánicos Polifenoles Fitatos, etc.	
Aditivos y contaminantes en los alimentos	Antioxidantes Estabilizantes Pesticidas, etc.	

Las dietas son el resultado de la combinación de alimentos y éstos son mezclas complejas de sustancias nutritivas y no nutritivas, entre las cuales las interacciones posibles, y sus consecuencias, son muy variadas.

Sin pretender hacer un estudio exhaustivo de todas las posibles consecuencias sobre el concepto que nos ocupa, la biodisponibilidad de minerales, podemos decir que los diferentes macro y micronutrientes la modulan.

Así, entre la cantidad y calidad de la **grasa** dietética y la utilización de los minerales parece establecerse una relación compleja, escasamente conocida y, en cierto modo, diferente para los distintos elementos.

Para el calcio se ha dicho que una cierta cantidad de grasa favorece su absorción pero que un exceso la deprime, tanto más, cuanto más saturada sea la grasa. Así mismo KIES (1988) considera que la biodisponibilidad del calcio se incrementa paralelamente a la **disminución** de la longitud de la cadena del ácido graso y al aumento del grado de insaturación.

Por el contrario, en el caso del hierro, el incremento en el nivel de grasa dietética y su desviación hacia el consumo de grasa saturada, podría favorecer la absorción del hierro no hémico en la rata (BOWERING y Col., 1977), efecto que se ejerce por debajo de ciertas concentraciones de mineral en la dieta y sólo hasta una determinada cantidad de grasa (AMINE y Col., 1975).

En humanos se ha descrito algo similar, en 1982 LUKASKI y Col. encontraron que ciclistas alimentados con dietas ricas en grasas saturadas estaban en un balance de hierro mucho más positivo que otros que consumían dietas idénticas pero a base de grasas poliinsaturadas. En la misma línea, VAN-DOKKUM (1983) describe una disminución del balance férrico en sujetos con regímenes de alto contenido en ácido linoleico.

Distintos **Hidratos de Carbono** ejercen también su influencia. Quizá una de las más conocidas sea el efecto favorecedor de la lactosa sobre la absorción del calcio, a la que parcialmente se le atribuye la buena utilización del calcio en la leche materna.

También a este azúcar se le señala como uno de los más favorecedores de la retención de hierro en ratas: lactosa > sacarosa > fructosa > glucosa, aunque estos efectos se discuten en humanos. Sin embargo, no siempre la presencia de hidratos de carbono es beneficiosa, habiéndose descrito una disminución en la biodisponibilidad del cobre en presencia de fructosa y sacarosa (FIELDS, 1988).

En cuanto a las interacciones de **vitaminas** con **minerales**, aunque no son demasiado bien estudiadas, existen dos casos cuya influencia resulta, por conocida, de uso común. Es el caso de la vitamina D y el calcio aunque su influencia ya se sabe que se extiende a otros elementos como el fósforo, magnesio, zinc, etc. y el otro caso concreto es el de la vitamina C y la utilización del hierro no hémico, hecho que fue señalado por primera vez por MOORE y DUBACH en 1951.

También entre los distintos **minerales** se dan una serie de antagonismos y sinergias que son muy importantes.

Un exceso de mineral puede empeorar la absorción de otro, posiblemente al competir por los lugares de ligamiento intestinal, de tal modo que la deficiencia de un mineral puede estar asociada con un aumento en la absorción de otro.

Es conocido el antagonismo entre sodio-potasio, cobre-zinc, hierro-zinc, cadmio-zinc y manganeso-hierro (FERRANDO, 1987). Esta competición puede extenderse, no sólo a nivel de absorción, sino también a los lugares de actuación a nivel fisiológico y bioquímico.

Así mismo, se ha descrito que el zinc inhibe la absorción intestinal de calcio pero que, sin embargo, el uso simultáneo de una ingesta elevada de calcio y fósforo no afecta ni a la excreción ni al balance de zinc (SPENCER y Col., 1985).

Otros autores (Nutrition Reviews, 1987) han visto que fórmulas infantiles suplementadas con hierro, producen una disminución en la absorción de cobre, pero no tienen efecto sobre la absorción de zinc.

Es, por otra parte, harto conocido que la presencia de otras sustancias de los alimentos o contenidos en ellos pueden modificar la biodisponibilidad de los minerales:

**Fibra, fitatos, etc.** disminuyen la digestibilidad al formar con muchos elementos complejos insolubles que impiden sus ulteriores absorciones.

Así, como indica LÖNNERDAL (1989), aunque cereales y legumbres contienen razonables niveles de elementos traza, su grado de absorción es bajo y esto se debe tanto a la presencia de fibra como de fitatos.

Los vegetales y frutas contienen una serie de **ácidos orgánicos** que pueden estimular la absorción de elementos traza de otros alimentos. El ácido cítrico, málico y succínico estimulan la absorción del hierro cuando se encuentran en concentraciones elevadas (GILLOOLY y Col., 1983).

Por otro lado, como señalan HALLBERG y Col. (1981), los vegetales contienen ácido oxálico que tiene un efecto negativo sobre la absorción del calcio y puede inhibir también la absorción de otros elementos.

El té y el café, consumido frecuentemente con los alimentos, contienen sustancias que pueden inhibir la absorción de elementos traza. Como indican ROSSANDER y Col. (1979), la absorción del hierro del té y café es baja y la adición de estas bebidas al desayuno, disminuye la absorción del hierro. Parece ser que el ácido tánico y clorogénico, así como la cafeína, son los responsables.

Lo mismo cabría decir para distintos **aditivos o contaminantes** presentes en los alimentos como antioxidantes, estabilizantes, pesticidas, etc. que son potencialmente capaces de formar con los elementos minerales, una serie de compuestos de elevado peso molecular que van a disminuir la biodisponibilidad de los mismos al impedir su absorción.

Estas interacciones se comentan sólo brevemente ya que no han sido objeto de este trabajo, que se ha enfocado en el papel que la proteína puede desempeñar sobre la biodisponibilidad mineral, de ahí que se dedique especial atención a los dos sujetos partícipes en dicha interacción, el mineral y la proteína.

#### 2.1.2.1.2.1. Factores dependientes del propio mineral

##### 2.1.2.1.2.1.1. Cantidad

Sin duda, la **cuantía** del mismo en el alimento es un importante condicionante de su biodisponibilidad.

Lógicamente la cantidad absorbida y utilizada depende de la ingesta, pero no sólo porque ella es un **determinante** principal en los procesos de difusión y absorción, sino también porque la cantidad ingerida puede jugar un **papel importante** en las interacciones que se producen.

##### 2.1.2.1.2.1.2. Forma del elemento

Otra pieza clave de la biodisponibilidad de un mineral en una dieta o un alimento concreto es su forma físico-química, lo que se ha dado en llamar "speciation" (VAN DOKKUM, 1989) o especie química o bioquímica, y hace referencia al estado de valencia, los complejos ligandos del metal y los compuestos del mineral.

Si pensamos que la estructura atómica de un elemento determina sus propiedades químicas y que éstas son responsables de sus funciones fisiológicas, entenderemos que la forma química en el alimento sea determinante y que en el intestino delgado, sea la llave de la absorción.

La forma físico-química en el lumen es, sin duda, de capital importancia, pero también interesa la especie química del mineral en el alimento o en la dieta, no sólo porque de ella depende la forma en el lumen sino también porque va a condicionar cambios o interacciones que pueden producirse en esos alimentos por efecto de las manipulaciones industriales o culinarias.

Por último cabría añadir que la naturaleza de los minerales tras la absorción

puede ser relevante para predecir la conducta metabólica de algunos de ellos, y así se ha sugerido el término "especie bioquímica" (SABBIONI y Col., 1985) o "especie metabólica" (VAN DOKKUM, 1989) para indicar, de alguna manera, en que medida un metal puede ser biotransformado en su forma metabólicamente activa.

#### 2.1.2.1.2.2. Factores dependientes de la proteína

El efecto de la proteína sobre la utilización de los distintos minerales parece contradictorio. Aunque existen resultados experimentales que asocian altas ingestas de proteína con elevadas excreciones fecales de zinc y aumento de sus requerimientos (SANDSTEAD, 1985), en términos generales parece que las dietas ricas en proteína favorecen la absorción de calcio y que muy poco hierro puede absorberse en su ausencia (McCANCE y Col., 1942), lo que contribuye a la mejor disponibilidad del hierro de la carne y a que ésta incremente también la absorción del hierro (LAYRISSE y Col., 1968, 1972) y del zinc de la misma procedencia en humanos (SHAH y Col., 1981).

Esta relación proteína-minerales no es sólo dependiente de la cantidad sino que también se relaciona con la calidad. En este sentido BRZOZOWSKA y Col. (1989) estudiaron la absorción aparente de hierro, cobre y zinc en ratas, en función del tipo de proteína de la dieta, y vieron que las absorciones más elevadas se producían cuando la dieta contenía caseína como fuente proteica, comparada con gluten o con una mezcla equimolecular caseína-gluten 1:1. Los efectos más marcados fueron para el zinc y el cobre y aunque en el caso del hierro no se observaron diferencias tan significativas, su absorción también se vio aumentada cuando la fuente proteica de la dieta era caseína. A la par demostraron que la concentración en tejidos de hierro, calcio y zinc se veía influenciada por el tipo de proteína y que el crecimiento de las ratas, cuya fuente proteica era gluten, fue menor.

Además, ha podido observarse que la presencia de proteína animal, en general, incrementa la disponibilidad de las sales ferrosas y férricas (LAYRISSE y Col., 1973) y del hierro de los vegetales. Se piensa que durante la digestión se

liberan una serie de aminoácidos: histidina, lisina, cisteína que forman quelatos y favorecen su solubilidad (VAN CAMPEN, 1973).

Pero no todas las proteínas animales tienen el mismo efecto; nuestro grupo pudo comprobar en ratas una mejor absorción y retención corporal del hierro cuando la proteína dietética era atún blanco, comparada con la caseína-metionina (GARCIA-ARIAS, 1989). En igual sentido, parece que la leche y el huevo son menos efectivos que por ejemplo el cordero o el pollo, el hígado y el pescado, por lo que BJORN-RASMUSSEN y HALLBERG (1979) no creen que el efecto beneficioso esté ligado a la composición aminoacídica de la carne, ya que los aminoácidos de la carne, pescado y huevo son muy similares y piensan que puede ser debido al llamado "factor carne", ausente en el huevo, o bien a diferencias en los péptidos formados durante la digestión.

No obstante, BEISEL y Col. (1976) en otro trabajo consideran que la carne puede actuar contrarrestando factores luminales que impiden la absorción, probablemente, mediante la formación de un transportador de hierro intraluminal que en opinión de LAYRISSE y Col. (1984) podrían ser aminoácidos como la cisteína, que, así, se responsabilizaría parcialmente del efecto beneficioso del "factor carne". VAN CAMPEN y GROSS (1969) señalan también que la cisteína es el aminoácido más eficiente para la absorción del hierro, y se ha descrito que cuando la cisteína se añade a comidas a base de legumbres, se produce un importante incremento en la absorción de hierro (MARTINEZ-TORRES y Col., 1981).

Así mismo, WAPNIR y Col. (1983) han encontrado un efecto beneficioso de la cisteína o histidina sobre la absorción de zinc.

Para entender mejor esta interacción conviene recordar que la absorción de la mayor parte de los minerales se produce en el duodeno, donde todavía el pH ácido favorece su solubilidad, porque a medida que descienden hacia el yeyuno e íleon, el incremento del pH los hace precipitar, evitando su absorción. El papel de la proteína residiría en que algunos productos procedentes de la digestión proteica, pequeños péptidos y aminoácidos, se unen y estabilizan los iones metálicos,

impidiendo así su ulterior precipitación al aumentar el pH, así como la posibilidad de que reaccionen con otros compuestos que podrían evitar su absorción.

La quelación ocurre cuando el catión se une por enlace iónico y covalente a la misma molécula (ligando). Dos aminoácidos pueden quelar a un catión polivalente dando lugar a una estructura bicíclica, similar a un dipéptido, que resiste la hidrólisis ácida y la acción de los enzimas intestinales. El metal así quelado es absorbido por transporte activo en el yeyuno donde radican los lugares de absorción de dipéptidos (ASHMEAD y Col., 1985) y de esta forma se consigue mejorar la absorción de los minerales ingeridos como sales inorgánicas.

Parece que paralelamente se mejora también la utilización de esos elementos, según se desprende de unos ensayos isotópicos "in vivo" en los que se observa que el quelato pasa intacto al torrente circulatorio, y se produce una mayor retención del elemento, que la correspondiente a base de su sal inorgánica, como se aprecia por los contenidos de diversos metales en distintos órganos (ASHMEAD, 1989).

Estudios en animales manifiestan que varios aminoácidos son capaces de incrementar la transferencia intestinal de hierro ferroso y férrico (GROPPEL y Col., 1971; McMILLAN y Col., 1982; Mc PHERSON y Col., 1964).

Además ha podido observarse que la presencia de histidina, lisina y cisteína mejoran la solubilidad del hierro mediante la formación de quelatos tridentados. Por su parte, cisteína y glutatión pueden también reducir el  $Fe^{+++}$  a  $Fe^{++}$ , mejorando así su solubilidad.

En resumen, de los estudios en animales y humanos puede decirse que varios aminoácidos son efectivos para promover la absorción del hierro, pero los más concluyentes son los que se refieren a los aminoácidos azufrados (MORRIS, 1985).

En el caso del zinc se ha descrito igualmente la formación de quelatos con aminoácidos que mejoran su absorción, señalándose a la cisteína e histidina de forma específica (HUNT y Col., 1987). O'DELL y Col. (1972) encontraron que el zinc

de productos de origen animal era más disponible que el de productos de origen vegetal y que, además, los requerimientos de zinc en ratas y pollos eran mayores cuando la proteína de la dieta procedía de vegetales.

Dentro de las proteínas animales existen también graduaciones y así la absorción de zinc en niños es mayor con leche materna que con leche de vaca (SANDSTRÖM y Col., 1983) y LÖNNERDAL (1980) sugiere que esto puede ser debido al alto contenido en caseína de la leche de vaca; ya que el mismo autor en otro trabajo (1985) vio que la caseína bovina tenía un efecto negativo sobre la absorción de zinc que no tenía la caseína humana y sugiere que este efecto negativo puede ser debido a la presencia de aminoácidos fosforilados o bien a la presencia de fosfato cálcico coloidal (CCP) en la caseína bovina, indicando que esta forma de calcio puede interferir con la absorción de zinc.

#### 2.1.2.1.3. Influencia de los procesos tecnológicos

El hecho de tener que procesar los alimentos se debe, por una parte, a la necesidad de conservación cuando la captura o cosecha es estacional, y por otra, a los hábitos alimentarios que obligan a darles unas características organolépticas determinadas (VARELA, 1985 b).

Mediante diferentes tipos de procesos térmicos, irradiación, congelación, liofilización, tratamientos químicos, etc., podemos aumentar la vida útil del alimento (conservación) ya que con ellos se consigue inhibir o retardar el crecimiento de microorganismos perjudiciales, inactivar enzimas, destruir sustancias tóxicas, etc.

La mayor parte de los tratamientos utilizados tanto en la preparación culinaria de alimentos (cocción, asado, fritura, etc.) como las realizadas a escala industrial (blanqueado, pasteurización y esterilización, etc.) implican actuación del calor, es decir, son procesos térmicos. Por ello, al analizar las repercusiones que ejercen sobre los nutrientes alimentarios, dedicaremos especial atención a su incidencia sobre la proteína u otros macronutrientes y, a través de ellos, a la interacción proteico-mineral u otras.

### 2.1.2.1.3.1. Mecanismo de daño térmico a la proteína

#### 2.1.2.1.3.1.1. Estructura y desnaturalización

El proceso térmico conduce a lo que se llama desnaturalización de las proteínas, fenómeno que significa un cambio importante en la estructura nativa: cuaternaria, terciaria y secundaria, pero que no altera la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) ya que si ésto ocurriera debería hablarse de deterioro (GOMEZ PIÑOL y Col., 1989).

La estructura fundamental de la proteína es la cadena polipeptídica, consistente en aminoácidos firmemente unidos en una secuencia bien definida por medio de enlaces covalentes  $\alpha$ -peptídicos.

De acuerdo con la nomenclatura propuesta por LINDERSTROEM-LANG la cadena polipeptídica se llama estructura primaria de la proteína y tiene forma de largo filamento, conteniendo entre 100 y 140 aminoácidos, en el que la secuencia -NH-CH(R)-CO se repite. Esta regularidad en la secuencia se modifica sólo en los lugares donde se inserta una molécula de prolina, causando una desviación en la dirección de la cadena. Otros enlaces covalentes que participan en la estructura primaria de las proteínas son los puentes disulfuro y enlaces éster, formados entre algunos de sus aminoácidos.

En la mayor parte de las proteínas, esta cadena polipeptídica se enrolla, según una estructura regular en forma de hélice mediante puentes de hidrógeno, uniones con una energía de enlace mucho menor que la del enlace covalente. Además, las fuerzas de Van der Waals pueden contribuir también a la estabilidad de la  $\alpha$ -hélice.

El enrollamiento de varias hélices alrededor de un eje longitudinal común, constituye lo que llamamos estructura terciaria de la proteína. Las uniones que la estabilizan son también enlaces de hidrógeno, aunque los puentes disulfuro juegan asimismo un papel importante. La mayor parte de las proteínas con pesos

moleculares sobre 20.000 están compuestas por más de una cadena polipeptídica y, por lo tanto, poseen una estructura cuaternaria. En este caso, la molécula proteica está compuesta de varias subunidades que están unidas por enlaces de hidrógeno y también por puentes disulfuro, del mismo modo que estos enlaces contribuyen también a la estructura secundaria y terciaria de la proteína.

El calor, al actuar sobre la proteína, va a producir su desnaturalización, fenómeno que por sí mismo no entraña necesariamente pérdidas nutritivas. La desnaturalización ocurre cuando se rompen los enlaces responsables de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, tales como enlaces de hidrógeno y disulfuro, afectándose por tanto la ordenación tridimensional de su molécula, aunque la cadena polipeptídica permanece sin alterarse (LANG, 1970).

Según BENDER (1978 a) aunque el calentamiento suave no tiene efecto sobre el valor nutritivo, las propiedades biológicas específicas de la molécula de proteína se pierden. Las propiedades físicas y químicas de la proteína cambian. Así, la proteína fibrilar sufre cambios en elasticidad, flexibilidad y longitud. Las proteínas globulares sufren pérdidas en solubilidad, viscosidad, propiedades osmóticas y movilidad electroforética, entre otras, que se acompañan de la liberación de grupos reactivos (-NH<sub>2</sub>, -COOH, -OH, -SH) previamente escondidos dentro de la molécula, para situarse en la superficie, pudiendo entrar en contacto más fácilmente con enzimas, de ahí que la desnaturalización se asocie generalmente con una susceptibilidad incrementada hacia la proteólisis enzimática.

Si consideramos también que se producen pérdidas de funcionalidad en la proteína nativa, este tratamiento puede ser muy positivo por el hecho de destruir factores antinutritivos de naturaleza proteica, como por ejemplo las antitripsinas de las leguminosas y el ovomucoide y ovinhibidor de la clara de huevo, también con carácter antitripsico, así como la destrucción de la avidina, que posee acción antivitaminica por combinarse con la biotina en un complejo no hidrolizable por los enzimas (GOMEZ PIÑOL y Col., 1989).

Hay que tener en cuenta que la proteína pasa de su estado nativo al

desnaturalizado a través de una situación intermedia de predesnaturalización (LEDWARD, 1979). Ambas situaciones son reversibles pero si el proceso de desnaturalización continúa, las proteínas pueden reaccionar consigo mismas o con otras moléculas para formar agregados y estas reacciones de postdesnaturalización son ya virtualmente irreversibles. Si el calor suministrado a la proteína es excesivo, entonces, los enlaces covalentes se romperían conduciendo a una degradación térmica, que ya es irreversible.

De este modo se comprenderá fácilmente el hecho de que si durante estos escalones intermedios se producen reacciones inter e intramoleculares e incluso hidrólisis o destrucciones por oxidación de péptidos y aminoácidos, pueda verse modificado el valor nutritivo del alimento (BENDER, 1984).

#### 2.1.2.1.3.1.2. Interacciones entre proteínas

En línea con lo que se acaba de comentar, si el calor aplicado al alimento es excesivo, pueden romperse los enlaces covalentes de la proteína llegando a una degradación térmica, incluso con posibilidad de destrucción de los aminoácidos componentes (HURRELL y CARPENTER, 1977). El desdoblamiento de la molécula durante la desnaturalización provoca cambios moleculares con repercusiones nutricionales bien conocidas, se forman isopéptidos al crearse nuevos enlaces peptídicos entre las funciones reactivas puestas al descubierto por el desplazamiento de las cadenas polipeptídicas y por ruptura de enlaces preexistentes (HURRELL y CARPENTER, 1975; MAURON, 1977, 1985 a; BENDER, 1978 a; DUTSON y Col., 1984; KIRK, 1984; GOMEZ PIÑOL, 1989).

Desde hace mucho tiempo, distintos autores (BJARNASON y CARPENTER, 1970; HURRELL y CARPENTER, 1975; KIRK, 1984; MAURON, 1977, 1985 a, 1985b), describieron la condensación entre los grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lisina y los grupos amida de la glutamina y asparragina. Otro aminoácido implicado es la cistina, que se destruye parcialmente por la ruptura de los enlaces disulfuro (MAURON, 1977; BENDER, 1978a; KIRK, 1984; GOMEZ PIÑOL, 1989); aparecen así grupos -SH, que pueden dar lugar a sulfuro de hidrógeno y a grupos carbonilo, que se pueden

esencial, su racemización puede disminuir la digestibilidad proteica.

#### 2.1.2.1.3.1.3. Reacciones con azúcares reductores

La mayor fuente de deterioro proteico, consecuencia del calentamiento de un alimento, es el grupo de reacciones conocidas como reacción de Maillard o de pardeamiento no enzimático.

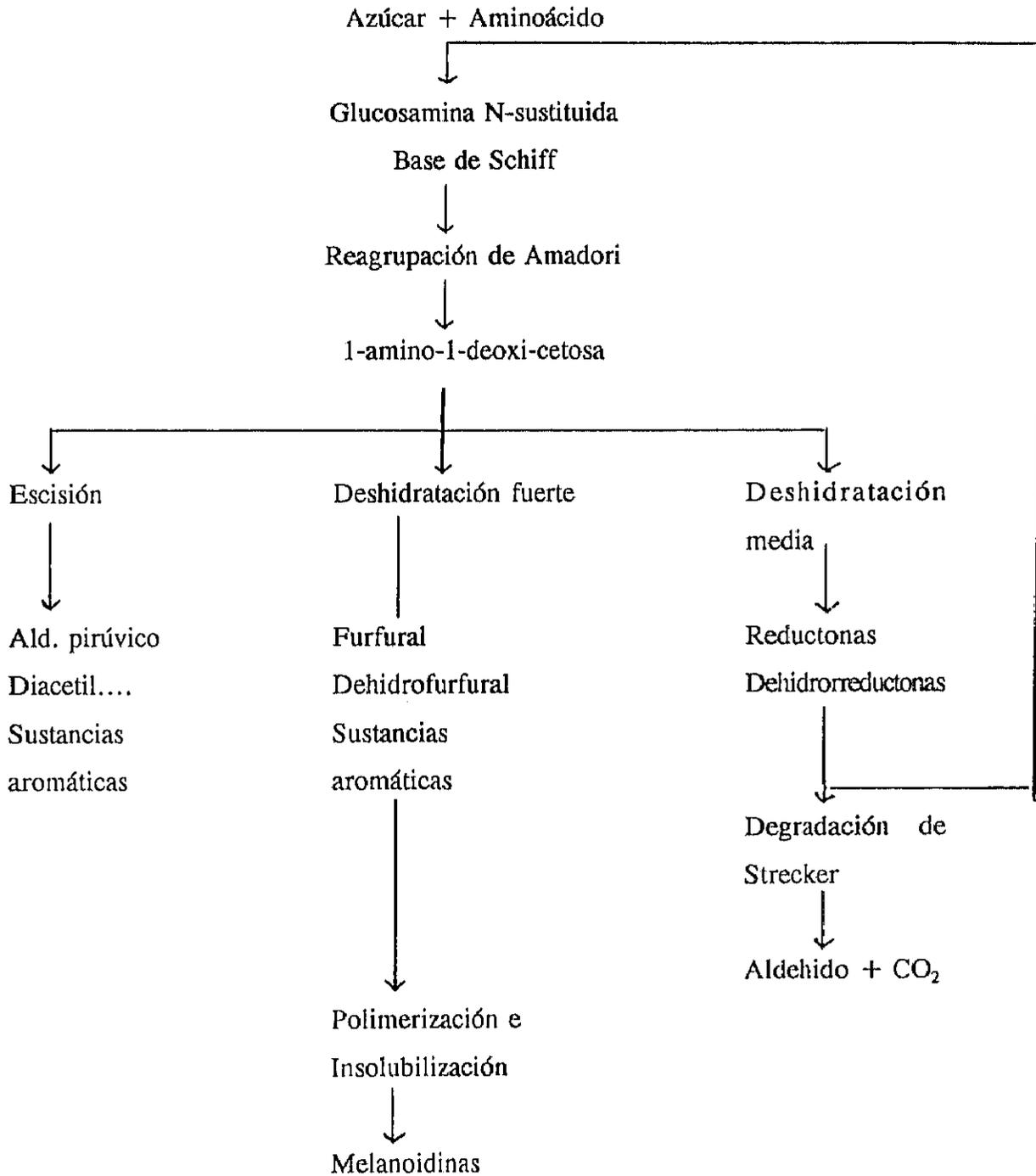
Esta reacción fue descrita por primera vez por Maillard en 1912 cuando publicó una nota breve sobre la producción de lo que él llamó pigmentos melanoideos por reacción de la glicocola (el nombre antiguo dado al aminoácido glicina) con glucosa. Repitió el experimento con otros azúcares y otros aminoácidos y aunque observó que la velocidad de reacción variaba, los resultados finales parecían producir esencialmente los mismos pigmentos pardos.

Tal como indicaba en un trabajo posterior, A.R. Ling (1908) le había precedido observando esta reacción como causa de la coloración que se desarrolla en la malta cuando se completa el proceso de malteado y la demostró in vitro con asparragina y glucosa. Sin embargo, Ling solamente se dio cuenta de la reacción en el limitado contexto del proceso de fermentación de la cerveza, no observó las pérdidas de agua y dióxido de carbono y no notó la presencia de nitrógeno en los productos de reacción, ni asoció la reacción con los pigmentos melanoideos que ocurren naturalmente.

#### Química de la reacción

La química tan compleja de la reacción ha sido desde antiguo muy estudiada por numerosos autores (DANEHY y Col., 1951; HODGE, 1953; ELLIS, 1959) y aún se continúa trabajando en ella (FINOT, 1982, WALLER y Col., 1983; MAURON, 1985a; DANEHY, 1986; FINOT y Col., 1990).

Un esquema sencillo y general de la reacción es el expuesto en la figura adjunta:



ADRIAN (1974)

Según MAURON (1985a), la reacción puede dividirse en tres etapas: temprana, avanzada y final.

- **Temprana.** El punto de arranque es la condensación entre el grupo carbonilo de un azúcar reductor y el amino de un aminoácido, para dar una glucosamina sustituida en el nitrógeno, base de Schiff; después se produce la reagrupación de Amadori, formando un deoxicetosil derivado. El aminoácido implicado principalmente es la lisina. En esta primera etapa no existe formación de color, la principal consecuencia de la reacción de Maillard en su fase inicial es la disminución del valor nutritivo, puesto que el aminoácido implicado en la reacción, al tener bloqueado su grupo amino formando el compuesto de Amadori, no es disponible.
  
- **Avanzada.** Bajo condiciones térmicas más severas la reacción de Maillard evoluciona hacia la etapa más avanzada. Esta fase lleva consigo la formación de cientos o quizá miles de compuestos que son responsables de los numerosos olores y aromas que desprenden los alimentos cocinados. Hay 3 caminos típicos por los que se llega hasta la formación de premelanoidinas, partiendo en todas los casos de los compuestos de Amadori, intermediarios clave de la reacción:
  - Produciendo por escisión moléculas de pocos átomos de carbono, algunas de las cuales pueden contener nitrógeno como aldehído pirúvico, diacetilo, hidroxacetilo, compuestos de menos átomos de carbono que el predecesor y que también pueden reaccionar con otros intermedios y son los que forman parte de los distintos aromas característicos.
  
  - Deshidratación media con formación de reductonas y dehidrorreductonas, que pueden reaccionar con aminoácidos todavía intactos y, que tras una degradación de Strecker, dan lugar a la transformación de los aminoácidos en los aldehídos correspondientes con un átomo de carbono menos, puesto que en esta reacción se

pierde CO<sub>2</sub> y se ha demostrado, mediante marcaje isotópico, que la mayor parte del dióxido de carbono procede del aminoácido. Estos aldehídos son importantes compuestos aromatizantes auxiliares.

- Deshidratación fuerte que produce directamente furfural y derivados.
- **Final.** Se forman los pigmentos negros, llamados melanoidinas.

ADRIAN (1974) opina que las sustancias solubles formadas durante la reacción se denominaron premelanoidinas, con objeto de distinguirlas de las melanoidinas que son insolubles y que se forman en la etapa final de la reacción, originando un residuo de color pardo que precisamente ha dado nombre a la reacción global (reacción de pardeamiento).

Sin embargo, según MAURON (1985a) una definición más coherente para estos términos consiste en denominar premelanoidinas a todos aquellos productos de polimerización con un peso molecular inferior a 1.000, dejando la acepción de melanoidinas para los productos con un peso molecular superior.

Parece que en la etapa inicial de la reacción no se produce color y los productos resultantes no presentan absorción en el U.V. cercano (HODGE, 1953). Además, al igual que indica NAMIKI (1988), la condensación entre el grupo amino del aminoácido y el carbonilo del azúcar reductor es un proceso reversible hasta que sucede la reagrupación de Amadori donde la reacción se convierte ya en un proceso irreversible.

Los productos que se forman en la etapa intermedia o avanzada carecen de color adicional o bien tienen un color amarillento y presentan ya una fuerte absorción en el U.V. cercano. Los productos fuertemente coloreados se producen en la etapa final de la reacción.

Así pues, hemos visto como a partir de un sistema sencillo: aminoácido-azúcar, bien por mediación de procesos térmicos, o bien como consecuencia de la

conservación a temperatura ambiente, se pueden formar un gran número de compuestos intermedios, la mayoría de los cuales, considerados individualmente, pueden sufrir, a su vez, reacciones de pardeamiento, lo cual indica su participación en la reacción global.

### Factores que influyen sobre la reacción

Toda esta serie de reacciones, que acabamos de ver, se encuentran sometidas a la influencia de determinados factores, como son la temperatura, pH, actividad del agua etc. y otros, como la naturaleza del azúcar, la del aminoácido implicado y la proporción en la que se encuentran estas sustancias.

El calor no es indispensable para el desarrollo de la reacción de Maillard, ya que sucede tanto durante el almacenamiento a temperatura ambiente como en los tratamientos térmicos. Es lenta a temperatura ambiente pero su intensidad aumenta paralelamente con la temperatura (MAILLARD, 1912; ADRIAN, 1974; CHEFTEL, 1976) y además, este parámetro parece influir en la naturaleza de los productos formados. En tal sentido, los trabajos de BENZING-PURDIE y Col. (1985), además de confirmar el efecto de la temperatura sobre la intensidad, apuntan que las estructuras de las melanoidinas sintetizadas a 22°C difieren considerablemente de las que se forman a mayor temperatura, presentando distintos tipos de carbonos alifáticos y menor número de carbonos insaturados.

En cuanto a la influencia del pH es importante destacar que la acidificación tiende a inhibir la reacción, mientras que la alcalinización aumenta su intensidad (ADRIAN, 1974; LINGNERT, 1990); se puede decir de forma general que la reacción se incrementa casi linealmente con el incremento de la alcalinidad, desde valores de pH de 3 a 8 y, probablemente, hasta pH 10. Este intervalo tan amplio de pH hace que la reacción pueda afectar a casi todos los alimentos sometidos a tratamientos térmicos, pero también puede explicar porqué la carne es más estable a los tratamientos térmicos que el pescado.

La actividad del agua también ejerce una influencia sobre la reacción. Se ha

visto que el pardeamiento no enzimático es máximo con humedades relativas de 40-70%, disminuye a medida que la dilución acuosa aumenta y desaparece en el caso de soluciones extremadamente diluidas (ADRIAN, 1974). Así, en sistemas líquidos el color tarda mucho más en desarrollarse que en sistemas secos o semisecos y su intensidad es también menor. Según PEPRIELLA y Col. (1985), cuando el grado de humedad es muy alto (solución), no se aprecia modificación alguna en la coloración al variar la actividad del agua en pequeña proporción. Sin embargo, cuando la humedad es muy baja, cualquier cambio efectuado en ese parámetro, por pequeño que sea, afecta en gran medida al color que se obtiene (FOX y Col., 1982).

La naturaleza del azúcar influye en la formación de color. Las pentosas resultan más reactivas que las hexosas, y éstas, que los disacáridos y trisacáridos (RUBENTHALER y Col., 1962; KATO, 1988; LINGNERT, 1990) y, además, ocasionan mayor pardeamiento, incluso, a menor temperatura (KNIPFEL y Col., 1983).

También la estructura estereoquímica del azúcar influye en la cinética de la reacción, viéndose que la ribosa es más reactiva que la xilosa (ADRIAN, 1963). Por su parte la isomaltosa y melobiosa presentan mayor coloración que la maltosa, celobiosa o lactosa y además, el color aparece más rápidamente (KATO, 1989).

En el mismo sentido CHEFTEL y Col. (1976) describieron que la ribosa era más reactiva que la glucosa y fructosa y éstos, a su vez, más que la lactosa y maltosa. Además, indicaron que aunque la sacarosa no es un azúcar reductor y por lo tanto no participaría en la reacción de Maillard, sí lo hace en alimentos ácidos, en los que progresivamente es hidrolizada en glucosa y fructosa y, también, cuando el calentamiento se realiza a temperaturas superiores a 130°C, ya que entonces se produce su hidrólisis. Esto último fue corroborado por HURRELL y CARPENTER (1977).

El tipo de aminoácido, ensayado en la mezcla, juega también un papel importante en la formación de color. Cuando los aminoácidos están incluidos en una cadena proteica, la reacción de Maillard no afecta a toda ella, sino que se produce

una selección, y el primer aminoácido dañado es el que contiene el grupo amino terminal de la cadena. Los siguientes aminoácidos dañados son los básicos, especialmente la lisina cuya destrucción es de cinco a quince veces mayor que la de los restantes aminoácidos. Posteriormente se afectan los aminoácidos azufrados, cisteína y metionina y algunas veces el triptófano (ADRIAN, 1974).

En cuanto a la reactividad de aminoácidos libres, los autores parecen no estar muy de acuerdo, pues mientras unos señalan que los que más color producen son la lisina y glicina y que la cisteína normalmente produce poco color (AMES, 1986), otros indican que las mezclas que contienen triptófano suelen ser más coloreadas que cuando es otro el aminoácido implicado (ADRIAN, 1963 y 1965).

#### Consecuencias nutritivas de la reacción

Según HURRELL (1990), la reacción de Maillard puede modificar el valor nutritivo de los alimentos por tres caminos:

- A) Reduciendo la calidad proteica de los mismos
- B) Influenciando el metabolismo de los elementos traza.
- C) Destruyendo ciertas vitaminas.

A) La reducción de la calidad proteica es el efecto nutricional más importante de la reacción de Maillard sobre el alimento. Este hecho, sin embargo, no supone un problema crucial para la población en general que consume una dieta variada, pero sí puede resultar de suma importancia para la población infantil en épocas en que su dieta básicamente la constituyen preparados dietéticos sensibles a esta reacción. Al desarrollarse en ellos, las fórmulas infantiles podrían llegar a no satisfacer los requerimientos del niño.

La calidad proteica puede reducirse durante el procesamiento de los alimentos, tanto a nivel industrial como doméstico, mediante la formación de compuestos de Amadori con la lisina en las etapas iniciales de la reacción y por destrucción de la misma y de otros aminoácidos esenciales, al reaccionar con las

premelanoidinas en las etapas avanzadas (HURRELL y FINOT, 1983).

HURRELL (1984) indicó que en la etapa inicial de la reacción, la lisina, pero no otros aminoácidos, reacciona con azúcares reductores para dar los deoxicetosil-lisina derivados que carecen de color.

En la etapa avanzada, los deoxicetosil derivados se descomponen para dar premelanoidinas que ya pueden reaccionar con otros aminoácidos, lo que conduciría a la destrucción de algunos aminoácidos esenciales, pudiendo producirse, además, enlaces cruzados entre las cadenas de la proteína y, con ellos, una reducción en la digestibilidad proteica. Las premelanoidinas se polimerizan para dar melanoidinas y, ya entonces, se produce el pardeamiento.

La mayor parte de los estudios realizados sobre los cambios en la calidad proteica o en la utilización de los aminoácidos por efecto de la reacción de Maillard, se han centrado en la lisina, por ser el aminoácido más sensible al tratamiento térmico. En esta línea, HURRELL y Col. (1983) estudiaron el comportamiento de la lisina contenida en leches en polvo, con un 2,5% de humedad, cuando se almacenaban varias semanas a dos temperaturas. Cuando la leche se mantenía a 60°C, a las 9 semanas de almacenamiento el producto conservaba su color natural. Sin embargo, alrededor del 40% de la lisina se había bloqueado en forma de lactulosil-lisina. Por el contrario, si la temperatura de almacenamiento se subía a 70°C, ya en las dos primeras semanas, el 50% de la lisina se bloqueaba, aunque el producto todavía conservaba su color natural, y sólo a partir de las tres semanas, el producto tomaba una tonalidad marrón-rojiza, como consecuencia de la degradación de la molécula de lactulosil-lisina.

Al comparar el comportamiento de la lisina con el de la metionina o triptófano bajo las mismas condiciones, los autores vieron que a 60°C ambos aminoácidos mantenían su estabilidad, pero a 70°C disminuía progresivamente y se originaba un empeoramiento de sus digestibilidades.

El primer caso es un claro ejemplo de la fase inicial de la reacción de

Maillard, no hay coloración y parte del aminoácido se bloquea. En el segundo caso se instaura ya la fase más avanzada en la que se bloquea mayor proporción de lisina, se implican otros aminoácidos en el proceso y se produce el pardeamiento.

MAURON (1985b) justifica el deterioro proteico de modo parecido, e indica que en la etapa inicial de la reacción se produce la pérdida de valor nutritivo de la proteína por bloqueo del grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lisina; a medida que avanza la reacción, la degradación del compuesto de Amadori de la lisina conlleva a la destrucción del aminoácido y, además, la posible formación de enlaces cruzados, disminuirían la disponibilidad de metionina y triptófano.

La pérdida de aminoácidos o de su disponibilidad, en función de la intensidad de la reacción, se pone de manifiesto también en los trabajos de HURRELL y CARPENTER (1982) quienes realizaron un estudio comparando la disponibilidad de estos aminoácidos limitantes para la rata. Para este fin, fueron utilizadas ratas que ingirieron leche en polvo sometida a dos temperaturas distintas. Cuando la temperatura era de 80°C la disponibilidad del triptófano disminuía menos que la de la lisina. Sin embargo, al elevar la temperatura a 100°C, el triptófano era menos disponible que la lisina. Así mismo DOWRSCHAK y HEGADUS (1974) encontraron que el triptófano era el aminoácido limitante para las ratas en leche severamente calentada.

La biodisponibilidad de los compuestos de Amadori, formados en las etapas iniciales de la reacción, ha sido estudiada por diversos autores. FINOT y Col. (1977a) hallaron en leches calentadas de un 2,5% a un 10% de lisina en forma de base de Schiff y pensaron que ésta podría ser biológicamente disponible para las ratas. No obstante, en un trabajo posterior (1977b), mediante técnica "in vivo", vieron que aunque el producto de Amadori, resultante de la reacción de la fructosa con la lisina, era parcialmente absorbido por el intestino, no se utilizaba y concluyeron que dicho compuesto no era biodisponible para la rata.

Lo mismo han observado otros autores trabajando con los deoxicetosil derivados de otros aminoácidos, por ejemplo, el compuesto de Amadori de la

metionina con la fructosa (HORN y Col., 1968) o el de la fructosa con la fenilalanina (JOHNSON y Col., 1977).

A pesar de ello, en algunos casos estos compuestos pueden ser todavía de cierta utilidad fisiológica y nutritiva. En esta línea se ha visto que el producto de la reacción de la fructosa con el triptófano, aunque es muy inadecuado como fuente de ese aminoácido, es preferible a la ausencia total de triptófano en la dieta (SGARBIERI y Col., 1973) y que la fructosil-glicina, aunque no sirve como aporte del aminoácido, resulta en opinión de HAGAN y Col. (1970) tan efectiva como la glicina como fuente de  $N_2$  en ratas privadas del mismo y sugieren que el compuesto era alterado en el intestino de la rata, del tal forma que el  $N_2$  podía ser todavía utilizado, pero el esqueleto carbonado del aminoácido se volvía indisponible.

Las reacciones que suceden en la etapa avanzada de la reacción de Maillard conducen a la destrucción de lisina, a la disminución de la digestibilidad proteica y a la reacción de las premelanoidinas con otros aminoácidos, en particular con la histidina, arginina y, quizá también, con el triptófano y la cisteína (HURRELL, 1990). Aunque el mecanismo no se conoce bien, parece ser que, como se ha dicho, se forman uniones cruzadas entre las cadenas de aminoácidos, que son resistentes a la actividad enzimática, bien porque impiden la penetración de los enzimas o bien porque bloquean los lugares de ataque con lo cual disminuye la digestibilidad proteica.

Además, ADRIAN (1974) sugiere un efecto indirecto de los productos de la reacción sobre la utilización de la proteína dietaria, ya que la fracción soluble en agua de la reacción glucosa-lisina reduce la digestión de la caseína "in vitro" e "in vivo" en ratas, incrementando la excrección urinaria de  $N_2$ . Además, los productos de bajo peso molecular, formados a partir de la misma mezcla, afectan a la utilización de los aminoácidos derivados de la proteína dietaria (ÖSTE y SDODIN, 1984) y diferentes compuestos heterocíclicos, formados durante la reacción, inhiben los enzimas Aminopeptidasa N y, fundamentalmente, Carboxipeptidasa A (OSTE y Col., 1986), pudiendo influenciar la utilización de la proteína dietaria si se encuentran en suficiente cantidad en la dieta (OSTE y Col., 1987).

B) Los productos de la reacción de Maillard interfieren con el metabolismo de los elementos traza y datos experimentales, casi siempre recientes, describen modificaciones en la excreción urinaria de zinc, pero también de otros elementos como cobre, hierro y calcio.

Los primeros resultados proceden de ensayos "in vitro" en los que HRDLICKA (1976) señala que cuando se calientan mezclas de glucosa-glicina o fructosa-glicina en presencia de sales de  $Fe^{+++}$  ó  $Cu^{++}$ , se forman pigmentos insolubles que actúan como agentes quelantes de estos cationes, y pueden influir en su utilización digestiva. El mecanismo inhibitorio podría relacionarse con que los iones  $Cu^{++}$  son fuertemente adheridos por las melanoidinas insolubles producidas en dichas mezclas (RENDLEMAN e INGLET, 1984); ya que esos compuestos se comportan como polímeros aniónicos, formando complejos moderadamente estables con el  $Cu^{++}$  y con  $Ca^{++}$ , de tal forma que al introducirlos en dietas para animales, podrían afectar la biodisponibilidad de los cationes (RENDLEMAN, 1987).

Datos experimentales, tanto en ratas como en humanos, confirman aspectos parciales del efecto de los productos de la reacción de Maillard favoreciendo la excreción urinaria de diversos cationes. Los primeros resultados proceden de las investigaciones de STEGINK y Col. (1977) al administrar intravenosamente mezclas de glucosa y distintos aminoácidos, esterilizadas conjuntamente, y ver que las excreciones urinarias de hierro, cobre y zinc eran mayores que cuando los individuos tomaban esas mismas mezclas vía oral o nasogástrica -resultados que fueron corroborados por FREEMAN y Col. (1975)- o cuando las mezclas de aminoácidos y glucosa se esterilizaban separadamente. Por ello propusieron que los productos de la reacción de Maillard serían responsables de la quelación de elementos traza a nivel metabólico y pensaron que tenían un efecto directo sobre los procesos reabsortivos del riñón.

La adición de productos de la reacción de Maillard a dietas para humanos y animales, o el empleo de alimentos que han sufrido dicha reacción, arrojan resultados dispares.

En humanos, JOHNSON y Col. (1983) y LYKKEN y Col. (1986) no encontraron cambios en las eliminaciones urinarias de hierro, cobre y zinc. Por el contrario, los resultados obtenidos en trabajos experimentales realizados con ratas alimentadas oralmente con dietas que contienen productos de la reacción, muestran elevadas excreciones urinarias de cationes; entre ellos el zinc suele ser el más comúnmente señalado (FURNISS y Col. 1986, 1989; FAIRWEATHER-TAIT y SYMSS, 1989; HURRELL, 1990), mientras que el calcio, el hierro y el cobre parecen menos modificados (HURRELL, 1990).

El incremento de la zincuria se ha atribuido a las premelanoidinas que podrían quelar al zinc en el intestino o después de su absorción y ser excretadas en la orina (FURNISS y Col., 1989); aunque también se especula que puedan tener un efecto directo sobre los procesos reabsortivos del riñón (FURNISS y Col., 1989; STEGINK y Col., 1977). Sin embargo, en opinión de los distintos autores, estas pérdidas urinarias no conducen a cambios en los niveles tisulares del zinc y coinciden al señalar que la biodisponibilidad del elemento no se modifica, lo cual explican al considerar que la eliminación de zinc por la orina es una ruta minoritaria de excreción en comparación con la fecal (HURRELL 1990, FAIRWEATHER-TAIT y SYMSS, 1989).

Además, FURNISS y Col. (1989) proponen que la homeostasis del elemento podría ser mantenida por pequeños cambios adaptativos en las pérdidas de zinc por heces, así como aumentando la absorción, y/o disminuyendo la excreción de zinc endógeno.

Aunque la mayor proporción de estos elementos se elimina por las heces, llama la atención que sólo existen escasas observaciones relativas a la influencia de los productos de la reacción de Maillard sobre los minerales a este nivel.

En ensayos "in vitro" ha podido verse que las muestras más oscurecidas ligaban más zinc y, tras la administración oral a voluntarios, se comprobó que las mejores absorciones del elemento se producían a partir de los productos menos coloreados, lo que achacaron a que los derivados de la reacción de Maillard fijaban

el zinc y consecuentemente lo hacen menos disponible para la absorción (LYKKEN y Col., 1986). Aunque HURRELL (1990) en un estudio similar realizado en ratas no encontró influencia alguna de estos compuestos sobre la excreción fecal de ningún mineral, tras el análisis crítico que realiza sobre los resultados de diversos autores, concluye que las premelanoidinas, absorbidas, son las responsables de las elevadas excreciones urinarias de zinc, mientras que las melanoidinas, no absorbibles, pueden disminuir su paso a través de la barrera intestinal y en consecuencia, aumentar su excreción fecal.

C) La influencia de la reacción de Maillard parece incluso extenderse hasta las vitaminas de los alimentos, aunque este aspecto ha sido poco estudiado. Sin embargo, existen evidencias de que las premelanoidinas pueden reaccionar y destruir ciertas vitaminas. Así, se han encontrado pérdidas moderadas de vitamina B<sub>6</sub> y tiamina en leches en polvo almacenadas a 60°C. La tiamina tiene un grupo amino y la vitamina B<sub>6</sub> o piridoxal un grupo aldehído y ambos podrían teóricamente participar en reacciones tipo Maillard. Al aumentar la temperatura a 70°C se produce una dramática destrucción de tiamina, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y ácido pantoténico que transcurre paralelamente con la degradación de la lactulosil-lisina y la aparición de productos de la reacción avanzada de Maillard, con lo que las vitaminas podrían haber reaccionado con las premelanoidinas formadas (FORD y Col., 1983).

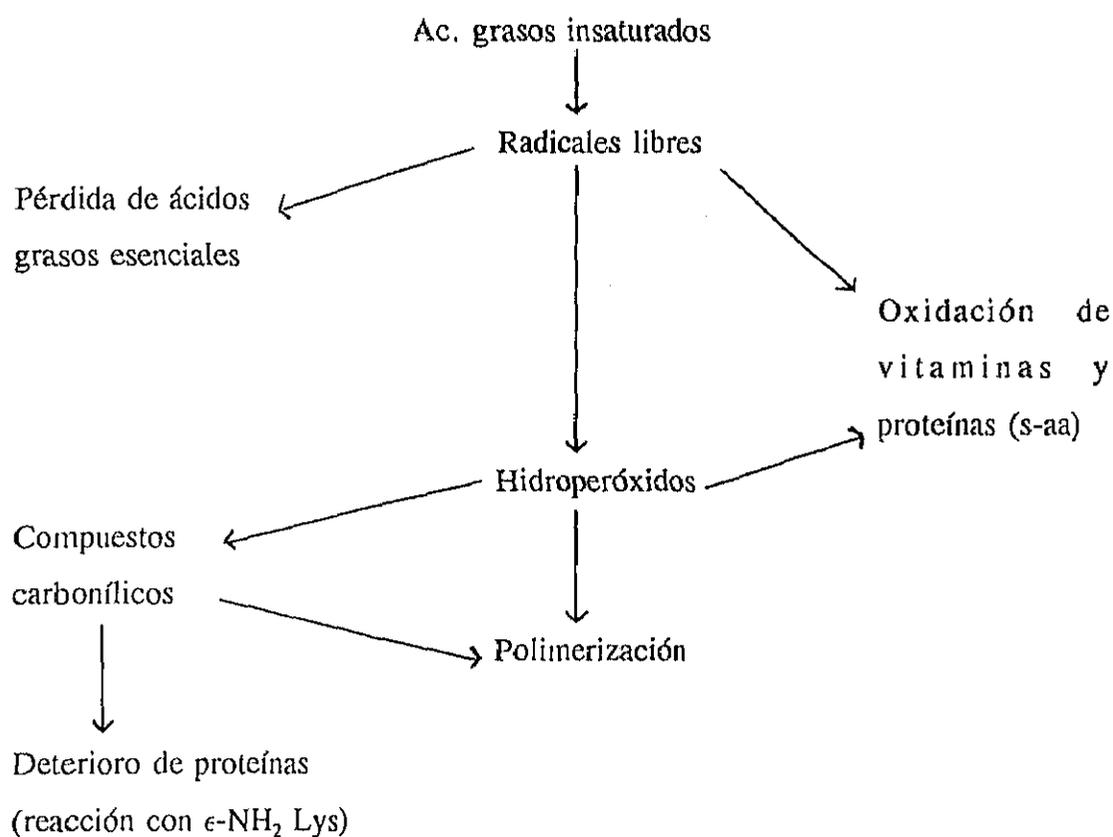
Los efectos no deseables de la reacción de Maillard no sólo se ciñen a pérdidas en el valor nutritivo de los alimentos sino que distintos autores han señalado la posible formación de sustancias antinutritivas o incluso tóxicas.

Igualmente se ha descrito actividad mutagénica y carcinogénica en los productos de la reacción (POWRIE y Col., 1981; O'BRIEN 1988; GAZZANI y Col., 1987; AESCHBACHER y Col., 1982, 1983; SUGIMURA, 1985). El potencial carcinogénico no ha sido perfectamente aclarado y, además, se contrapone al efecto anticarcinogénico encontrado por otros autores (KIM y Col., 1986).

Junto a todos estos efectos negativos, y a pesar de ellos, no podemos olvidar la importancia capital que tiene la reacción en el desarrollo de aromas y sabores,

factores determinantes en la elección de la dieta, así como en la aparición de color, que se anticipa a los anteriores en la selección de los alimentos. La reacción de Maillard proporciona un pardeamiento que es apreciado por el consumidor (pan, galletas, etc.) y participa en la formación de aromas, principalmente debido a los aldehídos formados en las distintas etapas de la reacción, y aunque estos aromas son apetecibles (torrefacción del café, maderización del vino, chocolate, etc.), es necesario considerar que pueden llegar a ser un elemento negativo en el caso de una insuficiente o excesiva reacción de Maillard.

#### 2.1.2.1.3.2. Mecanismo de oxidación lipídica e interacción con proteínas



MAURON (1977)

El deterioro de los alimentos mediante oxidación lipídica es especialmente importante en los que contienen grasas de naturaleza insaturada. La principal interacción lípido-proteína se plantea con los productos secundarios de carácter carbonílico procedentes de la autooxidación lipídica, que se incorporan al ciclo ya comentado de la reacción de Maillard.

Según MAURON (1985a), la oxidación de los lípidos insaturados sucede en 3 etapas:

- 1) Formación de radicales libres e hidroperóxidos
- 2) Degradación de hidroperóxidos a productos secundarios: aldehídos y cetonas.
- 3) Reacción de los productos secundarios para formar compuestos estables: ácidos carboxílicos y productos de polimerización.

La oxidación puede estar catalizada por iones metálicos y compuestos hemáticos, siendo los catalizadores mas fuertes el  $Fe^{++}$  y  $Cu^{++}$  (KE y ACKMAN, 1976). El efecto catalítico podría evitarse mediante la adición de etilendiaminotetracético (EDTA) que actuaría como quelante del hierro, reduciendo por tanto, la oxidación de la grasa (IGENE y Col., 1976); o bien, añadiendo al sustrato, en la etapa inicial de la reacción, un captor o quelante de oxígeno (AURAND y Col., 1977). Por el contrario, el calor, la luz y diversas reacciones aceleran el proceso.

Reacciones de los productos de oxidación de lípidos con proteínas han sido descritas teniendo lugar vía radicales libres (CHEFTEL 1977; GADNER, 1979; KAHYAT y SCHWALL 1983), aunque también los productos secundarios pueden reaccionar con las proteínas ya que algunos de ellos son bifuncionales y pueden dar lugar a la formación de enlaces cruzados (ej. formación de malonaldehído) y, aún más importante, pueden dar lugar a una reacción tipo Maillard con sus detrimentales efectos sobre el valor nutritivo de las proteínas, ya descritos (KIRK, 1984; MAURON, 1985a; FENNEMA, 1986).

Además, la oxidación lipídica disminuye la palatabilidad, destruye vitaminas y los peróxidos irritan la mucosa intestinal, provocando una disminución en la absorción, a lo que también contribuye la formación de polímeros no absorbibles, así como la destrucción de ácidos grasos, fundamentalmente insaturados, entre ellos, los esenciales (MAURON, 1985a, 1985b).

Puesto que el deterioro de los alimentos mediante oxidación lipídica es especialmente importante en los que contienen grasas de naturaleza insaturada, haremos una mayor incidencia sobre esta interacción en el capítulo correspondiente al procesamiento de pescados.

## 2.2. CASEINA - INTERACCIONES EN LAS QUE PARTICIPA- INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TERMICOS.

Los tratamientos térmicos y las interacciones entre nutrientes que en ellos se producen, van a tener una especial relevancia en la leche y productos derivados, ya que estos alimentos, durante una época de la vida, la lactancia, constituyen la única fuente de alimentación, de ahí que cualquier modificación pueda ejercer especiales secuelas. Además, debido a su alto contenido proteico así como de lípidos, hidratos de carbono y algunos minerales, en función de cómo se realicen estos tratamientos, se podrán producir una serie de interacciones que pueden conducir a una disminución en el valor nutritivo de los mismos.

### 2.2.1. Composición y estructura de la caseína

La composición de la leche de vaca en g/100 g. de alimento es la siguiente: sólidos totales 12,5, proteínas totales 3,4, grasa 3,6, lactosa 4,8 y cenizas 0,8. El nitrógeno total está constituido por: caseína 78%, proteínas del suero 17%, N<sub>2</sub> no proteico 5% (ALAIS y BLANC, 1975).

Queda claro que la caseína es la proteína mayoritaria, constituyendo más de las tres cuartas partes, por lo tanto, todas las modificaciones, bien sean estructurales o de composición, que en ella se produzcan por efecto del calentamiento, incidirán de forma acusada sobre el valor nutritivo de la leche o de las dietas que la contienen.

La caseína no es una entidad única sino que está constituida por un grupo de subunidades proteicas, asociadas y ligadas entre sí con iones orgánicos o inorgánicos, constituyendo las micelas (LÖNNERDAL, 1985). Estas subunidades proteicas, según su decreciente movilidad electroforética a pH 8,6, son:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  caseína (MELLANDER, 1939). La fracción  $\alpha$  es realmente compleja y distintos autores, trabajando en presencia de compuestos de tiol, encontraron un nuevo constituyente, la  $\kappa$ -caseína, que se forma a partir de la  $\alpha$ -caseína y esta última, se convierte en  $\alpha$ s-caseína de la cual se conocen distintas variantes, siendo la más

característica y estudiada la  $\alpha_s$  (NEELIN, 1964).

Las principales características fisico-químicas de estas subunidades se recogen en el cuadro siguiente:

	<u><math>\alpha_s</math>-caseína</u>	<u><math>\beta</math>-caseína</u>	<u><math>\kappa</math>-caseína</u>	<u><math>\gamma</math>-caseína</u>
% en la caseína	40	30	15	5
Pm (daltons)	23.600	24.200	20.000	21.000
n <sup>o</sup> Aminoácidos (residuos/mol.)	199	209	165	181
% Fósforo (átomos/mol)	1,10	0,56	0,22	0,10
% Glúcidos	0	0	5	0
% Cisteína	0	0	1,4	0
Solubilidad a 20°C en presencia de calcio	insoluble	insoluble	soluble	insoluble
Punto isoelectrico	4,1-4,5	4,1-4,5	4,1-4,5	5,8-6,4

ALAIS y BLANC (1975).

Composición aminoacídica de las fracciones en número de residuos por molécula

	$\alpha S_1$	$\beta$	K	$\gamma$
Ac. aspártico	15	9	12	7
Treonina	5	9	14	8
Serina	16	16	12-13	11
Ac. glutámico	39	39	27	32
Prolina	17	35	20	34
Glicina	9	5	3	4
Alanina	9	5	13-14	5
Cisteína (mitad)	0	0	2	0
Valina	11	19	10-11	17
Metionina	5	6	2	6
Isoleucina	11	10	11	7
Leucina	17	22	8	19
Tirosina	10	4	8	4
Fenilalanina	8	9	4	9
Triptófano	2	1	1	1
Lisina	14	11	9	10
Histidina	5	5	3	5
Arginina	6	4	5	2
Peso molecular	199	209	163-166	181

ALAIS y BLANC (1975)

Las subunidades  $\beta$  y  $\alpha_s$  tienen un peso molecular parecido y un alto contenido en prolina y ácido glutámico. Por el contrario, no contienen ni cisteína ni glúcidos. Ambas proteínas son calcio sensitivas a 20°C y son estabilizadas por la  $\kappa$ -caseína para que no precipiten en presencia del mismo. Sin embargo, la subunidad  $\beta$  es soluble en presencia de calcio a baja temperatura.

La  $\alpha_{s1}$  caseína contiene 9 átomos de fósforo por molécula y la  $\beta$ -caseína únicamente cinco.

La  $\gamma$ -caseína es el componente que presenta un movimiento electroforético más lento, es la fracción más soluble en varios reactivos y únicamente contiene un átomo de fósforo por molécula. Su composición aminoacídica es muy similar a la de la fracción  $\beta$  y para GREENBERG y Col. (1984), las fracciones  $\gamma$ -caseínas son fragmentos proteolíticos de la  $\beta$ -caseína. Su solubilidad a 20°C en presencia de calcio no está clara.

La fracción  $\kappa$  es soluble en presencia de calcio a todas las temperaturas, juega un papel esencial en la estabilización de la micela de caseína y estabiliza a las fracciones  $\alpha_s$  y  $\beta$ , impidiendo su precipitación por adición de calcio. Es un sustrato específico para la renina, ya que este enzima no ataca ni a la fracción  $\alpha_s$  ni a la  $\beta$  durante la fase enzimática primaria de la coagulación. Es, además, la única fracción que contiene cisteína y carbohidratos y un contenido en hidroxiaminoácidos superior al de las fracciones  $\alpha_s$  ó  $\beta$ . ALAIS y JOLLES (1961) confirmaron la presencia de galactosa, galactosamina y ácido siálico en esta fracción y YAMAUCHI y Col. (1981) encontraron, además, fucosa y N-acetilglucosamina.

El mecanismo de interacción entre las subunidades de caseína, así como la estructura de los micelas, no son muy conocidos. MACKINLAY y WAKE (1965) señalaron que la presencia de  $\kappa$ -caseína es necesaria para la formación de la micela y que sus propiedades estabilizadoras parecían ser independientes del contenido de carbohidratos.

En la micela, además de las subunidades de caseína, hay también fosfato inorgánico que está presente en dos formas distintas: como residuos de fosfoserina y fosfotreonina o como pirofosfato, en un enrejado formado por proteínas, aminoácidos fosforilados, cationes divalentes y citrato (LÖNNERDAL, 1985).

Los principales factores que influyen el tamaño de la micela son el calcio soluble total y la proporción de fracción  $\kappa$  en la caseína. La concentración de citrato tiene un efecto indirecto, y el calcio iónico no está significativamente relacionado con el diámetro medio micelar (ROSE y CALVIN, 1966).

Sobre la estructura de las micelas existen distintas hipótesis. WAUGH y NOBLE en 1965 indicaban que la  $\kappa$ -caseína estaba situada en la superficie de la micela estabilizando un núcleo interno constituido por las otras fracciones. Modelos similares fueron planteados por PAYENS 1966 y MORR 1967.

RIBADEAU-DUMAS y GARNIER (1969), propusieron que la micela tenía una estructura floja, suelta, que permitía la penetración de moléculas con Pm inferior a 35.000 daltons. La fracción  $\kappa$  no estaría necesariamente situada en la superficie sino que estaría distribuida uniformemente por toda la micela. ROSE (1969), propuso un modelo intermedio, la fracción  $\kappa$  estaría fundamentalmente en la superficie pero también aparecerían cantidades menores distribuidas en el interior y el complejo estaría estabilizado por enlaces coloidales calcio-fosfato.

### 2.2.2. Caseína y disponibilidad de minerales

Distintos minerales aparecen unidos a estas micelas de caseína en mayor o menor cuantía. Así, en los productos lácteos 2/3 del calcio total, 1/3 del magnesio, 1/4 del hierro, de 2/4 a 3/4 del cobre y un 95% del zinc aparecen asociados a las micelas (FLYNN y POWER, 1985). Distintos autores han encontrado cantidades muy similares de estos elementos, y coinciden en señalar que pueden estar directamente ligados a las caseínas o asociados al fosfato cálcico coloidal, incorporado dentro de las mismas (HAZELL, 1985; LÖNNERDAL, 1985; ABRAMS y Col., 1990).

No todas las fracciones de la caseína presentan la misma capacidad para ligar a los minerales, sino que la fracción  $\alpha_s$  parece ser la de mayor afinidad por el zinc, once átomos de zinc/mol, seguida de la fracción  $\beta$ , 8 átomos de zinc/mol y la  $\kappa$ , 1-2 átomos de zinc/mol. Además, se ha comprobado que mediante una defosforilación enzimática de la fracción  $\alpha_s$ , se reduce considerablemente la capacidad de ligar zinc, lo cual ha llevado a pensar que sean los restos de fosfoserina los principales implicados en esta unión. Por otra parte, se ha constatado que existe una competencia entre el calcio y el zinc por fijarse a la fracción  $\alpha_s$ , lo cual indica que los lugares de ligamiento para estos 2 metales son idénticos (SINGH y Col., 1989).

En lo que se refiere a la biodisponibilidad de estos elementos, asociados a las micelas de caseína, son numerosos los autores que coinciden en señalar una biodisponibilidad disminuida de hierro, cobre y zinc. Así, la mayor absorción del zinc de la leche humana respecto al de la leche de vaca, se ha achacado al alto contenido en caseína de esta última, a la presencia de aminoácidos fosforilados y de fosfato cálcico coloidal, forma que interferiría con la absorción de zinc (SANDSTRÖM y Col., 1983).

Por ello, el hecho de encontrar un 63% del zinc en leche desnatada, asociado con fosfato calcico coloidal, se ha relacionado con la pobre biodisponibilidad del zinc en esta leche (SINGH y Col., 1989).

LÖNNERDAL (1985) profundiza en los estudios de biodisponibilidad y atribuye la baja biodisponibilidad del hierro, cobre y zinc en productos lácteos a sus uniones con grupos fosfato de la caseína cargados negativamente. A ello habría que añadir, como otro factor negativo, el pobre contenido en cisteína de las caseínas, ya que únicamente la fracción  $\kappa$  presenta un grupo disulfuro por molécula (LAYRISSE y Col., 1968; ROTH y KIRCHGESSNER, 1985).

Por último, hay que considerar también que la digestión de la caseína da lugar a la formación de unos macrofosfopéptidos que pueden interactuar con los minerales formándose unos ligandos entre el péptido y los cationes que pueden disminuir la absorción de minerales. En este sentido, estudiando la influencia de

distintos tipos de proteínas sobre la biodisponibilidad del hierro, se ha encontrado que la proteína que más inhibe su diálisis "in vitro" es la caseína, de lo cual se responsabiliza a los productos de la digestión proteica que ligan fuertemente al hierro impidiendo su diálisis. Cuando la caseína se hidroliza antes de incluirla en la dieta, el nivel de hierro dializable aumenta (HURRELL y Col., 1989).

NAITO y Col. (1974) vieron que, tanto durante la digestión de la caseína "in vitro" con pepsina y tripsina, como en la digestión "in vivo" en la rata, se formaban grandes fosfopéptidos que podían ligar al hierro y a otros cationes en el duodeno, manteniéndolos solubles pero no disponibles.

Sin embargo, estos macrofosfopéptidos, formados durante la digestión de la caseína, no influyen siempre negativamente sobre la digestibilidad de todos los minerales sino que, en el caso del calcio, la mejoran y favorecen su incorporación al hueso, (SATO y Col., 1986). La presencia de estos compuestos en el lumen inhibe la precipitación del fosfato cálcico y su adición a una dieta con proteína de soja, aumenta casi proporcionalmente la solubilidad del calcio intraluminal (NAITO y Col., 1989). Esta afirmación se demostró en ratas alimentadas con dietas que contenían caseína defosforilada, al comprobar que la cantidad de calcio soluble en la parte inferior del intestino delgado era menor que cuando ingerían caseína no tratada, por lo que señalaron que el efecto de los fosfopéptidos de caseína no era estimular directamente a la mucosa para favorecer la absorción del calcio, sino promover indirectamente su absorción, al aumentar la concentración del elemento soluble, inhibiendo la precipitación de las sales de calcio en el intestino delgado (SATO y Col., 1983).

### 2.2.3. Efecto del calentamiento

La caseína, al igual que el resto de proteínas contenidas en distintos alimentos, va a sufrir una serie de modificaciones cuando es sometida a tratamientos térmicos. Así, como se ha descrito anteriormente, será susceptible de sufrir desnaturalización, alterándose su estructura nativa; pueden formarse isopéptidos, al crearse nuevos enlaces peptídicos entre las funciones reactivas descubiertas al

desplegarse las cadenas polipeptídicas o por ruptura de enlaces preexistentes; e incluso, si el calentamiento es excesivo, se puede producir una destrucción de los aminoácidos que la componen. Igualmente, podrá reaccionar con azúcares reductores o con el grupo carbonilo de lípidos oxidados y dar lugar a los productos resultantes de la reacción de Maillard.

Los efectos que los distintos tratamientos térmicos ejercen sobre la caseína y sus repercusiones sobre su valor nutritivo han sido estudiados por diversos autores. Los trabajos demuestran que la proteína a temperaturas superiores a 100-120°C no sufre ninguna modificación en lo que a composición aminoacídica se refiere, pero cuando la temperatura sobrepasa esos valores, o bien a temperaturas más bajas pero en presencia de azúcares reductores, se van a producir una serie de modificaciones, acompañadas de pérdidas de aminoácidos que reducen considerablemente su valor nutritivo (SMITH y FRIEDMAN, 1984).

En una experiencia realizada en ratas con caseína calentada a 121°C se observó que la ingesta, peso ganado, PER (eficacia proteica para el crecimiento), digestibilidad aparente y niveles plasmáticos de lisina y metionina eran menores que cuando las ratas se alimentaban con caseína no tratada, pérdidas que se incrementaban a medida que aumentaba el tiempo de calentamiento. Se vio también que cuando el calentamiento se producía en presencia de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa) las disminuciones eran más rápidas y mayores (KNIPFEL, 1975).

Por el contrario, FRIEDMAN y Col. (1988) no encontraron diferencias en peso ganado, PER y digestibilidad proteica en ratas alimentadas con caseína no calentada, calentada a 37°C durante diez días sola o en presencia de glucosa, ni en caseína sola o en presencia del azúcar reductor calentada a 120°C durante una hora. Los efectos negativos, sin duda, parecen estar ligados a la temperatura y ser proporcionales a ella, ya que cuando la caseína sola o en presencia de glucosa se calentaba a 180°C una hora, sí se producía una reducción considerable en el incremento de peso de las ratas, en el PER y en la digestibilidad proteica; y si el calentamiento llegaba a 240°C, la ganancia de peso y el PER presentaban valores negativos y la reducción en la digestibilidad proteica, era drástica. En el mismo

sentido, mediante ensayos de suplementación se demuestra que la caseína calentada a 180°C conserva sus características para favorecer la evolución ponderal de los animales al mismo nivel que la caseína no tratada, mientras que si la temperatura alcanza los 200 °C pierde su capacidad nutricional y su adición sobre la dieta basal no representa ningún beneficio en favor del crecimiento (ZIDERMAN y Col., 1988).

Por efecto de los tratamientos térmicos se han descrito importantes cambios en la composición aminoacídica de la caseína, aunque los autores no se ponen de acuerdo en la cuantía de la pérdida. Parece que no todos los aminoácidos se afectan de igual manera, sino que algunos de ellos son mucho más sensibles y lo hacen de forma más acusada. Además, el deterioro depende de la temperatura, así como de la presencia de azúcares reductores, desencadenantes de la reacción de Maillard.

Otro factor a tener en cuenta es el contenido de humedad, de ahí que cuando se calientan caseínas con distinto contenido en agua (4% u 80%) a 90°C durante veinticuatro horas, sola o en presencia de glucosa, se observa una considerable reducción en la disponibilidad de la metionina, lisina, alanina y cisteína fundamentalmente, pérdidas que aumentan al incrementarse el contenido en agua de la muestra, así como cuando el calentamiento se realiza en presencia de glucosa. La disminución en el contenido total de aminoácidos, es mucho menor, y la adición de glucosa duplica la destrucción de la lisina pero no afecta a las pérdidas de otros aminoácidos (PIENIAZEK y Col., 1975).

Este efecto de los carbohidratos, sobre la composición aminoacídica de la caseína calentada a diferentes temperaturas, ha sido tratado por diversos autores. Se ha visto que a 37°C durante 10 días, la caseína sola o en presencia de sacarosa no ofrece cambios. Sin embargo, cuando el azúcar es glucosa, se observa ya una disminución en la lisina. Al aumentar la temperatura a 121°C durante una hora, la caseína aislada no cambió pero si va acompañada de cualquiera de los dos azúcares, tienen lugar fuertes pérdidas de lisina y más moderadas de arginina. A esta temperatura se produce el desdoblamiento de la sacarosa en glucosa y fructosa, con lo que ya se origina la reacción de Maillard, comprometiéndose fundamentalmente

el grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lisina.

Al aumentar la temperatura a 200°C se observa una disminución en el contenido de lisina de todas las muestras, pero esta caída es menor que la que se produce a 121°C en presencia de los azúcares. A esta temperatura se produce también una reducción en la cantidad de serina.

A 300 °C se altera drásticamente la composición de todos los aminoácidos y muchos de ellos son totalmente destruidos, fundamentalmente cuando el calentamiento se hace en presencia de glucosa (SMITH y FRIEDMAN, 1984).

En lo que se refiere a la cuantía de la destrucción, los autores no se ponen de acuerdo y así, en mezclas calentadas de caseína y glucosa, se han descrito pérdidas del 71% para la lisina y leucina, 72% para la treonina e isoleucina y del 78% para la metionina (CHICHESTER, 1973). Otros autores encuentran para la misma mezcla, almacenada a 37°C durante 5 días, un 66% de la lisina inactivada, pero si permanece 30 días a la misma temperatura, las pérdidas llegan a ser del 90% para la lisina, 70% para la arginina, 50% para la metionina y 30% para la tirosina (LEA y HANNAN, 1949).

La biodisponibilidad de los minerales se va a ver alterada o modificada por la aplicación de tratamientos térmicos, pues como ya hemos señalado anteriormente, aunque estos elementos sean bastante estables a dichos tratamientos, no lo van a ser otros constituyentes del alimento o de la dieta en la que se encuentran, lo que puede dar lugar a una serie de interacciones que van a modificar la disponibilidad de los minerales y conllevan normalmente a una merma de la misma.

En el caso concreto de las modificaciones producidas en la caseína calentada y, como éstas, repercuten sobre la biodisponibilidad mineral, muy pocos estudios se han llevado a cabo cuando la proteína se procesaba aisladamente, siendo muchos más numerosos aquellos que se basan en el calentamiento en presencia de distintos azúcares, prestando una mayor atención a las modificaciones que se producen a nivel proteico, olvidando, en la mayoría de los casos, su influencia sobre la

biodisponibilidad mineral.

El calentamiento produce una serie de cambios en la estructura micelar y, por lo tanto, se originan modificaciones cuantitativas y cualitativas en los minerales ligados a las micelas. Sin embargo, de la naturaleza de estos cambios y de las repercusiones sobre la biodisponibilidad, no se sabe nada.

Cuando esta caseína calentada se introduce en una dieta, sus propios cambios van a modular su interacción con los componentes, sobre todo, si consideramos que pueden variar su composición aminoacídica, sus productos de digestión, etc. Tampoco acerca de esto último se sabe mucho, ni en sistemas modelos, ni en leche ni productos lácteos.

### 2.3. PESCADO GRASO (SARDINA) - INFLUENCIA SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD MINERAL - FRITURA.

El pescado es una importante fuente de nutrientes, un alimento tan viejo como el hombre, para el que ya las culturas primitivas desarrollaron las primeras teorías de conservación: salado, secado, ahumado, etc. No obstante, en los países occidentales y hasta fechas recientes, el pescado se ha considerado, según ambientes, como alimento de cuaresma o de personas enfermas, incluso el pescado azul ha sido, hasta hace muy poco tiempo, el alimento de los grupos de población de escasos recursos económicos.

Ultimamente, esta idea ha ido cambiando y en la actualidad la importancia del pescado crece, además de por su valor nutritivo en general, por el papel de su grasa en los problemas de aterosclerosis, papel, que como es bien conocido, se atribuye a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y dentro de éstos a la familia de PUFA W-3 que disminuyen la concentración de triglicéridos en plasma, tanto en sujetos normales como en hipertrigliceridémicos (GOODNIGHT y Col., 1982; SANDERS, 1985; NESTEL, 1986).

La sardina es rica en ácidos grasos de la serie W-3, fundamentalmente en eicosapentaenoico (EPA), el cual parece tener una gran acción antiagregatoria ya que interfiere en el metabolismo de prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos (LANDS, 1986; KINSELLA, 1987).

A pesar de todos estos aspectos beneficiosos una dieta occidental típica sólo contiene del orden de unos 20 g. de pescado por día, frente a la de los japoneses que llega a los 100 g/día, e incluso frente a la española, de 72g/día (VARELA y Col., 1985).

Desde el punto de vista nutritivo el pescado es de los alimentos más completos por la calidad y cantidad de los nutrientes que aporta. Por ejemplo, una ración media de un pescado magro como la pescadilla, con un contenido energético bajo, cubre más del 50% de la ingesta recomendada (RD) de proteína, el 10-20%

de muchos minerales y cantidades muy variables de las vitaminas hidrosolubles, que dependen especialmente del tratamiento al que el pescado se somete antes de ingerirlo. (NAVARRO, 1991a). Si esta misma ración es de pescado graso, por ejemplo sardinas, la cuantía y variedad de las recomendaciones satisfechas resulta aún mayor: el aporte energético aumenta, la proporción de proteína y minerales es igual o levemente superior y la cantidad suministrada de vitaminas supera aproximadamente un 17% de las RD de vitamina A y sobrepasa el 100% de la cantidad establecida para la vitamina D (MOREIRAS-VARELA y RUIZ-ROSO, 1986).

### 2.3.1. Características de la especie

La sardina "*Clupea pilchardus*", es una de las especies de pescado de mayor importancia en nuestro país, siendo el volumen de captura en el año 1991 de 91.680 Tm (FROM). Pertenece a la subclase Teleosteos, familia clupeidos. Su vida se desarrolla constantemente en el mar. Su tamaño varía según que proceda del Mediterráneo, de trece a quince centímetros, o del Atlántico, de dieciocho a veintidós centímetros. En general, las hembras tienden a ser mayores que los machos y la distribución por sexos es paritaria. La reproducción es fundamentalmente invernal, con un auge fértil entre Diciembre y Febrero.

La sardina es una especie gregaria, errática y tiene costumbres migratorias, formando grandes bandos. Al principio se alimenta de fitoplancton, pero, a medida que va creciendo, busca también el zooplancton y, cuando es adulta, se alimenta de todo tipo de plancton.

### 2.3.2. Contenido en nutrientes

Es muy difícil generalizar y establecer unos valores medios para el contenido en nutrientes del pescado en general y de la sardina en particular, ya que depende de la especie y variedad concreta de que se trate y, dentro de ella, de una serie de factores entre los que cabe destacar: sexo y ciclo biológico, localidad y estación del

año en que se realiza la captura, abundancia de nutrientes en el hábitat, temperatura y salinidad del agua, parte del animal analizado, etc. (GARCIA-ARIAS, 1989).

Siempre se ha sostenido que la carne de los pescados hembras es más rica en proteína que la de los machos, pero según BORGSTROM (1961), parece ser que influye más el estadio de madurez sexual.

Frecuentemente la carne tiene el máximo de grasa antes del desove, aunque es difícil saber si esto se debe a la actividad sexual o al hecho de que los animales durante este período no ingieran alimentos. En un estudio realizado, a lo largo de un año, en 10 tipos diferentes de especies marinas, se encontraron amplias variaciones mensuales tanto de composición en macronutrientes como en la calidad de la proteína (MOREIRAS TUNI, 1966). Las diferencias más importantes se observaron en la cantidad de grasa. Concretamente en la sardina este contenido variaba entre 2,27 y 15,92 en los meses de marzo y septiembre respectivamente.

VARELA y Col. (1990) describen para el mismo pescado un 20,3% de contenido lipídico en verano y un 5,4% en invierno, observando variaciones porcentuales de PUFA W-3 especialmente de C 20:5 el cual pasa de 4,62% en invierno a 11,7% en verano; mientras que otros ácidos grasos, tales como C 22:6 disminuyen.

Sin embargo, el porcentaje de proteína parece que permanece más estable a lo largo del tiempo, lo que apuntaría a que no hay interdependencia entre los contenidos de grasa y proteína. Por el contrario si se detecta una relación inversa entre el agua tisular y la grasa. Así, para el agua el rango de variación encontrado fue de 75,5-62,8 %, para la proteína 18,2-15,9% y en los minerales de 4,0-2,5%.

Los datos referentes a la influencia de las variaciones estacionales sobre la calidad de la proteína son más uniformes e indican que durante el invierno aparece una mejora en la calidad, siempre buena, de su proteína, tanto a nivel digestivo como metabólico (MOREIRAS TUNI, 1966).

### 2.3.2.1. Compuestos nitrogenados

El contenido total de nitrógeno en el pescado fresco varía de unas especies a otras en función de factores fisiológicos, ambientales, etc., pero en la mayor parte está comprendido entre 2,75-3,5%. En la sardina, el contenido en N<sub>2</sub> total es muy elevado, del 3,79% (PAUL y SOUTHGATE, 1978).

Este valor es la suma del N<sub>2</sub> constituyente de la proteína, que sin duda es el que tiene verdadero valor alimentario, más el nitrógeno no proteico en el que se incluyen sustancias diversas como aminoácidos libres, urea y bases nitrogenadas volátiles, que se forman por descarboxilación y desaminación de aminoácidos y bases orgánicas.

El N<sub>2</sub> no proteico es mucho más importante en el pescado que en la carne, y aunque su valor alimenticio es escaso, algunos autores lo señalaron hace ya mucho tiempo (CAMPBELL, 1935), como estimulante de la secreción gástrica, y desde luego, tiene una gran importancia como indicador del grado de frescura o alteración de los pescados y, por lo tanto, de su calidad y estado de conservación.

#### 2.3.2.1.1. Contenido en proteína

El N<sub>2</sub> proteico es la fracción más importante del N<sub>2</sub> total, suele suponer en la mayor parte de las especies más del 85% (PEREZ MARTIN, 1986).

En la sardina el porcentaje de proteínas oscila entre un 21,1% (GEIGER y BORGSTROM, 1962) y 23,7% (PAUL y SOUTHGATE, 1978).

Según estos datos, la sardina es un alimento esencialmente proteico, al mismo nivel que la carne de mamíferos: cerdo, cordero y ternera, que contienen también aproximadamente el 20,5% de proteína en el alimento, de ahí la importancia de estudiar su calidad.

### 2.3.2.1.2. Calidad proteica

La calidad nutritiva de una proteína, aparte de su accesibilidad a la digestión, es función de los aminoácidos que la integran, de forma que su valor biológico será tanto mayor, cuanto más se parezca su perfil aminoacídico al de la proteína tisular.

Si comparamos la proteína de la sardina con la proteína del huevo, considerada como patrón para el hombre adulto, no aparecen variaciones acusadas; sus aminoácidos esenciales, que son los de verdadero interés nutritivo, presentan unos valores próximos, en los que cabe destacar las deficiencias, no demasiado acusadas, de azufrados, valina, fenilalanina y triptófano y el alto contenido en lisina y, sobre todo, en histidina. Estas desviaciones positivas y negativas aparecen también en la carne (NAVARRO, 1991 a).

Ensayos biológicos han demostrado "in vivo" la alta calidad nutritiva de esta proteína que ya se desprendía de su patrón aminoacídico. La proteína de la sardina se digiere muy bien. Así EL RAWI y GEIGER ya en 1952 observaron que las proteínas de sardina, atún y bacalao eran todas igualmente bien digeridas y absorbidas. En concreto para la sardina, se han descrito valores de digestibilidad aparente del 90,3% y del 93% (NAVARRO y Col., 1987; RUIZ-ROSO, 1983).

Los resultados de valor biológico señalan su gran calidad e indican que la carne de la sardina es metabolizada con gran eficacia, de tal forma que al incluirla al 9% como fuente proteica en la dieta de animales, se obtuvo un valor biológico 50% más elevado que cuando como fuente proteica se empleó caseína, aunque no se señala si ésta iba suplementada con el aminoácido metionina (DEVEL y Col., 1946).

Resultados más recientes de la bibliografía sitúan los valores de valor biológico entre 80-90%, indistintamente para la proteína de pescado graso o magro, y, en concreto para la sardina, de 88,6% (NAVARRO y Col., 1987).

Como consecuencia de su digestibilidad y metabolización, la utilización

nutritiva global de la proteína de pescado en general y sardina en particular, muestra altos valores de NPU (utilización neta de la proteína), lo que revela el gran valor nutricional de esta fuente proteica. Así, se han encontrado valores de NPU de 79,9% y 62% (NAVARRO y Col., 1987; PEREZ ALVAREZ-QUIÑONES, 1990).

Esta característica se manifiesta igualmente en su buena capacidad para mantener el crecimiento, con unas cifras de PER similares o incluso superiores a las del patrón caseína-DL-metionina. (CASTRILLON y Col., 1984, 1987; NAKAJIMA y Col., 1988).

#### 2.3.2.2. Lípidos

La grasa es el componente de cuantía más variable entre las especies de pescado, oscilando, como decíamos, dentro de márgenes amplísimos. En este sentido, son muy acusadas las variaciones estacionales de la sardina, cuya proporción en grasa varía, según los distintos autores, desde un 1% en los meses de enero y febrero hasta un 27% durante los meses de julio y agosto.

La grasa de la sardina, como la de otros pescados, se caracteriza por ser fuertemente insaturada y así, el aceite de sardina tiene un índice de yodo medio próximo a 185. Al lado de algunos ácidos grasos saturados, hay que destacar la presencia de grasas monoinsaturadas y, sobre todo, la riqueza en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

En el siguiente cuadro aparecen los valores obtenidos por distintos autores, para los ácidos grasos mayoritarios en la sardina cruda, expresados en g/100 g de grasa:

	<u>C16:0</u>	<u>C18:0</u>	<u>C18:1</u>	<u>C20:5</u>	<u>C22:6</u>
REMOLI (1968)	23,9	1,6	-	8,6	19,5
HARWOOD y Col. (1975)	16,2	3,5	11,4	16,9	12,9
SEN y Col. (1977)	-	2,3	-	13,2	-
ACKMAN (1982)	17,8	3,6	13,0	11,0	13,0
MEDINA (1986)	27,3	9,5	20,2	4,6	16,0
HEARN y Col. (1987)	14,5	4,9	15,4	11,5	25,8
PEREZ ALVAREZ- QUIÑONES (1990)	27,3	3,5	20,7	11,2	5,4

Tomado de PEREZ ALVAREZ-QUIÑONES (1990)

Con vistas a su relación con los problemas sanitarios, no sólo hay que considerar la cantidad total de PUFA, sino también el contenido en ácidos grasos de las familias W3 y W6 y la proporción que guardan entre sí (SINGER y Col., 1983; HEROLD y KINSELLA 1986), ya que los efectos beneficiosos, tanto en lípidos sanguíneos, como en lípidos de membranas celulares, han sido atribuidos a una relación disminuida de PUFA W6/W3 (HUANG y Col., 1986).

A este respecto, en la sardina, la suma del eicosapentaenoico (EPA) que contiene 20 átomos de carbono y 5 dobles enlaces (C20:5 W3) y el docosahexaenoico (DHA) con 22 átomos de carbono y 6 dobles enlaces (C22:6 W3), componentes más importantes de la familia W3, suponen más del 40% de los ácidos grasos totales y la relación W6/W3 es de 0,08, relación extremadamente baja, lo que hace que sea considerada como una especie óptima en la prevención del riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Estos y otros factores han de ser tenidos en cuenta para explicar el papel que ya se le reconoce al pescado en la prevención y tratamiento de las enfermedades

cardiovasculares, ya que numerosos datos epidemiológicos y experimentales en hombres y animales, clásicos ya, han puesto de manifiesto que mediante manipulaciones dietéticas, que afectan fundamentalmente a la cantidad y calidad de la grasa, puede modificarse el espectro lipídico plasmático y, por esta vía, estimular o inhibir el proceso aterosclerótico. Así, dietas ricas en colesterol y en grasas saturadas elevan el colesterol plasmático, mientras que la grasa poliinsaturada lo reduce, disminuyendo así mismo las concentraciones de LDL, VLDL y tienen un efecto variable sobre las de HDL (GOODNIGHT y Col., 1982).

#### 2.3.2.3. Vitaminas

Uno de los valores más positivos del pescado, desde el punto de vista alimentario, es su contenido en vitaminas aunque algunos autores, como BENDER (1978a), consideran que los pescados no son una fuente preferente de vitaminas hidrosolubles. En los tratados de vitaminas los señalan como cualificados aportes de B<sub>2</sub> y nicotinamida. La sardina en concreto aporta respectivamente 0,25 mg y 9,7 mg por 100 g de porción comestible (SOUCI y Col., 1981).

Por otra parte, para el contenido de B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> en sardina se describen valores de 0,02 mg, 0,96 mg y 0,14 mg. La riqueza en ácido fólico se aproxima a 8 mg por 100 g de porción comestible (ANDUJAR y Col., 1983).

Sin duda, en el campo de las vitaminas debe resaltarse que estas especies son ante todo, fuentes de vitaminas liposolubles. El contenido medio de vitamina D para la sardina es de 7,5-8 mg por 100 g de porción comestible (ANDUJAR y Col., 1983; SOUCI y Col., 1981; PAUL y SOUTHGATE, 1978).

Los valores señalados para la vitamina A oscilan en torno a 0,02 mg por 100 g de porción comestible (SOUCI y Col., 1981).

La carne de pescado es también buena fuente de vitamina E y, aunque su contenido guarda cierta interconexión con el de grasa, no existen grandes diferencias entre el pescado magro y graso. En este sentido KINSELLA (1987) observa que la

concentración de vitamina E por gramo de grasa decrece a medida que ésta aumenta en el pescado y PAUL y SOUTHGATE (1978) encuentran para la sardina 0,30 mg/100 g de porción comestible.

#### 2.3.2.4. Minerales

A pesar de que el pescado es una importante fuente de minerales, en su conocimiento no se ha profundizado tanto como en el caso de la proteína. En la década de los cincuenta no se conocían los límites de variación normales de dicha composición mineral, ni la utilización de estos constituyentes. Actualmente, en las tablas de composición de alimentos aparece ya la composición mineral de las distintas especies, pero todavía se observan muchas lagunas en los elementos minoritarios; algunas como la del yodo, resultan especialmente significativas, ya que el pescado es una de las mejores fuentes de este nutriente.

El contenido de cenizas en el pescado muestra amplias oscilaciones entre especies. Aún así puede indicarse que las cenizas están constituídas mayoritariamente por potasio, seguido de fósforo, sodio, cloro, magnesio, calcio y luego, en cantidades que normalmente se aproximan o no alcanzan el mg/100 g alimento, el hierro, zinc, cobre y yodo por este orden (PAUL y SOUTHGATE, 1978; SOUCI y Col., 1981; ANDUJAR y Col., 1983). De los restantes elementos existe escasa o nula información. En el siguiente cuadro se muestra la composición mineral de la sardina, recogida en distintas tablas de composición de alimentos (mg/100 g porción comestible).

	<u>Na</u>	<u>K</u>	<u>Ca</u>	<u>Mg</u>	<u>P</u>	<u>Fe</u>	<u>Cu</u>	<u>Zn</u>	<u>S</u>	<u>Cl</u>	<u>I</u>
PAUL Y SOUTGATE (1978)	650	430	550	52	520	2,9	0,19	3,0	310	1000	-
SOUCI y Col. (1981)	100	-	85	24	258	2,4	0,17	-	-	-	0,013
ANDUJAR y Col (1983)	-	-	43	29	-	1,1	-	0,5	-	-	0,016

#### 2.3.2.4.1. Calcio y Fósforo

Los contenidos de calcio y fósforo muestran amplias variaciones entre especies, de forma más acusada el del calcio. El pescado es una importante fuente de calcio, aunque su riqueza en fósforo supere con amplitud la del calcio. No obstante, este desequilibrio es mucho más acusado en la carne de mamíferos, de ahí que, respecto a ella, el pescado sea un alimento mucho más equilibrado en estos componentes. De hecho, la relación calcio/fósforo en los pescados oscila entre 0,03-0,7 con unos valores medios de 0,2-0,3.

En la sardina entera, como podemos deducir por la tabla, la relación calcio/fósforo es óptima, siendo prácticamente igual a uno lo cual garantiza la buena utilización de estos minerales.

Además, es necesario señalar que si el pescado se consume entero, como en el caso de las sardinas enlatadas, éstas constituyen una importante fuente de calcio para el hombre (BENDER, 1978).

En cuanto a la biodisponibilidad de este elemento, en el pescado en general y en la sardina en particular, prácticamente no existe información en la literatura científica. Un trabajo ya antiguo, realizado en ratas jóvenes, demostró que el calcio aportado en la dieta por sardinas frescas, o polvo de leche, era retenido en proporciones de 94,7 y 93,8 % respectivamente, es decir, con igual efectividad

(LUNDE y LIE, 1940).

BASU y Col., (1942) administrando 70 g. de pescado entero elevaron la ingesta cálcica de individuos que estaban ingiriendo una dieta de arroz, logrando así ingestas diarias de 577 mg de calcio y 637 mg de fósforo, de las cuales retuvieron aproximadamente el 45%.

La buena utilización del calcio y del fósforo del pescado se corroboró también en voluntarios en los que la introducción en su dieta de un concentrado de pescado, aproximadamente hasta un tercio de la ingesta, no alteró los balances de calcio, fósforo ni sus niveles séricos, por lo que los autores concluyeron que el calcio del pescado es tan utilizable como el administrado bajo forma de gluconato (SPENCER y Col., 1975).

Por último cabría plantearse también la influencia que ejerce el pescado sobre la biodisponibilidad de estos elementos de la dieta. Así GARCIA-ARIAS (1991), utilizando bonito como fuente proteica, lo cual suponía un aporte paralelo del 23% del fósforo y de 0,06% del calcio, comparados con la dieta patrón en la que ambos elementos procedían de un corrector mineral, los resultados indicaban que la utilización nutritiva de ambos elementos no variaba y, por tanto que el fósforo del pescado era aprovechado con la misma efectividad que el procedente del corrector; además, que la proteína del pescado incidía tan favorablemente como la caseína sobre las utilizaciones del fósforo y del calcio total de la dieta (GARCIA-ARIAS, 1989).

#### 2.3.2.4.2. Hierro, Cobre y Zinc

La carne de los pescados es menos rica en estos tres elementos que la de los mamíferos. En términos generales parece que el pescado graso posee mayores concentraciones y, en lo que se refiere al hierro, las especies de carne roja suelen tener mayor porcentaje que las de carne muy blanca (NAMIKI, 1934).

Aunque no existe mucha información sobre la biodisponibilidad de estos

elementos, al pescado se le supone un cierto poder eritropoyético. En los ensayos con bonito (GARCIA-ARIAS, 1991), en los que el 7% del hierro dietético procedía del pescado, sustituyendo al mismo porcentaje aportado por la caseína, se observó una clara mejora en la cantidad del elemento absorbido respecto a la obtenida con la proteína láctea y, en consecuencia, un aumento de la retención corporal de hierro, lo que podría estar en relación con el citado poder hematopoyético del pescado. Un efecto positivo similar se ejercía sobre el balance de zinc (GARCIA-ARIAS, 1992).

#### 2.3.2.4.3. Yodo

El yodo es con toda probabilidad el aporte mineral más importante de los pescados y, ciertamente, el bocio resulta en extremo raro en las zonas costeras, donde ordinariamente se come mucho pescado.

Su contenido varía mucho de unas especies a otras, de 0,01 mg hasta 0,2 mg por 100 g (LOVERN, 1946), siendo los moluscos especialmente ricos mientras que la sardina sólo contiene 0,016 mg por 100 g de porción comestible.

#### 2.3.3 Procesado de pescado

El pescado es un alimento de captura estacional, con un alto contenido en agua biológicamente activa, por lo que crudo se deteriora muy rápidamente. Las mayores causas de alteración son el crecimiento microbiano, la actividad enzimática y las reacciones químicas que se originan por interacciones entre nutrientes o con otros componentes.

De ahí que, como los pescados no son en su mayor parte consumidos en un plazo corto desde su captura, sea necesario proceder a su conservación en las condiciones más idóneas, para mantener sus propiedades sanitarias y nutritivas (KARMAS y HARRIS, 1987).

Si a esto se une el que por razones de palatabilidad, hábitos alimentarios, etc, en raras ocasiones el pescado se consume crudo en nuestra área geográfica, sino que

normalmente se cocina de distintas formas, se comprenderá que suele someterse a una serie de procesos de tipo industrial o doméstico.

Durante los tratamientos a los que se somete el pescado, pueden producirse una serie de cambios que modifican su composición o, incluso, la calidad de sus nutrientes. Cambios que deben ser tenidos en cuenta para conocer y valorar lo que desde el punto de vista nutritivo es más interesante: el valor nutritivo que tiene el pescado en el momento de ser ingerido, es decir, su valor nutritivo real (NAVARRO, 1991b).

La mayor parte de los tratamientos utilizados, tanto en la preparación culinaria de alimentos en general y del pescado en particular (cocción, asado y fritura) como las realizadas a escala industrial (blanqueado, pasteurización y esterilización) implican actuación del calor, es decir, son procesos térmicos, de ahí que su incidencia deba ser considerada de forma particular.

#### 2.3.3.1. Efecto de los tratamientos térmicos

La influencia del calor depende de numerosos factores pero, sin duda, la temperatura alcanzada en relación al tiempo tiene especial importancia (PIGOTT y TUCKER, 1990). Por ello, la elección de estos y otros parámetros debe ser optimizada para conseguir que se logren los objetivos del proceso y, a la vez, se retenga la máxima proporción de nutriente.

##### 2.3.3.1.1. Efecto sobre la proteína

El calor, al actuar sobre la proteína del pescado, al igual que sobre cualquier otra, produce su desnaturalización, fenómeno que por sí mismo no entraña necesariamente pérdidas nutritivas. A temperaturas entre 40-70°C comienzan a desnaturalizarse la miosina y la proteína sarcoplásmica y posteriormente el colágeno (NAVARRO, 1991 b).

La desnaturalización ocurre cuando, por efecto del calor, se rompen los

enlaces responsables de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, tales como enlaces de hidrógeno y disulfuro, afectando por tanto a la ordenación tridimensional de la molécula, aunque la cadena polipeptídica permanece estable (LANG, 1970).

La proteína pasa de su estado nativo al desnaturalizado a través de una situación intermedia de predesnaturalización, al final de la cual las reacciones todavía resultan reversibles en gran parte. Con posterioridad, si se aporta un calor excesivo, el proceso podría continuar, los enlaces covalentes se romperían, conduciendo a una degradación térmica irreversible (LEDWARD, 1979).

Desde el punto de vista nutritivo interesa conocer la posible degradación del alimento por las pérdidas de nutrientes que comportan las temperaturas muy elevadas, llegando a hidrolizarse e incluso a destruirse por oxidación péptidos y aminoácidos (BENDER, 1984). Así, en caballa calentada a 115° se ha encontrado una disminución de cisteína disponible de hasta el 35% de su valor inicial pero sin producirse cambios en el contenido total del aminoácidos. La metionina es más estable y a 115°C no presenta cambios, pero cuando la temperatura aumenta a 126°C se produce una reducción del 20% de metionina disponible (PIENIAZEK y Col., 1975).

BENDER (1978 b) señala que procesos relativamente severos y, a menudo, incontrolados causan daños en los aminoácidos azufrados con considerables caídas del NPU. En este sentido se ha visto una reducción del 33% en el PER de pescado calentado a 150°C durante una hora, respecto al mismo pescado crudo. Sin embargo, el PER recuperó su valor inicial cuando el pescado se suplementó con metionina (FRAGNE y ADRIAN, 1967). Así mismo, el único aminoácido severamente afectado en concentrados de pescados calentados a 120°C durante 4 horas fue la cisteína, encontrándose pérdidas del 30% de su contenido total. La lisina disponible iba también disminuyendo a medida que aumentaban la temperatura y el tiempo de calentamiento (DUBROW y STILLINGS, 1970).

Las proteínas del pescado están limitadas por los aminoácidos azufrados pero tienen un "exceso" de lisina, de ahí que el daño a esta última pueda no afectar al

NPU; ello explica que en filetes de merluza calentados a 105°C no se presentaron cambios en el NPU paralelos al descenso de la lisina disponible, que pasó del 8,6 al 6,9% (YAÑEZ y Col., 1970).

Tampoco se ha encontrado ningún cambio en el NPU de sardinas enlatadas comparado con las frescas (VARELA y Col., 1963).

El desdoblamiento de la molécula durante la desnaturalización y la modificación de las cadenas laterales, producidas por el calentamiento, pueden conducir a la formación de nuevos enlaces inter o intramoleculares, por ejemplo, a la formación de puentes disulfuro y enlaces en los que participa el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina, formación de isopéptidos, racemización de aminoácidos, etc., y como señalaba FORD en 1973 la lisina es capaz de reaccionar con los grupos amida de la asparragina y glutamina para dar lugar a nuevos péptidos, los cuales no son hidrolizables por las proteínas digestivas. Así mismo indica que los aminoácidos azufrados pueden participar en la formación de enlaces cruzados que originan isopéptidos. Por el contrario, la destrucción de la metionina, al igual que otros autores, lo achaca a que se produce la oxidación del aminoácido para formar sulfóxido de metionina.

La mayor fuente de deterioro proteico, consecuente al calentamiento o almacenamiento de un alimento, es el conjunto de reacciones conocidas como reacciones de Maillard. En el pescado, no merece mucha consideración por la escasa presencia de hidratos de carbono, aunque pueda producirse entre la ribosa del músculo o sus productos de degradación y los aminoácidos, y verse favorecida si el pH post-mortem del pescado aumenta (ADRIAN, 1974). Ya TARR en 1954 señalaba que pequeñas cantidades de ribosa presentes en ciertas especies de pescado (0,4% del peso expresado en s.s.) eran suficientes para causar daño a la proteína. Posteriormente otros autores, como HARRIS y VON LOESECKE (1960), HASHIBA (1982) y ASHOOR y ZENT (1984), también señalan a la ribosa como el azúcar responsable de la reacción de Maillard en pescados.

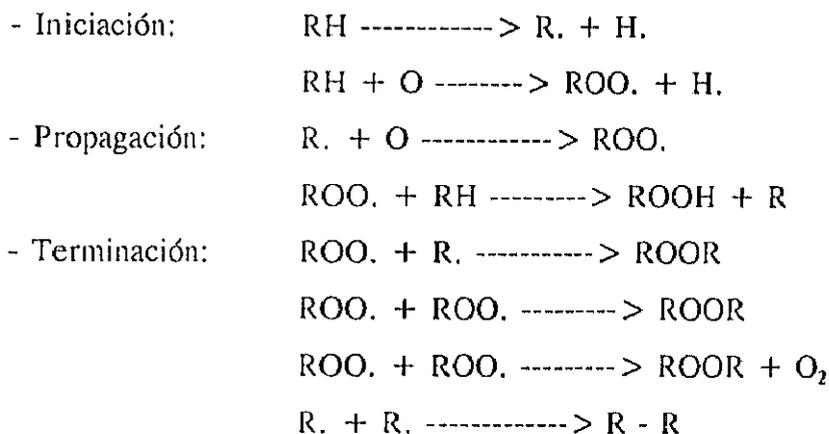
De forma experimental se ha producido esta reacción trabajando con una

mezcla de proteína de pescado y glucosa que se almacenó 40 días a 37°C. Pasado este tiempo se observaron pérdidas de casi un 50% de arginina y lisina (PLAKAS y Col., 1985).

### 2.3.3.1.2. Mecanismo de oxidación lipídica e interacción con proteínas

Como señalamos en un capítulo anterior, este tipo de reacción se produce también entre el grupo amino de los aminoácidos y el grupo carbonilo de los lípidos oxidados, forma que puede tener mucha más importancia en el pescado, particularmente en el graso, ya que la oxidación lipídica es especialmente importante en éste, debido a sus altos niveles de lípidos poliinsaturados (PUFA), cuya oxidación, según KINSELLA y Col, (1977) produce colores, olores y sabores típicos con intensidades crecientes en función de la grasa.

KHAYAT y SCHWALL (1983) estudiaron en profundidad la oxidación de los lípidos insaturados del pescado y observaron que el mecanismo de la reacción es vía radicales libres, propagándose en cadena; las etapas de la autooxidación son:

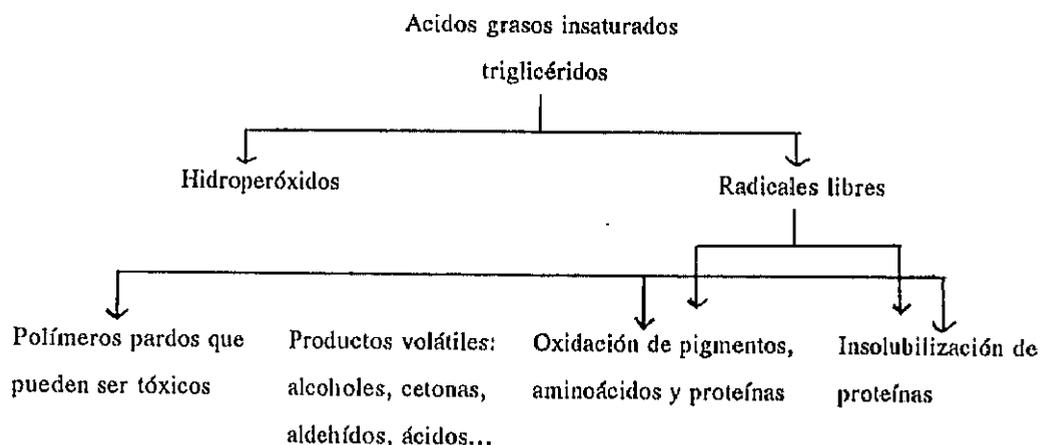


siendo ROO. un radical peroxi, R. un radical del lípido y RH un lípido insaturado.

Los hidroperóxidos formados (ROOH) pueden también convertirse en radicales que aceleren la reacción. Estos y, en general, los radicales libres, son inestables y pueden oxidar pigmentos, aminoácidos o vitaminas.

Además, tanto los radicales e hidroperóxidos como los productos secundarios (aldehídos y cetonas) pueden reaccionar con las proteínas, formando complejos lípido-proteína insolubles, que contribuyen al aspecto rugoso y al olor rancio.

El esquema general de la oxidación de lípidos y sus consecuencias puede resumirse así:



La temperatura alta, acelera la escisión de peróxidos y se forman gran cantidad de compuestos volátiles como carbonilos, ácidos y polímeros...

Así, se ha sugerido que existe una relación entre la pérdida de aminoácidos y la rancidez oxidativa de lípidos en arenques (REEVES, 1973). En concreto, la interacción de aminoácidos con aceite de soja oxidado, utilizado comúnmente como cobertura en conservas de pescado, puede implicar pérdidas de triptófano y fenilalanina (KASIMOTO y YOSHIDA, 1973).

Por otra parte, el grado de pardeamiento y la pérdida de lisina disponible son proporcionales a la descomposición de peróxidos en mezclas lípido-proteína oxidadas. Así se ha encontrado una disminución del 20-30% de lisina disponible inicial al freírse pescados blancos en aceites vegetales, disminución que aumenta cuando el aceite empleado es recalentado.

El daño se achaca a la formación de enlaces entre los grupos amino de la proteína y los productos de la oxidación de la grasa (TOOLEY y LAWRIE, 1974).

En este mismo sentido se ha visto que durante la elaboración de la harina de arenque se produce la oxidación de ácidos grasos insaturados, formándose aldehído malónico, que puede reaccionar con los aminoácidos para dar compuestos carbonil-amino que son los precursores de muchas reacciones de pardeamiento, y que pueden comprometer la utilización de aminoácidos como la lisina (HAWTHORN, 1983).

La presencia de estos lípidos oxidados en los alimentos puede influir negativamente en la utilización de proteínas en general y de algunos aminoácidos en particular, tales como la lisina y aminoácidos azufrados (KIRK, 1984).

En sistemas modelos con proteínas y lípidos oxidados se han encontrado pérdidas en el contenido total de lisina, histidina y triptófano. Al determinar la metionina total no se observan cambios pero sin embargo, ésta se encuentra oxidada, apareciendo como sulfóxido de metionina.

El aminoácido que más rápido reacciona es la metionina, seguido de la lisina, y a gran distancia el triptófano. Esta diferencia en reactividad se debe al tipo de reacción que tiene lugar pues mientras la metionina es oxidada por el peróxido, la lisina reacciona con su carbonilo y el triptófano, por su muy baja reactividad, sólo reacciona con algunos productos secundarios muy activos. Las mayores pérdidas de biodisponibilidad son para la lisina, seguida de los aminoácidos azufrados y éstos del triptófano (NIELSEN, 1984).

En un estudio sobre sardinas cocidas, fritas y asadas se han descrito pérdidas en el contenido de triptófano (crecientes según el orden en que se han enumerado los procesos) que parecen relacionarse positivamente con la temperatura empleada, y que pueden atribuirse a interacciones lipídico-proteicas ya que el detrimento fue máximo en un lote de sardinas dejado enranciar voluntariamente (BEAMONTE, 1988).

En la misma línea HURRELL (1990) achaca la considerable reducción en la biodisponibilidad de la cisteína, hallada en pescados calentados, a la reacción de este aminoácido con el grupo carbonilo de lípidos oxidados mediante una reacción tipo

Maillard.

#### 2.3.3.1.3. Efecto sobre los micronutrientes

Los procesos térmicos van a repercutir también sobre la cantidad y calidad de algunos micronutrientes.

La estabilidad de las vitaminas al calor puede estar influenciada por otros factores como, por ejemplo, los otros componentes del alimento que pueden ejercer tanto una acción protectora como acelerar su destrucción. Así, la sensibilidad de cada vitamina al calor no se puede predecir en general, ya que depende de las condiciones del proceso, y del tipo de alimento del que esté formando parte (HARRIS y VON LOESECKE, 1960; HEEPE, 1961).

La vitamina A parece ser estable en el proceso de enlatado del pescado (LOPEZ-MATAS y FELLERS, 1948). De ahí que LUNDE (1937) encuentre que el ahumado de sardina no causa pérdidas si el pescado se procesa entero y sólo un ligero deterioro si la sardina se filetea previamente. Por el contrario, BAILEY (1943) considera que el ahumado destruye totalmente este nutriente en filetes de sardina.

Sin embargo, cuando la grasa del pescado se oxida, si se produce una gran destrucción de esta vitamina (THALER, 1961).

El tocoferol es muy resistente al calor y sus pérdidas durante el cocinado se deben fundamentalmente a la oxidación de la grasa. Cuando el aceite se calienta en presencia de aire se forman peróxidos que conllevan a una destrucción importante de vitamina E. Las pérdidas más significativas de esta vitamina suceden durante el almacenamiento de alimentos que han sido cocinados en aceites vegetales (BRUNNEL y Col., 1961). La formación de hidroperóxidos, al oxidarse la grasa insaturada de los pescados, provoca una destrucción de vitaminas tales como B<sub>1</sub>, ácido ascórbico, B<sub>2</sub>, E, A y B<sub>12</sub> (KIRK, 1984).

El pescado es así mismo una buena fuente de vitamina D, sobre todo cuando se procesa entero. Los datos de BACHARACH y Col. (1942) sugieren que se puede producir alguna pérdida en el enlatado de la sardina; sin embargo, ASCHECHOUG y Col. (1939) señalan que la vitamina D es estable en el enlatado y subsiguiente almacenamiento.

En opinión de HURRELL (1990) la reacción de Maillard es también causa de deterioro vitamínico y describe pérdidas de tiamina, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y ácido pantoténico; al mismo tiempo indica que las posibles pérdidas de vitamina A, C y fólico se deben achacar más a la presencia de oxígeno que a la reacción de Maillard.

En cuanto a la acción de los procesos térmicos sobre los minerales de los pescados, los pocos trabajos existentes no señalan ningún efecto sobre la composición mineral de los alimentos en general y del pescado en particular.

No obstante los minerales totales se pierden netamente en los pescados magros durante la cocción. En los de alto contenido en grasa, la caballa por ejemplo, estas pérdidas disminuyen mucho o no se producen, lo que sugiere también una interrelación con el contenido lipídico de la especie (GALL y Col., 1983; BEAMONTE, 1988).

Los minerales que se pierden preferentemente son sodio, potasio, magnesio, y el fósforo sólo en la cocción (GALL y Col., 1983). El bonito, aunque es un pescado graso, pierde también potasio, magnesio y fósforo por efecto de la cocción y no muestra diferencias según que ésta se realice al vapor o en salmuera (GARCIA-ARIAS 1989).

Aunque por el propio proceso térmico realmente no se produzcan muchos cambios cuantitativos en los minerales del pescado e incluso tampoco cambios cualitativos importantes, si puede darse un efecto indirecto, de tal forma que modificaciones producidas en otros nutrientes pueden alterar su biodisponibilidad.

En este sentido algunos minerales que actúan catalizando ciertas reacciones

químicas pueden alterar su forma, por ejemplo, el óxido de trimetilamina (OTMA), constituyente natural del pescado, se puede transformar durante el calentamiento en trimetilamina y dimetilamina (TMA + DMA) o en dimetilamina y formaldehído (TMA + H<sub>2</sub>CO), pero para que esta transformación tenga lugar el ión ferroso se convierte en ión férrico (CHAO y GORDON, 1983) y de esta forma se modifica la biodisponibilidad del hierro alimentario.

En un ensayo con bonito como fuente proteica de la dieta, lo cual supuso que el bonito aportaba también parcialmente los minerales dietéticos, no se observaron cambios en los balances de calcio o fósforo por efecto de la cocción al vapor o en salmuera (GARCIA ARIAS, 1989).

Por último señalar que acerca de los efectos que los productos de la reacción de Maillard pueden tener sobre la biodisponibilidad mineral en pescados, no se sabe nada.

#### 2.3.3.1.4. Efectos no nutritivos

Es obvio, que por los tratamientos térmicos, el pescado adquiera unas cualidades organolépticas que, a través de una mejor palatabilidad, redundarán positivamente en su ingestión. Pero también conviene señalar un hecho, no estrictamente nutritivo pero sí de importancia para la salud, como es la posible formación de mutágenos durante el proceso.

En sardinas asadas se han aislado derivados del triptófano que son potentes mutágenos (SUGIMURA, 1978) e incluso sin necesidad de que las condiciones de calefacción fueran tan drásticas, se obtuvieron nuevos mutágenos también en sardinas asadas (GOMEZ PIÑOL, 1989).

La mutagenicidad de las mezclas de ribosa con distintos aminoácidos es mayor que cuando el azúcar implicado es otro (ASHOOR y ZENT, 1984), de ahí que se hayan identificado compuestos mutágenos en muchos pescados asados (LINGNERT, 1990). Sin embargo hay que tener en cuenta que la mutagenicidad se

ha probado en ensayos tipo "Test de Ames" por lo que es muy difícil de extrapolar al hombre y, tampoco se sabe si podría provocar cáncer en ensayos de Toxicidad Experimental.

### 2.3.3.2. Fritura

La fritura en baño de aceite es una de las técnicas culinarias más antiguas, que se originó y desarrolló en los países mediterráneos, seguramente por la abundancia de aceite de oliva.

En otras regiones esta técnica no era muy popular, se decía que los alimentos fritos eran poco digestibles e incluso se llegó a hablar de su posible toxicidad. Sin embargo, posiblemente sea la forma preferente de cocinar el pescado en nuestro país, y día a día se va popularizando de forma extraordinaria en EE.UU. y Europa. Según VARELA (1980) dicha tendencia se debe, además de las costumbres alimentarias adquiridas por razones turísticas, al efecto extraordinario que este sistema culinario tiene sobre la palatabilidad de los alimentos y porque supone un considerable ahorro de tiempo en su preparación.

El proceso de fritura ha empezado a estudiarse hace relativamente pocos años; VIOLA (1969), BENDER (1977), BIRCH y Col. (1977), DAGERSKOG (1977), DOWNEY (1977), VARELA (1977), ZACHARIAS (1977), VARELA y Col. (1988), entre otros, han publicado revisiones sobre la problemática de la fritura.

En líneas generales podemos decir que se trata de un proceso extraordinariamente complejo en el que intervienen varios factores. Para VARELA (1977) son tres: el alimento que se va a freír, la grasa de fritura y las condiciones del proceso.

Cuando el alimento se introduce en el aceite caliente, normalmente entre 170°C y 200°C, la temperatura en su superficie sube rápidamente y se pierde agua por evaporación.

Como consecuencia, la superficie se deshidrata y el plano de evaporación se mueve hacia el interior del alimento, formándose una costra de naturaleza porosa que permite durante el proceso la eliminación del agua a través de esos poros y su reemplazamiento posteriormente por el aceite caliente (VARELA, 1988).

En el mismo sentido DAGERSKOG (1977) señala que la costra superficial que se produce debe de ser atractiva, de buen sabor y significar una pérdida mínima del valor nutricional del alimento.

Por otra parte, a nivel de la grasa del baño de fritura se produce, durante los primeros contactos entre la grasa culinaria y el alimento, un drástico descenso de la temperatura, para ascender paulatinamente a medida que disminuye el contenido en agua dentro de los alimentos (FIGUEROA, 1984; BELMONTE, 1988; HERNANDEZ, 1989; MOREIRAS-VARELA y Col., 1990).

A pesar de la alta temperatura de la grasa del baño, lo que haría pensar en un importante daño térmico al alimento, este es menor que el que a primera vista cabría esperar. La razón radica en que mientras dura la evaporación del agua, la temperatura en el interior del alimento no sube de 100 °C y una vez que ha penetrado en el alimento la grasa caliente del baño, el tiempo que transcurre hasta que la fritura finaliza es relativamente corto (VARELA, 1977).

En la misma línea FELLOWS (1985), trabajando en fritura de pescados, observa que las temperaturas más altas se producen en la superficie del alimento, con la formación de la costra y tostado del entorno, mientras que en el interior del músculo, la temperatura no pasa de 100°C mientras haya agua evaporándose. Por otra parte, SANCHEZ-MUNIZ y Col. (1990) señalan que al freir sardinas la temperatura del aceite en la freidora permanece la mayor parte del tiempo por debajo de 140°C.

De todo lo anterior se deduce una consecuencia importante, que la grasa caliente actúa en el interior del alimento durante un período de tiempo muy corto (GUILLAUMIN, 1988), de ahí que la fritura en baño de aceite no produzca un daño

mayor que otros procesos culinarios.

#### 2.3.3.2.1. Modificaciones que se producen en el pescado frito

##### 2.3.3.2.1.1. Pérdida de agua y de peso

Como consecuencia del proceso y dada la temperatura de la grasa durante el mismo, inicialmente sobre 180°C y luego siempre por encima de 100°C, el alimento pierde agua, siendo ésta reemplazada en parte por la grasa utilizada en el proceso.

La transformación del estado crudo al frito, además, da lugar a otros cambios: pérdida de peso (la cantidad de agua que se pierde es superior a la de la grasa incorporada), enriquecimiento en grasa y cambios en los componentes más inestables del alimento (VARELA, 1977).

Con respecto al peso, todos los datos encontrados en la literatura muestran un descenso significativo en el pescado frito frente al crudo. Así, en sardinas se han señalado pérdidas del 27% y del 29,4% (RUIZ-ROSO, 1983; MEDINA, 1986).

Como ya hemos dicho, el alimento por evaporación pierde agua. GALL y Col. (1983) examinaron las modificaciones cuantitativas debidas al proceso de fritura en cuatro especies de pescados: mero, pargo, palometa y caballa, encontrando en todos los casos una reducción en la humedad del alimento frito. En sardina, el descenso del contenido hídrico por la fritura se sitúa en torno al 40% (MEDINA, 1986; BEAMONTE, 1988; BEAMONTE, 1989).

##### 2.3.3.2.1.2. Modificaciones en la grasa

Las modificaciones en la grasa de un pescado frito son fundamentalmente debidas a fenómenos de penetración de la grasa del baño o a intercambios entre ambas, si se trata de un pescado graso, más que a efectos de su degradación, aunque, por supuesto, se produzcan oxidaciones y compuestos polímeros (POKORNY, 1980).

En opinión de VARELA (1977), el intercambio se produce porque la grasa utilizada se introduce en el alimento ocupando parte del espacio dejado por el agua al evaporarse. La capacidad de absorber la grasa de fritura disminuye a medida que se incrementa el contenido graso inicial del pescado, hasta un nivel de saturación donde ya no existe absorción ni elución neta (GALL y Col., 1983).

En un estudio realizado en sardinas con un alto contenido graso inicial, se observó que el proceso de fritura no producía un cambio cuantitativo importante en este nutriente (RUIZ ROSO, 1983).

MEDINA (1986), partiendo de sardinas con un contenido graso medio, encontró en la primera fritura un aumento del 20% en dicho nivel graso y en la misma línea, FIGUEROA (1984), señala que existe una tendencia a ser mayor la penetración de grasa al aumentar el número de frituras.

Por esta penetración de la grasa del baño se provoca una dilución de la grasa propia del alimento (SANCHEZ-MUNIZ y Col., 1991), lo que puede resultar de especial interés en lo referente a la fritura de pescado azul. En este caso, la dilución, antes mencionada, provoca una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados W-3, presentes en el aceite del pescado, por lo que se podría alterar, al menos cuantitativamente, el papel protector de esta grasa en las enfermedades cardiovasculares.

Sin embargo, la fritura en grasas monoenoicas como el aceite de oliva, enriquece al pescado azul en ácidos grasos de la familia W-9 pudiendo resultar beneficioso en el tratamiento de dichas enfermedades (VIEJO, 1992).

En este sentido, MEDINA (1986), estudiando la composición en algunos ácidos grasos de sardinas fritas en aceite de oliva, girasol o manteca de cerdo, observó que el contenido en ácidos grasos saturados disminuyó con la fritura, pero esta disminución fue mínima cuando se empleó manteca de cerdo. El contenido en oleico aumentó ligeramente utilizando aceite de girasol o manteca de cerdo, en cambio, fue mucho mayor en el alimento frito con aceite de oliva. La cantidad de

linoleico aumentó ligeramente con aceite de oliva y manteca de cerdo, y marcadamente con girasol. Los poliinsaturados C20:4 y C22:6 disminuyeron en todos los casos. En este mismo trabajo encontró que en la fritura de sardinas con aceite de oliva el contenido total en ácidos grasos monoinsaturados de la sardina aumentó desde 27% al 57%, mientras que el contenido en ácidos grasos poliinsaturados disminuyó desde un 30% a un 13% y el contenido en saturados de 42% a 31%.

SANCHEZ-MUNIZ y Col. (1991), en fritura de sardinas en aceite de oliva, demostraron un enriquecimiento del pescado en ácido oleico (de un 20,5% a un 65,8%) y pérdidas en ácido palmítico (14,1% frente a 27,6%) y ácido docosahexaenoico (1,2% frente a un 16,2%), mientras que otros ácidos grasos sufrieron modificaciones de menor cuantía.

#### 2.3.3.2.1.3. Modificaciones en la proteína

El proceso de fritura puede afectar a las proteínas del alimento. En este sentido TOOLEY (1972) encontró pérdidas de lisina disponible del orden de 17-25% después de freir pescado. La fritura de pescados blancos en varios aceites vegetales reprodujo pérdidas de lisina similares, pero en opinión de TOOLEY Y LAWRIE (1974), como la proteína de pescado contiene exceso de lisina, el daño térmico puede que no tenga efectos sobre el NPU.

En sardinas fritas durante 4 minutos a 180°C se han descrito pérdidas de lisina del 29% (AITKEN y CONNELL, 1979) y disminuciones de la disponibilidad de la metionina sin cambios en su contenido total, así como pérdidas de triptófano que se aproximan al 9% (BEAMONTE, 1988).

En general, el daño proteico parece debido a la unión del resto amino de los aminoácidos con los ácidos grasos oxidados, hidroperóxidos, epóxidos y aldehídos, dando compuestos insolubles de difícil digestión que contribuirían a disminuir la digestibilidad de la grasa y la proteína (POKORNY, 1980).

Por ello, EL-ZEANY y Col. (1982) sugieren que existe una relación entre la pérdida de aminoácidos y el enranciamiento oxidativo de pescados, ya que el grado de oscurecimiento y la pérdida de lisina fueron proporcionales a la extensión de la descomposición de los peróxidos en la mezcla lípidos oxidados-proteínas.

NAWAR (1984) considera que los cambios oxidativos, introducidos por hidroperóxidos en las sulfoproteínas, pueden ocasionar pérdidas nutritivas.

No obstante, los ensayos biológicos en distintas especies de pescado magro y graso, fritas en condiciones adecuadas, no muestran variaciones dignas de consideración sobre los distintos parámetros que cuantifican el valor nutritivo. BENDER (1972) opina que la fritura durante seis minutos a 180°C tiene poco efecto en el valor biológico o digestibilidad proteica.

En un trabajo realizado en pescado empanado que implicaba calentamiento, congelación y recalentamiento, BODWELL Y WOHMACK (1978) no hallaron cambios substanciales en el valor nutritivo de la proteína. Según AITKEN y CONNELL (1978), el tratamiento por calor no reduce el VB de los pescados, aunque algunos tipos de procesos a que se someten las comidas a base de pescado producen ligeras pérdidas o ganancias en la digestibilidad.

MOREIRAS-VARELA y Col. (1988) estudiaron la utilización digestiva y metabólica de la proteína de diferentes alimentos de origen animal crudos y fritos, aisladamente o en presencia de hidratos de carbono, y sólo aparecieron pérdidas en dicho valor nutritivo en los alimentos procesados en presencia de hidratos de carbono.

Tampoco MOREIRAS-VARELA y Col. (1990) encontraron diferencias significativas en el valor nutritivo de la proteína de pescado, juzgado mediante el PER, ya estuviese frito o rehogado-estofado con aceite de oliva frente al control caseína + DL-metionina.

La disminución en el contenido total de aminoácidos o de su biodisponibilidad

y por otro lado, la estabilidad de los parámetros biológicos tras los procesos culinarios usuales del pescado, no son hechos contradictorios, sino complementarios.

Mientras que las condiciones sean relativamente suaves y sólo se deteriore la lisina, uno de los aminoácidos más lábiles pero cuya concentración en el pescado es alta, los parámetros biológicos no se afectarán. Por el contrario, en condiciones más drásticas, en las que, además de ella, también se alteren los aminoácidos azufrados, que son limitantes en el pescado, entonces ya aparecerán disminuidos los parámetros biológicos (STILLINGS y Col., 1969).

#### 2.3.3.2.1.4. Modificaciones en los micronutrientes

En lo que se refiere a la influencia sobre la composición y conservación del contenido vitamínico, la fritura no resulta especialmente lesiva, teniendo en cuenta el calentamiento que implica, pudiendo considerarse una ventaja de este proceso el hecho de que la temperatura en el interior del alimento nunca exceda los 100 °C mientras haya agua evaporándose (VARELA, 1980) y que el tiempo de fritura es en general muy corto comparado con otros métodos de cocinado (GUILLAUMIN, 1988).

VARELA y Col. (datos no publicados), indican que el porcentaje de retención, es decir, la porción conservada, en la sardina frita es del 61 % para la B<sub>2</sub>, 46% en la B<sub>6</sub> y 72% para el ácido fólico, mientras que la vitamina A se conserva en su totalidad. Por el contrario FELLOWS (1988) señala que la fritura origina pérdidas importantes de nutrientes, particularmente de vitaminas liposolubles.

En cuanto a las modificaciones que el proceso de fritura puede inducir sobre la composición mineral de los pescados, muy pocos trabajos se han realizado al respecto, pero la mayoría de los autores coinciden en señalar que las pérdidas encontradas eran mínimas (CAUSERET, 1962; TARR, 1962; FELLOWS, 1988).

GALL y Col. (1983) frieron distintos tipos de pescado y analizaron el

contenido mineral tras el proceso. Al comparar los valores con los del pescado en crudo, no encontraron ninguna pérdida de sodio, potasio, fósforo, magnesio, calcio, zinc, hierro, cobre y manganeso cocinando un pescado con alto contenido en grasa, como la caballa española. Por el contrario, si el pescado tenía poca grasa, se perdía sodio, potasio y magnesio.

**3.- MATERIAL Y METODOS**

### 3.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio de la influencia que las interacciones proteico-minerales ejercen sobre la biodisponibilidad de algunos minerales de la dieta se ha realizado primero utilizando un sistema modelo experimental y posteriormente en un alimento real. Así, el diseño de los estudios efectuados puede resumirse de la siguiente forma:

- 3.1.1. Estudio de la influencia que la presencia de una proteína, caseína, ejerce sobre la disponibilidad y/o biodisponibilidad del calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc.
  - 3.1.1.1. Influencia de la cantidad.
  - 3.1.1.2. Influencia del tratamiento térmico de esa proteína en forma aislada o en unión con azúcar y/o aceite.
- 3.1.2. Modulación que un alimento rico en proteína, sardina, tratado o no térmicamente, ejerce sobre la biodisponibilidad del calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc de la dieta.
  - 3.1.2.1. Influencia de la sardina entera, utilizada como fuente proteica fundamentalmente.
  - 3.1.2.2. Influencia de la proteína procedente de las sardinas.
  - 3.1.2.3. Influencia de la fritura.

Para llevar a cabo estos estudios se han realizado:

- A.- Ensayos para determinar los cambios en la forma físico-química (especie) del calcio.
- B.- Ensayos de digestibilidad "in vitro" (medida de la disponibilidad).
- C.- Ensayos de balance en animales (medida de la biodisponibilidad).

El trabajo se inició referido al calcio, comenzando por estudiar las posibles modificaciones en su forma físico-química, especie; se continuó viendo si estos cambios afectaban su digestibilidad "in vitro" y por último, valorando si existían modificaciones en su utilización nutritiva global. Así, en un principio se estudiaron

las variaciones que se producían en el calcio iónico al ponerlo en contacto con la caseína o sus mezclas, tratadas o no térmicamente, con objeto de predecir su posterior utilización "in vivo". A continuación mediante la técnica de digestión "in vitro" se estudió si simulando las condiciones del lumen esos cambios se mantenían a lo largo del proceso digestivo, afectándolo, o si desaparecían; o bien, si se originaban nuevas modificaciones. Además se evaluó que proporción de calcio y en que forma atravesaba una membrana semipermeable con tamaño de poro similar al del intestino. Estos estudios de digestibilidad "in vitro" se ampliaron para analizar la disponibilidad de otros minerales dietéticos: calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc.

Posteriormente, se realizaron una serie de ensayos "in vivo", utilizando la caseína o sus mezclas como fuente proteica y/o de otros macronutrientes de la dieta, y se estudió la biodisponibilidad de dichos elementos incluidos en esas dietas. Una vez conocidos los cambios que una proteína patrón, caseína, no tratada o calentada, de forma aislada o en presencia de otros nutrientes, introducía en la biodisponibilidad de los minerales citados, se amplió el estudio a un alimento que se utilizó como fuente proteica de origen animal, con la idea de conocer lo que ocurre cuando la proteína se calienta no de modo aislado sino formando parte de un alimento, en el que además existen otros nutrientes que también pueden interaccionar.

Este alimento y su proteína se emplearon para la preparación de las dietas y con ellas se realizaron los estudios de disponibilidad y biodisponibilidad de los elementos enumerados.

### 3.2.- MUESTRAS OBJETO DE ESTUDIO

3.2.1. Elaboración de las muestras correspondientes al apartado 3.1.1. del diseño experimental: "Influencia de la presencia de una proteína, caseína, sobre la disponibilidad y/o biodisponibilidad de calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc".

3.2.1.1. Para cumplir los objetivos señalados en el punto 3.1.1.1. se emplearon:

- Caseína no tratada
- Caseína calentada a 200°C durante una hora

3.2.1.2. Para el punto 3.1.1.2. del diseño experimental, "Influencia del tratamiento térmico de esa proteína en forma aislada o en unión de azúcar y/o aceite", se emplearon:

- Caseína	- No tratadas
- Caseína + 60% (glucosa + fructosa) al 50%	- Calentadas: 100°C
- Caseína + 60% sacarosa	150°C
- Caseína + 40% aceite de oliva	200°C
- Caseína + 60% (glucosa + fructosa) al 50% + 40% aceite de oliva	durante 1 h.
- Caseína + 60% sacarosa + 40% aceite de oliva	

Inicialmente se estudió la influencia que la caseína aislada, calentada o no, ejercía sobre la forma del calcio y la posible dependencia de la cantidad.

Para ello se emplearon distintas cantidades de caseína láctica (Central Ibérica de Drogas, S.A., Madrid), 15, 30 y 45 mg que sin tratar o calentadas en estufa a 200°C durante una hora, se añadían a un volumen determinado de una solución de calcio iónico, con el objeto de conocer la influencia de la proteína sobre la forma del elemento. Con esto se completaba el apartado 3.2.1.1., que fue un estudio orientativo preliminar.

Una vez conocida la influencia de la cantidad se profundizó en el estudio para acercarnos más a la realidad de los alimentos. Entonces, la caseína no se procesó únicamente sola, sino en presencia de otros nutrientes: azúcar y/o aceite de oliva.

Para estos nuevos ensayos se empleó caseína Hammarsten (ref. n° 2242, Merck) por ser mucho más pura que la anterior y estar exenta de lactosa; como

azúcares en unos casos se utilizó una mezcla al 50% de glucosa (ref. n° 8337, Merck) y fructosa (ref. n° 5323, Merck) y en otros sacarosa (ref. n° 7651, Merck), para poder estudiar la influencia de la presencia inmediata de un azúcar reductor. El aceite empleado fue puro de oliva de 0,4° de acidez (Carbonell).

Al total de caseína se añadió 60% de azúcar y/o 40% de aceite.

Las temperaturas del tratamiento fueron: 100, 150 y 200°C aplicadas a las muestras durante una hora.

El calentamiento se realizó en estufa en la que se introdujeron las muestras en cápsulas de porcelana una vez alcanzada la temperatura deseada.

Todas las cápsulas contenían 5 gramos de muestra: caseína aislada o sus mezclas, con el fin de que el espesor de las muestras fuera siempre el mismo y por lo tanto esto no hiciera variar la temperatura alcanzada en su interior.

Transcurrida una hora, las muestras se sacaban y se dejaban enfriar en un desecador hasta temperatura ambiente. A continuación se procedía al mezclado del contenido de todas las cápsulas con igual composición.

El calentamiento se efectuó de una sola vez para evitar posibles diferencias en mezclas idénticas debidas al proceso.

Además, en este apartado ya no se ensayaron distintas cantidades de muestra sino que se fijó una cantidad, 30 mg, que se empleó en todos los casos, y para todas las muestras en los ensayos del tipo A.

- Con las muestras correspondientes al punto 3.2.1.1. se practicaron:
  - A. Ensayos para determinar los cambios en la forma físico-química del calcio.
- Con las muestras del apartado 3.2.1.2. se practicaron:
  - A. Ensayos para determinar los cambios en la forma físico-química del

calcio, lo cual se realizó con todas las muestras y a todas las temperaturas.

B. Ensayos de digestibilidad "in vitro"

B.1. Se realizaron en:

- Caseína	- No tratadas
- Caseína + 60% (glucosa + fructosa) al 50%	- Calentadas: 150 ° (1 hora)
	200 ° (1 hora)

Se estudió exclusivamente la digestibilidad "in vitro" del calcio.

B.2. Se realizaron en las dietas que contenían:

- Caseína sin tratar	Calentadas a 150°C durante una hora
- Caseína	
- Caseína + 60% (glucosa + fructosa) al 50%	
- Caseína + 40% aceite de oliva	
- Caseína + 60% (glucosa + fructosa) al 50% + 40% aceite de oliva	

Se estudió la digestibilidad "in vitro" de calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc (la preparación de las dietas se explicará en el apartado 3.2.3).

C. Ensayos de balance mineral en animales. Se emplearon las mismas dietas que en el apartado B2.

3.2.2. Elaboración de las muestras correspondientes al apartado 3.1.2 del diseño experimental: "Modulación que un alimento rico en proteína, sardina, tratado o no térmicamente, ejerce sobre la digestibilidad y/o biodisponibilidad de calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc".

- Sardina	- Cruda - Frita
- Proteína obtenida de la sardina	- Cruda - Frita

Se empleó un pescado azul, la sardina (*Clupea pilchardus*) tanto cruda como frita. Las sardinas se limpiaron de escamas, cabeza y vísceras. Se separaron en dos grupos; uno se dejó como muestra cruda y el otro se frió en freidoras domésticas de tres litros de capacidad a una temperatura inicial de 180°C durante 4 minutos. El aceite empleado en la fritura fue aceite puro de oliva de 0,4° de acidez (Carbonell).

Posteriormente, a las sardinas crudas y fritas se les separó la espina, se trituraron y se les añadió como antioxidante una mezcla al 50% de BHT y BHA al 0,02% de la grasa (Merck).

A continuación se liofilizaron y se mantuvieron a -20°C en botes de cristal herméticamente cerrados en atmósfera inerte de nitrógeno.

Estas fueron empleadas como muestras de sardina entera. Para lo que llamaremos proteínas de sardina, fue necesario realizar una extracción de la grasa, lo cual se hizo tomando sardinas crudas y fritas liofilizadas y haciendo en cada una de ellas extracciones sucesivas de la grasa con eter en frío. El material así obtenido se almacenó a -20°C en botes herméticamente cerrados bajo atmósfera inerte de nitrógeno hasta su uso.

Con los cuatro tipos de muestras se prepararon dietas semisintéticas y en ellas se realizaron:

- B. Ensayos de digestibilidad "in vitro".
- C. Ensayos de balance mineral en animales.

### 3.2.3. Preparación de las dietas

Se prepararon dietas semisintéticas que se ajustaron a las recomendaciones dietéticas de la National Research Council (1978), a base de:

- Almidón de trigo (Central Ibérica de Drogas, S.A., Madrid).
- Sacarosa (Confisa, S.A.).
- Celulosa microcristalina (Central Ibérica de Drogas, S.A., Madrid).
- Aceite puro de oliva de 0,4° de acidez (Carbonell).
- Complemento vitamínico (Roche).
- Complemento mineral (Merck).

Como fuente proteica de las dietas se emplearon las muestras señaladas anteriormente:

- Caseína sin tratar
- Caseína calentada a 150°C
- Caseína + 60% (glucosa + fructosa) al 50% calentada a 150°C.
- Caseína + 40% aceite de oliva calentada a 150°C.
- Caseína + 60% (glucosa + fructosa) al 50% + 40% aceite de oliva calentada a 150°C.
- Caseína láctica
- Sardina cruda
- Sardina frita
- Proteína de la sardina cruda
- Proteína de la sardina frita

muestras que en unos casos aportan únicamente proteína, mientras que en otros, se aporta subsidiariamente una cantidad de grasa y/o hidratos de carbono y/o minerales que serán descontados del aceite, sacarosa y corrector mineral añadidos para la elaboración de las dietas semisintéticas.

Las composiciones en nutrientes de todas las dietas se muestran en los esquemas I y II y los análisis de las mismas en las tablas III y IV.

Los componentes del corrector vitamínico se indican en el esquema V y el de los distintos correctores minerales según la fuente proteica empleada en los esquemas VI, VII, VIII, IX, X y XI.

### 3.3. METODOLOGIA EMPLEADA

#### 3.3.1. Cambios en la forma físico-química del calcio

Para la realización de este estudio se llevó a cabo la puesta a punto de una técnica combinada que permitía cuantificar el calcio iónico, el calcio soluble total y el precipitado.

El procedimiento empleado fue el siguiente: a un volumen determinado (1,5 ml) de una solución patrón de calcio iónico de concentración conocida (1,68-1,82 mmol/l) y tamponada a pH 7 (calcium-pH qualicheck<sup>R</sup>, 52360, Radiometer Copenhagen) se le añadía una determinada cantidad de la caseína aislada (15, 30 o 45 mg según los ensayos) o de sus mezclas (30 mg), tratadas térmicamente o no y se agitaba durante dos horas. Transcurrido este tiempo se centrifugaba a 8000 r.p.m. durante dos horas a temperatura ambiente.

A continuación se procedió a la cuantificación del calcio iónico del sobrenadante mediante electrodo selectivo (ICA 1, Radiometer Copenhagen). Hecho esto, se separaba el sobrenadante del precipitado por filtración a través de un filtro exento de cenizas (Schleicher and Schuell, 589<sup>l</sup>, Germany). Este filtro, que retenía al precipitado, se lavaba repetidamente con agua desionizada procedente de un sistema Milli-Q Plus (Millipore Ibérica S.A.), recogiendo estas fracciones de agua y uniéndolas al sobrenadante.

En éste se determinaba el calcio soluble total por espectrofotometría de absorción atómica (E.A.A.) en un aparato Perkin-Elmer 420. En su cuantificación

total se añadía el calcio soluble existente en el volumen que utilizó el ICA 1 para determinar el calcio iónico.

El filtro, una vez lavado, se colocaba en un crisol de porcelana que tras desecarlo en placa a 100°C aproximadamente, se introducía en la mufla para su incineración a 450°-500°C. Una vez obtenidas cenizas blancas, se realizaba la disolución ácida y filtrado de las mismas y se cuantificaba el calcio mediante E.A.A.

De esta forma el calcio total se separaba en tres fracciones: iónico, soluble, que incluía al iónico y al soluble no ionizado, y precipitado.

Este último podría haberse determinado por diferencia. Sin embargo, se prefirió cuantificarlo en cada muestra ya que su medida sirvió a la vez como control de calidad de la técnica, al poder calcular el % de recuperación del calcio existente inicialmente.

### 3.3.2.- Técnica de digestión "in vitro"

Con este método pretendíamos conocer si el calcio que encontrábamos precipitado en experiencias químicas anteriores, tenía un significado fisiológico desde el punto de vista nutritivo, es decir, si permanecía así y no se absorbía o si posteriormente se solubilizaba de alguna forma en el proceso digestivo y podía, en definitiva, ser absorbido.

Para ello se utilizó la técnica de Miller y Col. (1981) modificada por Vaquero y Col. (1992) que se adaptó a nuestras necesidades.

La técnica consta de dos fases: una fase de digestión gástrica y otra fase de digestión intestinal, las cuales tienen una duración de dos y cuatro horas respectivamente.

Para iniciar el proceso de digestión gástrica, se pesaron en un bote de polietileno de 500 ml de capacidad 6 g de muestra y se añadieron 300 ml de una solución de calcio iónico de igual concentración que la utilizada en los ensayos

anteriores pero sin tamponar. El peso de la muestra y el volumen de líquido no se eligieron al azar sino que se tomaron éstos para mantener las proporciones de los ensayos anteriores.

El pH se ajustó a 2.0 con HCl 6M y a continuación se añadieron 12 ml de una solución de pepsina, 4 g de pepsina (Sigma Chemical Co., nr 7000, St Louis, MO) en 25 ml de HCl 0,1 M. Una vez añadido el enzima gástrico se incubó en un baño de agua con una agitación de 100 oscilaciones por minuto a 37°C durante dos horas, controlando que el pH se mantuviera en 2.0 mediante la adición de HCl 6M. Transcurridas las dos horas de digestión gástrica, se tomaron cuatro alícuotas de 40g del digerido gástrico que se colocaron en botes de plástico de 250 ml de capacidad, en cada uno de los cuales se introdujo un segmento de la membrana de diálisis (Bestl nr. 1063F09. Medicell International LTD size: 9 36/32") que contenía 50 ml de una solución de NaHCO<sub>3</sub>, cuya concentración era dependiente de la valoración de la acidez del digerido gástrico. Seguidamente se añadía en cada uno de los cuatro botes 10 ml de una solución de pancreatina y sales biliares: 0,4 g pancreatina (Sigma Chemical Co., nr P-1750, St. Louis, MO) y 2,5 g sales biliares (Sigma Chemical Co., nr. B-8756, St. Louis, MO) en 100 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, y se colocaban de nuevo en el baño a 37°C, a 100 oscilaciones por minuto pero durante cuatro horas, periodo de tiempo en el que se simulaba la digestión intestinal. A cada hora de incubación intestinal se sacaba un bote del baño, se lavaba la membrana de diálisis con agua desionizada, se controlaba el peso y el pH del dializado y del líquido que no dializaba y subsiguientemente se realizaba el análisis de los minerales en ambas fracciones.

Se utilizaron una serie de blancos en los que se realizaba el proceso exactamente igual, que servían para descontar el escaso aporte mineral de los reactivos y enzimas empleados.

Todo el material se lavó con HNO<sub>3</sub> 10 N.

Cuando las muestras ensayadas eran dietas semisintéticas, empleadas posteriormente para los experimentos "in vivo", existió una ligera modificación, pues aunque se mantenía la proporción de 6 g de muestra y 300 ml de líquido en la

fase inicial del proceso, este volumen no era de una solución de calcio iónico sino agua desionizada procedente de un sistema Milli-Q Plus (Millipore Ibérica, S.A.), ya que en este caso se pretendía estudiar la disponibilidad de los distintos minerales contenidos en esas dietas. Por el contrario, cuando las muestras ensayadas (caseína y sus mezclas) no formaban parte de una dieta, para conocer su influencia sobre la digestibilidad *in vitro* del calcio era necesario un aporte exógeno del elemento, de ahí que se eligiera una solución de calcio iónico de igual concentración que la utilizada en la determinación de los cambios en la forma físico-química del calcio.

La acidez del digerido gástrico se determinó tomando aproximadamente unos 15 g del mismo y añadiéndoles 0,25 g de la solución de pancreatina y sales biliares por gramo de digerido gástrico. Para la valoración se utilizó una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 6% peso/volumen y se calculó el número de equivalentes de  $\text{NaHCO}_3$  necesarios para que el pH de la mezcla fuese 7,0.

La disponibilidad "in vitro" de los minerales se calculó como el porcentaje de elemento dializado del total presente en la alícuota, y se denominó % de elemento dializable. Esto se realizó para cada hora de digestión intestinal.

### 3.3.3. Ensayos de balance mineral

Con estos ensayos se pretendía conocer si los cambios observados en la forma físico-química o en la digestibilidad "in vitro" de los minerales, tenían, además de físico-químico, un significado biológico, es decir, si modificaban la biodisponibilidad de los distintos elementos.

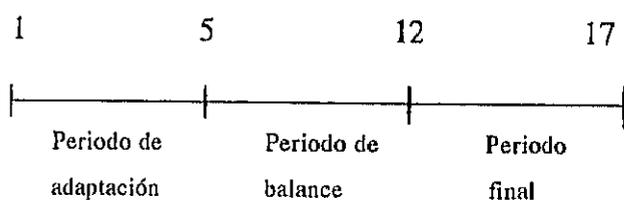
#### 3.3.3.1. Procedimiento

El trabajo se realizó mediante ensayos de balance mineral en ratas Wistar de nuestro criadero, seleccionadas en el momento del destete, con un peso aproximado de  $40 \pm 0,5$  g, introducidas en células metabólicas individuales que permiten la recogida por separado de heces y orina así como la cuantificación de la ingesta. Estas células se alojaron en cámaras termorreguladas a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  con una

humedad del 50-70% y un fotoperiodo controlado de 12 horas. Los grupos estaban constituidos por 8 animales, cuatro hembras y cuatro machos.

El diseño seguido fue distinto según los casos:

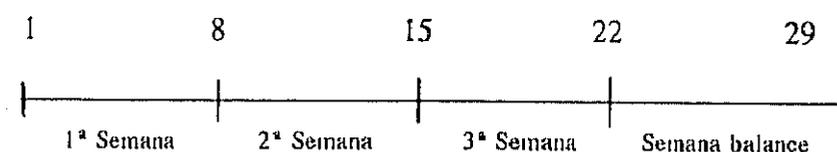
3.3.3.1.1. En los ensayos para conocer la influencia de la caseína (ensayo 1), el periodo experimental tuvo una duración de 16 días, cuatro de adaptación a la dieta seguidos de un periodo de siete días de balance y tras éste, otro periodo de cinco días al final del cual se sacrificaron los animales.



Se utilizaron cinco grupos de ratas en función de los diferentes tipos de muestra que contenían las dietas:

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caseína sin tratar (grupo control)</li> <li>- Caseína</li> <li>- Caseína + 60% (glucosa + fructosa) al 50%</li> <li>- Caseína + 40% aceite de oliva</li> <li>- Caseína + 60% (glucosa + fructosa) al 50% + 40% aceite oliva</li> </ul>	<p>Calentadas a 150°C durante una hora</p>
---	--

3.3.3.1.2. En los ensayos para conocer la influencia de la proteína de sardina (ensayo 2), el período experimental duró cuatro semanas. Durante las tres primeras se estudió la ingesta y la evolución ponderal y en la última semana se realizó el balance. A continuación se sacrificaron los animales.



Se utilizaron 5 grupos de ratas en función de la muestra que contuvieran las dietas:

- Caseína (grupo control)

- Sardina cruda
- Sardina frita
- Proteína de la sardina cruda
- Proteína de la sardina frita

En ambos grupos de balance el régimen alimentario y de bebida (agua desionizada) fue "ad libitum".

La recogida de la orina correspondiente al periodo de balance se realizó sobre HCl al 5%. Se filtró a través de papel Whatman nº41 y se diluyó convenientemente con la misma disolución, congelándose para análisis posteriores. Las heces se desecaron, pesaron, homogenizaron y una parte se incineró para el análisis mineral.

Transcurrida la semana de balance los animales, en ayuno de 4 horas, se sacrificaron previa anestesia con Nembutal (pentobarbital sódico) al 30% vía intraperitoneal, en dosis de 0,15 ml/100 g de peso.

En todos los animales se separaron el hígado y bazo así como una porción de piel, que se limpiaron cuidadosamente, se pesaron y congelaron a -20°C hasta el momento de su análisis. Además, en las ratas del 2º ensayo se procedió a la extracción de sangre en todos los animales mediante canulación de la carótida. La sangre se centrifugó a 3000 r.p.m. para la obtención del suero y una vez separado éste, se lavó el precipitado con suero fisiológico y se centrifugó de nuevo a la misma velocidad, operación que se realizó tres veces, para la obtención de los hematíes.

Tanto el suero como los hematíes se guardaron a -20°C hasta el momento de su análisis.

Todo el material utilizado para los análisis minerales se lavó con detergente enzimático "Tergazyme" (Alconox) y HCl diluido. El material quirúrgico era de acero inoxidable. Para evitar posibles errores en el análisis de la orina, debidos a la contaminación ambiental o de los recipientes, se prepararon cápsulas, blancos de recogida, que durante los periodos de balance se manipularon de la misma forma que las correspondientes a los animales.

### 3.3.3.2. Parámetros controlados

- Peso de las ratas en los días:

Primer ensayo: 1, 5, 12, 17 del experimento

Segundo ensayo: 1, 8, 15, 22, 29 del experimento

- Ingesta sólida semanal y durante los periodos de balance.
- Eliminación fecal y urinaria de los minerales calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc durante el tiempo de balance.
- En los siguientes órganos se controló:

Primer ensayo: Hígado: peso, cenizas, hierro, cobre, zinc, magnesio.

Bazo: peso, cenizas, magnesio, hierro, zinc.

Piel: cenizas, zinc.

Segundo ensayo: Hígado: peso, cenizas, magnesio, hierro, cobre, zinc

Bazo: peso, cenizas, magnesio, hierro, zinc.

Piel: cenizas, calcio, hierro, cobre, zinc.

- En el segundo ensayo se extrajo sangre a los animales y se determinó calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc, en sueros así como zinc y cobre en hematíes.

### 3.3.3.3. Indices utilizados

Eficacia alimentaria

$$EA = \frac{\text{Incremento de peso por día}}{\text{g sustancia seca ingerida por día}}$$

Coefficiente de eficacia proteica para el crecimiento (PER)

$$\text{PER} = \frac{\text{Incremento de peso por día}}{\text{g proteína s.s. por día}}$$

Para el estudio de los balances de minerales se han empleado los siguientes índices.

- 1.- Absorción aparente: cantidad ingerida del mineral menos la cantidad eliminada por heces.

$$A = I - F$$

- 2.- Utilización Digestiva o Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA): porcentaje absorbido del ingerido.

$$\text{CDA} = \% A/I = \frac{I - F}{I} \times 100$$

- 3.- Retención corporal o balance: cantidad absorbida de mineral menos cantidad eliminada por orina.

$$R = A - O = I - F - O$$

- 4.- Utilización metabólica del nutriente: porcentaje retenido del absorbido.

$$\% R/A = \frac{I - F - O}{I - F}$$

- 5.- Utilización nutritiva global del nutriente: porcentaje retenido del ingerido.

$$\% R/I = \frac{I - F - O}{I}$$

### 3.4. TECNICAS ANALITICAS EMPLEADAS

En las muestras anteriormente citadas, empleadas para la elaboración de las dietas, así como en las dietas una vez preparadas, se efectuaron los análisis de:

- Humedad, por pérdida de peso en estufa a 105°C hasta peso constante.
- Proteínas, mediante la determinación de Nitrógeno Total por el método Kjeldahl, utilizando un analizador Kjeltec modelo Auto 1030 y conversión a proteína multiplicando por el factor 6,25 (A.O.A.C. 1975).
- Extracto etéreo, por el sistema método Soxhlet, utilizando el sistema Soxtec de extracción, modelo 1040 (Tecator, Suecia).
- Cenizas por incineración a 450-500°C (A.O.A.C., 1975).
- Los minerales se analizaron en el filtrado de la disolución ácida de esas cenizas (HCl/HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O en las proporciones 1/1/2) o directamente en el suero y la orina mediante espectrofotometría de absorción atómica (E.A.A.) de llama en un aparato Perkin-Elmer 420, adicionando lantano al 0,5% a las muestras y a los estándares de las determinaciones de calcio y magnesio para evitar posibles interferencias.

En cada serie de muestras se analizó un suero control (Monitrol I-Normatest, Laboratorios Dade) y una mezcla del mismo material biológico de rata, utilizada como control interno (muestra de referencia). Los coeficientes de variación interensayo fueron de un 4,63% para el zinc y un 4,33% para el calcio, en el caso de las dietas.

### 3.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO

El estudio estadístico de los datos se llevó a cabo, en primer lugar, analizando la distribución de las distintas variables en la muestra, de lo que se

obtuvo que, aunque los grupos o unidades de análisis eran pequeños, cada una de las variables en el conjunto de la muestra seguía una distribución próxima a lo normal, por lo que optamos por la realización de pruebas paramétricas asumiendo la normalidad en los grupos. Ambos tratamientos se utilizaron tanto en el estudio de las variables como en el de los casos.

En el tratamiento estadístico sobre las observaciones, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) apropiados para casillas de igual o distinto tamaño, con una o dos fuentes de variación, según el experimento de que se tratara. Cuando se obtuvieron diferencias significativas se efectuaron tests de Duncan's para realizar comparaciones entre grupos.

En los experimentos de digestión "in vitro" de caseína, sola o en presencia de azúcares y tratada térmicamente o no, se realizó un análisis de varianza split-split, en el cual, los factores principales fueron la temperatura de calentamiento, la presencia de azúcares y el tiempo de digestión. El tiempo fue considerado como el factor sub plot o factor split.

El análisis de datos correspondientes a la diálisis mineral en función del tiempo de digestión "in vitro" se realizó también mediante ajustes de regresión lineal, efectuándose comparaciones de las pendientes obtenidas con las distintas muestras.

Los niveles de significación se han establecido en 0,1%, 1% y 5% y se expresaron en todos los casos señalando  $P < 0,001$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ . Los resultados no significativos se indicarán con N.S.

La codificación de los datos se realizó en un ordenador IBM 370 y el cálculo estadístico con ayuda de los programas de la serie SAS, versión 5.18 (Sas Institute, North Carolina, 1988).

## ESQUEMA I

COMPOSICION EN NUTRIENTES DE LAS DIETAS DE LOS ENSAYOS REFERIDOS A LA CASEINA (Exp.1)  
(g/100 g sustancia seca)

<u>DIETA CON</u>	<u>MUESTRA</u>	<u>ACEITE DE OLIVA</u>	<u>CELULOSA</u>	<u>ALMIDON</u>	<u>AZUCAR</u>	<u>CORRECTOR VITAMINICO</u>	<u>CORRECTOR MINERAL</u>
CST + DL-METIONINA	10,75 0,2	8	5	35,94	35,94	0,16	3,81
C 150°C + DL-METIONINA	10,76 0,2	8	5	35,94	35,94	0,16	3,81
CA 150°C + DL-METIONINA	15,56 0,2	3,55	5	35,76	35,76	0,16	3,81
CGF 150°C + DL-METIONINA	16,90 0,2	8	5	36,17	29,83	0,16	3,81
CGFA 150°C + DL-METIONINA	20,18 0,2	3,96	5	36,27	30,22	0,16	3,81

## ESQUEMA II

COMPOSICION EN NUTRIENTES DE LAS DIETAS DE LOS ENSAYOS REFERIDOS A LA SARDINA (Exp.2)  
(g/100 g sustancia seca)

<u>FUENTE PROTEICA</u>	<u>MUESTRA</u>	<u>ACEITE OLIVA</u>	<u>CELULOSA</u>	<u>ALMIDON</u>	<u>AZUCAR</u>	<u>CORRECTOR VITAMINICO</u>	<u>CORRECTOR MINERAL</u>
CASEINA + DL-METIONINA	12,28 0,2	8	5	35,62	35,62	0,16	4,24
SARDINA CRUDA	13,64	7,35	5	36,03	36,03	0,16	2,31
SARDINA FRITA	15,71	4,15	5	36,16	36,16	0,16	2,82
PROTEINA CRUDA	12,79	7,90	5	36,09	36,09	0,16	2,42
PROTEINA FRITA	13,06	7,88	5	35,93	35,93	0,16	2,60

ESQUEMA III

## CONTENIDO EN NUTRIENTES DE LAS DIETAS SEGUN ANALISIS (g/100 g sustancia seca)

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>HUMEDAD</u>	<u>PROTEINA</u>	<u>GRASA</u>	<u>CENIZAS</u>
C ST	3,9574 ± 0,12	10,55 ± 0,08	8,04 ± 0,11	3,3075 ± 0,24
C 150°	3,6807 ± 0,12	10,51 ± 0,08	7,91 ± 0,10	3,2925 ± 0,13
CA 150°	3,7480 ± 0,13	10,55 ± 0,14	8,13 ± 0,12	3,1850 ± 0,20
CGF 150°	4,3860 ± 0,05	10,49 ± 0,10	7,83 ± 0,20	3,4625 ± 0,17
CGFA 150°	3,8521 ± 0,09	10,61 ± 0,07	7,72 ± 0,22	3,3775 ± 0,18
C	5,9547 ± 0,16	10,50 ± 0,10	8,23 ± 0,08	3,0655 ± 0,12
SC	5,9525 ± 0,05	10,46 ± 0,12	7,65 ± 0,11	3,1350 ± 0,04
SF	5,4933 ± 0,14	10,46 ± 0,15	7,60 ± 0,07	3,3253 ± 0,10
PSC	5,9881 ± 0,13	10,38 ± 0,15	8,01 ± 0,04	3,1175 ± 0,13
PSF	5,8615 ± 0,10	10,62 ± 0,20	7,62 ± 0,20	3,2160 ± 0,11

---

Valores medios ± desviación estándar

## ESQUEMA IV

### ANALISIS DEL CONTENIDO EN ALGUNOS MINERALES DE LAS DIETAS

<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>Ca</u>	<u>Mg</u>	<u>Fe</u>	<u>Cu</u>	<u>Zn</u>
	<u>mg/g dieta</u>		<u>µg/g dieta</u>		
C ST	5,93 ± 0,35	0,46 ± 0,07	56,20 ± 5,17	8,05 ± 0,90	35,08 ± 1,40
C 150°	5,92 ± 0,24	0,43 ± 0,09	54,55 ± 3,58	7,71 ± 0,30	32,62 ± 0,85
CA 150°	5,99 ± 0,33	0,39 ± 0,11	54,42 ± 2,97	7,88 ± 0,05	34,01 ± 1,20
CGF 150°	5,79 ± 0,18	0,46 ± 0,04	55,25 ± 4,08	7,57 ± 0,79	32,64 ± 1,14
CGFA 150°	5,82 ± 0,33	0,42 ± 0,08	54,39 ± 1,41	7,87 ± 0,46	31,73 ± 0,90
C	6,70 ± 0,02	0,32 ± 0,01	56,19 ± 4,35	8,25 ± 0,84	26,81 ± 0,90
SC	6,41 ± 0,08	0,33 ± 0,04	53,13 ± 3,99	7,48 ± 0,63	27,08 ± 0,62
SF	7,11 ± 0,09	0,34 ± 0,04	52,39 ± 1,43	7,49 ± 0,35	27,22 ± 0,79
PSC	6,44 ± 0,20	0,38 ± 0,02	52,17 ± 2,35	7,79 ± 0,50	27,11 ± 0,81
PSF	6,74 ± 0,12	0,33 ± 0,03	53,47 ± 3,26	7,75 ± 0,52	27,26 ± 0,77

Valores medios ± desviación estándar

ESQUEMA V

COMPOSICION DEL CORRECTOR VITAMINICO (mg/kg dieta)

Colina	.....	1489,87
Acido fólico	.....	1,11
Niacina	.....	22,22
Vitamina K <sub>1</sub>	.....	0,30
Vitamina B <sub>12</sub>	.....	0,055
Riboflavina	.....	3,4687
Tiamina	.....	5,6322
Vitamina B <sub>6</sub>	.....	6,66
Pantotenato cálcico	.....	8,88
Vitamina A	.....	0,0088
Vitamina D <sub>3</sub>	.....	0,0111
Vitamina E	.....	66,66

## ESQUEMA VI

### COMPOSICION DEL CORRECTOR MINERAL DE LAS DIETAS DE LOS ENSAYOS REFERIDOS A CASEINA (Exp.1) (mg/100 g dieta)

Ioduro potásico	.....	0,021
Sulfato de cobre. 5H <sub>2</sub> O	.....	2,472
Fluoruro sódico	.....	0,243
Sulfato de manganeso. H <sub>2</sub> O	.....	16,920
Sulfato ferroso. 7H <sub>2</sub> O	.....	19,904
Cloruro sódico	.....	90,63
Carbonato magnésico	.....	88,68
Sulfato de magnesio. 7H <sub>2</sub> O	.....	225
Fosfato ácido de calcio	.....	680
Fosfato monopotásico	.....	820
Fosfato monosódico. 2H <sub>2</sub> O	.....	294,38
Carbonato de calcio	.....	1000
Carbonato de zinc	.....	2,556
Bicarbonato potásico	.....	610,343
Cromato sódico	.....	0,11
Selenito de sodio. 5H <sub>2</sub> O	.....	0,0365
Oxido de zinc	.....	1,7892

## ESQUEMA VII

**COMPOSICION DEL CORRECTOR MINERAL DE LA DIETA QUE CONTIENE CASEINA DE LOS ENSAYOS REFERIDOS A LA SARDINA (Exp.2) (mg/100 g dieta)**

Ioduro potásico .....	0,021
Sulfato de cobre. 5H <sub>2</sub> O .....	2,472
Fluoruro sódico .....	0,2430
Sulfato de manganeso. H <sub>2</sub> O .....	16,920
Sulfato ferroso. 7H <sub>2</sub> O .....	19,90
Cloruro sódico .....	480,57
Carbonato magnésico .....	88,68
Sulfato de magnesio. 7H <sub>2</sub> O .....	225
Fosfato ácido de calcio .....	680
Fosfato monopotásico .....	820
Fosfato monosódico. 2H <sub>2</sub> O .....	294,38
Carbonato de calcio .....	1000
Carbonato de zinc .....	2,556
Bicarbonato potásico .....	610,343
Cromato sódico .....	0,11
Selenito de sodio. 5H <sub>2</sub> O .....	0,0365
Oxido de zinc .....	1,7892

## ESQUEMA VIII

### COMPOSICION DEL CORRECTOR MINERAL DE LA DIETA QUE CONTIENE SARDINA CRUDA (Exp.2) (mg/100 g dieta)

Ioduro potásico	.....	0,021
Sulfato de cobre. 5H <sub>2</sub> O	.....	2,00
Fluoruro sódico	.....	0,243
Sulfato de manganeso. H <sub>2</sub> O	.....	16,920
Sulfato ferroso. 7H <sub>2</sub> O	.....	12,29
Cloruro sódico	.....	0
Carbonato magnésico	.....	39,81
Sulfato de magnesio. 7H <sub>2</sub> O	.....	225
Fosfato ácido de calcio	.....	267,41
Fosfato monopotásico	.....	475
Carbonato de calcio	.....	920,42
Carbonato de zinc	.....	1,2057
Bicarbonato potásico	.....	348,51
Cromato sódico	.....	0,11
Selenito de sodio. 5H <sub>2</sub> O	.....	0,0365
Oxido de zinc	.....	0,8486

## ESQUEMA IX

### COMPOSICION DEL CORRECTOR MINERAL DE LA DIETA QUE CONTIENE SARDINA FRITA (Exp.2) (mg/100 g dieta)

Ioduro potásico	.....	0,021
Sulfato de cobre. 5H <sub>2</sub> O	.....	1,9428
Fluoruro sódico	.....	0,243
Sulfato de manganeso. H <sub>2</sub> O	.....	16,920
Sulfato ferroso. 7H <sub>2</sub> O	.....	12,7514
Cloruro sódico	.....	101,32
Carbonato magnésico	.....	46,0086
Sulfato de magnesio. 7H <sub>2</sub> O	.....	225
Fosfato ácido de calcio	.....	341,79
Fosfato monopotásico	.....	522,1857
Carbonato de calcio	.....	942,4544
Carbonato de zinc	.....	1,4771
Bicarbonato potásico	.....	383,1314
Cromato sódico	.....	0,11
Selenito de sodio. 5H <sub>2</sub> O	.....	0,0365
Oxido de zinc	.....	1,04

## ESQUEMA X

### COMPOSICION DEL CORRECTOR MINERAL DE LA DIETA QUE CONTIENE PROTEINA DE SARDINA CRUDA (Exp.2) (mg/100 g dieta)

Ioduro potásico	.....	0,021
Sulfato de cobre. 5H <sub>2</sub> O	.....	2,0286
Fluoruro sódico	.....	0,243
Sulfato de manganeso. H <sub>2</sub> O	.....	16,920
Sulfato ferroso. 7H <sub>2</sub> O	.....	12,7657
Cloruro sódico	.....	29,86
Carbonato magnésico	.....	42,8486
Sulfato de magnesio. 7H <sub>2</sub> O	.....	225
Fosfato ácido de calcio	.....	308,6286
Fosfato monopotásico	.....	496,8257
Carbonato de calcio	.....	913,9057
Carbonato de zinc	.....	1,2886
Bicarbonato potásico	.....	364,5228
Cromato sódico	.....	0,11
Selenito de sodio. 5H <sub>2</sub> O	.....	0,0365
Oxido de zinc	.....	0,9057

## ESQUEMA XI

### COMPOSICION DEL CORRECTOR MINERAL DE LA DIETA QUE CONTIENE PROTEINA DE SARDINA FRITA (Exp.2) (mg/100 g dieta)

Ioduro potásico	.....	0,021
Sulfato de cobre. 5H <sub>2</sub> O	.....	2,0457
Fluoruro sódico	.....	0,243
Sulfato de manganeso. H <sub>2</sub> O	.....	16,920
Sulfato ferroso. 7H <sub>2</sub> O	.....	14,1257
Cloruro sódico	.....	174,1714
Carbonato magnésico	.....	54,2057
Sulfato de magnesio. 7H <sub>2</sub> O	.....	225
Fosfato ácido de calcio	.....	454,9371
Fosfato monopotásico	.....	580,6
Carbonato de calcio	.....	918,0828
Carbonato de zinc	.....	1,6828
Bicarbonato potásico	.....	425,9886
Cromato sódico	.....	0,11
Selenito de sodio. 5H <sub>2</sub> O	.....	0,0365
Oxido de zinc	.....	1,1828

4.- ***RESULTADOS***

**ABREVIATURAS**

<b>C</b>	<b>Caseína</b>
<b>C ST</b>	<b>Caseína sin calentar</b>
<b>CA</b>	<b>Caseína + 40% aceite</b>
<b>CS</b>	<b>Caseína + 60% sacarosa</b>
<b>CSA</b>	<b>Caseína + 40% aceite + 60% sacarosa</b>
<b>CGF</b>	<b>Caseína + 60% (glucosa + fructosa) al 50%</b>
<b>CGFA</b>	<b>Caseína + 40% aceite + 60% (glucosa + fructosa) al 50%</b>
<b>SC</b>	<b>Sardina cruda</b>
<b>SF</b>	<b>Sardina frita</b>
<b>PSC</b>	<b>Proteína extraída de la sardina cruda</b>
<b>PSF</b>	<b>Proteína extraída de la sardina frita</b>

TABLA I

CAMBIOS QUE EXPERIMENTA LA FORMA FISICO-QUIMICA DEL CALCIO POR LA PRESENCIA DE DIFERENTES CANTIDADES DE CASEINA SIN TRATAR O CALENTADA ( $\mu\text{g Ca}$ )

	<u>Caseína añadida</u>	<u>Ca<sup>++</sup></u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Ca total</u>
Sin tratar	15 mg	69,14 $\pm$ 1,47 <sup>A</sup>	103,84 $\pm$ 3,20	28,30 $\pm$ 5,57	132,14 $\pm$ 7,00
	30 mg	50,90 $\pm$ 1,15 <sup>B</sup>	102,80 $\pm$ 3,07	28,82 $\pm$ 4,17	131,62 $\pm$ 4,87
	45 mg	41,33 $\pm$ 0,95 <sup>C</sup>	102,36 $\pm$ 4,08	27,70 $\pm$ 2,39	130,06 $\pm$ 3,98
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001	N.S.	N.S.	N.S.
Tratada termi- camente 200°C	15 mg	63,43 $\pm$ 2,57 <sup>A</sup>	75,00 $\pm$ 2,19 <sup>A</sup>	57,92 $\pm$ 5,78 <sup>A</sup>	132,92 $\pm$ 7,08
	30 mg	38,48 $\pm$ 0,46 <sup>B</sup>	50,38 $\pm$ 3,22 <sup>B</sup>	78,87 $\pm$ 3,34 <sup>B</sup>	129,24 $\pm$ 4,43
	45 mg	27,05 $\pm$ 1,61 <sup>C</sup>	41,72 $\pm$ 0,09 <sup>C</sup>	93,72 $\pm$ 2,63 <sup>C</sup>	135,44 $\pm$ 2,64
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	N.S.

Valores medios de 8 determinaciones  $\pm$  desviación estándar.

La solución cálcica de partida contiene 134,71  $\mu\text{g}$  de calcio soluble y de ellos 105,81  $\mu\text{g}$  como calcio iónico.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre las distintas cantidades en un mismo tratamiento (Test de Duncan's).

TABLA II

VARIACIONES EN EL CONTENIDO DEL CALCIO IONICO DE UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE LAS DISTINTAS MUESTRAS ( $\mu\text{g}$ ).

<u>Muestras</u>	<u>Sin tratar</u>	<u>Calentadas</u>		
		<u>100 °C</u>	<u>150 °C</u>	<u>200 °C</u>
C	65,08 $\pm$ 1,14 <sup>AB</sup>	63,43 $\pm$ 1,87 <sup>A</sup>	48,85 $\pm$ 0,30 <sup>A</sup>	21,49 $\pm$ 0,90 <sup>A</sup>
CS	66,58 $\pm$ 5,13 <sup>A</sup>	69,29 $\pm$ 4,92 <sup>B</sup>	60,87 $\pm$ 1,03 <sup>B</sup>	16,21 $\pm$ 0,52 <sup>B</sup>
CCF	57,41 $\pm$ 2,48 <sup>C</sup>	61,62 $\pm$ 0,78 <sup>A</sup>	26,00 $\pm$ 0,30 <sup>C</sup>	16,68 $\pm$ 0,30 <sup>B</sup>
CA	51,85 $\pm$ 0,30 <sup>D</sup>	60,72 $\pm$ 0,49 <sup>A</sup>	60,57 $\pm$ 0,30 <sup>B</sup>	35,62 $\pm$ 0,30 <sup>C</sup>
CSA	62,08 $\pm$ 1,33 <sup>B</sup>	71,24 $\pm$ 0,78 <sup>B</sup>	70,64 $\pm$ 0,35 <sup>D</sup>	29,46 $\pm$ 3,22 <sup>D</sup>
CGFA	62,52 $\pm$ 2,19 <sup>B</sup>	69,74 $\pm$ 1,10 <sup>B</sup>	47,69 $\pm$ 0,75 <sup>E</sup>	31,11 $\pm$ 2,27 <sup>D</sup>
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones  $\pm$  desviación estándar.

La solución cálcica de partida contiene 105,81  $\mu\text{g}$  de calcio iónico.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA III

VARIACIONES EN EL CONTENIDO DEL CALCIO SOLUBLE DE UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE LAS DISTINTAS MUESTRAS ( $\mu\text{g}$ ).

<u>Muestras</u>	<u>Sin tratar</u>	<u>Calentadas</u>		
		<u>100 °C</u>	<u>150 °C</u>	<u>200 °C</u>
C	117,53 $\pm$ 2,70 <sup>A</sup>	111,66 $\pm$ 0,48 <sup>AB</sup>	48,89 $\pm$ 1,94 <sup>A</sup>	20,98 $\pm$ 3,03 <sup>A</sup>
CS	112,62 $\pm$ 1,44 <sup>B</sup>	108,97 $\pm$ 1,41 <sup>BC</sup>	60,68 $\pm$ 0,31 <sup>B</sup>	15,23 $\pm$ 0,45 <sup>B</sup>
CCF	110,73 $\pm$ 2,84 <sup>B</sup>	107,41 $\pm$ 2,20 <sup>C</sup>	24,33 $\pm$ 1,58 <sup>C</sup>	10,54 $\pm$ 0,34 <sup>C</sup>
CA	105,38 $\pm$ 0,50 <sup>C</sup>	114,34 $\pm$ 1,30 <sup>A</sup>	60,74 $\pm$ 1,69 <sup>B</sup>	37,69 $\pm$ 2,15 <sup>D</sup>
CSA	116,54 $\pm$ 0,29 <sup>A</sup>	112,42 $\pm$ 3,55 <sup>AB</sup>	70,15 $\pm$ 1,26 <sup>D</sup>	30,28 $\pm$ 3,06 <sup>E</sup>
CGFA	111,71 $\pm$ 1,11 <sup>B</sup>	111,34 $\pm$ 2,51 <sup>AB</sup>	44,86 $\pm$ 0,92 <sup>E</sup>	29,90 $\pm$ 2,96 <sup>E</sup>
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,01	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones  $\pm$  desviación estándar.

La solución cálcica de partida contiene 134,71  $\mu\text{g}$  de calcio soluble.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA IV

FORMACION DE CALCIO PRECIPITADO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE LAS DISTINTAS MUESTRAS ( $\mu\text{g}$ ).

Muestras	Sin tratar	Calentadas		
		100 °C	150 °C	200 °C
C	17,96 ± 3,21 <sup>AB</sup>	23,64 ± 2,56 <sup>AB</sup>	85,97 ± 1,64 <sup>A</sup>	111,53 ± 3,53 <sup>A</sup>
CS	16,94 ± 1,21 <sup>A</sup>	22,59 ± 0,23 <sup>ABC</sup>	76,97 ± 1,23 <sup>B</sup>	115,02 ± 1,10 <sup>A</sup>
CCF	23,47 ± 4,84 <sup>CD</sup>	26,11 ± 2,00 <sup>D</sup>	109,72 ± 1,11 <sup>C</sup>	114,30 ± 1,49 <sup>A</sup>
CA	25,85 ± 1,92 <sup>C</sup>	21,57 ± 0,20 <sup>AC</sup>	77,18 ± 1,36 <sup>B</sup>	94,67 ± 3,66 <sup>B</sup>
CSA	20,02 ± 0,69 <sup>ABD</sup>	20,59 ± 1,66 <sup>C</sup>	64,96 ± 2,72 <sup>D</sup>	102,87 ± 6,35 <sup>C</sup>
CGFA	21,50 ± 0,94 <sup>BD</sup>	24,30 ± 0,93 <sup>BD</sup>	87,78 ± 2,10 <sup>A</sup>	93,36 ± 3,66 <sup>B</sup>
ANOVA	P = 0,0011	P = 0,0012	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

La solución cálcica de partida no contenía calcio precipitado.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA V

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE LAS DISTINTAS MUESTRAS SIN TRATAR.

<u>Muestras</u>	<u>Ca iónico</u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Recuperación</u>
C	48,31 ± 0,84 <sup>AB</sup>	87,24 ± 2,00 <sup>A</sup>	13,33 ± 2,38 <sup>AB</sup>	100,58 ± 2,64
CS	49,43 ± 3,81 <sup>A</sup>	83,60 ± 1,07 <sup>B</sup>	12,57 ± 0,90 <sup>A</sup>	96,17 ± 1,76
CGF	42,62 ± 1,84 <sup>C</sup>	82,20 ± 2,10 <sup>B</sup>	17,42 ± 3,59 <sup>CD</sup>	99,62 ± 3,26
CA	38,49 ± 0,22 <sup>D</sup>	78,22 ± 0,37 <sup>C</sup>	19,19 ± 1,42 <sup>C</sup>	97,41 ± 1,50
CSA	46,08 ± 0,99 <sup>B</sup>	86,51 ± 0,22 <sup>A</sup>	14,86 ± 0,51 <sup>ABD</sup>	101,38 ± 0,41
CGFA	46,41 ± 1,63 <sup>B</sup>	82,92 ± 0,82 <sup>B</sup>	15,96 ± 0,70 <sup>BD</sup>	98,89 ± 0,15
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P = 0,0011	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA VI

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE LAS DISTINTAS MUESTRAS CALENTADAS A 100°C.

<u>Muestras</u>	<u>Ca iónico</u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Recuperación</u>
C	47,08 ± 1,39 <sup>A</sup>	82,89 ± 0,35 <sup>AB</sup>	17,55 ± 1,90 <sup>AB</sup>	100,43 ± 2,02
CS	51,43 ± 3,65 <sup>B</sup>	80,90 ± 1,05 <sup>BC</sup>	16,77 ± 0,17 <sup>AC</sup>	97,66 ± 0,93
CGF	45,74 ± 0,58 <sup>A</sup>	79,73 ± 1,63 <sup>C</sup>	19,38 ± 1,49 <sup>D</sup>	99,12 ± 1,78
CA	45,07 ± 0,36 <sup>A</sup>	84,87 ± 0,97 <sup>A</sup>	16,01 ± 0,15 <sup>AC</sup>	100,89 ± 0,94
CSA	52,88 ± 0,58 <sup>B</sup>	83,45 ± 2,64 <sup>AB</sup>	15,28 ± 1,23 <sup>C</sup>	98,74 ± 2,11
CGFA	51,77 ± 0,81 <sup>B</sup>	82,65 ± 1,86 <sup>AB</sup>	18,03 ± 0,69 <sup>BD</sup>	100,68 ± 1,67
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P = 0,0012	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA VII

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE LAS DISTINTAS MUESTRAS CALENTADAS A 150°C.

<u>Muestras</u>	<u>Ca iónico</u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Recuperación</u>
C	36,26 ± 0,22 <sup>A</sup>	36,30 ± 1,44 <sup>A</sup>	63,82 ± 1,22 <sup>A</sup>	100,12 ± 2,09
CS	45,19 ± 0,76 <sup>B</sup>	45,04 ± 0,23 <sup>B</sup>	57,14 ± 0,91 <sup>B</sup>	102,18 ± 0,72
CGF	19,30 ± 0,22 <sup>C</sup>	18,06 ± 1,17 <sup>C</sup>	81,45 ± 0,82 <sup>C</sup>	99,51 ± 0,98
CA	44,96 ± 0,22 <sup>B</sup>	45,09 ± 1,25 <sup>B</sup>	57,29 ± 1,01 <sup>B</sup>	102,38 ± 1,78
CSA	52,44 ± 0,26 <sup>D</sup>	52,07 ± 0,93 <sup>D</sup>	48,22 ± 2,02 <sup>D</sup>	100,30 ± 2,76
CGFA	35,40 ± 0,56 <sup>E</sup>	33,30 ± 0,68 <sup>E</sup>	65,16 ± 1,56 <sup>A</sup>	98,47 ± 0,91
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA VIII

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE LAS DISTINTAS MUESTRAS CALENTADAS A 200°C.

<u>Muestras</u>	<u>Ca iónico</u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Recuperación</u>
C	15,95 ± 0,67 <sup>A</sup>	15,57 ± 2,25 <sup>A</sup>	82,79 ± 2,62 <sup>A</sup>	98,36 ± 4,60
CS	12,04 ± 0,38 <sup>B</sup>	11,30 ± 0,34 <sup>B</sup>	85,38 ± 0,82 <sup>A</sup>	96,69 ± 0,90
CGF	12,38 ± 0,22 <sup>B</sup>	7,82 ± 0,25 <sup>C</sup>	84,85 ± 1,10 <sup>A</sup>	92,68 ± 1,32
CA	26,44 ± 0,22 <sup>C</sup>	27,98 ± 1,60 <sup>D</sup>	70,27 ± 2,72 <sup>B</sup>	98,26 ± 1,96
CSA	21,87 ± 2,39 <sup>D</sup>	22,48 ± 2,27 <sup>E</sup>	76,37 ± 4,71 <sup>C</sup>	98,85 ± 3,76
CGFA	23,09 ± 1,68 <sup>D</sup>	22,20 ± 2,19 <sup>E</sup>	69,30 ± 2,71 <sup>B</sup>	91,50 ± 3,59
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA IX

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE CASEINA NO TRATADA O CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS.

<u>Tratamiento</u>	<u>Ca iónico</u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Recuperación</u>
Sin tratar	48,31 ± 0,84 <sup>A</sup>	87,24 ± 2,00 <sup>A</sup>	13,33 ± 2,38 <sup>A</sup>	100,58 ± 2,64
100°	47,68 ± 1,39 <sup>A</sup>	82,89 ± 0,35 <sup>B</sup>	17,55 ± 1,90 <sup>B</sup>	100,43 ± 2,02
150°	36,26 ± 0,22 <sup>B</sup>	36,30 ± 1,44 <sup>C</sup>	63,82 ± 1,22 <sup>C</sup>	100,12 ± 2,09
200°	15,95 ± 0,67 <sup>C</sup>	15,57 ± 2,25 <sup>D</sup>	82,79 ± 2,62 <sup>D</sup>	98,36 ± 4,60
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA X

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE UNA MEZCLA DE CASEINA Y SACAROSA NO TRATADA O CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS.

<u>Tratamiento</u>	<u>Ca iónico</u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Recuperación</u>
Sin tratar	49,43 ± 3,81 <sup>A</sup>	83,60 ± 1,07 <sup>A</sup>	12,57 ± 0,90 <sup>A</sup>	96,17 ± 1,76
100°	51,43 ± 3,65 <sup>A</sup>	80,90 ± 1,05 <sup>B</sup>	16,77 ± 0,17 <sup>B</sup>	97,66 ± 0,93
150°	45,19 ± 0,76 <sup>B</sup>	45,04 ± 0,23 <sup>C</sup>	57,14 ± 0,91 <sup>C</sup>	102,18 ± 0,72
200°	12,04 ± 0,38 <sup>C</sup>	11,30 ± 0,34 <sup>D</sup>	85,38 ± 0,82 <sup>D</sup>	96,69 ± 0,90
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XI

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE UNA MEZCLA DE CASEINA, GLUCOSA Y FRUCTOSA NO TRATADA O CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS.

<u>Tratamiento</u>	<u>Ca iónico</u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Recuperación</u>
Sin tratar	42,62 ± 1,84 <sup>A</sup>	82,20 ± 2,10 <sup>A</sup>	17,42 ± 3,59 <sup>A</sup>	99,62 ± 3,26
100°	45,74 ± 0,58 <sup>B</sup>	79,73 ± 1,63 <sup>B</sup>	19,38 ± 1,49 <sup>A</sup>	99,12 ± 1,78
150°	19,30 ± 0,22 <sup>C</sup>	18,06 ± 1,17 <sup>C</sup>	81,45 ± 0,82 <sup>B</sup>	99,51 ± 0,98
200°	12,38 ± 0,22 <sup>D</sup>	7,83 ± 0,25 <sup>D</sup>	84,85 ± 1,10 <sup>C</sup>	92,68 ± 1,32
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XII

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE UNA MEZCLA DE CASEINA Y ACEITE NO TRATADA O CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS.

<u>Tratamiento</u>	<u>Ca iónico</u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Recuperación</u>
Sin tratar	38,49 ± 0,22 <sup>A</sup>	78,22 ± 0,37 <sup>A</sup>	19,19 ± 1,42 <sup>A</sup>	97,41 ± 1,50
100°	45,07 ± 0,36 <sup>B</sup>	84,88 ± 0,97 <sup>B</sup>	16,01 ± 0,15 <sup>B</sup>	100,89 ± 0,94
150°	44,96 ± 0,22 <sup>B</sup>	45,09 ± 1,25 <sup>C</sup>	57,29 ± 1,01 <sup>C</sup>	102,38 ± 1,78
200°	26,44 ± 0,22 <sup>C</sup>	27,98 ± 1,60 <sup>D</sup>	70,27 ± 2,72 <sup>D</sup>	98,26 ± 1,96
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XIII

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE UNA MEZCLA DE CASEINA, SACAROSA Y ACEITE NO TRATADA O CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS.

<u>Tratamiento</u>	<u>Ca iónico</u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Recuperación</u>
Sin tratar	46,08 ± 0,99 <sup>A</sup>	86,51 ± 0,22 <sup>A</sup>	14,86 ± 0,51 <sup>A</sup>	101,38 ± 0,41
100°C	52,88 ± 0,58 <sup>B</sup>	83,45 ± 2,64 <sup>B</sup>	15,28 ± 1,23 <sup>A</sup>	98,74 ± 2,11
150°C	52,44 ± 0,26 <sup>B</sup>	52,07 ± 0,93 <sup>C</sup>	48,22 ± 2,02 <sup>B</sup>	100,30 ± 2,76
200°C	21,87 ± 2,39 <sup>C</sup>	22,48 ± 2,27 <sup>D</sup>	76,37 ± 4,71 <sup>C</sup>	98,85 ± 3,76
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XIV

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO EN UNA SOLUCION TRAS LA ADICION DE 30 MG DE UNA MEZCLA DE CASEINA, GLUCOSA, FRUCTOSA Y ACEITE NO TRATADA O CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS.

<u>Tratamiento</u>	<u>Ca iónico</u>	<u>Ca soluble</u>	<u>Ca precipitado</u>	<u>Recuperación</u>
Sin tratar	46,41 ± 1,63 <sup>A</sup>	82,92 ± 0,82 <sup>A</sup>	15,96 ± 0,70 <sup>A</sup>	98,89 ± 0,15
100°C	51,77 ± 0,81 <sup>B</sup>	82,65 ± 1,86 <sup>A</sup>	18,03 ± 0,69 <sup>A</sup>	100,69 ± 1,67
150°C	35,40 ± 0,56 <sup>C</sup>	33,30 ± 0,68 <sup>B</sup>	65,16 ± 1,56 <sup>B</sup>	98,47 ± 0,91
200°C	23,09 ± 1,68 <sup>D</sup>	22,20 ± 2,19 <sup>C</sup>	69,30 ± 2,71 <sup>C</sup>	91,50 ± 3,59
<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.  
 Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 para valores pertenecientes a una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XV

DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL CALCIO EN PRESENCIA DE CASEINA CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL CALCIO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS Y NO DIALIZADAS.

CASEINA I	TIEMPO DE DIGESTION	DIALIZADO		NO DIALIZADO		
		TOTAL SOLUBLE	IONICO	TOTAL SOLUBLE	IONICO	PRECIPITADO
Sin tratar	1 h.	15.78 ± 0,10 <sup>A</sup>	7,61 ± 1,06	48,07 ± 1,62	9,78 ± 0,27 <sup>A</sup>	39,47 ± 0,94 <sup>A</sup>
	2 h.	18,45 ± 0,20 <sup>B</sup>	8,57 ± 1,43	48,77 ± 1,39	8,69 ± 1,09 <sup>B</sup>	35,42 ± 1,71 <sup>A</sup>
	3 h.	20,00 ± 0,46 <sup>C</sup>	8,29 ± 1,24	47,53 ± 0,80	8,97 ± 1,00 <sup>B</sup>	34,86 ± 0,78 <sup>B</sup>
	4 h.	21,33 ± 0,83 <sup>D</sup>	8,29 ± 1,35	47,28 ± 1,08	9,38 ± 0,68 <sup>AB</sup>	33,68 ± 0,78 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,01	NS	NS	P < 0,05	P < 0,05
150°C	1 h.	18,40 ± 1,12 <sup>A</sup>	10,10 ± 0,74	57,02 ± 0,77 <sup>A</sup>	12,28 ± 1,56 <sup>A</sup>	27,47 ± 1,66
	2 h.	19,81 ± 0,76 <sup>B</sup>	10,30 ± 0,92	56,24 ± 2,19 <sup>A</sup>	11,09 ± 1,05 <sup>B</sup>	26,40 ± 1,71
	3 h.	19,60 ± 0,41 <sup>B</sup>	10,09 ± 1,33	54,06 ± 2,97 <sup>BC</sup>	11,27 ± 1,74 <sup>B</sup>	28,23 ± 2,39
	4 h.	20,62 ± 0,92 <sup>B</sup>	9,90 ± 0,71	53,43 ± 2,57 <sup>C</sup>	11,49 ± 1,49 <sup>AB</sup>	27,86 ± 1,95
	ANOVA	P < 0,05	NS	P < 0,05	P < 0,05	NS
200°C	1 h.	10,30 ± 1,33 <sup>A</sup>	6,37 ± 0,63 <sup>A</sup>	6,51 ± 0,27 <sup>A</sup>	1,82 ± 0,83 <sup>A</sup>	85,21 ± 1,97 <sup>AB</sup>
	2 h.	8,53 ± 1,44 <sup>BD</sup>	4,01 ± 0,31 <sup>B</sup>	5,83 ± 0,18 <sup>AB</sup>	1,09 ± 0,55 <sup>AB</sup>	86,70 ± 2,03 <sup>BC</sup>
	3 h.	7,29 ± 0,92 <sup>CD</sup>	3,28 ± 0,55 <sup>B</sup>	4,29 ± 0,14 <sup>BC</sup>	0,36 ± 0,63 <sup>B</sup>	89,75 ± 2,03 <sup>CD</sup>
	4 h.	7,61 ± 0,81 <sup>D</sup>	2,91 ± 0,83 <sup>B</sup>	3,69 ± 0,19 <sup>C</sup>	0,55 ± 0,55 <sup>B</sup>	89,08 ± 1,35 <sup>D</sup>
	ANOVA	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,05

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de un mismo tratamiento térmico y columna (Test de Duncan's).

La influencia de la temperatura fue significativa con P < 0,001 (ANOVA)

TABLA XVI

DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL CALCIO EN PRESENCIA DE UNA MEZCLA DE CASEINA CON GLUCOSA Y FRUCTOSA CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL CALCIO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS Y NO DIALIZADAS.

CGF	TIEMPO DE DIGESTION	DIALIZADO		NO DIALIZADO		
		TOTAL SOLUBLE	IONICO	TOTAL SOLUBLE	IONICO	PRECIPITADO
Sin tratar	1 h.	19,12 ± 0,33 <sup>A</sup>	10,50 ± 1,29 <sup>A</sup>	54,28 ± 2,87 <sup>A</sup>	14,89 ± 1,95 <sup>A</sup>	29,73 ± 3,15 <sup>A</sup>
	2 h.	22,10 ± 1,18 <sup>B</sup>	11,72 ± 1,15 <sup>B</sup>	55,64 ± 2,33 <sup>B</sup>	13,85 ± 1,13 <sup>B</sup>	25,43 ± 3,30 <sup>B</sup>
	3 h.	23,13 ± 0,64 <sup>C</sup>	11,88 ± 1,03 <sup>B</sup>	53,02 ± 2,42 <sup>A</sup>	13,85 ± 1,11 <sup>B</sup>	26,99 ± 2,65 <sup>A</sup>
	4 h.	24,51 ± 0,76 <sup>D</sup>	11,84 ± 0,72 <sup>B</sup>	51,59 ± 1,24 <sup>C</sup>	13,41 ± 0,78 <sup>B</sup>	26,93 ± 1,69 <sup>C</sup>
	ANOVA	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,05	P < 0,05
150°C	1 h.	22,26 ± 1,31 <sup>A</sup>	10,60 ± 0,84	58,03 ± 0,40 <sup>A</sup>	13,55 ± 0,78	23,22 ± 0,65 <sup>A</sup>
	2 h.	23,77 ± 1,59 <sup>B</sup>	10,80 ± 0,68	57,25 ± 1,71 <sup>AB</sup>	12,37 ± 0,33	22,38 ± 2,57 <sup>AB</sup>
	3 h.	25,06 ± 0,98 <sup>C</sup>	11,00 ± 0,17	56,82 ± 1,12 <sup>AB</sup>	12,57 ± 0,19	21,27 ± 1,56 <sup>AB</sup>
	4 h.	25,48 ± 0,90 <sup>C</sup>	11,19 ± 0,36	55,90 ± 0,74 <sup>B</sup>	12,57 ± 0,19	21,63 ± 0,64 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,05	NS	P < 0,01	NS	P < 0,01
200°C	1 h.	10,93 ± 0,53 <sup>A</sup>	9,03 ± 0,83 <sup>A</sup>	7,87 ± 0,71 <sup>A</sup>	10,06 ± 0,97 <sup>A</sup>	82,90 ± 1,40 <sup>A</sup>
	2 h.	7,00 ± 0,40 <sup>B</sup>	6,32 ± 0,62 <sup>B</sup>	3,84 ± 0,22 <sup>B</sup>	5,95 ± 0,18 <sup>B</sup>	90,12 ± 0,62 <sup>B</sup>
	3 h.	4,69 ± 0,16 <sup>C</sup>	4,51 ± 0,31 <sup>C</sup>	2,57 ± 0,12 <sup>B</sup>	4,68 ± 0,23 <sup>C</sup>	93,37 ± 0,26 <sup>B</sup>
	4 h.	4,99 ± 0,07 <sup>C</sup>	5,05 ± 0,31 <sup>C</sup>	3,96 ± 1,01 <sup>B</sup>	5,57 ± 0,98 <sup>BC</sup>	91,67 ± 1,07 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,001	P < 0,05	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de un mismo tratamiento térmico y columna (Test de Duncan's).

La influencia de la temperatura fue significativa con P < 0,001 (ANOVA)

TABLA XVII

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL CALCIO EN PRESENCIA DE CASEINA O DE UNA MEZCLA DE CASEINA CON GLUCOSA Y FRUCTOSA. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL CALCIO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS Y NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.**

TIEMPO	MUESTRA	DIALIZADO		NO DIALIZADO		
		TOTAL SOLUBLE	IONICO	TOTAL SOLUBLE	IONICO	PRECIPITADO
1ª hora	C	15,78 ± 0,10	7,61 ± 1,06	48,07 ± 1,62	9,78 ± 0,27	39,47 ± 0,94
	CGF	19,12 ± 0,33	10,50 ± 1,29	54,28 ± 2,87	14,89 ± 1,95	29,73 ± 3,15
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
2ª hora	C	18,45 ± 0,20	8,57 ± 1,43	48,77 ± 1,39	8,69 ± 1,09	35,42 ± 1,71
	CGF	22,10 ± 1,18	11,72 ± 1,15	55,64 ± 2,33	13,85 ± 1,13	25,43 ± 3,30
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
3ª hora	C	20,00 ± 0,46	8,29 ± 1,24	47,53 ± 0,80	8,97 ± 1,00	34,86 ± 0,78
	CGF	23,13 ± 0,64	11,88 ± 1,03	53,02 ± 2,42	13,85 ± 1,11	26,99 ± 2,65
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
4ª hora	C	21,33 ± 0,83	8,29 ± 1,35	47,28 ± 1,08	9,38 ± 0,68	33,68 ± 0,78
	CGF	24,51 ± 0,76	11,84 ± 0,72	51,59 ± 1,24	13,41 ± 0,78	26,93 ± 1,69
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

TABLA XVIII

DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL CALCIO EN PRESENCIA DE CASEINA O DE UNA MEZCLA DE CASEINA CON GLUCOSA Y FRUCTOSA CALENTADAS A 150°C. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL CALCIO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS Y NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.

TIEMPO	MUESTRA	DIALIZADO		NO DIALIZADO		
		TOTAL SOLUBLE	IONICO	TOTAL SOLUBLE	IONICO	PRECIPITADO
1ª hora	C	18,40 ± 1,12	10,10 ± 0,74	57,02 ± 0,77	12,28 ± 1,56	27,47 ± 1,66
	CGF	22,26 ± 1,31	10,60 ± 0,84	58,03 ± 0,40	13,55 ± 0,78	23,22 ± 0,65
	ANOVA	P < 0,001	N.S.	N.S.	P < 0,01	N.S.
2ª hora	C	19,81 ± 0,76	10,30 ± 0,92	56,24 ± 2,19	11,09 ± 1,05	26,40 ± 1,71
	CGF	23,77 ± 1,59	10,80 ± 0,68	57,25 ± 1,71	12,37 ± 0,33	22,38 ± 2,57
	ANOVA	P < 0,001	N.S.	N.S.	P < 0,01	N.S.
3ª hora	C	19,60 ± 0,41	10,09 ± 1,33	54,06 ± 2,97	11,27 ± 1,74	28,23 ± 2,39
	CGF	25,06 ± 0,98	11,00 ± 0,17	56,82 ± 1,12	12,57 ± 0,19	21,27 ± 1,56
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,01
4ª hora	C	20,62 ± 0,92	9,90 ± 0,71	53,43 ± 2,57	11,49 ± 1,49	27,86 ± 1,95
	CGF	25,48 ± 0,90	11,19 ± 0,36	55,90 ± 0,74	12,57 ± 0,19	21,63 ± 0,64
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,01	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,05

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

TABLA XIX

DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL CALCIO EN PRESENCIA DE CASEINA O DE UNA MEZCLA DE CASEINA CON GLUCOSA Y FRUCTOSA CALENTADAS A 200°C. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL CALCIO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS Y NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.

TIEMPO	MUESTRA	DIALIZADO		NO DIALIZADO		
		TOTAL SOLUBLE	IONICO	TOTAL SOLUBLE	IONICO	PRECIPITADO
1ª hora	C	10,30 ± 1,33	6,37 ± 0,63	6,51 ± 0,27	1,82 ± 0,83	85,21 ± 1,97
	CGF	10,93 ± 0,53	9,03 ± 0,83	7,87 ± 0,71	10,06 ± 0,97	82,90 ± 1,40
	ANOVA	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
2ª hora	C	8,53 ± 1,44	4,01 ± 0,31	5,83 ± 0,18	1,09 ± 0,55	86,70 ± 2,03
	CGF	7,00 ± 0,40	6,32 ± 0,62	3,84 ± 0,22	5,95 ± 0,18	90,12 ± 0,62
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
3ª hora	C	7,29 ± 0,92	3,28 ± 0,57	4,29 ± 0,14	0,36 ± 0,63	89,75 ± 2,03
	CGF	4,69 ± 0,16	4,51 ± 0,31	2,57 ± 0,12	4,68 ± 0,23	93,37 ± 0,26
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,01	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
4ª hora	C	7,61 ± 0,81	2,91 ± 0,83	3,69 ± 0,19	0,55 ± 0,55	89,08 ± 1,35
	CGF	4,99 ± 0,07	5,05 ± 0,31	3,96 ± 1,01	5,57 ± 0,98	91,67 ± 1,07
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001	N.S.	P < 0,001	N.S.

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

TABLA XX

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL CALCIO EN PRESENCIA DE CASEINA O DE UNA MEZCLA DE CASEINA CON GLUCOSA Y FRUCTOSA CALENTADAS A DISTINTAS TEMPERATURAS. PORCENTAJE DE CALCIO IONICO RESPECTO AL SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.**

<u>TIEMPO</u>	<u>TRATAMIENTO</u>	<u>C</u>	<u>CGF</u>
1 <sup>a</sup> hora	S.T.	48,25 ± 6,56	54,88 ± 5,98
	150 °C	55,16 ± 7,19	47,59 ± 2,87
	200 °C	62,18 ± 5,24	82,87 ± 11,03
	ANOVA	N.S.	P < 0,05
2 <sup>a</sup> hora	S.T.	46,37 ± 7,39	53,30 ± 7,43
	150 °C	52,06 ± 5,27	45,49 ± 3,02
	200 °C	47,38 ± 4,37	90,83 ± 14,45
	ANOVA	N.S.	P < 0,05
3 <sup>a</sup> hora	S.T.	41,43 ± 5,70	51,47 ± 5,63
	150 °C	51,36 ± 5,71	43,94 ± 1,47
	200 °C	44,94 ± 5,20	96,10 ± 5,94
	ANOVA	N.S.	P < 0,001
4 <sup>a</sup> hora	S.T.	39,02 ± 7,31	48,40 ± 4,29
	150 °C	48,02 ± 3,36	43,94 ± 1,31
	200 °C	37,83 ± 6,97	101,09 ± 4,91
	ANOVA	N.S.	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

TABLA XXI

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL CALCIO DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL CALCIO DIETETICO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS Y NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.**

TIEMPO	DIETA QUE CONTIENE	DIALIZADO		NO DIALIZADO	
		TOTAL SOLUBLE	IONICO	TOTAL SOLUBLE	PRECIPITADO
1ª hora	C ST	22,60 ± 2,65 <sup>A</sup>	21,84 ± 1,50 <sup>A</sup>	35,23 ± 0,70	42,17 ± 1,19 <sup>A</sup>
	C 150	21,84 ± 0,61 <sup>AB</sup>	21,37 ± 0,56 <sup>A</sup>	36,59 ± 0,54	41,93 ± 0,08 <sup>A</sup>
	CA 150	21,25 ± 0,89 <sup>AB</sup>	16,10 ± 0,65 <sup>B</sup>	35,99 ± 0,50	42,75 ± 0,53 <sup>AB</sup>
	CGF 150	20,22 ± 0,50 <sup>BC</sup>	17,35 ± 0,40 <sup>B</sup>	36,07 ± 0,05	44,93 ± 0,66 <sup>C</sup>
	CGFA 150	22,03 ± 0,69 <sup>AB</sup>	22,27 ± 0,10 <sup>A</sup>	36,04 ± 0,05	41,69 ± 0,53 <sup>A</sup>
	ANOVA	P < 0,05	P < 0,001	N.S.	P < 0,01
2ª hora	C ST	23,73 ± 1,21 <sup>A</sup>	23,55 ± 0,35 <sup>A</sup>	36,07 ± 0,84 <sup>A</sup>	40,19 ± 1,01 <sup>A</sup>
	C 150	20,63 ± 0,17 <sup>BC</sup>	19,85 ± 0,10 <sup>B</sup>	34,73 ± 0,30 <sup>B</sup>	44,63 ± 0,47 <sup>B</sup>
	CA 150	21,71 ± 0,23 <sup>B</sup>	16,25 ± 0,56 <sup>C</sup>	32,27 ± 0,19 <sup>C</sup>	46,03 ± 0,04 <sup>B</sup>
	CGF 150	19,63 ± 0,24 <sup>C</sup>	16,22 ± 1,10 <sup>C</sup>	35,07 ± 0,33 <sup>BD</sup>	45,30 ± 0,09 <sup>B</sup>
	CGFA 150	23,57 ± 1,48 <sup>A</sup>	22,67 ± 0,95 <sup>A</sup>	35,73 ± 0,26 <sup>AD</sup>	40,70 ± 1,64 <sup>A</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
3ª hora	C ST	22,67 ± 0,81 <sup>A</sup>	23,50 ± 0,34 <sup>A</sup>	37,11 ± 0,61 <sup>A</sup>	40,21 ± 0,38 <sup>A</sup>
	C 150	19,66 ± 0,14 <sup>B</sup>	18,59 ± 0,09 <sup>B</sup>	32,67 ± 0,20 <sup>B</sup>	47,67 ± 0,06 <sup>B</sup>
	CA 150	20,39 ± 0,16 <sup>C</sup>	14,29 ± 0,45 <sup>C</sup>	32,66 ± 0,54 <sup>B</sup>	46,95 ± 0,51 <sup>B</sup>
	CGF 150	18,06 ± 0,33 <sup>C</sup>	14,74 ± 0,15 <sup>C</sup>	34,13 ± 0,22 <sup>C</sup>	47,80 ± 0,25 <sup>B</sup>
	CGF 150	21,89 ± 1,39 <sup>A</sup>	21,87 ± 1,10 <sup>B</sup>	34,81 ± 0,24 <sup>C</sup>	43,29 ± 1,17 <sup>C</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
4ª hora	C ST	21,60 ± 0,79 <sup>A</sup>	20,84 ± 0,71 <sup>A</sup>	36,89 ± 0,53 <sup>A</sup>	41,50 ± 0,27 <sup>A</sup>
	C 150	17,76 ± 0,21 <sup>B</sup>	17,29 ± 0,46 <sup>B</sup>	31,86 ± 0,64 <sup>B</sup>	50,38 ± 0,83 <sup>B</sup>
	CA 150	19,28 ± 0,20 <sup>C</sup>	13,30 ± 0,43 <sup>C</sup>	32,70 ± 0,31 <sup>C</sup>	48,02 ± 0,22 <sup>C</sup>
	CGF 150	17,46 ± 0,20 <sup>B</sup>	13,13 ± 0,40 <sup>C</sup>	32,93 ± 0,08 <sup>C</sup>	49,60 ± 0,13 <sup>B</sup>
	CGFA 150	21,06 ± 1,38 <sup>A</sup>	20,74 ± 0,73 <sup>A</sup>	33,19 ± 0,41 <sup>C</sup>	45,74 ± 1,72 <sup>D</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 3 determinaciones ± SD

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora y columna (Test de Duncan's).

TABLA XXII

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL CALCIO DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. PORCENTAJE DE CALCIO IONICO RESPECTO AL SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.**

<u>TIEMPO</u>	<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>DIALIZADO</u>
1ª hora	C ST	97,12 ± 2,78 <sup>A</sup>
	C 150	99,24 ± 1,31 <sup>A</sup>
	CA 150	75,80 ± 0,90 <sup>B</sup>
	CGF 150	85,81 ± 1,18 <sup>B</sup>
	CGFA 150	100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001
2ª hora	C ST	98,77 ± 1,74 <sup>A</sup>
	C 150	96,03 ± 1,05 <sup>A</sup>
	CA 150	74,83 ± 1,85 <sup>B</sup>
	CGF 150	80,41 ± 3,60 <sup>B</sup>
	CGFA 150	97,40 ± 3,67 <sup>A</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001
3ª hora	C ST	100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	C 150	94,51 ± 0,66 <sup>A</sup>
	CA 150	70,10 ± 2,78 <sup>B</sup>
	CGF 150	81,62 ± 1,59 <sup>B</sup>
	CGFA 150	100,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001
4ª hora	C ST	95,97 ± 0,14 <sup>A</sup>
	C 150	97,40 ± 3,63 <sup>A</sup>
	CA 150	68,98 ± 1,77 <sup>B</sup>
	CGF 150	75,17 ± 1,45 <sup>B</sup>
	CGFA 150	99,93 ± 0,09 <sup>A</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora (Test de Duncan's).

TABLA XXIII

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL MAGNESIO DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE MAGNESIO DIETETICO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS Y NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.**

<u>TIEMPO</u>	<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>DIALIZADO</u>		<u>NO DIALIZADO</u>
		<u>SOLUBLE</u>	<u>SOLUBLE</u>	<u>PRECIPITADO</u>
1ª hora	C ST	30,43 ± 1,16 <sup>A</sup>	67,64 ± 0,55 <sup>A</sup>	1,93 ± 1,65 <sup>A</sup>
	C 150	28,35 ± 2,08 <sup>A</sup>	72,52 ± 1,01 <sup>B</sup>	0,85 ± 0,43 <sup>A</sup>
	CA 150	27,77 ± 1,69 <sup>AB</sup>	79,17 ± 0,97 <sup>C</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	CGF 150	21,06 ± 1,71 <sup>C</sup>	67,13 ± 1,01 <sup>A</sup>	11,81 ± 2,68 <sup>B</sup>
	CGFA 150	24,18 ± 3,02 <sup>BC</sup>	82,26 ± 0,96 <sup>D</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	ANOVA	P < 0,01	P < 0,001	P < 0,001
2ª hora	C ST	34,03 ± 1,16 <sup>A</sup>	59,80 ± 0,55 <sup>A</sup>	6,16 ± 1,75 <sup>A</sup>
	C 150	32,25 ± 1,73 <sup>A</sup>	66,13 ± 2,81 <sup>B</sup>	2,44 ± 3,53 <sup>B</sup>
	CA 150	33,08 ± 0,73 <sup>A</sup>	71,79 ± 0,49 <sup>C</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>B</sup>
	CGF 150	30,29 ± 0,67 <sup>B</sup>	61,33 ± 0,83 <sup>A</sup>	8,21 ± 1,25 <sup>A</sup>
	CGFA 150	33,22 ± 0,84 <sup>A</sup>	81,91 ± 1,06 <sup>D</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>B</sup>
	ANOVA	P = 0,0105	P < 0,001	P < 0,01
3ª hora	C ST	34,91 ± 0,59 <sup>A</sup>	60,90 ± 0,71 <sup>AB</sup>	4,18 ± 0,21 <sup>A</sup>
	C 150	31,58 ± 1,75 <sup>B</sup>	64,50 ± 3,44 <sup>A</sup>	4,92 ± 5,16 <sup>AB</sup>
	CA 150	34,35 ± 0,56 <sup>A</sup>	68,35 ± 0,23 <sup>C</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	CGF 150	31,01 ± 1,93 <sup>B</sup>	59,36 ± 1,22 <sup>B</sup>	9,63 ± 3,13 <sup>B</sup>
	CGFA 150	35,67 ± 0,84 <sup>A</sup>	77,76 ± 1,37 <sup>D</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>
	ANOVA	P < 0,01	P < 0,001	P < 0,01
4ª hora	C ST	34,93 ± 1,09 <sup>A</sup>	54,14 ± 0,32 <sup>A</sup>	10,92 ± 1,40 <sup>A</sup>
	C 150	32,02 ± 2,21 <sup>B</sup>	60,07 ± 3,90 <sup>B</sup>	7,91 ± 6,09 <sup>A</sup>
	CA 150	34,09 ± 0,80 <sup>AB</sup>	65,40 ± 0,43 <sup>C</sup>	0,52 ± 0,45 <sup>B</sup>
	CGF 150	31,64 ± 1,94 <sup>B</sup>	55,52 ± 0,91 <sup>A</sup>	12,83 ± 2,78 <sup>A</sup>
	CGFA 150	35,50 ± 0,89 <sup>A</sup>	73,14 ± 0,36 <sup>D</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora y columna (Test de Duncan's).

TABLA XXIV

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL COBRE DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE COBRE DIETETICO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS Y NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.**

<u>TIEMPO</u>	<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>DIALIZADO</u>		<u>NO DIALIZADO</u>
		<u>SOLUBLE</u>	<u>SOLUBLE</u>	<u>PRECIPITADO</u>
1ª hora	C ST	0,00 ± 0,00	89,38 ± 1,96 <sup>A</sup>	10,62 ± 1,96 <sup>A</sup>
	C 150	0,00 ± 0,00	86,49 ± 1,37 <sup>AB</sup>	13,51 ± 1,37 <sup>AB</sup>
	CA 150	0,00 ± 0,00	84,07 ± 0,90 <sup>B</sup>	15,93 ± 0,90 <sup>B</sup>
	CGF 150	0,00 ± 0,00	84,65 ± 1,79 <sup>B</sup>	15,35 ± 1,79 <sup>B</sup>
	CGFA 150	0,00 ± 0,00	86,55 ± 1,49 <sup>AB</sup>	13,45 ± 1,49 <sup>AB</sup>
	<i>ANOVA</i>	N.S.	P < 0,05	P < 0,05
2ª hora	C ST	0,00 ± 0,00	89,38 ± 1,19 <sup>A</sup>	12,47 ± 1,19 <sup>A</sup>
	C 150	0,00 ± 0,00	84,93 ± 2,11 <sup>B</sup>	15,07 ± 2,11 <sup>B</sup>
	CA 150	0,00 ± 0,00	79,81 ± 1,10 <sup>C</sup>	20,19 ± 1,10 <sup>C</sup>
	CGF 150	0,00 ± 0,00	84,11 ± 0,53 <sup>B</sup>	15,89 ± 0,53 <sup>B</sup>
	CGFA 150	0,00 ± 0,00	83,82 ± 1,18 <sup>B</sup>	16,18 ± 1,18 <sup>B</sup>
	<i>ANOVA</i>	N.S.	P < 0,001	P < 0,001
3ª hora	C ST	8,87 ± 0,02 <sup>A</sup>	89,37 ± 0,10 <sup>A</sup>	1,77 ± 0,10 <sup>A</sup>
	C 150	12,21 ± 1,03 <sup>B</sup>	82,98 ± 1,91 <sup>B</sup>	4,81 ± 1,50 <sup>B</sup>
	CA 150	10,34 ± 0,49 <sup>C</sup>	80,14 ± 1,09 <sup>C</sup>	9,51 ± 1,35 <sup>C</sup>
	CGF 150	10,28 ± 0,11 <sup>C</sup>	81,99 ± 1,07 <sup>BC</sup>	7,73 ± 1,19 <sup>C</sup>
	CGFA 150	10,22 ± 1,12 <sup>C</sup>	82,37 ± 0,82 <sup>B</sup>	7,41 ± 1,55 <sup>C</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,01	P < 0,001	P < 0,001
4ª hora	C ST	10,64 ± 0,49 <sup>A</sup>	87,79 ± 1,58 <sup>A</sup>	1,75 ± 1,77 <sup>A</sup>
	C 150	15,76 ± 1,51 <sup>B</sup>	81,55 ± 1,23 <sup>B</sup>	2,69 ± 1,37 <sup>A</sup>
	CA 150	14,16 ± 0,28 <sup>B</sup>	79,46 ± 0,62 <sup>C</sup>	6,38 ± 0,87 <sup>B</sup>
	CGF 150	11,28 ± 0,50 <sup>A</sup>	80,58 ± 0,30 <sup>BC</sup>	8,15 ± 0,75 <sup>B</sup>
	CGFA 150	11,09 ± 1,02 <sup>A</sup>	80,41 ± 0,65 <sup>BC</sup>	8,50 ± 0,97 <sup>B</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora y columna (Test de Duncan's).

TABLA XXV

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL HIERRO DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL HIERRO DIETETICO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL**

<u>TIEMPO</u>	<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>SOLUBLE</u>	<u>PRECIPITADO</u>
1ª hora	C ST	66,93 ± 0,97 <sup>AB</sup>	33,07 ± 0,97 <sup>AB</sup>
	C 150	65,25 ± 1,30 <sup>B</sup>	34,75 ± 1,30 <sup>B</sup>
	CA 150	62,57 ± 2,57 <sup>C</sup>	37,43 ± 2,57 <sup>C</sup>
	CGF 150	68,33 ± 0,49 <sup>A</sup>	31,67 ± 0,49 <sup>A</sup>
	CGFA 150	67,55 ± 0,41 <sup>AB</sup>	32,45 ± 0,41 <sup>AB</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,01	P < 0,01
2ª hora	C ST	67,96 ± 0,66 <sup>A</sup>	32,04 ± 0,66 <sup>A</sup>
	C 150	57,86 ± 1,70 <sup>B</sup>	42,14 ± 1,70 <sup>B</sup>
	CA 150	59,06 ± 1,31 <sup>B</sup>	40,94 ± 1,31 <sup>B</sup>
	CGF 150	67,40 ± 0,75 <sup>A</sup>	32,60 ± 0,75 <sup>A</sup>
	CGFA 150	66,45 ± 0,81 <sup>A</sup>	33,55 ± 0,81 <sup>A</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001
3ª hora	C ST	66,85 ± 1,94 <sup>A</sup>	33,15 ± 1,94 <sup>A</sup>
	C 150	50,53 ± 0,90 <sup>B</sup>	49,47 ± 0,90 <sup>B</sup>
	CA 150	56,48 ± 1,30 <sup>C</sup>	43,52 ± 1,30 <sup>C</sup>
	CGF 150	66,70 ± 0,29 <sup>A</sup>	33,30 ± 0,29 <sup>A</sup>
	CGFA 150	66,61 ± 1,08 <sup>A</sup>	33,39 ± 1,08 <sup>A</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001
4ª hora	C ST	66,69 ± 1,25 <sup>A</sup>	33,31 ± 1,25 <sup>A</sup>
	C 150	47,21 ± 1,50 <sup>B</sup>	52,79 ± 1,50 <sup>B</sup>
	CA 150	55,30 ± 1,14 <sup>C</sup>	44,70 ± 1,14 <sup>C</sup>
	CGF 150	67,90 ± 0,89 <sup>A</sup>	32,10 ± 0,89 <sup>A</sup>
	CGFA 150	67,37 ± 0,70 <sup>A</sup>	32,63 ± 0,70 <sup>A</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar  
 Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora y columna (Test de Duncan's).

TABLA XXVI

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL ZINC DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL ZINC DIETETICO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL**

<u>TIEMPO</u>	<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>SOLUBLE</u>	<u>PRECIPITADO</u>
1ª hora	C ST	64,35 ± 0,13 <sup>A</sup>	35,65 ± 0,13 <sup>A</sup>
	C 150	59,17 ± 1,21 <sup>B</sup>	40,83 ± 1,21 <sup>B</sup>
	CA 150	51,82 ± 1,48 <sup>C</sup>	48,18 ± 1,48 <sup>C</sup>
	CGF 150	51,05 ± 0,84 <sup>C</sup>	48,95 ± 0,84 <sup>C</sup>
	CGFA 150	54,57 ± 1,08 <sup>D</sup>	45,43 ± 1,08 <sup>D</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001
2ª hora	C ST	63,91 ± 1,24 <sup>A</sup>	36,09 ± 1,24 <sup>A</sup>
	C 150	52,16 ± 0,54 <sup>B</sup>	47,84 ± 0,54 <sup>B</sup>
	CA 150	48,35 ± 0,81 <sup>C</sup>	51,65 ± 0,81 <sup>C</sup>
	CGF 150	49,26 ± 0,90 <sup>C</sup>	50,74 ± 0,90 <sup>C</sup>
	CGFA 150	51,70 ± 1,33 <sup>B</sup>	48,30 ± 1,33 <sup>B</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001
3ª hora	C ST	64,78 ± 2,04 <sup>A</sup>	35,22 ± 2,04 <sup>A</sup>
	C 150	46,05 ± 0,85 <sup>BC</sup>	53,95 ± 0,85 <sup>BC</sup>
	CA 150	44,25 ± 1,75 <sup>B</sup>	55,75 ± 1,75 <sup>B</sup>
	CGF 150	48,49 ± 1,08 <sup>C</sup>	51,51 ± 1,08 <sup>C</sup>
	CGFA 150	49,83 ± 3,86 <sup>C</sup>	50,17 ± 3,86 <sup>C</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001
4ª hora	C ST	63,75 ± 0,94 <sup>A</sup>	36,25 ± 0,94 <sup>A</sup>
	C 150	43,78 ± 0,80 <sup>B</sup>	56,22 ± 0,80 <sup>B</sup>
	CA 150	41,75 ± 1,28 <sup>B</sup>	58,25 ± 1,28 <sup>B</sup>
	CGF 150	50,68 ± 1,39 <sup>C</sup>	49,32 ± 1,39 <sup>C</sup>
	CGFA 150	47,57 ± 1,31 <sup>D</sup>	52,43 ± 1,31 <sup>D</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar  
 Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora y columna (Test de Duncan's).

TABLA XXVII

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL CALCIO DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL CALCIO DIETETICO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS Y NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.**

<u>TIEMPO</u>	<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>DIALIZADO</u>		<u>NO DIALIZADO</u>	
		<u>TOTAL SOLUBLE</u>	<u>IONICO</u>	<u>SOLUBLE</u>	<u>PRECIPITADO</u>
1ª hora	C	22,07 ± 1,71	20,34 ± 0,65 <sup>A</sup>	35,68 ± 3,95	42,25 ± 5,52
	SC	24,30 ± 1,24	14,42 ± 1,85 <sup>B</sup>	36,20 ± 2,87	39,49 ± 4,05
	SF	24,34 ± 1,21	13,58 ± 0,43 <sup>B</sup>	34,95 ± 0,71	40,71 ± 1,66
	PSC	23,32 ± 0,92	13,59 ± 1,24 <sup>B</sup>	31,69 ± 1,87	44,98 ± 1,02
	PSF	24,37 ± 1,29	12,89 ± 0,17 <sup>B</sup>	36,50 ± 2,20	39,13 ± 1,23
	<i>ANOVA</i>	N.S.	P < 0,001	N.S.	N.S.
2ª hora	C	22,82 ± 0,86 <sup>A</sup>	21,26 ± 0,30 <sup>A</sup>	34,21 ± 0,77 <sup>A</sup>	42,96 ± 1,44 <sup>A</sup>
	SC	24,76 ± 0,71 <sup>A<sup>BC</sup></sup>	14,69 ± 1,62 <sup>B</sup>	33,52 ± 1,75 <sup>A</sup>	41,72 ± 1,04 <sup>A</sup>
	SF	25,77 ± 1,82 <sup>BC</sup>	12,78 ± 0,88 <sup>B</sup>	34,60 ± 0,46 <sup>A</sup>	39,63 ± 2,24 <sup>A</sup>
	PSC	23,71 ± 0,95 <sup>AB</sup>	13,08 ± 1,16 <sup>B</sup>	26,61 ± 3,95 <sup>B</sup>	49,68 ± 4,82 <sup>B</sup>
	PSF	26,20 ± 1,53 <sup>C</sup>	13,46 ± 0,35 <sup>B</sup>	32,33 ± 4,15 <sup>A</sup>	41,46 ± 3,08 <sup>A</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,05	P < 0,05
3ª hora	C	21,56 ± 0,47 <sup>A</sup>	20,08 ± 0,34 <sup>A</sup>	36,60 ± 0,27 <sup>A</sup>	41,84 ± 0,47 <sup>A</sup>
	SC	22,62 ± 1,17 <sup>A</sup>	13,07 ± 0,69 <sup>B</sup>	29,56 ± 1,95 <sup>B</sup>	47,82 ± 2,76 <sup>B</sup>
	SF	23,41 ± 0,91 <sup>AB</sup>	11,89 ± 0,51 <sup>B</sup>	32,66 ± 0,53 <sup>C</sup>	43,92 ± 1,45 <sup>A</sup>
	PSC	21,79 ± 0,99 <sup>A</sup>	13,01 ± 2,10 <sup>B</sup>	26,88 ± 0,31 <sup>D</sup>	51,32 ± 0,68 <sup>C</sup>
	PSF	25,03 ± 2,05 <sup>B</sup>	13,29 ± 0,52 <sup>B</sup>	31,36 ± 2,38 <sup>BC</sup>	43,61 ± 1,28 <sup>A</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
4ª hora	C	19,80 ± 0,44 <sup>A</sup>	18,34 ± 0,52 <sup>A</sup>	35,81 ± 0,35 <sup>A</sup>	44,39 ± 0,77 <sup>A</sup>
	SC	20,60 ± 1,21 <sup>A</sup>	12,26 ± 0,56 <sup>B</sup>	29,52 ± 2,41 <sup>BC</sup>	49,87 ± 3,62 <sup>BC</sup>
	SF	21,67 ± 0,58 <sup>AB</sup>	11,25 ± 0,51 <sup>B</sup>	29,31 ± 0,93 <sup>BC</sup>	49,02 ± 0,75 <sup>BC</sup>
	PSC	21,13 ± 1,11 <sup>AB</sup>	12,30 ± 1,76 <sup>B</sup>	27,13 ± 0,49 <sup>C</sup>	51,73 ± 0,69 <sup>C</sup>
	PSF	23,33 ± 2,01 <sup>B</sup>	12,23 ± 0,21 <sup>B</sup>	30,12 ± 2,05 <sup>B</sup>	46,55 ± 1,38 <sup>AB</sup>
	<i>ANOVA</i>	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,01

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora y columna (Test de Duncan's).

TABLA XXVIII

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL CALCIO DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. PORCENTAJE DE CALCIO IONICO RESPECTO AL SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.**

<u>TIEMPO</u>	<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>DIALIZADO</u>
1ª hora	C	92,41 ± 4,54 <sup>A</sup>
	SC	56,16 ± 0,47 <sup>B</sup>
	SF	55,88 ± 3,23 <sup>B</sup>
	PSC	54,24 ± 0,35 <sup>B</sup>
	PSF	52,24 ± 2,64 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,001
2ª hora	C	93,26 ± 4,17 <sup>A</sup>
	SC	59,23 ± 4,90 <sup>B</sup>
	SF	49,61 ± 0,62 <sup>B</sup>
	PSC	51,32 ± 0,79 <sup>B</sup>
	PSF	50,13 ± 1,05 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,001
3ª hora	C	93,21 ± 3,66 <sup>A</sup>
	SC	57,80 ± 0,99 <sup>B</sup>
	SF	50,80 ± 0,84 <sup>B</sup>
	PSC	52,96 ± 0,58 <sup>B</sup>
	PSF	50,94 ± 0,07 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,001
4ª hora	C	92,65 ± 3,11 <sup>A</sup>
	SC	58,60 ± 0,92 <sup>B</sup>
	SF	51,95 ± 0,99 <sup>B</sup>
	PSC	52,16 ± 0,29 <sup>B</sup>
	PSF	50,53 ± 2,52 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora (Test de Duncan's).

TABLA XXIX

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL MAGNESIO DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DE MAGNESIO DIETETICO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES DIALIZADAS Y NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL.**

<u>TIEMPO</u>	<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>DIALIZADO</u>		<u>NO DIALIZADO</u>	
		<u>SOLUBLE</u>	<u>SOLUBLE</u>	<u>PRECIPITADO</u>	
1ª hora	C	27,31 ± 2,57	66,03 ± 2,03	6,66 ± 0,78	
	SC	31,41 ± 2,61	65,73 ± 2,68	3,34 ± 3,22	
	SF	30,24 ± 2,11	67,02 ± 0,85	2,73 ± 1,29	
	PSC	30,98 ± 0,89	67,85 ± 1,56	1,16 ± 1,62	
	PSF	27,30 ± 0,86	65,99 ± 2,05	6,71 ± 2,21	
	ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	
2ª hora	C	34,66 ± 2,58 <sup>A</sup>	59,49 ± 1,83 <sup>A</sup>	5,85 ± 4,11	
	SC	39,12 ± 1,93 <sup>B</sup>	60,49 ± 1,07 <sup>AB</sup>	1,12 ± 1,18	
	SF	34,84 ± 1,52 <sup>A</sup>	63,53 ± 1,56 <sup>C</sup>	1,67 ± 1,63	
	PSC	35,77 ± 0,78 <sup>A</sup>	62,55 ± 1,15 <sup>BC</sup>	1,73 ± 1,83	
	PSF	34,41 ± 0,48 <sup>A</sup>	63,46 ± 0,77 <sup>C</sup>	2,11 ± 0,81	
	ANOVA	P < 0,05	P < 0,05	N.S.	
3ª hora	C	35,67 ± 1,10 <sup>A</sup>	60,28 ± 0,46	4,04 ± 0,99	
	SC	40,12 ± 1,51 <sup>B</sup>	60,28 ± 0,60	0,56 ± 0,96	
	SF	34,94 ± 0,73 <sup>A</sup>	60,61 ± 3,97	4,45 ± 4,70	
	PSC	38,99 ± 0,21 <sup>B</sup>	58,75 ± 0,49	2,26 ± 0,28	
	PSF	34,30 ± 1,08 <sup>A</sup>	62,03 ± 1,54	3,62 ± 2,57	
	ANOVA	P < 0,001	N.S.	N.S.	
4ª hora	C	35,34 ± 3,27	55,88 ± 1,75	8,77 ± 2,70	
	SC	38,85 ± 1,53	54,64 ± 0,59	6,50 ± 2,08	
	SF	37,48 ± 1,44	56,12 ± 1,07	6,39 ± 1,48	
	PSC	38,39 ± 1,30	56,26 ± 0,18	5,35 ± 1,17	
	PSF	36,19 ± 0,57	56,26 ± 0,58	7,51 ± 1,15	
	ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar  
 Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora y columna (Test de Duncan's).

TABLA XXX

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL HIERRO DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL HIERRO DIETETICO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL**

<u>TIEMPO</u>	<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>SOLUBLE</u>	<u>PRECIPITADO</u>
1ª hora	C	68,16 ± 1,33 <sup>A</sup>	31,84 ± 1,33 <sup>A</sup>
	SC	55,23 ± 0,27 <sup>B</sup>	44,77 ± 0,27 <sup>B</sup>
	SF	53,59 ± 0,33 <sup>C</sup>	46,41 ± 0,33 <sup>C</sup>
	PSC	56,66 ± 0,55 <sup>D</sup>	43,34 ± 0,55 <sup>D</sup>
	PSF	56,49 ± 0,58 <sup>BD</sup>	43,51 ± 0,58 <sup>BD</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001
2ª hora	C	64,51 ± 0,40 <sup>A</sup>	35,49 ± 0,40 <sup>A</sup>
	SC	54,90 ± 0,15 <sup>B</sup>	45,10 ± 0,15 <sup>B</sup>
	SF	54,75 ± 2,29 <sup>B</sup>	45,25 ± 2,29 <sup>B</sup>
	PSC	54,58 ± 0,19 <sup>B</sup>	45,42 ± 0,19 <sup>B</sup>
	PSF	54,25 ± 0,76 <sup>B</sup>	45,75 ± 0,76 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001
3ª hora	C	66,56 ± 0,15 <sup>A</sup>	33,44 ± 0,15 <sup>A</sup>
	SC	53,77 ± 0,60 <sup>B</sup>	46,23 ± 0,60 <sup>B</sup>
	SF	57,85 ± 5,86 <sup>B</sup>	42,15 ± 5,86 <sup>B</sup>
	PSC	55,38 ± 0,16 <sup>B</sup>	44,62 ± 0,16 <sup>B</sup>
	PSF	55,12 ± 0,07 <sup>B</sup>	44,88 ± 0,07 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001
4ª hora	C	66,21 ± 0,94 <sup>A</sup>	33,79 ± 0,94 <sup>A</sup>
	SC	53,64 ± 0,30 <sup>B</sup>	46,36 ± 0,30 <sup>B</sup>
	SF	53,46 ± 0,14 <sup>B</sup>	46,54 ± 0,14 <sup>B</sup>
	PSC	54,66 ± 0,28 <sup>B</sup>	45,34 ± 0,28 <sup>B</sup>
	PSF	53,65 ± 0,53 <sup>B</sup>	46,35 ± 0,53 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar  
 Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora y columna (Test de Duncan's).

TABLA XXXI

**DIGESTIBILIDAD "IN VITRO" DEL ZINC DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. DISTRIBUCION PORCENTUAL DEL ZINC DIETETICO TOTAL EN SOLUBLE Y NO SOLUBLE EN LAS FRACCIONES NO DIALIZADAS A CADA HORA DE DIGESTION INTESTINAL**

<u>TIEMPO</u>	<u>DIETA QUE CONTIENE</u>	<u>SOLUBLE</u>	<u>PRECIPITADO</u>
1ª hora	C	65,05 ± 0,36 <sup>A</sup>	34,95 ± 0,36 <sup>A</sup>
	SC	55,23 ± 2,52 <sup>B</sup>	44,77 ± 2,52 <sup>B</sup>
	SF	52,38 ± 3,29 <sup>BC</sup>	47,62 ± 3,29 <sup>BC</sup>
	PSC	45,28 ± 0,64 <sup>D</sup>	54,72 ± 0,64 <sup>D</sup>
	PSF	49,51 ± 1,13 <sup>C</sup>	50,49 ± 1,13 <sup>C</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001
2ª hora	C	65,19 ± 0,24 <sup>A</sup>	34,80 ± 0,24 <sup>A</sup>
	SC	50,38 ± 0,82 <sup>B</sup>	49,62 ± 0,82 <sup>B</sup>
	SF	47,72 ± 0,40 <sup>C</sup>	52,28 ± 0,40 <sup>C</sup>
	PSC	41,66 ± 0,40 <sup>D</sup>	58,34 ± 0,40 <sup>D</sup>
	PSF	44,00 ± 2,18 <sup>B</sup>	56,00 ± 2,18 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001
3ª hora	C	64,84 ± 0,68 <sup>A</sup>	35,16 ± 0,68 <sup>A</sup>
	SC	54,53 ± 0,93 <sup>B</sup>	45,47 ± 0,93 <sup>B</sup>
	SF	57,17 ± 3,59 <sup>B</sup>	42,83 ± 3,59 <sup>B</sup>
	PSC	48,89 ± 1,16 <sup>C</sup>	51,11 ± 1,16 <sup>C</sup>
	PSF	57,36 ± 5,09 <sup>B</sup>	42,64 ± 5,09 <sup>B</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001
4ª hora	C	65,52 ± 0,35 <sup>A</sup>	34,48 ± 0,35 <sup>A</sup>
	SC	47,42 ± 0,80 <sup>B</sup>	52,58 ± 0,80 <sup>B</sup>
	SF	56,80 ± 0,74 <sup>C</sup>	43,20 ± 0,74 <sup>C</sup>
	PSC	54,57 ± 3,94 <sup>CD</sup>	45,53 ± 3,94 <sup>CD</sup>
	PSF	51,24 ± 2,18 <sup>D</sup>	48,76 ± 2,18 <sup>D</sup>
	ANOVA	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 4 determinaciones ± desviación estándar

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma hora y columna (Test de Duncan's).

TABLA XXXII

EFICACIA ALIMENTARIA DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. SEMANA DE BALANCE.

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>INGESTA (g rata/día s.s.)</u>	<u>Δ PESO (g rata/día)</u>	<u>EFICACIA ALIMENTARIA</u>
C ST	9,10 ± 0,18	4,29 ± 0,15	0,47 ± 0,01 <sup>A</sup>
C 150°C	8,18 ± 0,46	3,51 ± 0,35	0,42 ± 0,03 <sup>B</sup>
CA 150°C	8,37 ± 0,42	3,70 ± 0,35	0,43 ± 0,02 <sup>B</sup>
CGF 150°C	8,56 ± 0,45	3,30 ± 0,29	0,38 ± 0,02 <sup>C</sup>
CGFA 150°C	8,97 ± 0,61	3,67 ± 0,33	0,40 ± 0,01 <sup>BC</sup>
ANOVA	N.S.	N.S.	P < 0,01

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's)

TABLA XXXIII

BALANCE DE CALCIO CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>Ca INGERIDO</u>	<u>Ca HECES</u>	<u>Ca ORINA</u>	<u>Ca ABSORBIDO</u>	<u>Ca RETENIDO</u>	<u>% A/I</u>	<u>% R/A</u>	<u>% R/I</u>
	(mg/día)							
C ST	56,19 ± 1,13	19,24 ± 1,06 <sup>A</sup>	1,37 ± 0,16	36,95 ± 0,56	35,58 ± 0,58	65,89 ± 1,31 <sup>A</sup>	96,29 ± 0,44 <sup>A</sup>	63,44 ± 1,23 <sup>AC</sup>
C 150°C	53,11 ± 1,39	15,60 ± 0,90 <sup>AB</sup>	1,47 ± 0,19	37,51 ± 0,82	36,04 ± 0,88	70,75 ± 1,17 <sup>B</sup>	96,05 ± 0,52 <sup>A</sup>	67,95 ± 1,13 <sup>B</sup>
CA 150°C	52,10 ± 2,57	15,49 ± 0,74 <sup>B</sup>	1,83 ± 0,27	36,61 ± 2,01	34,78 ± 1,85	70,12 ± 0,94 <sup>B</sup>	95,07 ± 0,61 <sup>AB</sup>	66,65 ± 0,83 <sup>AB</sup>
CGF 150°C	51,91 ± 2,74	17,07 ± 1,36 <sup>AB</sup>	2,48 ± 0,42	34,84 ± 1,64	32,36 ± 1,56	67,38 ± 1,29 <sup>AB</sup>	92,90 ± 1,11 <sup>B</sup>	62,55 ± 1,16 <sup>C</sup>
CGFA 150°C	54,05 ± 3,60	18,83 ± 1,57 <sup>AB</sup>	2,41 ± 0,54	35,22 ± 2,35	32,81 ± 2,16	65,30 ± 1,48 <sup>A</sup>	93,30 ± 1,29 <sup>B</sup>	60,92 ± 1,57 <sup>C</sup>
ANOVA	N.S.	P > 0,05	N.S.	N.S.	N.S.	P < 0,01	P < 0,05	P < 0,001

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XXXIV

BALANCE DE MAGNESIO CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>Mg INGERIDO</u>	<u>Mg HECES</u>	<u>Mg ORINA</u>	<u>Mg ABSORBIDO</u>	<u>Mg RETENIDO</u>	<u>% A/I</u>	<u>% R/A</u>	<u>% R/I</u>
	(mg/día)							
C ST	4,40 ± 0,09	0,96 ± 0,07	0,62 ± 0,02	3,45 ± 0,07 <sup>A</sup>	2,83 ± 0,07 <sup>A</sup>	78,36 ± 1,28	81,94 ± 0,71	64,23 ± 1,40
C 150°C	3,68 ± 0,20	0,84 ± 0,07	0,64 ± 0,07	2,84 ± 0,17 <sup>BC</sup>	2,20 ± 0,12 <sup>CD</sup>	77,07 ± 1,25	77,58 ± 1,55	59,73 ± 1,10
CA 150°C	3,38 ± 0,17	0,89 ± 0,12	0,52 ± 0,06	2,49 ± 0,14 <sup>C</sup>	1,97 ± 0,14 <sup>D</sup>	73,90 ± 2,86	78,65 ± 2,71	58,47 ± 3,74
CGF 150°C	4,14 ± 0,22	0,83 ± 0,07	0,66 ± 0,07	3,31 ± 0,17 <sup>AB</sup>	2,66 ± 0,17 <sup>AB</sup>	80,12 ± 1,15	79,92 ± 2,20	64,03 ± 2,00
CGFA 150°C	3,90 ± 0,26	0,84 ± 0,07	0,66 ± 0,10	3,06 ± 0,23 <sup>AB</sup>	2,40 ± 0,13 <sup>BC</sup>	78,22 ± 1,28	79,50 ± 2,14	62,13 ± 1,68
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	P < 0,01	P < 0,001	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's)

TABLA XXXV

BALANCE DE COBRE CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>Cu INGERIDO</u>	<u>Cu HECES</u>	<u>Cu ABSORBIDO</u>	<u>% A/I</u>
	(µg/día)			
C ST	76,32 ± 1,54	57,96 ± 2,19	18,36 ± 1,06	24,20 ± 1,64
C 150°C	65,48 ± 3,66	49,89 ± 2,09	15,60 ± 2,03	23,10 ± 2,41
CA 150°C	68,59 ± 3,39	49,94 ± 2,41	18,65 ± 1,59	26,98 ± 1,77
CGF 150°C	67,84 ± 3,58	52,66 ± 3,32	15,18 ± 1,56	22,50 ± 1,94
CGFA 150°C	73,49 ± 5,00	57,10 ± 4,73	16,39 ± 2,53	22,60 ± 3,03
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con  $P < 0,05$  entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's)

TABLA XXXVI

BALANCE DE HIERRO CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>Fe INGERIDO</u>	<u>Fe HECES</u>	<u>Fe ORINA</u>	<u>Fe ABSORBIDO</u>	<u>Fe RETENIDO</u>	<u>% A/I</u>	<u>% R/A</u>	<u>% R/I</u>
	(µg/día)							
C ST	532,74 ± 10,74	272,59 ± 12,65 <sup>A</sup>	17,19 ± 1,40 <sup>A</sup>	260,15 ± 8,73	242,96 ± 8,92	48,93 ± 1,77 <sup>AB</sup>	93,33 ± 0,62 <sup>A</sup>	45,68 ± 1,71 <sup>A</sup>
C 150°C	482,53 ± 17,38	231,18 ± 7,47 <sup>B</sup>	25,56 ± 2,66 <sup>AB</sup>	251,36 ± 15,24	225,8 ± 15,92	51,81 ± 1,75 <sup>A</sup>	89,41 ± 1,58 <sup>AB</sup>	46,41 ± 2,01 <sup>A</sup>
CA 150°C	473,69 ± 23,38	215,12 ± 10,04 <sup>B</sup>	32,27 ± 2,48 <sup>BC</sup>	258,57 ± 16,30	226,30 ± 15,82	54,35 ± 1,47 <sup>A</sup>	87,14 ± 1,33 <sup>B</sup>	47,43 ± 1,71 <sup>A</sup>
CGF 150°C	494,90 ± 26,11	254,59 ± 17,83 <sup>AB</sup>	29,74 ± 4,11 <sup>B</sup>	240,31 ± 12,42	210,57 ± 11,20	48,81 ± 1,90 <sup>AB</sup>	87,64 ± 1,40 <sup>B</sup>	42,78 ± 1,83 <sup>AB</sup>
CGFA 150°C	507,63 ± 34,53	273,69 ± 16,06 <sup>A</sup>	41,31 ± 5,03 <sup>C</sup>	233,94 ± 21,02	192,63 ± 19,55	45,50 ± 1,96 <sup>B</sup>	81,27 ± 2,73 <sup>C</sup>	37,21 ± 2,36 <sup>B</sup>
ANOVA	N.S.	P < 0,05	P < 0,001	N. S.	N.S.	P < 0,05	P < 0,001	P < 0,01

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XXXVII

BALANCE DE ZINC CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>Zn INGERIDO</u>	<u>Zn HECES</u>	<u>Zn ORINA</u>	<u>Zn ABSORBIDO</u>	<u>Zn RETENIDO</u>	<u>% A/I</u>	<u>% R/A</u>	<u>% R/I</u>
	(µg/día)							
C ST	332,56 ± 6,71	244,82 ± 8,70 <sup>A</sup>	19,90 ± 1,29 <sup>AB</sup>	87,74 ± 6,45 <sup>A</sup>	67,84 ± 6,50 <sup>A</sup>	26,42 ± 2,00 <sup>A</sup>	76,50 ± 2,22 <sup>A</sup>	20,43 ± 2,00 <sup>A</sup>
C 150°C	288,60 ± 10,39	238,73 ± 9,90 <sup>A</sup>	17,59 ± 3,07 <sup>B</sup>	49,87 ± 14,20 <sup>A</sup>	32,28 ± 15,35 <sup>AB</sup>	17,80 ± 3,92 <sup>A</sup>	58,49 ± 10,98 <sup>AB</sup>	12,92 ± 3,62 <sup>AB</sup>
CA 150°C	296,06 ± 14,61	233,03 ± 15,13 <sup>A</sup>	27,79 ± 3,62 <sup>ABC</sup>	63,03 ± 16,65 <sup>A</sup>	35,25 ± 15,78 <sup>AB</sup>	21,23 ± 4,33 <sup>A</sup>	46,08 ± 10,57 <sup>B</sup>	12,41 ± 3,95 <sup>AB</sup>
CGF 150°C	292,35 ± 15,42	263,79 ± 36,25 <sup>AB</sup>	29,82 ± 4,04 <sup>BC</sup>	28,56 ± 29,00 <sup>AB</sup>	-1,26 ± 28,61 <sup>BC</sup>	17,60 ± 4,23 <sup>A</sup>	<37,36 ± 10,72 <sup>BC</sup>	<9,35 ± 3,3 <sup>BC</sup>
CGFA150°C	296,15 ± 20,14	323,04 ± 29,90 <sup>B</sup>	32,73 ± 4,82 <sup>C</sup>	-26,88 ± 26,40 <sup>B</sup>	-59,61 ± 28,10 <sup>C</sup>	<6,10 ± 2,42 <sup>B</sup>	<12,51 ± 7,25 <sup>C</sup>	<1,47 ± 0,85 <sup>C</sup>
ANOVA	N.S.	P = 0,0539	P < 0,05	P < 0,01	P = 0,0016	P < 0,01	P < 0,001	P < 0,01

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XXXVIII

CONTENIDO MINERAL POR GRAMO DE HIGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>CENIZAS (g/g hígado)</u>	<u>HIERRO</u>		<u>MAGNESIO</u>		<u>ZINC</u>		<u>COBRE</u>	
		<u>(mg/g hígado)</u>		<u>(mg/g hígado)</u>		<u>(μg/g hígado)</u>		<u>(μg/g hígado)</u>	
C ST	15,11 ± 0,28	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	7,12 ± 0,62	13,21 ± 1,06			
C 150°C	15,48 ± 0,41	0,23 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	8,63 ± 1,02	14,93 ± 1,53			
CA 150°C	15,76 ± 0,24	0,23 ± 0,02	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,00	7,31 ± 0,48	13,04 ± 0,84			
CCF 150°C	15,02 ± 0,24	0,19 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,00	8,07 ± 0,79	12,67 ± 0,72			
CGFA 150°C	15,07 ± 0,20	0,21 ± 0,02	0,17 ± 0,00	0,17 ± 0,00	8,65 ± 0,65	13,71 ± 0,91			
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.			

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

TABLA XXXIX

CONTENIDO MINERAL (TOTAL) DEL HIGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>PESO (g)</u>	<u>CENIZAS (mg)</u>	<u>HIERRO</u>	<u>MAGNESIO</u>	<u>ZINC</u>	<u>COBRE</u>
			<u>(mg)</u>		<u>(<math>\mu</math>g)</u>	
C ST	2,41 $\pm$ 0,17	36,30 $\pm$ 2,43	0,49 $\pm$ 0,06	0,42 $\pm$ 0,02	17,43 $\pm$ 2,31	31,71 $\pm$ 3,12
C 150°C	2,30 $\pm$ 0,21	35,20 $\pm$ 2,56	0,52 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,02	18,82 $\pm$ 1,31	32,32 $\pm$ 1,03
CA 150°C	2,26 $\pm$ 0,06	35,64 $\pm$ 1,37	0,53 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,01	16,66 $\pm$ 1,49	29,65 $\pm$ 2,53
CGF 150°C	2,19 $\pm$ 0,10	32,80 $\pm$ 1,09	0,42 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,01	17,43 $\pm$ 1,48	27,64 $\pm$ 1,66
CGFA 150°C	2,33 $\pm$ 0,14	35,12 $\pm$ 2,10	0,49 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,02	19,75 $\pm$ 1,11	31,33 $\pm$ 1,43
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 8 animales  $\pm$  error estándar de la media.

TABLA XL

CONTENIDO MINERAL POR GRAMO DE BAZO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>CENIZAS</u> (g/g bazo)	<u>MAGNESIO</u>	<u>HIERRO</u>	<u>ZINC</u>		<u>COBRE</u>
				(μg/g bazo)		
C ST	15,77 ± 0,72	192,10 ± 5,91	264,31 ± 14,71 <sup>AB</sup>	24,42 ± 0,84 <sup>A</sup>		183,52 ± 15,14
C 150°C	17,49 ± 1,41	201,34 ± 6,35	247,53 ± 23,55 <sup>B</sup>	24,20 ± 0,89 <sup>A</sup>		208,32 ± 32,23
CA 150°C	16,26 ± 0,23	200,31 ± 54,9	245,67 ± 13,91 <sup>B</sup>	25,10 ± 0,55 <sup>A</sup>		183,29 ± 19,60
CGF 150°C	16,93 ± 0,63	193,42 ± 9,57	313,51 ± 19,37 <sup>A</sup>	20,16 ± 0,48 <sup>B</sup>		165,77 ± 15,89
CGFA 150°C	16,87 ± 0,40	201,29 ± 5,94	253,96 ± 10,91 <sup>B</sup>	23,17 ± 1,43 <sup>A</sup>		210,99 ± 14,07
ANOVA	N.S.	N.S.	P < 0,05	P < 0,05		N.S.

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's)

TABLA XLI

CONTENIDO MINERAL TOTAL DEL BAZO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>PESO (g)</u>	<u>CENIZAS (mg)</u>	<u>MAGNESIO</u>	<u>HIERRO</u>	<u>ZINC</u>		<u>COBRE</u>
					(μg)		
C ST	0,17 ± 0,01	2,75 ± 0,22	33,07 ± 1,51	45,64 ± 3,46 <sup>AB</sup>	4,30 ± 0,37 <sup>A</sup>		31,71 ± 3,12
C 150°C	0,19 ± 0,04	3,17 ± 0,59	36,98 ± 6,39	43,83 ± 7,26 <sup>B</sup>	4,40 ± 0,71 <sup>A</sup>		32,32 ± 1,03
CA 150°C	0,16 ± 0,01	2,69 ± 0,15	33,17 ± 2,17	40,36 ± 2,48 <sup>B</sup>	4,13 ± 0,18 <sup>A</sup>		29,65 ± 2,53
CGF 150°C	0,19 ± 0,03	3,12 ± 0,51	34,85 ± 4,53	57,84 ± 8,79 <sup>A</sup>	3,75 ± 0,64 <sup>B</sup>		27,64 ± 1,66
CGFA 150°C	0,15 ± 0,01	2,57 ± 0,20	30,78 ± 2,45	39,34 ± 3,99 <sup>B</sup>	3,53 ± 0,34 <sup>B</sup>		31,33 ± 1,43
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	P < 0,05	P < 0,05		N.S.

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.  
 Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XLII

CONTENIDO DE CENIZAS Y ZINC POR GRAMO DE PIEL DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>CENIZAS (g)</u>	<u>ZINC (<math>\mu</math>g)</u>
C ST	7,53 $\pm$ 0,16	21,87 $\pm$ 1,37
C 150°C	8,08 $\pm$ 0,27	22,46 $\pm$ 1,65
CA 150°C	8,18 $\pm$ 0,29	25,18 $\pm$ 1,09
CGF 150°C	8,09 $\pm$ 0,26	25,96 $\pm$ 2,34
CGFA 150°C	7,59 $\pm$ 0,42	22,69 $\pm$ 1,10
ANOVA	N.S.	N.S.

---

Valores medios de 8 animales  $\pm$  error estándar de la media.

TABLA XLIII

INCREMENTO DE PESO (g rata/día) DE RATAS QUE CONSUMIERON DIETAS CON LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>1ª SEMANA</u>	<u>2ª SEMANA</u>	<u>3ª SEMANA</u>	<u>4ª SEMANA</u>
C	2,83 ± 0,12	3,52 ± 0,23	3,75 ± 0,23	4,60 ± 0,42
SC	3,02 ± 0,19	3,85 ± 0,29	4,41 ± 0,35	4,37 ± 0,60
SF	2,87 ± 0,36	3,52 ± 0,41	4,40 ± 1,03	4,73 ± 0,59
PSC	2,43 ± 0,20	3,87 ± 0,39	4,14 ± 0,36	4,92 ± 0,62
PSF	2,44 ± 0,26	3,66 ± 0,35	4,19 ± 0,61	5,12 ± 0,55
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

TABLA XLIV

COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>1ª SEMANA</u>		<u>2ª SEMANA</u>		<u>3ª SEMANA</u>		<u>4ª SEMANA</u>	
	<u>Ingesta</u>	<u>PER</u>	<u>Ingesta</u>	<u>PER</u>	<u>Ingesta</u>	<u>PER</u>	<u>Ingesta</u>	<u>PER</u>
	C	7,49 ± 0,16	3,46 ± 0,14	9,09 ± 0,25	3,66 ± 0,16	10,86 ± 0,50	3,01 ± 0,13	13,65 ± 0,61
SC	7,93 ± 0,40	3,65 ± 0,13	10,00 ± 3,92	3,66 ± 0,18	13,46 ± 0,52	3,11 ± 0,14	14,65 ± 0,78	3,22 ± 0,35
SF	7,40 ± 0,41	3,60 ± 0,31	9,39 ± 0,50	3,53 ± 0,28	12,76 ± 0,72	3,27 ± 0,11	14,54 ± 0,94	3,03 ± 0,22
PSC	7,36 ± 0,20	3,16 ± 0,20	9,94 ± 0,47	3,68 ± 0,25	12,71 ± 0,47	3,12 ± 0,20	15,35 ± 0,91	3,01 ± 0,22
PSF	7,01 ± 0,34	3,22 ± 0,19	8,97 ± 0,66	3,59 ± 0,20	12,53 ± 0,71	3,30 ± 0,25	15,08 ± 0,92	3,13 ± 0,16
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

TABLA XLV

EFICACIA ALIMENTARIA GLOBAL DE DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>INGESTA</u> (g rata/día s.s.)	<u>Δ PESO</u> (g rata/día)	<u>EFICACIA</u> <u>ALIMENTARIA</u>
C	10,60 ± 0,29	3,67 ± 0,18	0,35 ± 0,01
SC	11,51 ± 0,44	3,92 ± 0,31	0,34 ± 0,02
SF	11,02 ± 0,56	3,88 ± 0,39	0,35 ± 0,02
PSC	11,32 ± 0,39	3,84 ± 0,25	0,34 ± 0,01
PSF	11,60 ± 0,43	3,74 ± 0,30	0,32 ± 0,01
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.

---

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

TABLA XLVI

BALANCE DE CALCIO CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>Ca INGERIDO</u>	<u>Ca HECES</u>	<u>Ca ORINA</u>	<u>Ca ABSORBIDO</u>	<u>Ca RETENIDO</u>	<u>% A/I</u>	<u>% R/A</u>	<u>% R/I</u>
	(mg/día)							
C	97,28 ± 4,36	39,31 ± 2,11 <sup>AB</sup>	1,40 ± 0,22 <sup>AB</sup>	58,04 ± 2,52	56,65 ± 2,44	59,71 ± 0,82 <sup>AB</sup>	97,61 ± 0,34 <sup>AB</sup>	58,28 ± 0,87 <sup>AB</sup>
SC	102,30 ± 5,47	37,60 ± 2,57 <sup>A</sup>	1,86 ± 0,30 <sup>A</sup>	64,71 ± 3,67	62,85 ± 3,56	63,30 ± 1,58 <sup>A</sup>	97,15 ± 0,48 <sup>B</sup>	61,49 ± 1,47 <sup>A</sup>
SF	113,98 ± 7,40	52,88 ± 4,48 <sup>C</sup>	1,28 ± 0,18 <sup>AB</sup>	61,10 ± 4,20	59,82 ± 4,16	53,76 ± 1,84 <sup>C</sup>	97,85 ± 0,29 <sup>AB</sup>	52,61 ± 1,83 <sup>C</sup>
PSC	105,14 ± 6,22	46,98 ± 3,16 <sup>ABC</sup>	0,89 ± 0,09 <sup>B</sup>	58,16 ± 3,55	57,27 ± 3,57	55,39 ± 1,22 <sup>BC</sup>	98,47 ± 0,22 <sup>A</sup>	54,52 ± 1,26 <sup>BC</sup>
PSF	111,85 ± 6,20	48,31 ± 2,88 <sup>BC</sup>	1,07 ± 0,24 <sup>B</sup>	63,54 ± 4,81	62,47 ± 4,62	56,58 ± 1,92 <sup>BC</sup>	98,39 ± 0,29 <sup>A</sup>	55,67 ± 1,87 <sup>BC</sup>
ANOVA	N.S.	P < 0,01	P < 0,05	N.S.	N.S.	P < 0,001	P < 0,05	P < 0,01

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XLVII

BALANCE DE MAGNESIO CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>Mg INGERIDO</u>	<u>Mg HECES</u>	<u>Mg ORINA</u>	<u>Mg ABSORBIDO</u>	<u>Mg RETENIDO</u>	<u>% A/I</u>	<u>% R/A</u>	<u>% R/I</u>
	(mg/día)							
C	4,65 ± 0,21	1,89 ± 0,14	1,15 ± 0,18	2,76 ± 0,23	1,60 ± 0,09	58,93 ± 3,23	59,99 ± 4,29	34,44 ± 0,80
SC	5,27 ± 0,28	2,00 ± 0,17	1,60 ± 0,13	3,27 ± 0,17	1,67 ± 0,22	62,27 ± 2,13	50,29 ± 4,27	31,39 ± 2,96
SF	5,23 ± 0,34	1,96 ± 0,23	1,69 ± 0,05	3,27 ± 0,19	1,58 ± 0,17	63,01 ± 2,59	47,44 ± 2,58	30,08 ± 2,54
PSC	5,72 ± 0,33	2,22 ± 0,10	1,59 ± 0,16	3,50 ± 0,26	1,91 ± 0,16	60,81 ± 1,46	54,63 ± 2,98	33,20 ± 1,84
PSF	5,48 ± 0,30	2,12 ± 0,14	1,67 ± 0,17	3,36 ± 0,24	1,69 ± 0,16	61,21 ± 2,10	50,72 ± 3,69	30,83 ± 2,01
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

TABLA XLVIII

BALANCE DE COBRE CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>Cu INGERIDO</u>	<u>Cu HECES</u>	<u>Cu ABSORBIDO</u>	<u>% A/I</u>
	<u>(<math>\mu\text{g}/\text{día}</math>)</u>			
C	119,78 $\pm$ 5,37	19,29 $\pm$ 1,32 <sup>A</sup>	100,49 $\pm$ 5,76 <sup>A</sup>	83,56 $\pm$ 1,67 <sup>A</sup>
SC	119,38 $\pm$ 6,39	78,41 $\pm$ 4,57 <sup>B</sup>	40,98 $\pm$ 4,98 <sup>B</sup>	34,01 $\pm$ 2,89 <sup>B</sup>
SF	115,20 $\pm$ 7,48	77,59 $\pm$ 4,78 <sup>B</sup>	37,61 $\pm$ 3,69 <sup>B</sup>	32,28 $\pm$ 1,94 <sup>BC</sup>
PSC	127,18 $\pm$ 7,52	82,95 $\pm$ 6,55 <sup>BC</sup>	44,23 $\pm$ 3,77 <sup>B</sup>	35,03 $\pm$ 2,48 <sup>B</sup>
PSF	128,60 $\pm$ 7,13	94,61 $\pm$ 5,20 <sup>C</sup>	33,99 $\pm$ 4,15 <sup>B</sup>	26,18 $\pm$ 2,20 <sup>C</sup>
ANOVA	N.S.	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 8 animales  $\pm$  error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA XLIX

BALANCE DE HIERRO CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>Fe INGERIDO</u>	<u>Fe HECES</u>	<u>Fe ORINA</u>	<u>Fe ABSORBIDO</u>	<u>Fe RETENIDO</u>	<u>% A/I</u>	<u>% R/A</u>	<u>% R/I</u>
	(µg/día)							
C	815,81 ± 36,55	607,08 ± 28,43 <sup>A</sup>	27,81 ± 1,92	208,73 ± 29,14 <sup>A</sup>	180,92 ± 29,77 <sup>A</sup>	25,18 ± 2,95 <sup>A</sup>	84,26 ± 2,74 <sup>A</sup>	21,72 ± 3,14 <sup>A</sup>
SC	847,95 ± 45,37	481,36 ± 21,06 <sup>B</sup>	24,25 ± 0,65	366,59 ± 31,34 <sup>BC</sup>	342,35 ± 31,22 <sup>BC</sup>	42,94 ± 1,71 <sup>B</sup>	93,15 ± 0,48 <sup>B</sup>	40,04 ± 1,78 <sup>C</sup>
SF	806,48 ± 52,13	568,67 ± 44,25 <sup>AB</sup>	21,39 ± 0,88	237,81 ± 24,39 <sup>A</sup>	216,42 ± 23,94 <sup>A</sup>	30,92 ± 2,63 <sup>A</sup>	90,59 ± 0,68 <sup>B</sup>	26,88 ± 2,39 <sup>AB</sup>
PSC	851,74 ± 50,38	566,48 ± 31,57 <sup>AB</sup>	24,73 ± 2,09	285,27 ± 30,98 <sup>AB</sup>	260,54 ± 30,21 <sup>AB</sup>	33,19 ± 2,31 <sup>A</sup>	90,76 ± 1,21 <sup>B</sup>	30,26 ± 2,34 <sup>B</sup>
PSF	887,30 ± 49,20	483,92 ± 27,76 <sup>B</sup>	22,97 ± 2,21	403,38 ± 46,27 <sup>C</sup>	380,41 ± 44,75 <sup>C</sup>	48,44 ± 4,14 <sup>B</sup>	94,17 ± 0,42 <sup>B</sup>	42,26 ± 3,24 <sup>C</sup>
ANOVA	N.S.	P < 0,05	N.S.	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA L

BALANCE DE ZINC CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>Zn INGERIDO</u>	<u>Zn HECES</u>	<u>Zn ORINA</u>	<u>Zn ABSORBIDO</u>	<u>Zn RETENIDO</u>	<u>% A/I</u>	<u>% R/A</u>	<u>% R/I</u>
	(µg/día)							
C	389,25 ± 17,44	369,31 ± 17,09 <sup>A</sup>	26,43 ± 2,10 <sup>A</sup>	19,93 ± 10,65	- 6,49 ± 10,64	5,89 ± 2,18	<17,03 ± 8,93	2,29 ± 1,40
SC	432,20 ± 23,12	360,64 ± 19,35 <sup>A</sup>	20,67 ± 1,70 <sup>ABC</sup>	71,55 ± 29,72	50,89 ± 30,18	16,30 ± 5,54	47,72 ± 16,90	12,93 ± 5,18
SF	418,52 ± 27,17	380,54 ± 30,56 <sup>A</sup>	17,26 ± 1,80 <sup>C</sup>	37,98 ± 17,97	20,72 ± 18,91	10,69 ± 3,43	44,78 ± 13,52	7,81 ± 3,16
PSC	442,60 ± 26,18	415,61 ± 12,04 <sup>A</sup>	18,41 ± 1,71 <sup>BC</sup>	27,00 ± 24,54	8,59 ± 24,26	8,20 ± 3,19	34,74 ± 13,62	5,59 ± 2,77
PSF	452,36 ± 25,08	502,22 ± 54,17 <sup>B</sup>	25,17 ± 3,95 <sup>AB</sup>	-49,86 ± 50,40	-75,03 ± 52,26	<7,08 ± 4,24	<30,13 ± 14,40	<5,35 ± 3,48
ANOVA	N.S.	P < 0,05	P < 0,05	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA LI

CONTENIDO MINERAL POR GRAMO DE HIGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>CENIZAS</u> (g/g hígado)	<u>(mg/g hígado)</u>		<u>(µg/g hígado)</u>	
		<u>HIERRO</u>	<u>MAGNESIO</u>	<u>ZINC</u>	<u>COBRE</u>
C	12,29 ± 0,17	0,15 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,13 ± 0,00	17,75 ± 0,44 <sup>A</sup>	4,22 ± 0,25 <sup>A</sup>
SC	12,05 ± 0,14	0,11 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,13 ± 0,00	19,31 ± 0,61 <sup>AB</sup>	7,73 ± 0,50 <sup>B</sup>
SF	12,36 ± 0,09	0,07 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,13 ± 0,01	21,09 ± 0,52 <sup>BC</sup>	10,00 ± 0,85 <sup>BC</sup>
PSC	12,88 ± 0,09	0,09 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,15 ± 0,00	22,87 ± 0,89 <sup>C</sup>	8,99 ± 0,93 <sup>BC</sup>
PSF	12,24 ± 0,34	0,08 ± 0,00 <sup>B</sup>	0,14 ± 0,00	21,96 ± 1,81 <sup>BC</sup>	11,01 ± 1,28 <sup>C</sup>
ANOVA	N.S.	P < 0,001	N.S.	P < 0,01	P < 0,001

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA LII

CONTENIDO MINERAL (TOTAL) DEL HIGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>PESO (g)</u>	<u>CENIZAS (mg)</u>	<u>HIERRO</u>	<u>MAGNESIO</u>	<u>ZINC</u>	<u>COBRE</u>
			<u>(mg)</u>		<u>(µg)</u>	
C	7,90 ± 0,33	97,22 ± 4,61	1,17 ± 0,11 <sup>A</sup>	1,07 ± 0,05	139,84 ± 5,38 <sup>A</sup>	33,42 ± 2,39 <sup>A</sup>
SC	8,02 ± 0,25	96,80 ± 3,70	0,86 ± 0,07 <sup>AB</sup>	1,07 ± 0,03	154,74 ± 6,32 <sup>AB</sup>	62,08 ± 4,58 <sup>B</sup>
SF	7,2 ± 0,49	89,00 ± 6,10	0,53 ± 0,03 <sup>B</sup>	0,89 ± 0,12	150,81 ± 8,72 <sup>AB</sup>	71,63 ± 6,68 <sup>BC</sup>
PSC	6,81 ± 0,30	87,57 ± 3,18	0,59 ± 0,08 <sup>B</sup>	1,01 ± 0,04	154,22 ± 3,58 <sup>AB</sup>	60,02 ± 8,46 <sup>B</sup>
PSF	7,74 ± 0,58	94,24 ± 6,84	0,57 ± 0,04 <sup>B</sup>	1,07 ± 0,07	163,61 ± 5,08 <sup>B</sup>	82,20 ± 8,33 <sup>C</sup>
ANOVA	N.S.	N.S.	P < 0,001	N.S.	P < 0,01	P < 0,001

Valores medios de 8 animales ± error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA LIII

CONTENIDO MINERAL POR GRAMO DE BAZO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>CENIZAS (g/g bazo)</u>	<u>MAGNESIO</u>	<u>HIERRO</u> ( $\mu\text{g/g}$ bazo)	<u>ZINC</u>
C	14,07 $\pm$ 0,31	138,27 $\pm$ 3,75	254,97 $\pm$ 19,47 <sup>A</sup>	16,05 $\pm$ 0,59
SC	14,04 $\pm$ 0,22	140,46 $\pm$ 2,97	334,02 $\pm$ 25,58 <sup>B</sup>	18,34 $\pm$ 1,16
SF	13,48 $\pm$ 0,10	137,69 $\pm$ 2,36	289,64 $\pm$ 16,58 <sup>AB</sup>	16,00 $\pm$ 0,61
PSC	13,68 $\pm$ 0,39	133,91 $\pm$ 4,14	342,37 $\pm$ 22,72 <sup>B</sup>	15,63 $\pm$ 0,78
PSF	13,80 $\pm$ 0,34	141,58 $\pm$ 3,80	309,35 $\pm$ 18,95 <sup>AB</sup>	15,96 $\pm$ 0,64
ANOVA	N.S.	N.S.	P < 0,05	N.S.

Valores medios de 8 animales  $\pm$  error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA LIV

CONTENIDO MINERAL (TOTAL) DEL BAZO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>PESO (g)</u>	<u>CENIZAS (mg)</u>	<u>MAGNESIO</u>	<u>HIERRO</u>	<u>ZINC</u>
				<u>(<math>\mu</math>g)</u>	
C	0,40 $\pm$ 0,02	5,65 $\pm$ 0,29	55,38 $\pm$ 2,54	101,86 $\pm$ 8,48 <sup>A</sup>	6,44 $\pm$ 0,37
SC	0,34 $\pm$ 0,02	4,74 $\pm$ 0,33	47,29 $\pm$ 3,16	111,86 $\pm$ 10,08 <sup>AB</sup>	6,12 $\pm$ 0,42
SF	0,41 $\pm$ 0,04	5,59 $\pm$ 0,61	57,12 $\pm$ 6,29	120,48 $\pm$ 14,39 <sup>AB</sup>	6,68 $\pm$ 0,82
PSC	0,41 $\pm$ 0,03	5,64 $\pm$ 0,57	54,85 $\pm$ 5,07	136,06 $\pm$ 7,01 <sup>B</sup>	6,38 $\pm$ 0,61
PSF	0,43 $\pm$ 0,03	6,01 $\pm$ 0,41	61,76 $\pm$ 4,40	132,65 $\pm$ 8,49 <sup>AB</sup>	6,79 $\pm$ 0,55
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	P < 0,05	N.S.

Valores medios de 8 animales  $\pm$  error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA LV

CONTENIDO MINERAL POR GRAMO DE PIEL DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>CENIZAS (g)</u>	<u>ZINC</u>	<u>COBRE</u>	<u>CALCIO</u>	<u>HIERRO</u>
				( $\mu\text{g}$ )	
C	5,71 $\pm$ 0,26	16,49 $\pm$ 0,71 <sup>A</sup>	4,62 $\pm$ 0,45 <sup>A</sup>	75,33 $\pm$ 11,97 <sup>A</sup>	19,56 $\pm$ 3,63 <sup>A</sup>
SC	5,34 $\pm$ 0,31	14,55 $\pm$ 0,78 <sup>A</sup>	5,33 $\pm$ 1,23 <sup>A</sup>	53,57 $\pm$ 12,54 <sup>AB</sup>	14,63 $\pm$ 2,92 <sup>AB</sup>
SF	5,12 $\pm$ 0,22	14,81 $\pm$ 0,68 <sup>A</sup>	3,43 $\pm$ 0,66 <sup>AB</sup>	55,96 $\pm$ 12,04 <sup>AB</sup>	14,46 $\pm$ 2,70 <sup>AB</sup>
PSC	4,86 $\pm$ 0,19	16,88 $\pm$ 0,85 <sup>A</sup>	2,17 $\pm$ 0,11 <sup>B</sup>	32,75 $\pm$ 2,04 <sup>B</sup>	10,40 $\pm$ 0,89 <sup>B</sup>
PSF	5,53 $\pm$ 0,24	19,54 $\pm$ 1,39 <sup>B</sup>	2,20 $\pm$ 0,13 <sup>B</sup>	33,38 $\pm$ 2,13 <sup>B</sup>	9,46 $\pm$ 0,72 <sup>B</sup>
ANOVA	N.S.	P < 0,01	P < 0,01	P < 0,05	P < 0,05

Valores medios de 8 animales  $\pm$  error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA LVI

CONTENIDO MINERAL DE HEMATIES EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS  
( $\mu\text{g/g}$  células)

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>ZINC</u>	<u>COBRE</u>
	$\mu\text{g}$	
C	7,33 $\pm$ 0,19	2,32 $\pm$ 0,31 <sup>AB</sup>
SC	7,34 $\pm$ 0,23	2,09 $\pm$ 0,17 <sup>AB</sup>
SF	7,45 $\pm$ 0,21	2,30 $\pm$ 0,18 <sup>AB</sup>
PSC	7,35 $\pm$ 0,12	1,59 $\pm$ 0,09 <sup>B</sup>
PSF	7,27 $\pm$ 0,21	2,79 $\pm$ 0,36 <sup>A</sup>
ANOVA	N.S.	P < 0,05

Valores medios de 8 animales  $\pm$  error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

TABLA LVII

CONTENIDO MINERAL SERICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS. ( $\mu\text{g}/\text{cc}$ )

<u>DIETAS QUE CONTIENEN</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>	<u>ZINC</u>	<u>HIERRO</u>	<u>COBRE</u>
C	107,67 $\pm$ 0,91	16,87 $\pm$ 1,44	1,21 $\pm$ 0,06	3,52 $\pm$ 0,44	0,17 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>
SC	106,81 $\pm$ 2,10	14,69 $\pm$ 0,28	1,08 $\pm$ 0,04	3,63 $\pm$ 0,48	0,84 $\pm$ 0,03 <sup>BC</sup>
SF	105,28 $\pm$ 2,29	14,12 $\pm$ 0,51	1,05 $\pm$ 0,03	3,61 $\pm$ 0,39	0,79 $\pm$ 0,03 <sup>BC</sup>
PSC	104,40 $\pm$ 2,36	14,94 $\pm$ 0,42	1,17 $\pm$ 0,03	3,71 $\pm$ 0,51	0,87 $\pm$ 0,02 <sup>C</sup>
PSF	107,91 $\pm$ 2,85	15,02 $\pm$ 0,55	1,15 $\pm$ 0,03	3,32 $\pm$ 0,14	0,73 $\pm$ 0,03 <sup>B</sup>
ANOVA	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	P < 0,001

Valores medios de 8 animales  $\pm$  error estándar de la media.

Letras distintas expresan diferencias significativas con P < 0,05 entre los valores de una misma columna (Test de Duncan's).

FIGURA 1.-

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO TRAS LA ADICION DE CASEINA CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS A UNA SOLUCION DE CALCIO IONICO

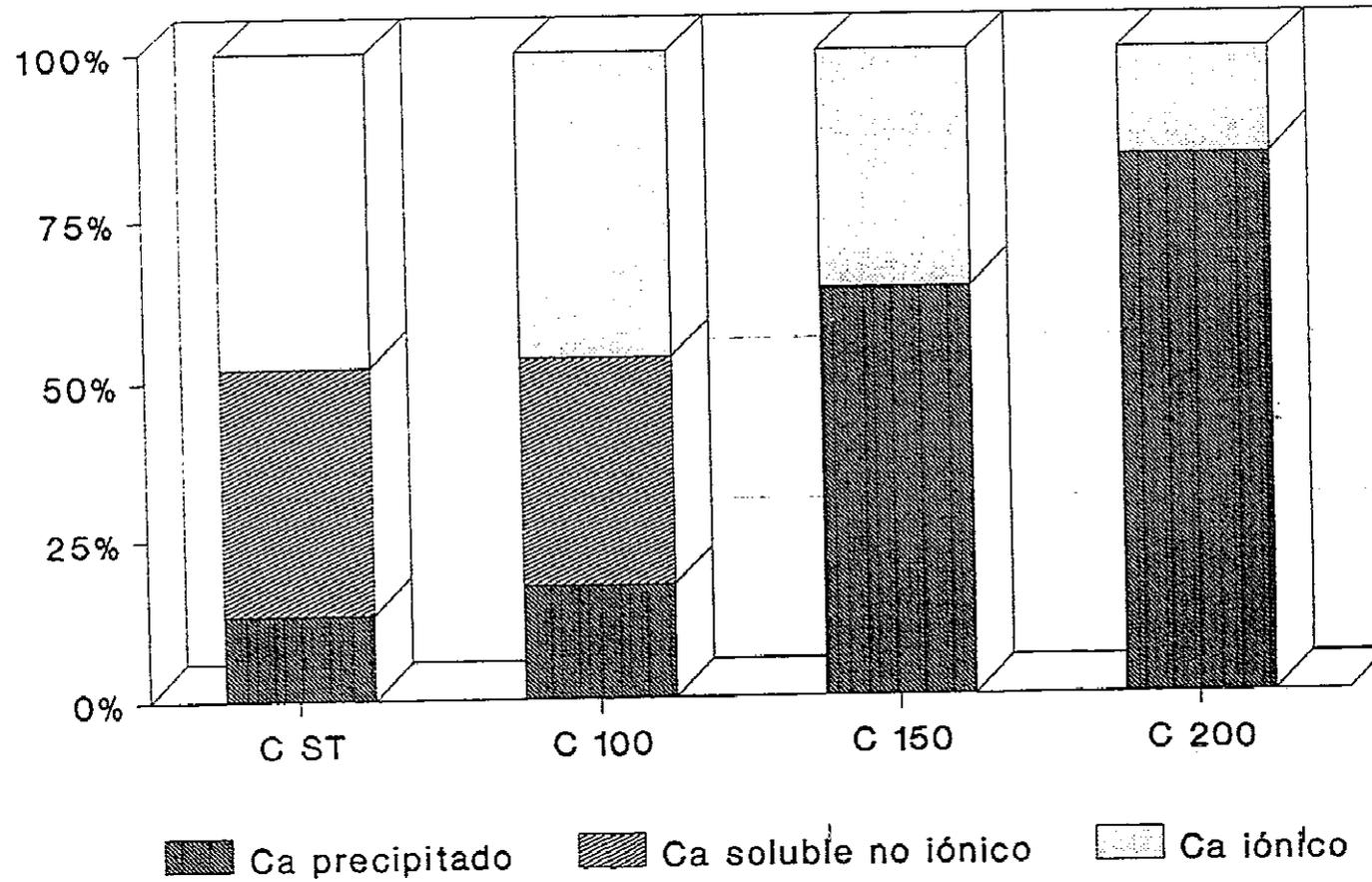


FIGURA 2.-

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO TRAS LA ADICION DE UNA MEZCLA DE CASEINA Y SACAROSA CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS A UNA SOLUCION DE CALCIO IONICO

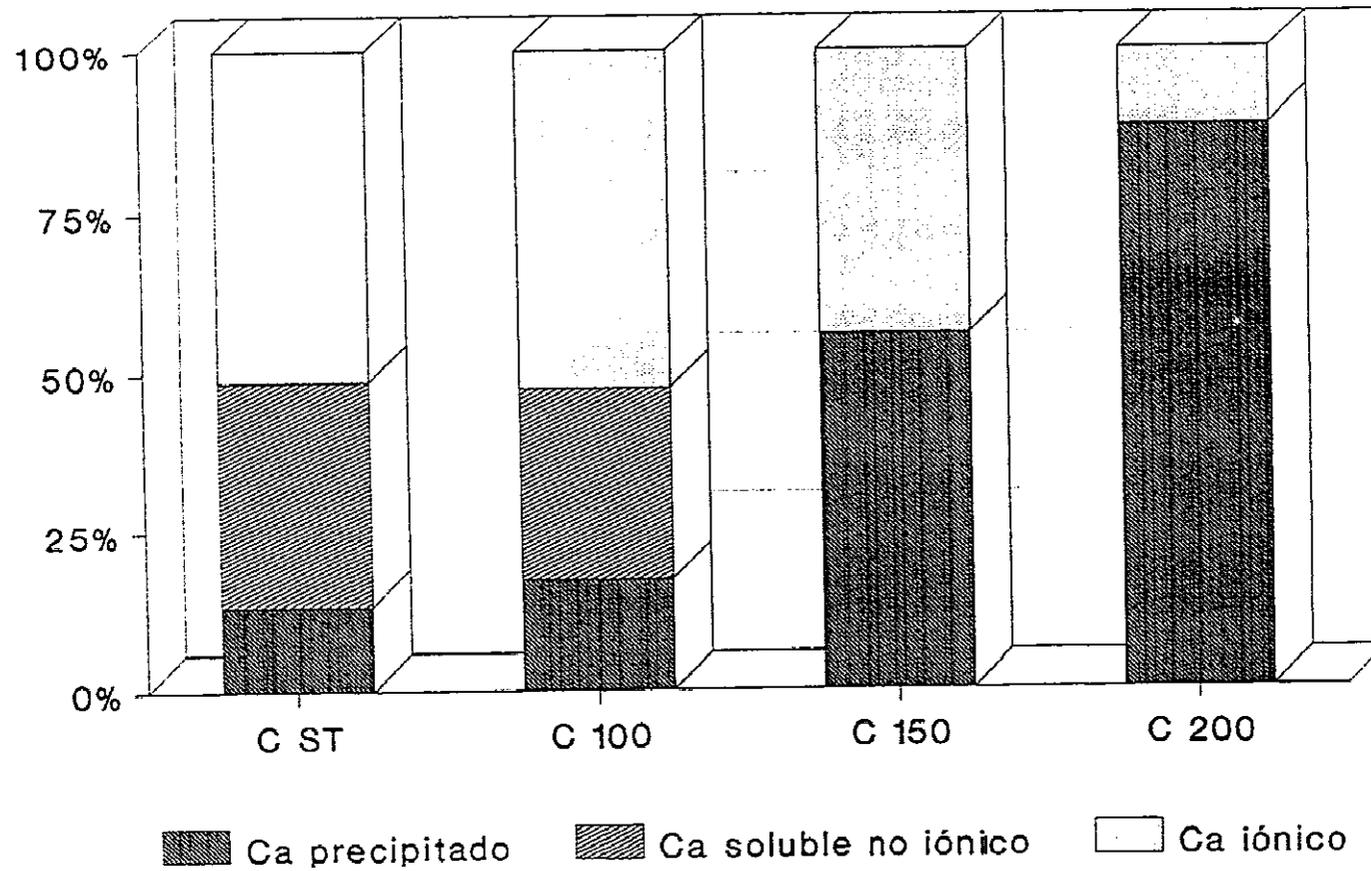


FIGURA 3.-

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO TRAS LA ADICION DE UNA MEZCLA DE CASEINA GLUCOSA Y FRUCTOSA CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS A UNA SOLUCION DE CALCIO IONICO

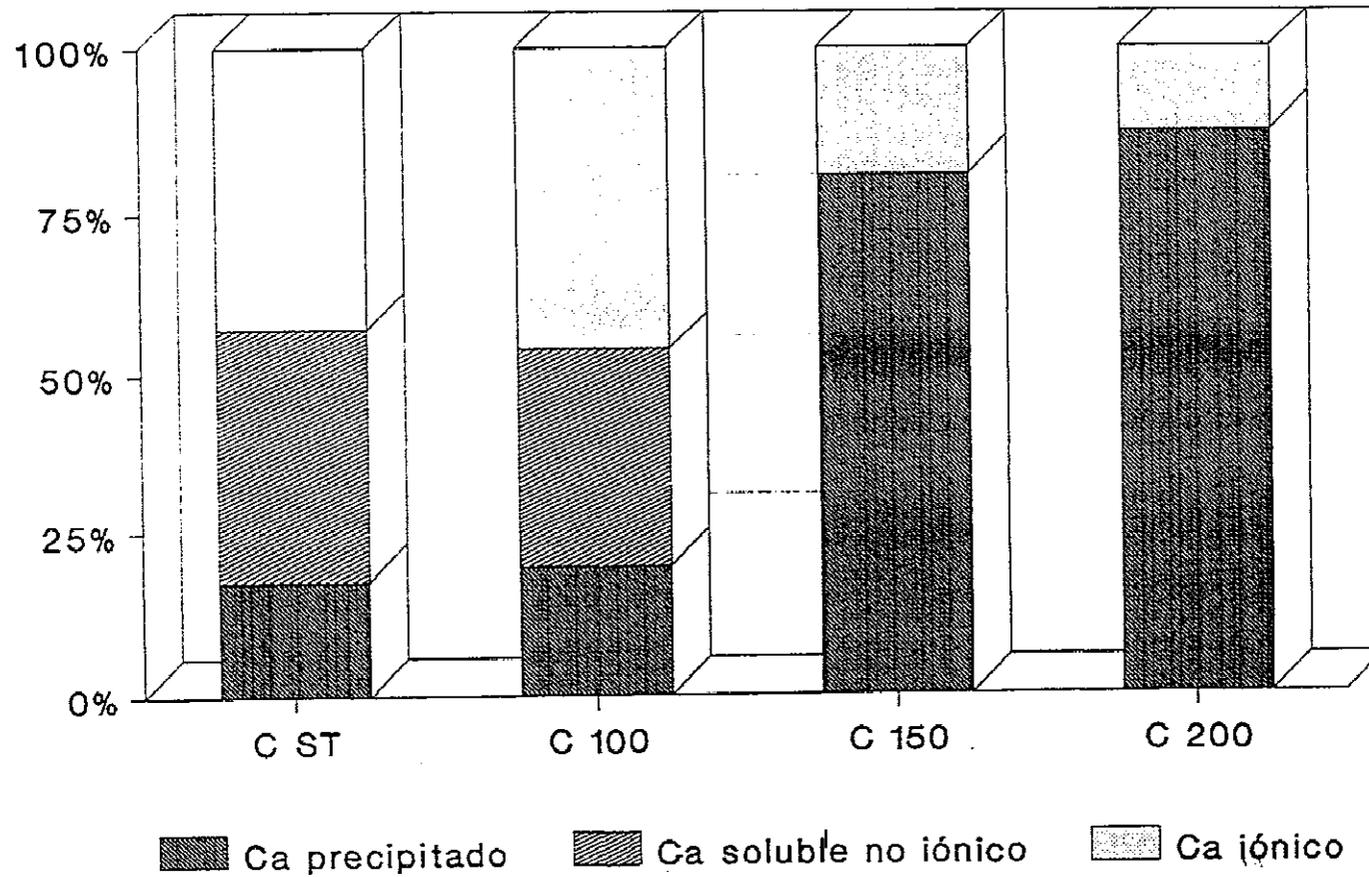


FIGURA 4.-

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO TRAS LA ADICION DE UNA MEZCLA DE CASEINA Y ACEITE CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS A UNA SOLUCION DE CALCIO IONICO

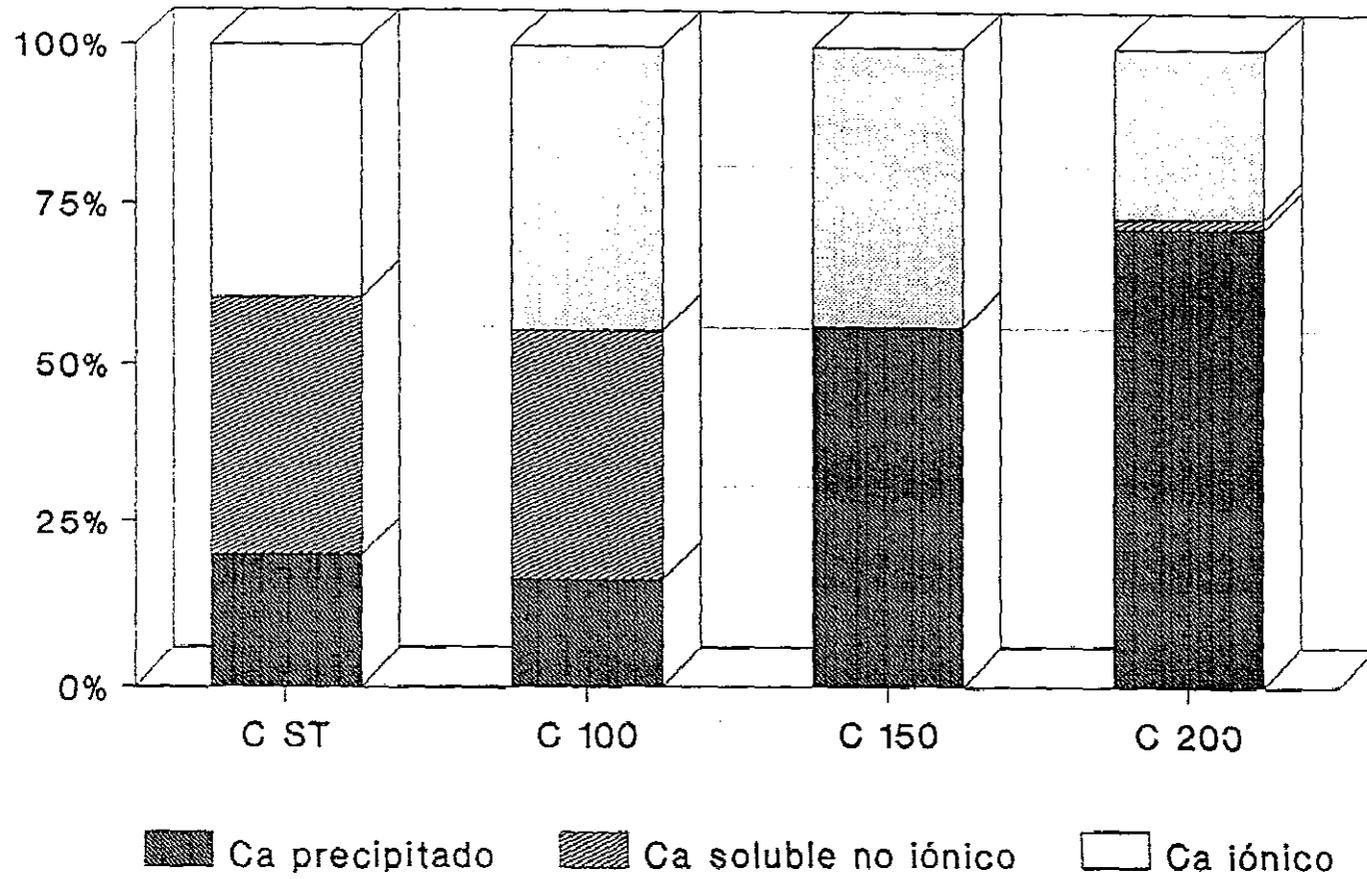


FIGURA 5.-

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO TRAS LA ADICION DE UNA MEZCLA DE CASEINA SACAROSA Y ACEITE CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS A UNA SOLUCION DE CALCIO IONICO

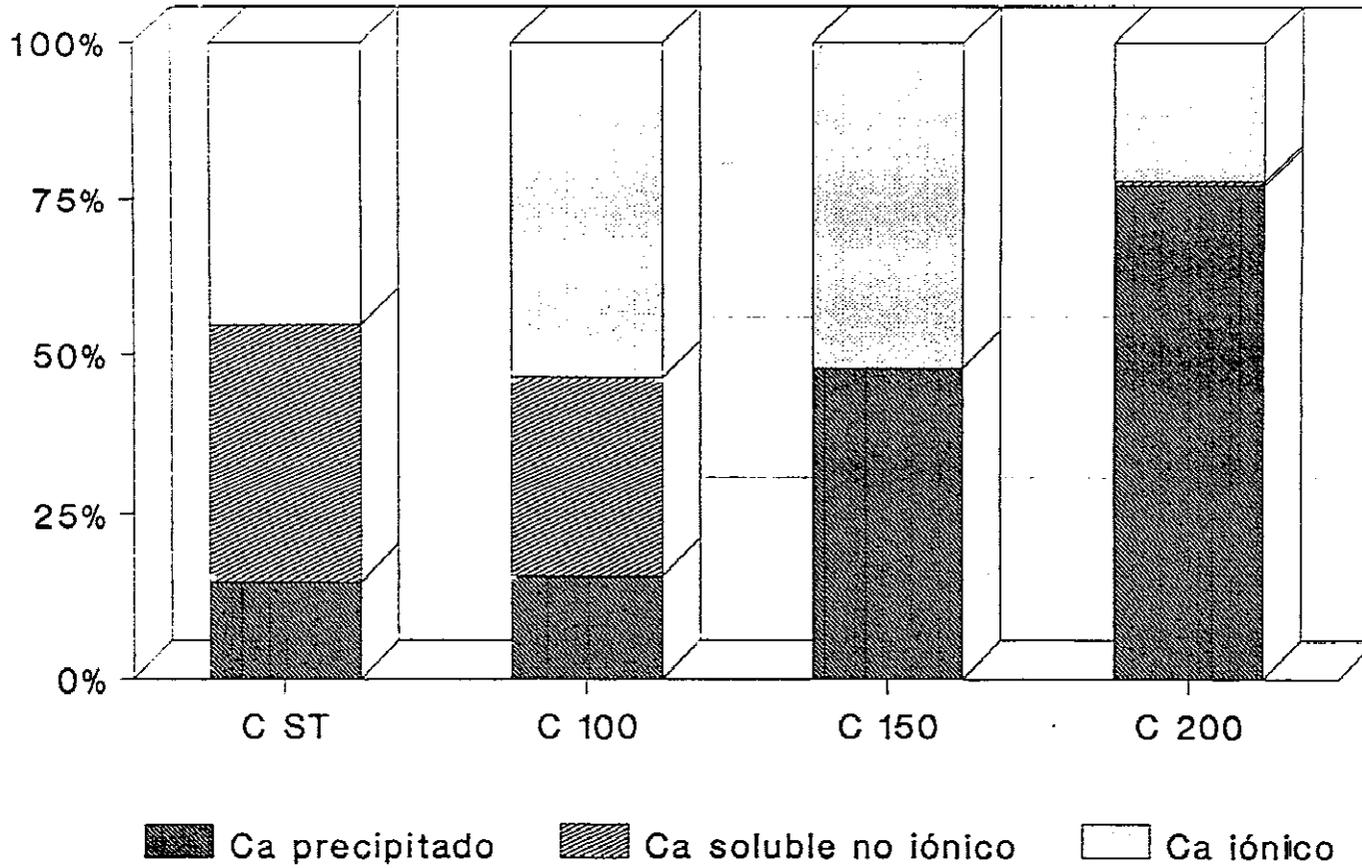


FIGURA 6.-

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS FORMAS DEL CALCIO TRAS LA ADICION DE UNA MEZCLA DE CASEINA GLUCOSA FRUCTOSA Y ACEITE CALENTADA A DISTINTAS TEMPERATURAS A UNA SOLUCION DE CALCIO IONICO

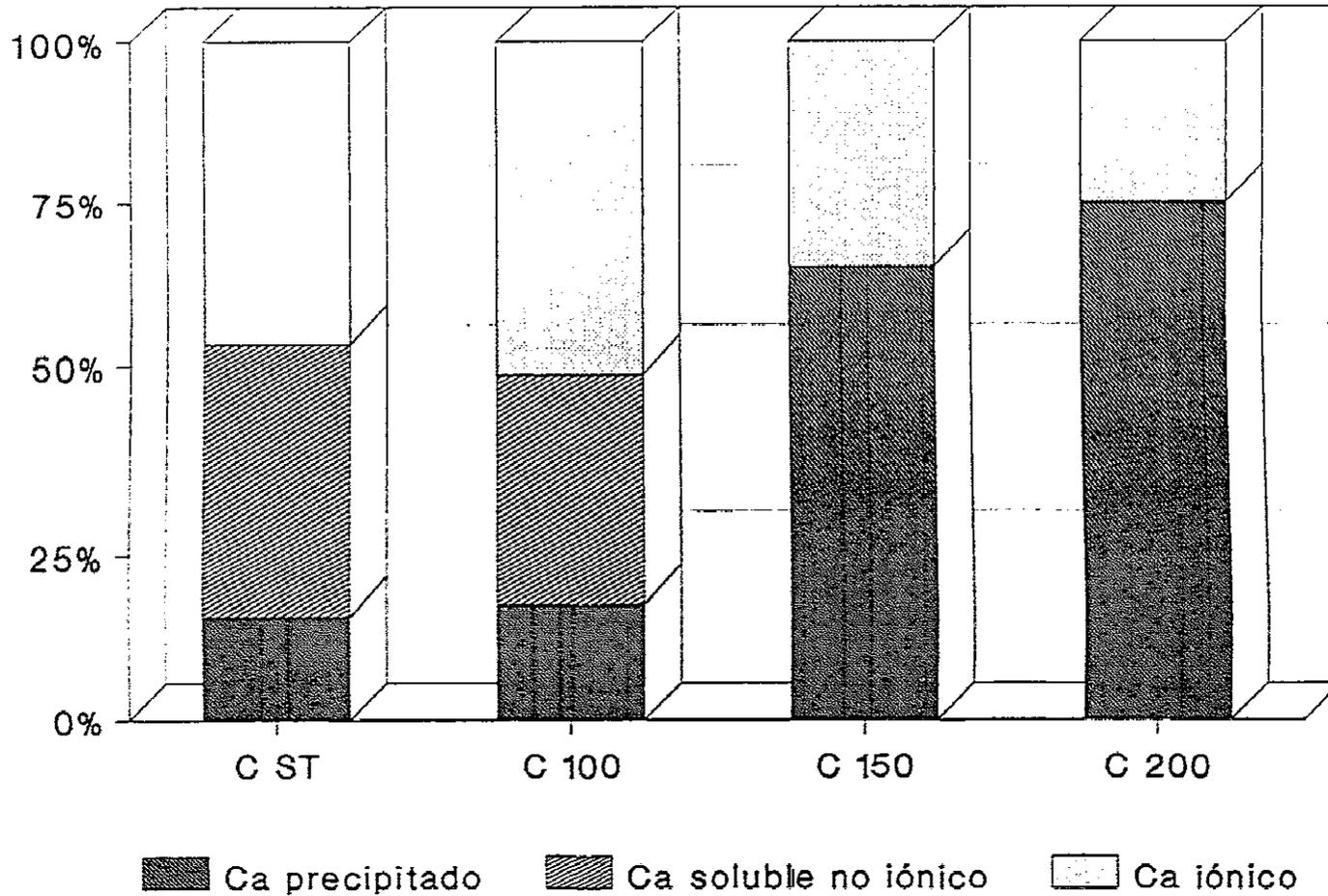


FIGURA 7.- PORCENTAJE DEL CALCIO TOTAL QUE DIALIZA

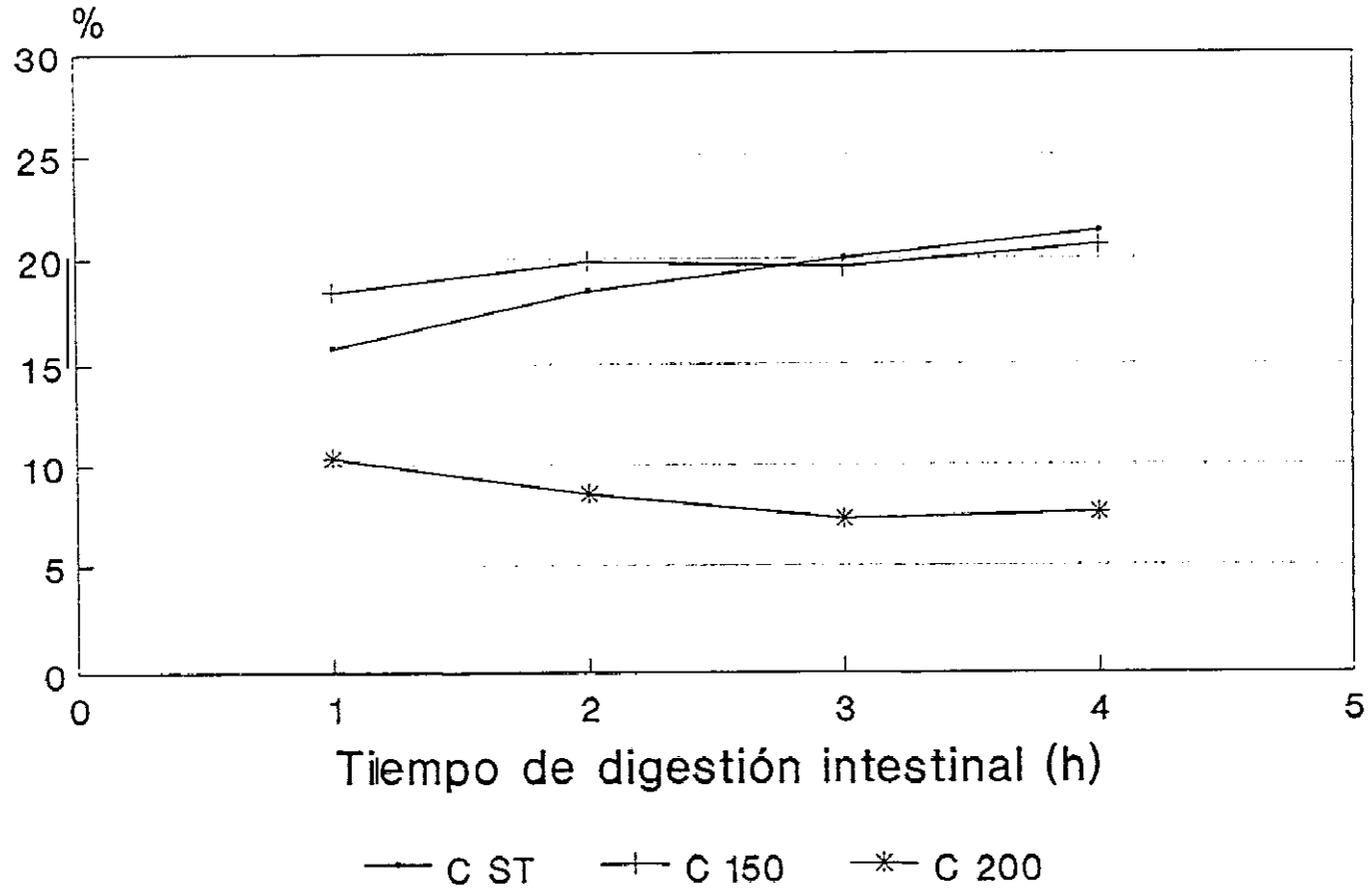


FIGURA 8.- PORCENTAJE DEL CALCIO TOTAL QUE DIALIZA

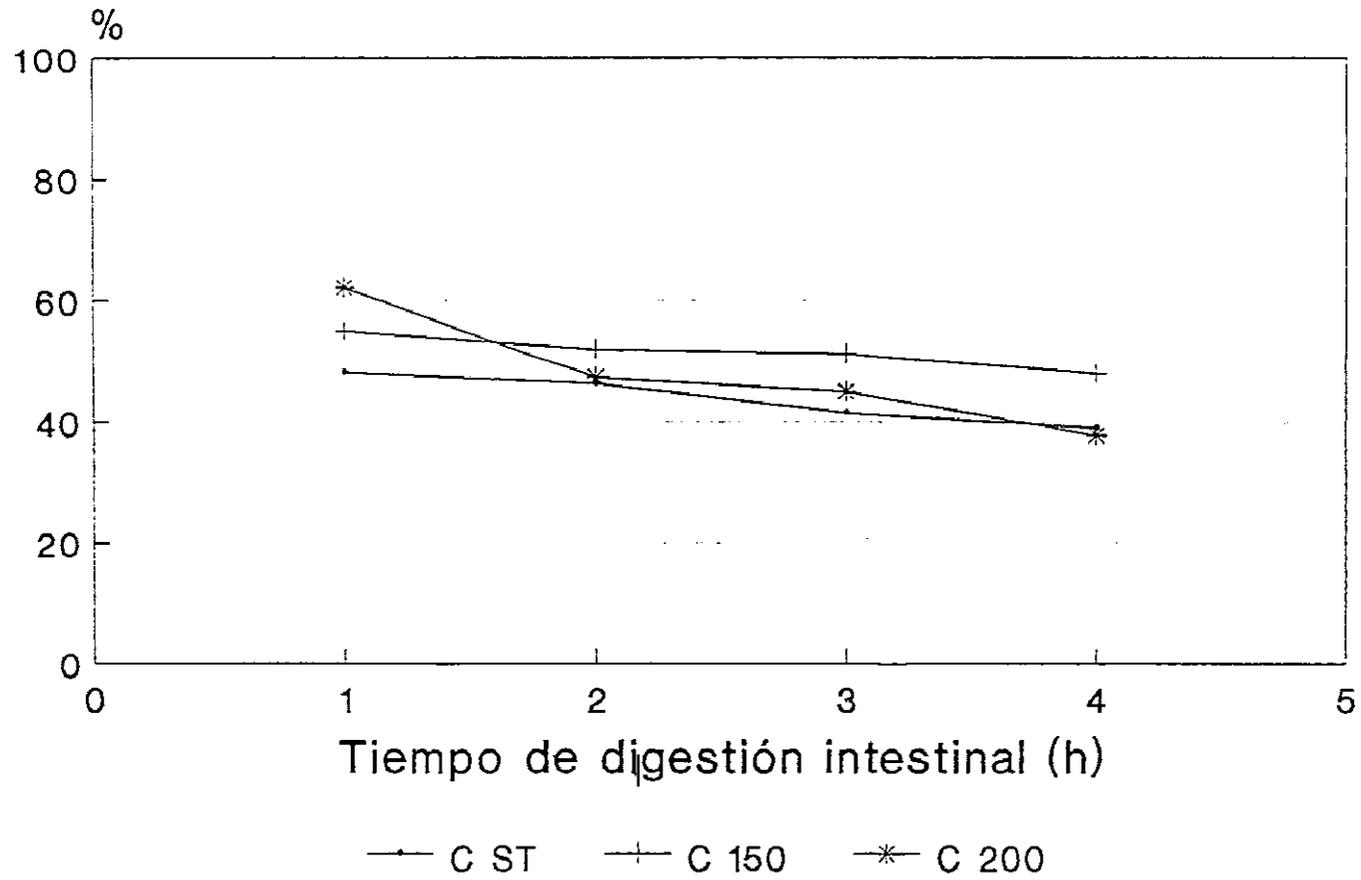


FIGURA 9.- %  $\text{Ca}^{++}$  RESPECTO DEL SOLUBLE QUE DIALIZA

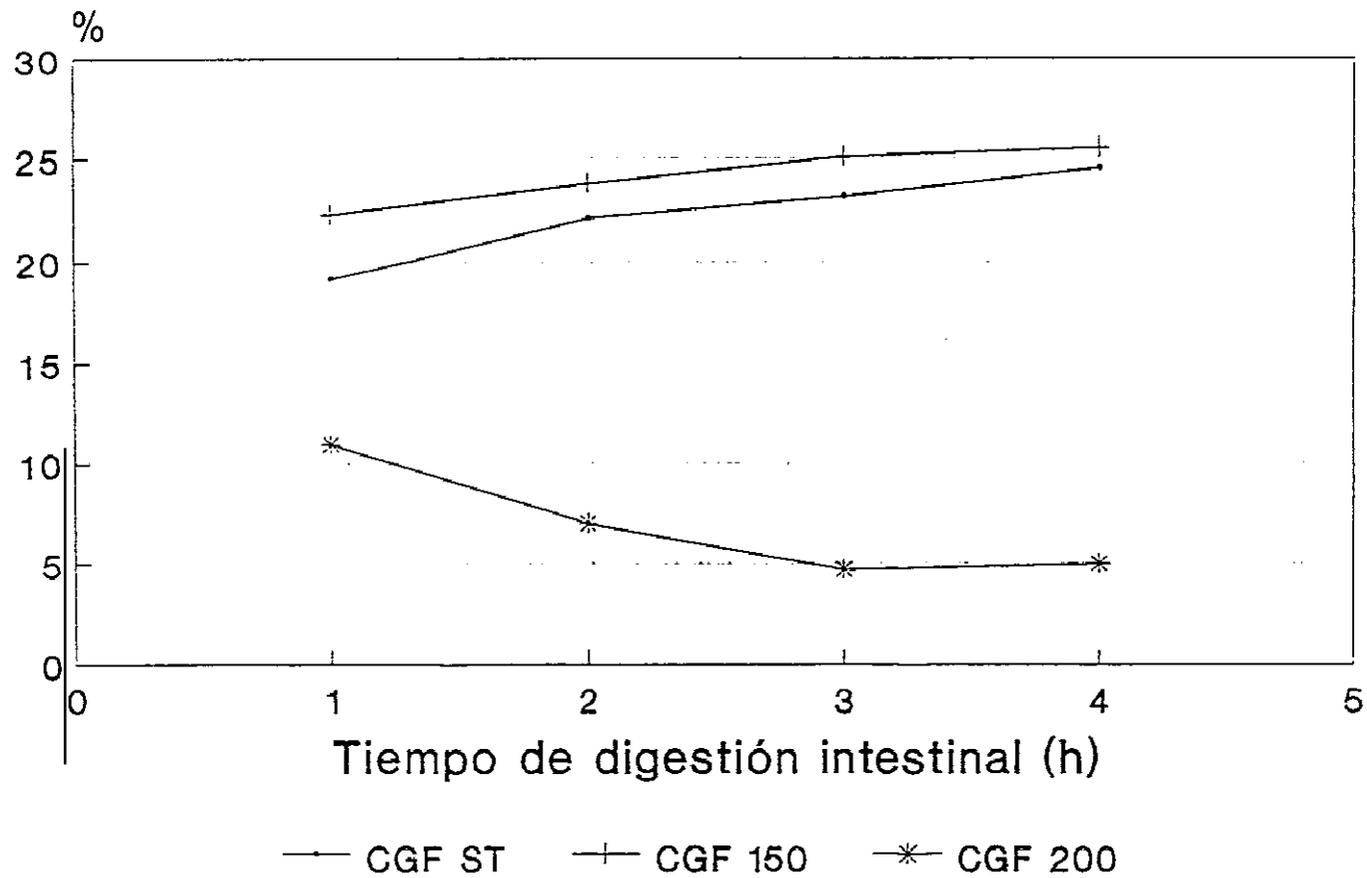


FIGURA 10.- % Ca<sup>++</sup> RESPECTO DEL SOLUBLE QUE DIALIZA

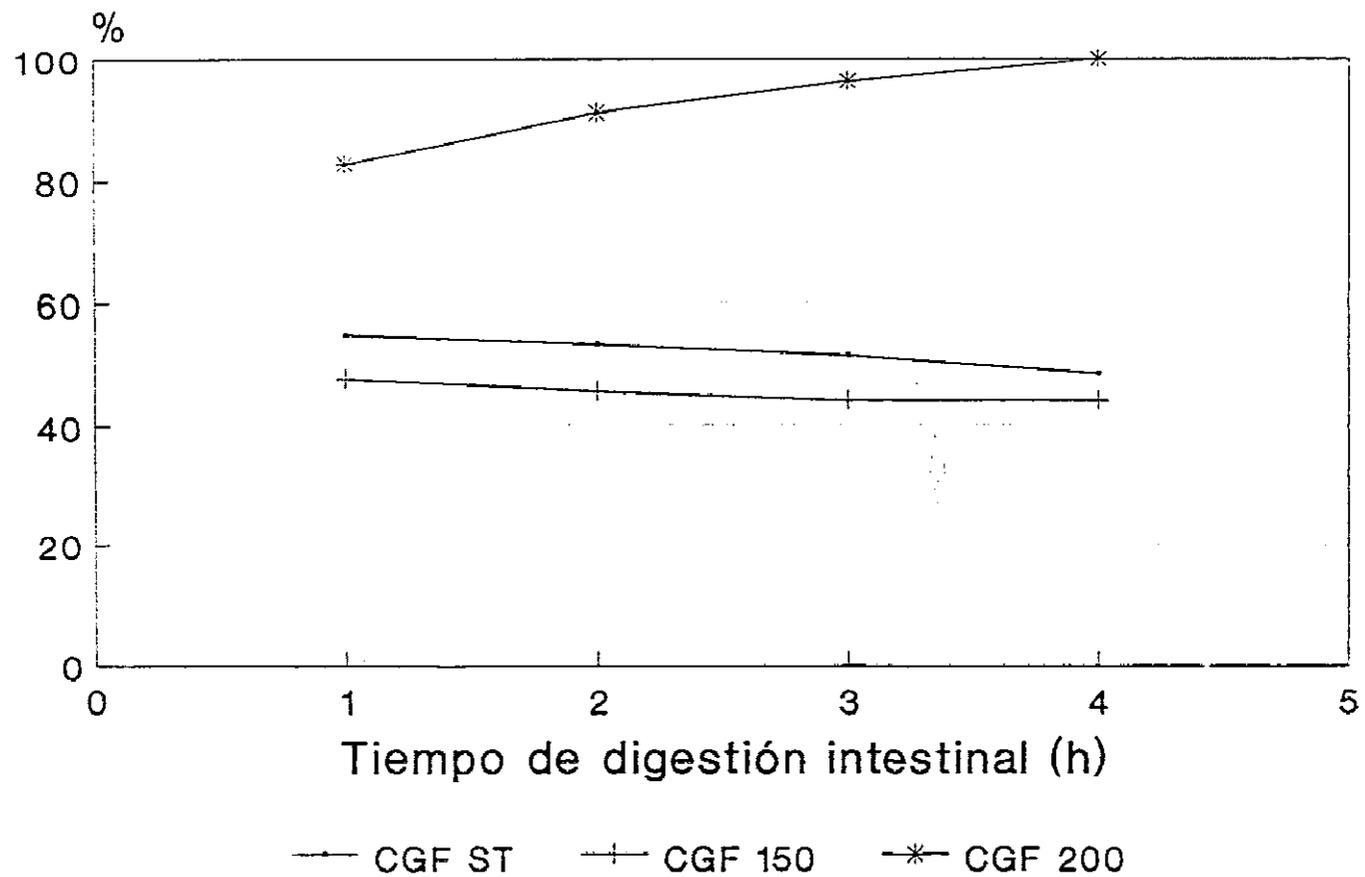


FIGURA 11.- PORCENTAJE DEL CALCIO TOTAL QUE DIALIZA

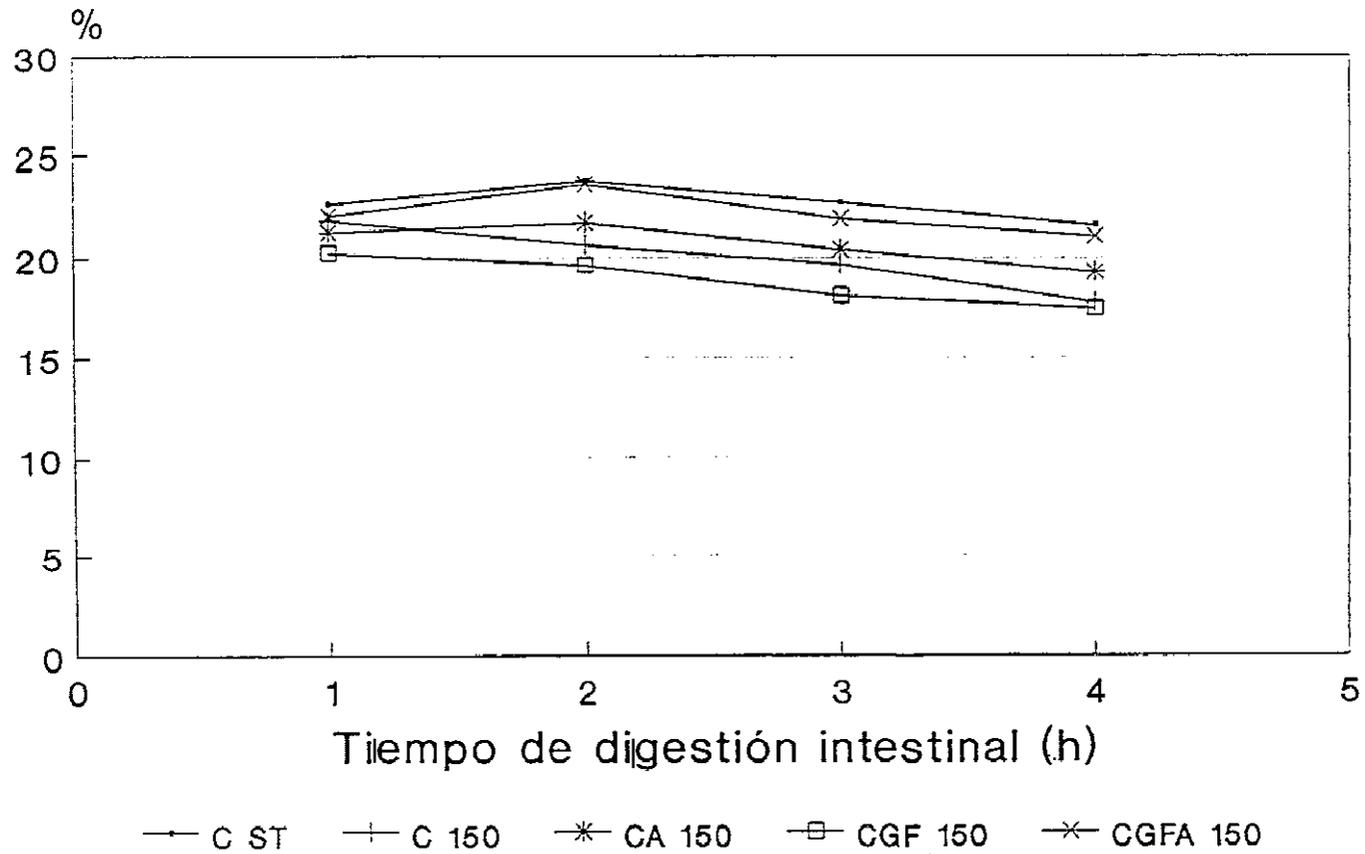


FIGURA 12.- % Ca<sup>++</sup> RESPECTO DEL SOLUBLE QUE DIALIZA

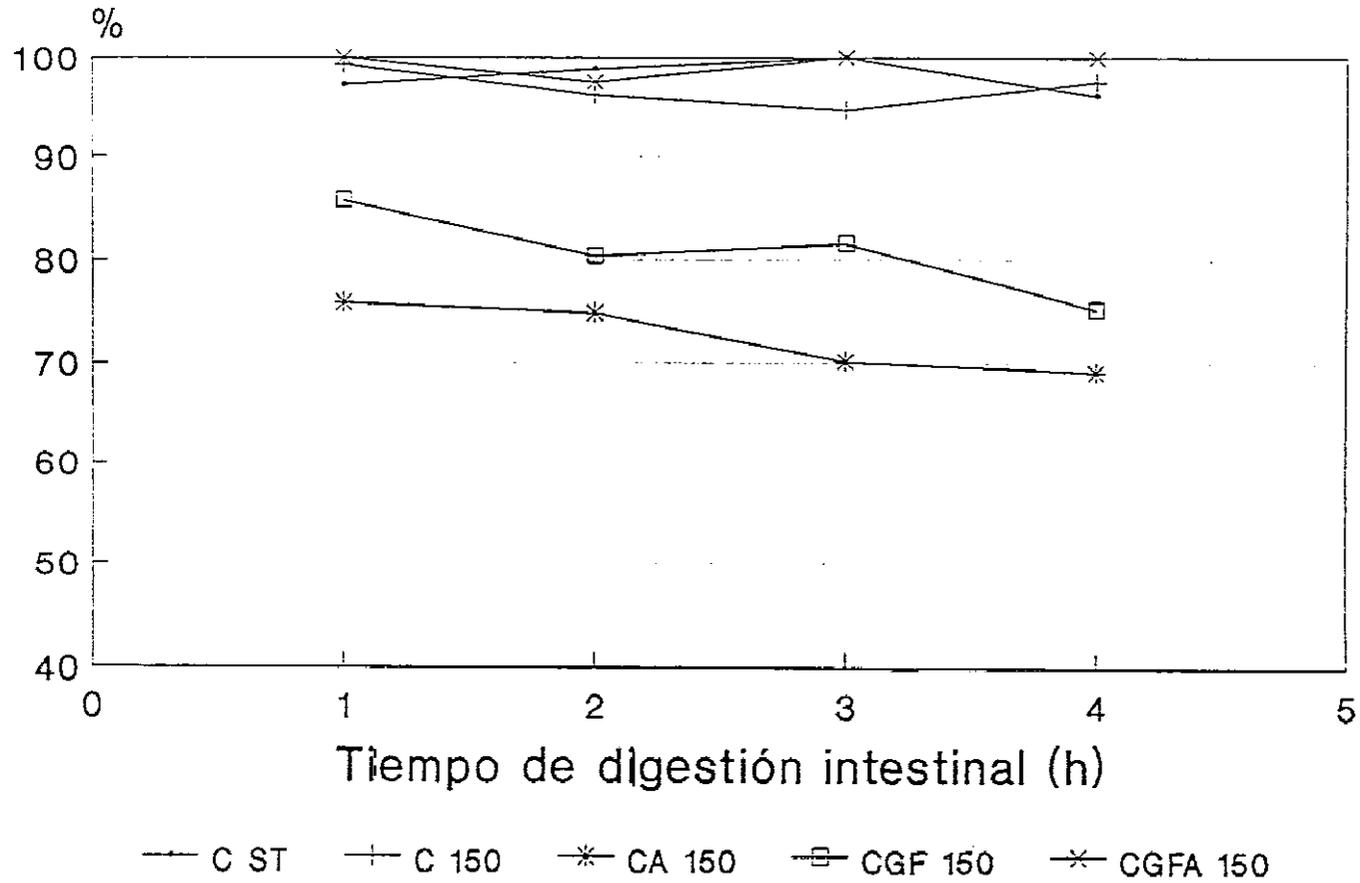


FIGURA 13.- PORCENTAJE DEL CALCIO TOTAL QUE DIALIZA

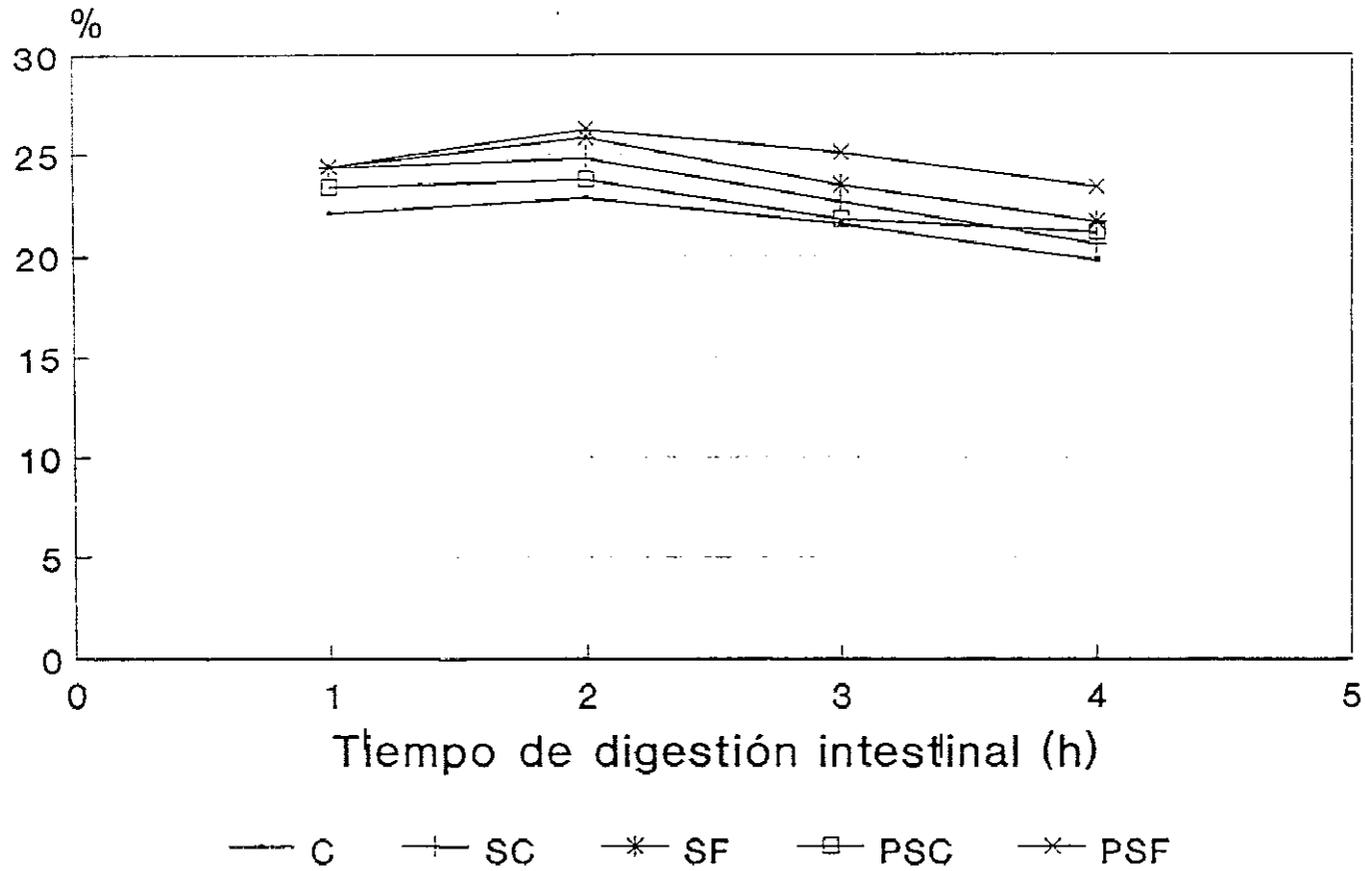


FIGURA 14.- %Ca<sup>++</sup> RESPECTO DEL SOLUBLE QUE DIALIZA

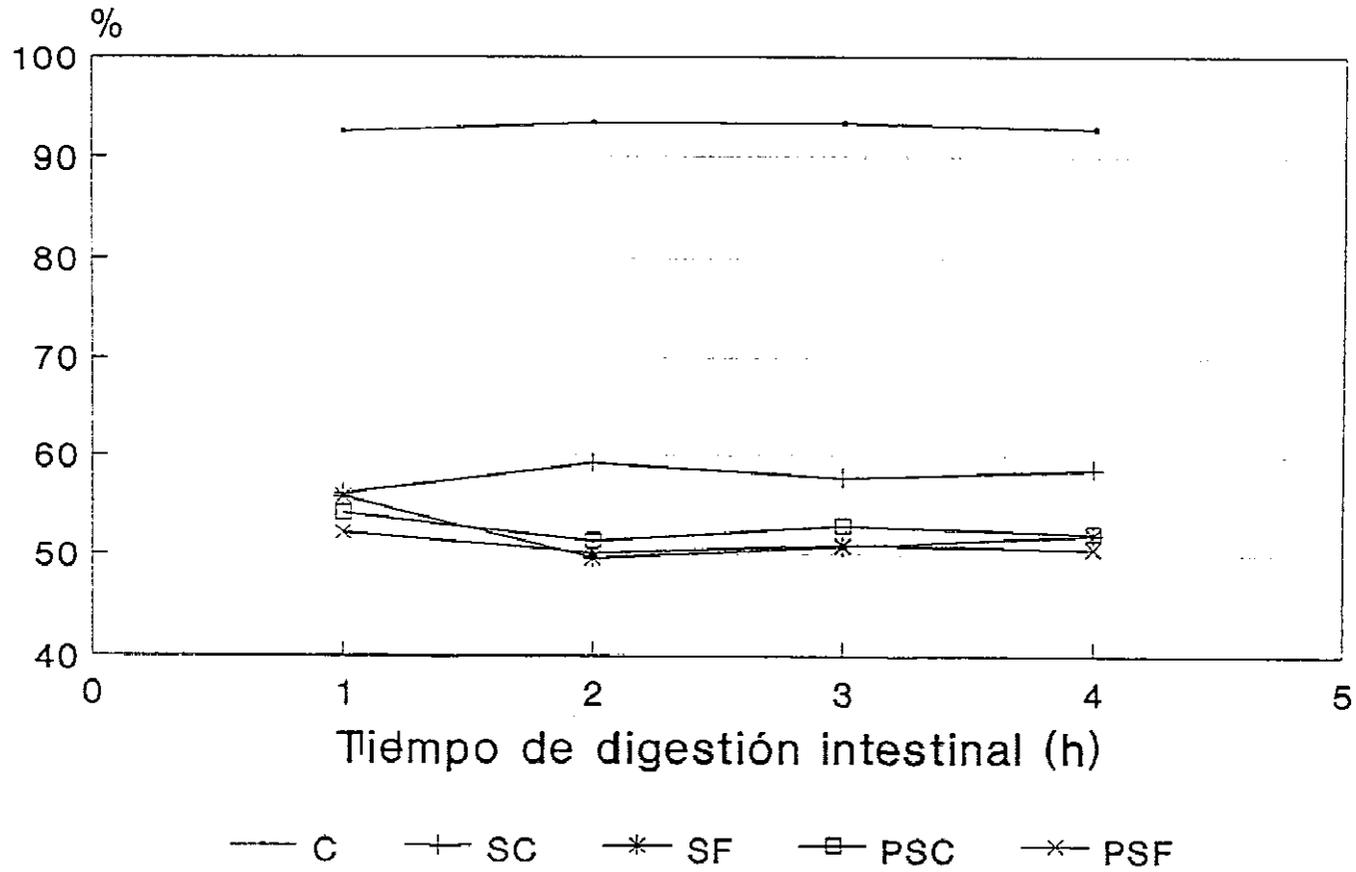


FIGURA 15.- PORCENTAJE DEL MAGNESIO TOTAL QUE DIALIZA

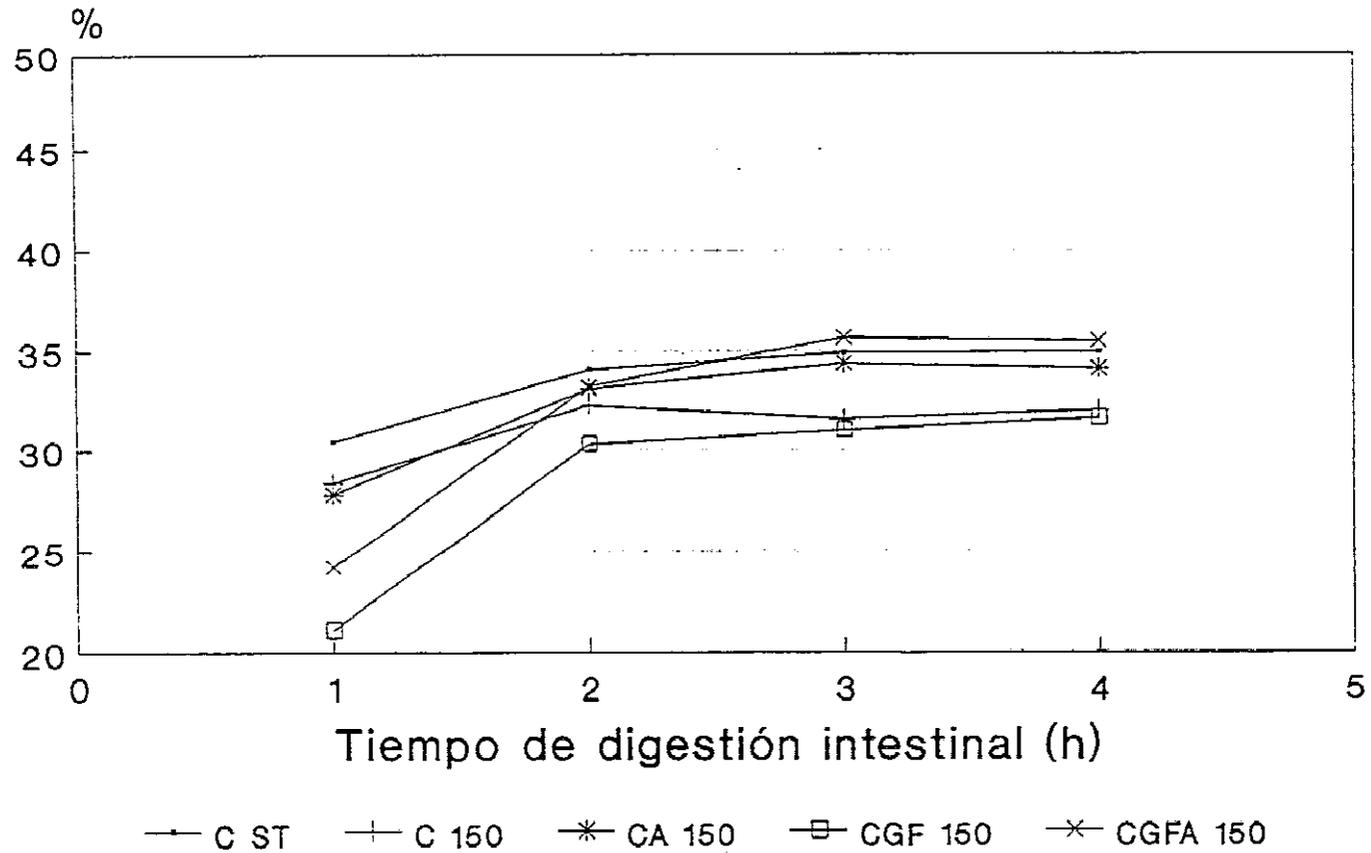


FIGURA 16.- PORCENTAJE DEL MAGNESIO TOTAL QUE DIALIZA

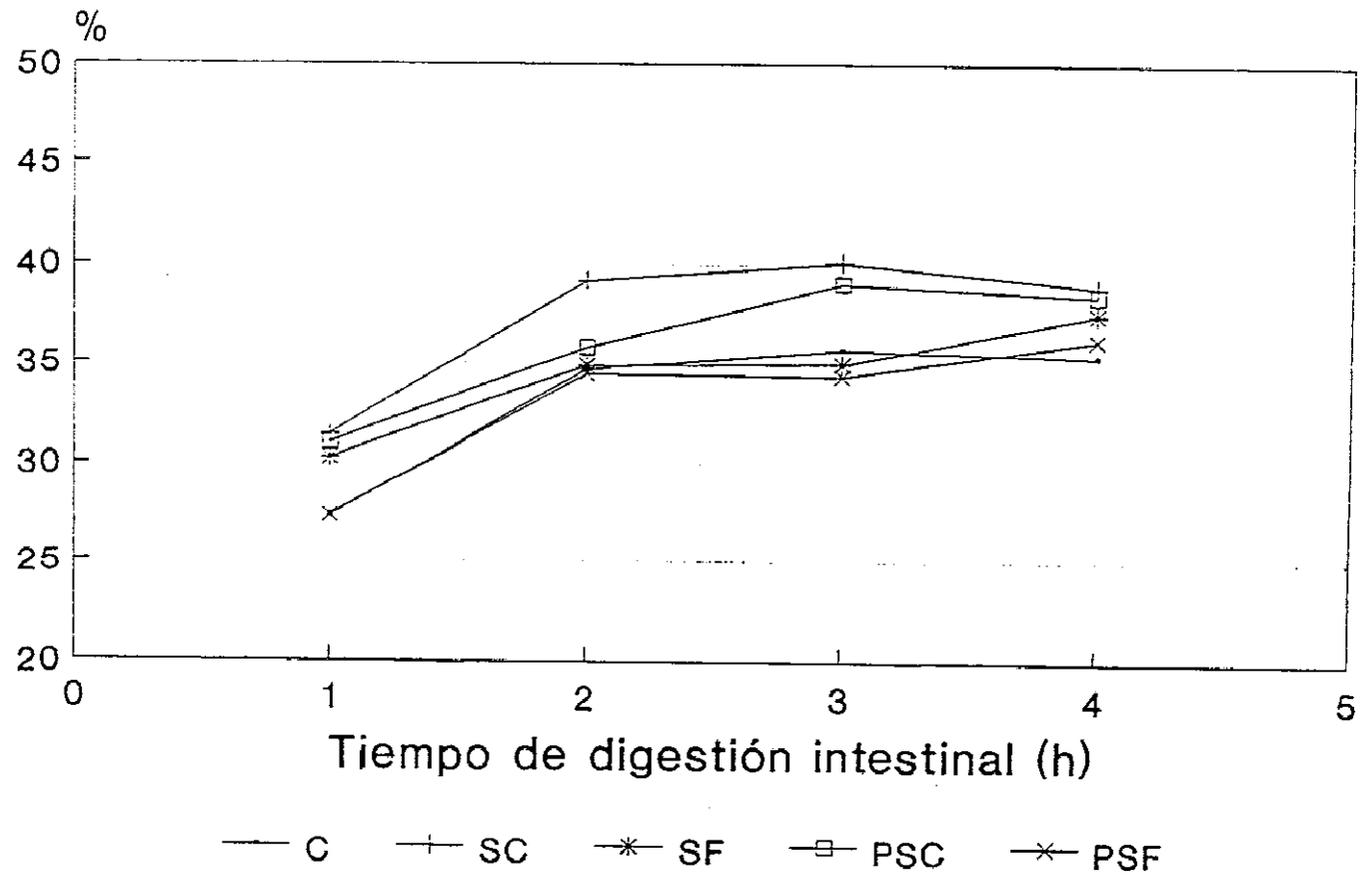


FIGURA 17.- PORCENTAJE DEL COBRE TOTAL QUE DIALIZA

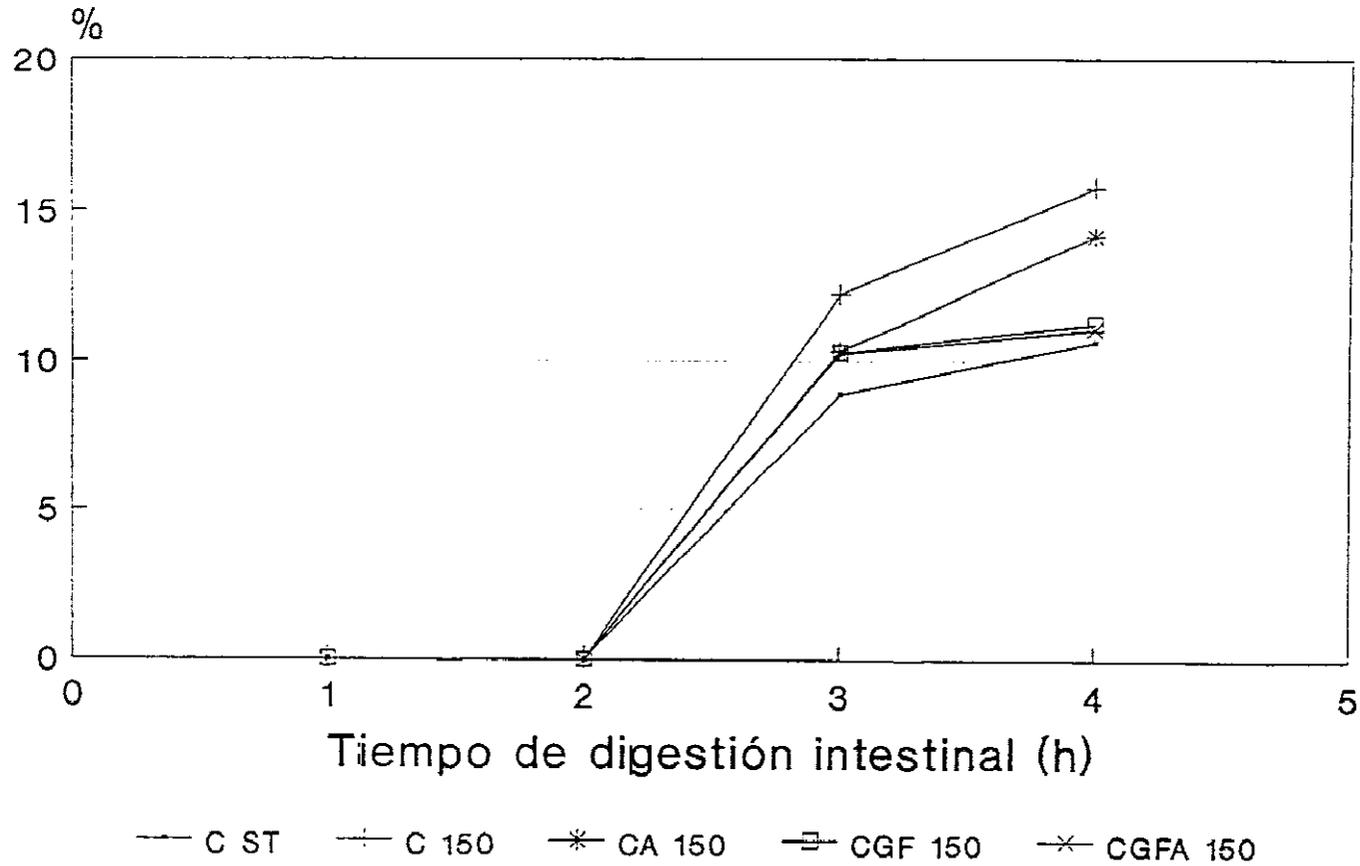


FIGURA 18.- PORCENTAJE DEL HIERRO TOTAL QUE DIALIZA

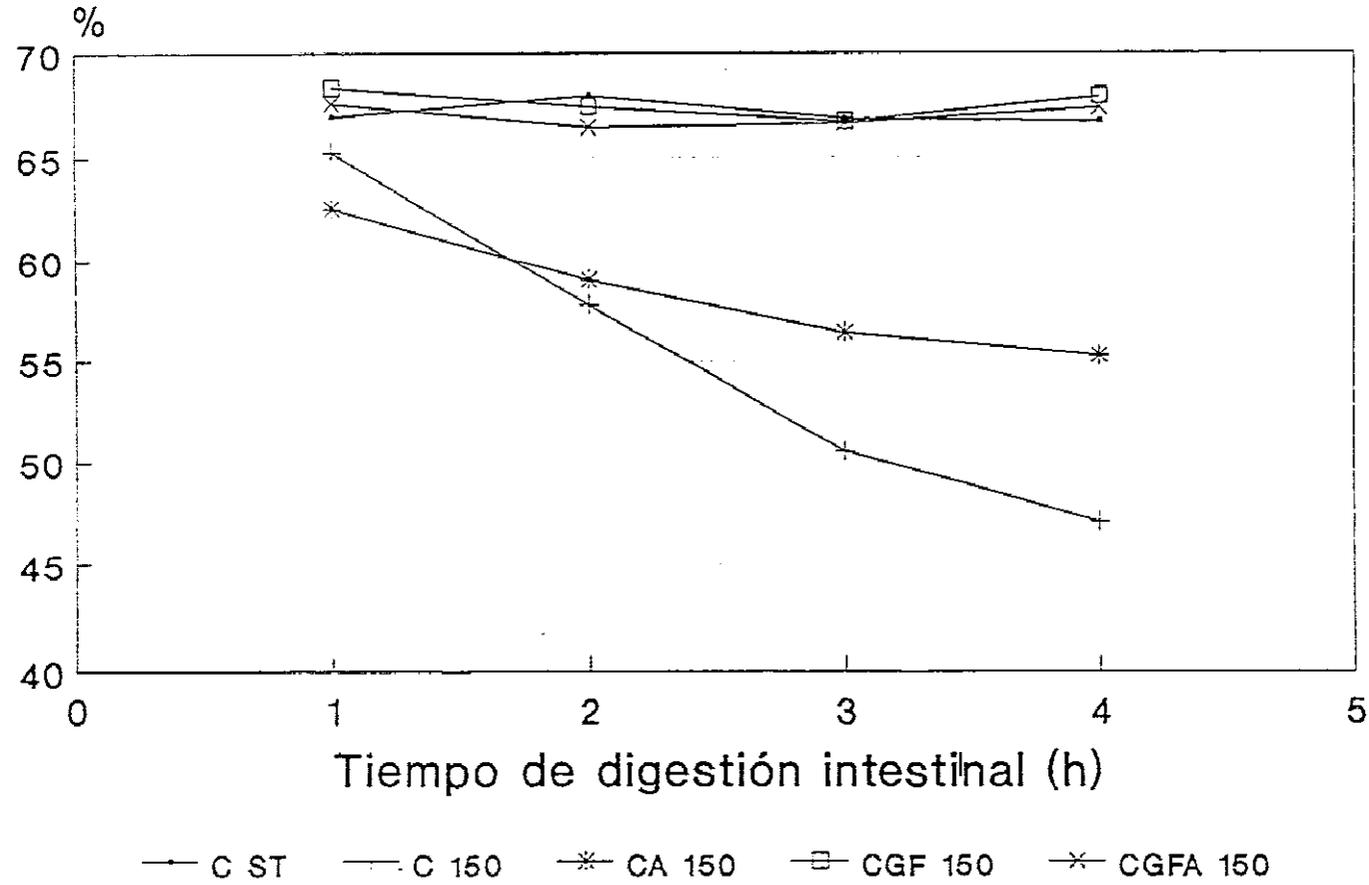


FIGURA 19.- PORCENTAJE DEL HIERRO TOTAL QUE DIALIZA

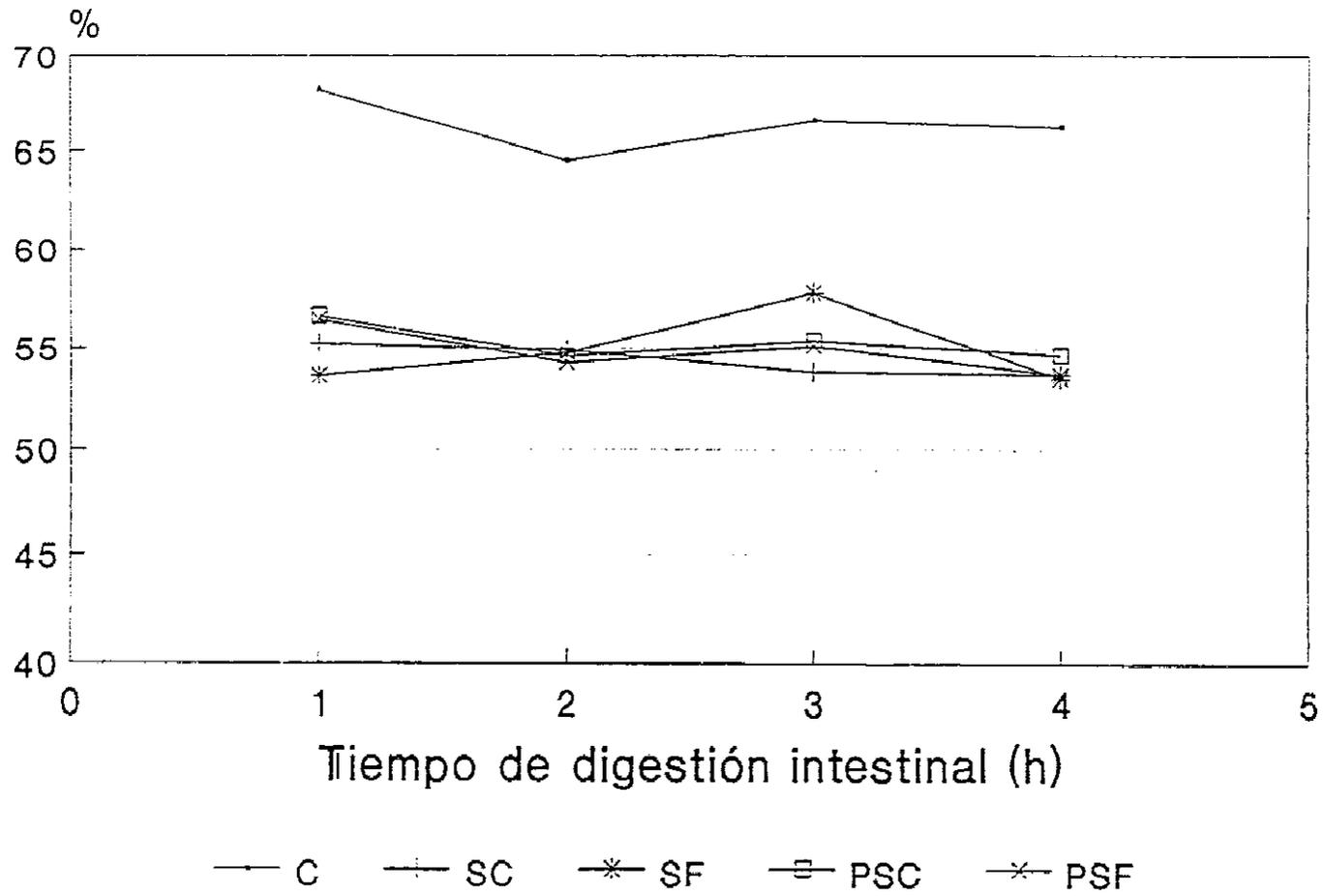


FIGURA 20.- PORCENTAJE DEL ZINC TOTAL QUE DIALIZA

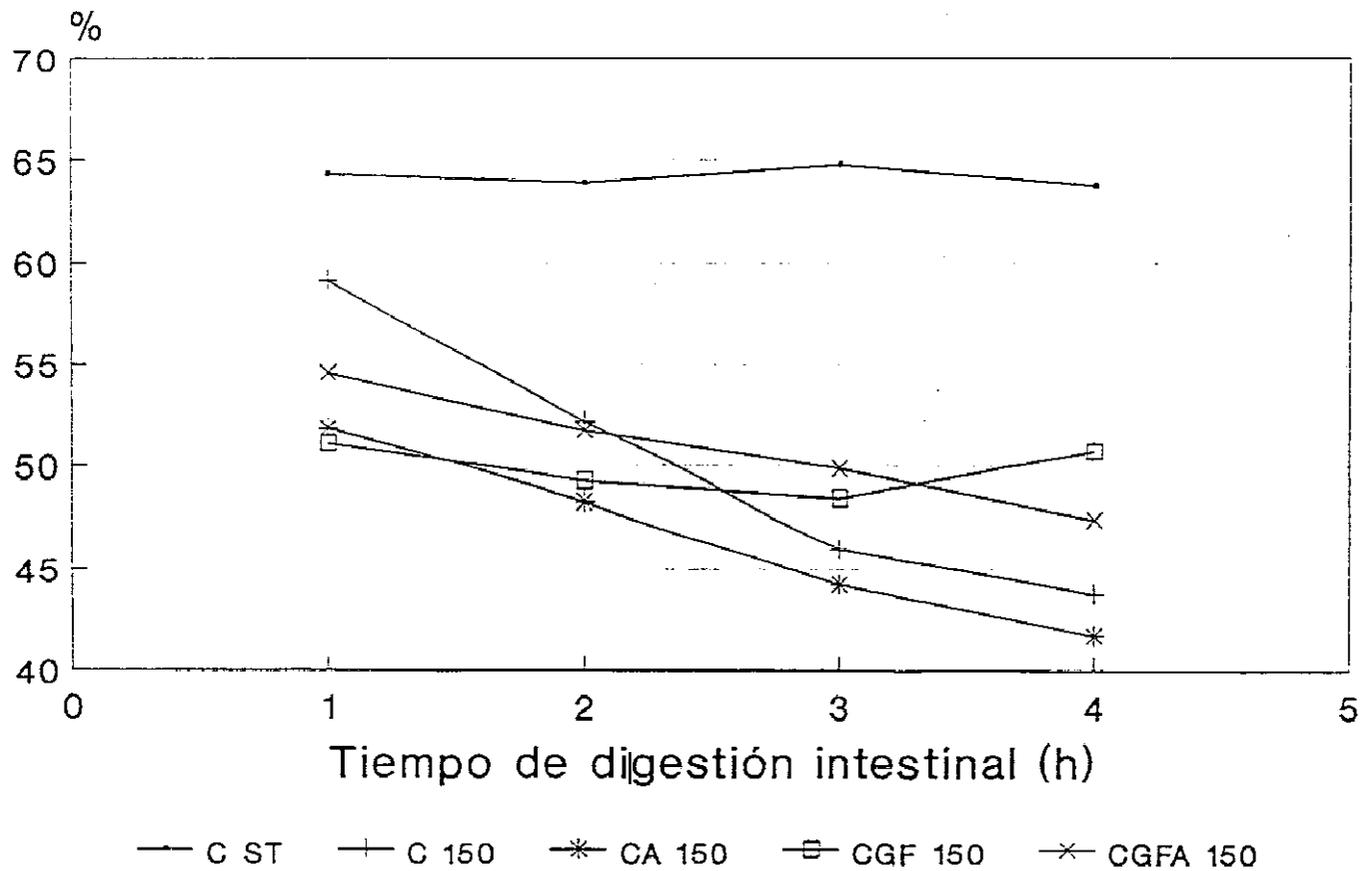


FIGURA 21.- PORCENTAJE DEL ZINC TOTAL QUE DIALIZA

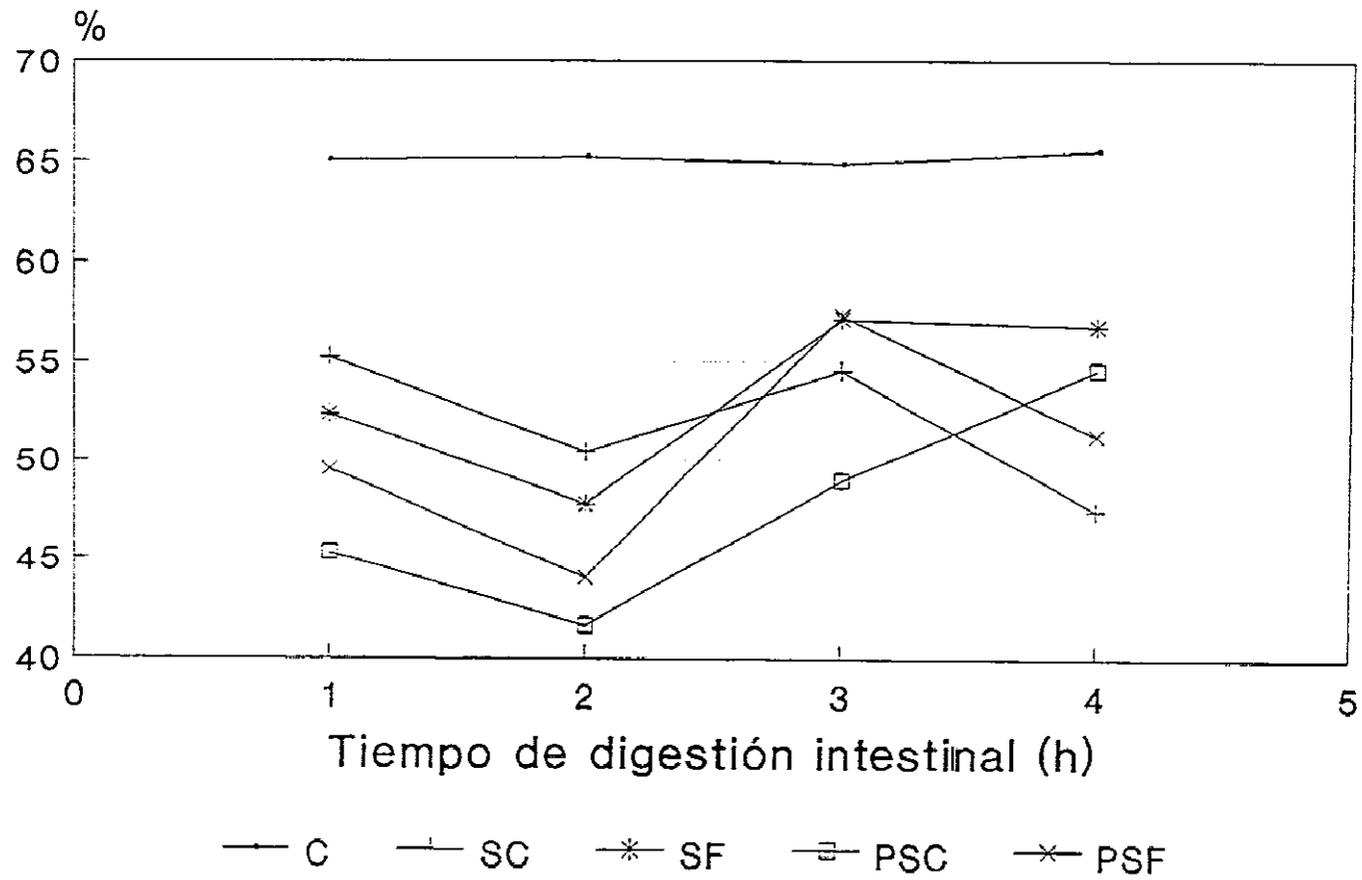


FIGURA 22.-

EVOLUCION PONDERAL DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

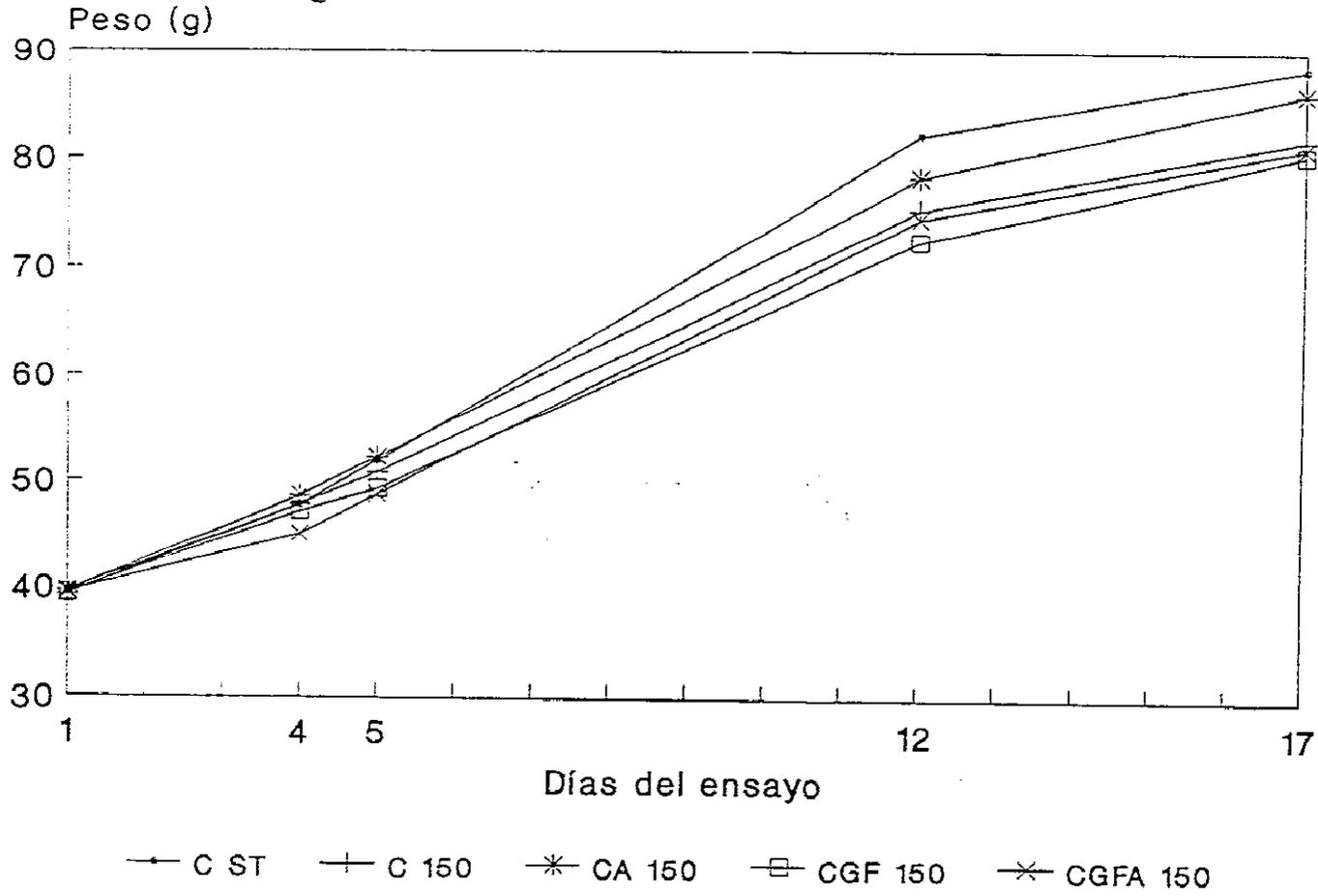


FIGURA 23.-

EVOLUCION PONDERAL DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS

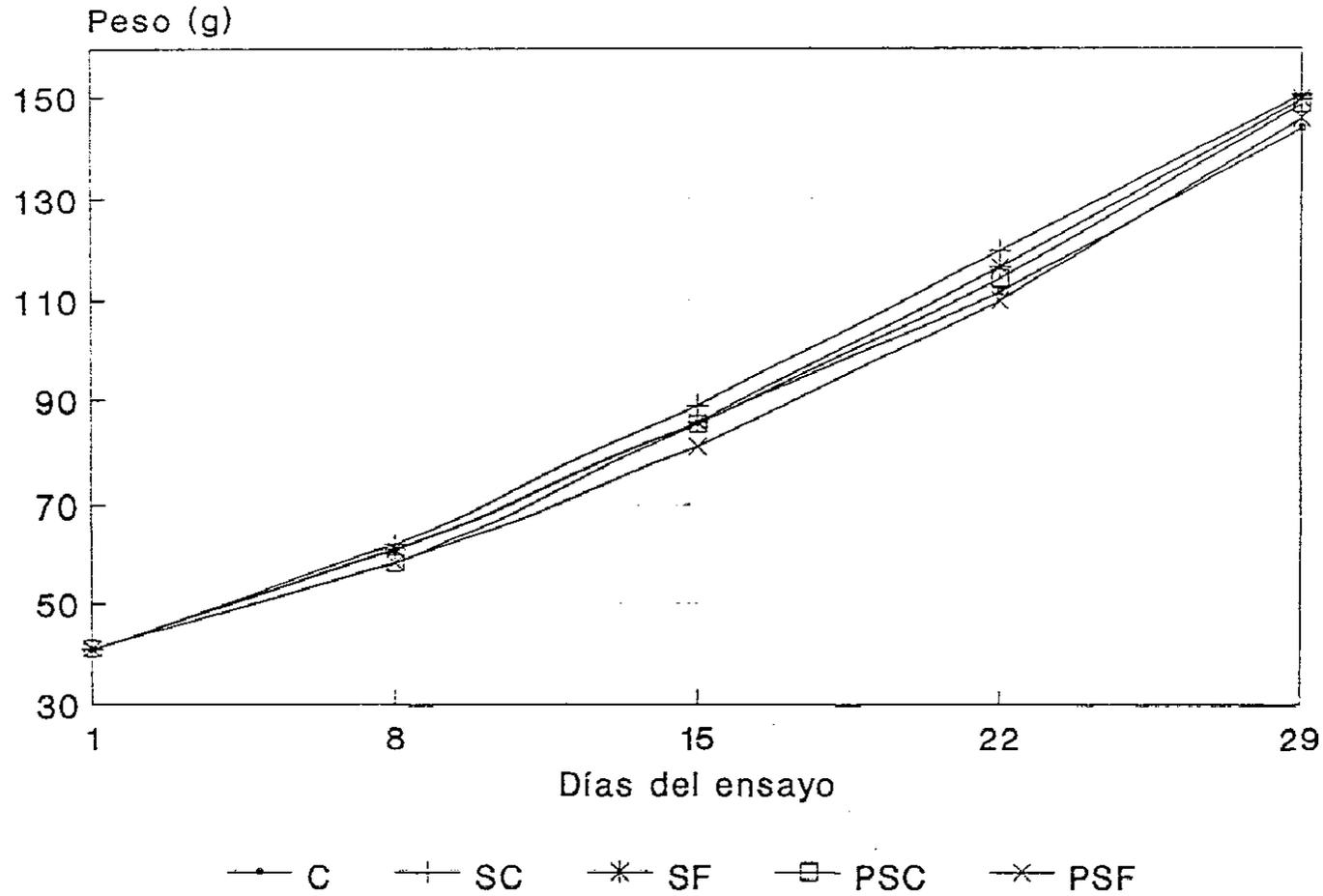


FIGURA 24.-

BALANCE DE ZINC DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE  
CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS ( $\mu\text{gZn}/\text{día}$ )

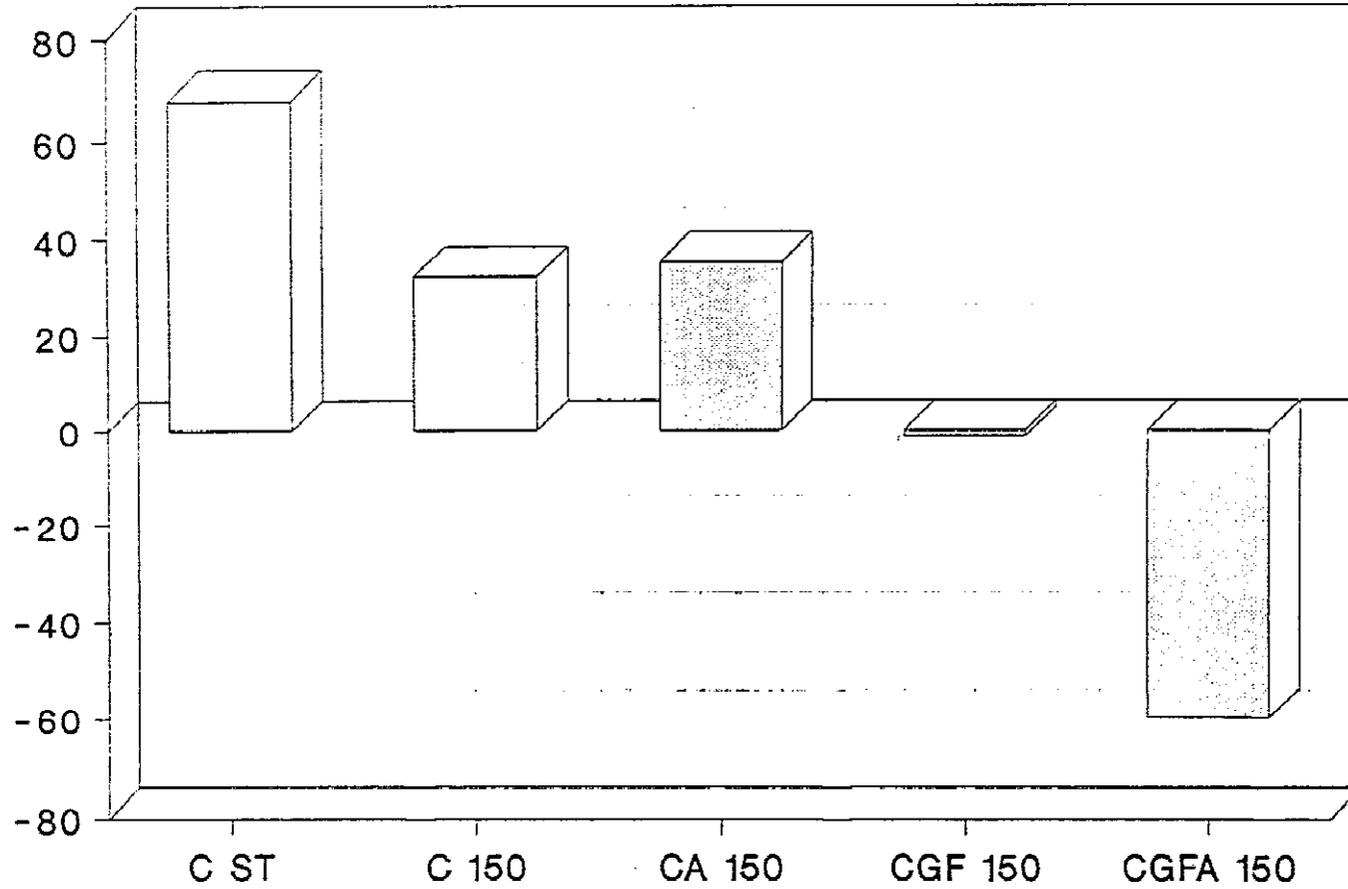
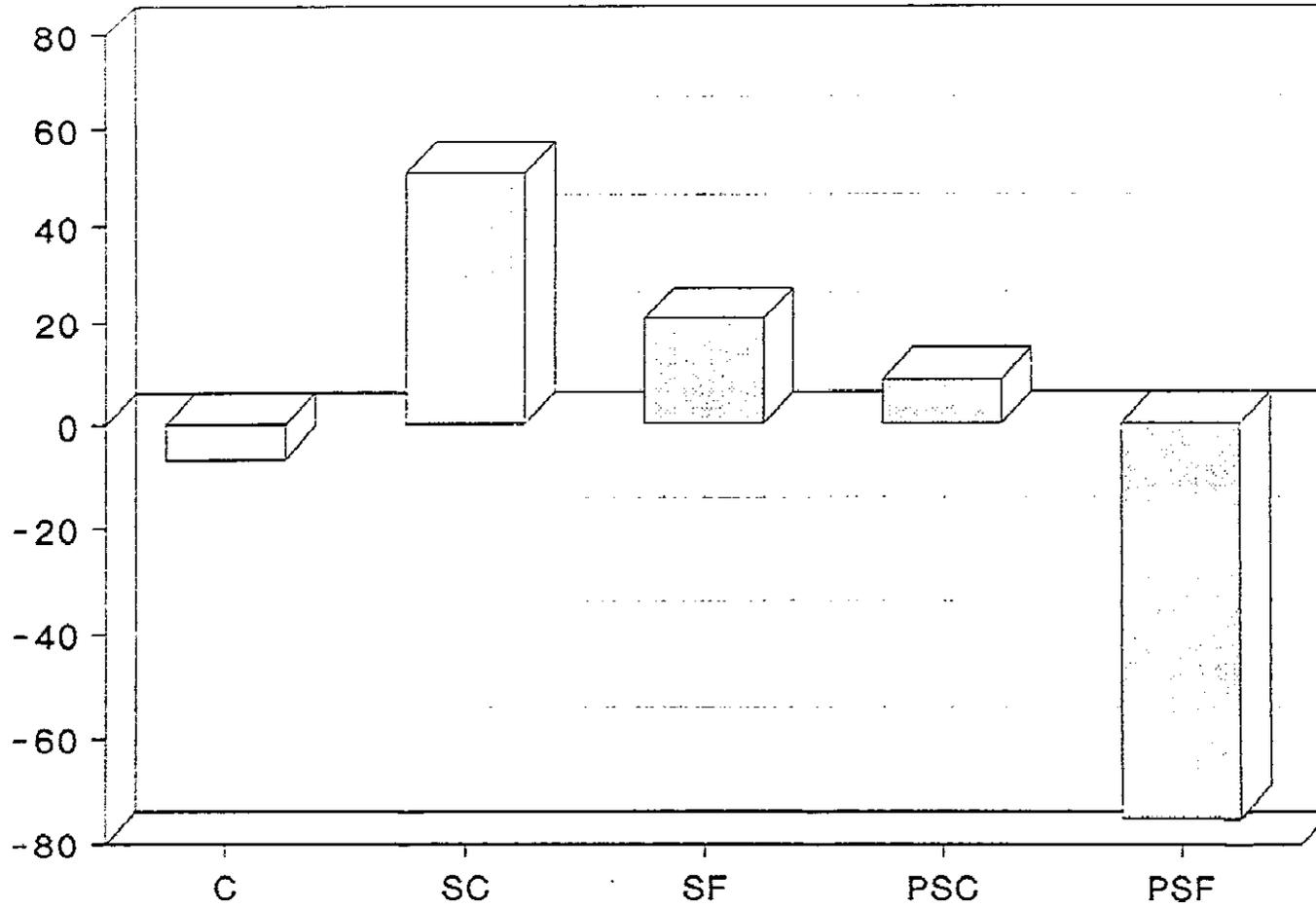


FIGURA 25.-

BALANCE DE ZINC DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE  
CONTIENEN LAS DISTINTAS MUESTRAS ( $\mu\text{gZn}/\text{día}$ )



**FOTO I**

---

5.- *DISCUSION DE RESULTADOS*

## 5.1.- CASEÍNA Y BIODISPONIBILIDAD DE MINERALES

### 5.1.1.- Influencia de la presencia de caseína, en cantidades variables, sobre la disponibilidad del calcio.

#### 5.1.1.1.- Efecto de la cantidad y del tratamiento térmico.

La adición de caseína a una solución de  $\text{Ca}^{++}$  originó una redistribución del elemento de manera que parte del mismo precipitó y otra porción quedó en solución, conservando su estado iónico inicial o bajo forma soluble no ionizada (Tabla 1).

La precipitación del calcio se entiende puesto que las fracciones  $\alpha$ s y  $\beta$  de la caseína son calcio-sensitivas a temperatura ambiente (ALAIS y BLANC, 1975) y arrastran al elemento en su precipitación; precisamente esta característica se ha utilizado para separarlas de las restantes fracciones (LÖNNERDAL, 1985).

En las condiciones del ensayo las distribuciones del calcio en soluble y precipitado no pareció depender de la cantidad de caseína añadida; si bien en la fracción soluble, su reparto entre  $\text{Ca}^{++}$  y soluble no iónico acusó algo esa influencia. El  $\text{Ca}^{++}$  disminuyó a medida que aumentaba la cantidad de caseína añadida, aunque no de forma directamente proporcional; en sentido inverso se incrementaba el calcio soluble no iónico. Ya que la caseína une al calcio formando sales de fosfato cálcico coloidal incorporadas dentro de las micelas, y directamente a sus fracciones proteicas (ABRAMS y Col., 1990), puede entenderse que al aumentar la cantidad añadida se incrementen los ligandos que fijan al elemento y lo mantienen soluble, disminuyendo, así, la fracción iónica.

Como es bien conocido, por acción del calor la estructura proteica de la caseína se altera y la molécula se desnaturaliza. Además, con temperaturas elevadas y tiempos prolongados se dañan aminoácidos específicos y aparecen pérdidas que reducen su valor nutritivo.

Este hecho ha sido perfectamente comprobado a partir de 120 °C (SMITH y FRIEDMAN, 1984). Concretamente se sabe que el calor altera en la leche la estructura de las micelas de la caseína, y produce disociación de sus fracciones  $\kappa$ ,  $\beta$ , y  $\alpha_s$  (en el orden indicado), disociación que se incrementa con la severidad del tratamiento (SINGH y CREAMER, 1991). Si recordamos que la fracción  $\kappa$  es soluble en presencia de calcio a todas las temperaturas y que, además, juega un papel esencial en el mantenimiento de la micela al estabilizar e impedir la precipitación de las fracciones  $\alpha_s$  y  $\beta$  en presencia del elemento, se comprenderá que en nuestros ensayos, al añadir la caseína calentada a 200°C a la solución cálcica, se produjera una disminución muy importante del calcio soluble total respecto a la ocasionada con la caseína sin tratar, más intensa cuanto mayor era la cantidad añadida, así como un paralelo incremento de la fracción de calcio precipitado.

Por último, de nuestros resultados se desprende que las alteraciones consecuentes al calentamiento han afectado en gran medida a los ligandos del calcio que lo mantenían en solución, ya que ahora el calcio total soluble ha disminuido considerablemente, pero además, en su mayor parte, se encuentra en forma iónica y no ligado.

#### 5.1.1.2. Efecto de la temperatura de calentamiento y de la presencia en la muestra de azúcar y/o aceite sobre la biodisponibilidad del calcio.

##### 5.1.1.2.1. Influencia sobre las formas del elemento

Como una cuestión preliminar debería comentarse que al estudiar los datos recogidos en las Tablas 2, 3 y 4, se observa que aunque los valores obtenidos con la caseína sin tratar y calentada a 200° siguen la misma tónica del ensayo 5.1.1.1., las cifras no coinciden exactamente.

Aquí la adición de 30 mg de caseína sin calentar produjo una menor precipitación del calcio soluble, mientras que si se añadía calentada a 200° se

manifestaban los mismos efectos observados con la caseína láctica, calentada a igual temperatura, pero más agudizados.

Estas divergencias en valor absoluto, que no en comportamiento, hemos de atribuir las a la distinta naturaleza y riqueza proteica de ambas caseínas. En el ensayo 5.1.1.1., el primero que realizamos a título orientativo, se empleó la caseína habitual en la preparación de las dietas semisintéticas para los animales, cuya riqueza proteica fue del 83,90% y denominada como "caseína láctica" por la casa comercial.

A la vista de los resultados obtenidos con ella y, pensando en profundizar en su influencia, al diseñar este segundo grupo de ensayos se decidió emplear una caseína de mayor pureza y de características perfectamente definidas, por ello se empleó la Hammersten (Merck) cuya riqueza era del 95,80%.

Este hecho, dos caseínas distintas, puede explicar las diferencias halladas en los valores absolutos, e incluso hacernos entender el agravamiento de los efectos debidos al calentamiento cuando se empleó una caseína más pura, ya que, como decíamos en 5.1.1.1., existe un efecto positivo de la cantidad unida al calentamiento.

El análisis refleja que la adición de 30 mg de las distintas muestras sin calentar a las soluciones de calcio produjo una disminución del elemento ionizado, parte del cual permaneció soluble pero en forma no iónica y una pequeña parte del total precipitó (Tablas 2, 3, 4) de modo que la distribución porcentual de las formas del elemento se aproximó a 80-85% como soluble, del cual prácticamente la mitad apareció ionizado, y en torno al 15-20% se halló precipitado (Tabla 5).

Aunque el Anova refleja diferencias significativas en las formas del calcio por efecto de las distintas muestras, con los valores más altos para el calcio precipitado y, consecuentemente, más bajas de soluble en la que contenía caseína y aceite, debe señalarse que cuantitativamente no fueron muy importantes y que a ello pudo contribuir, además de las diferencias de composición entre ellas que, sin duda, sería el efecto más importante, la recuperación de los análisis que en algunos casos (muestras que contienen sacarosa sin calentar a alta temperatura o casi todas las

muestras a 200°C) fue menos adecuada. En estas valoraciones siempre se perdía algo de calcio, a pesar de que precisamente esas muestras se repitieron en varias ocasiones, tratando de obviar posibles errores.

La distribución de las formas en que apareció el calcio, tras la adición de las distintas muestras calentadas a 100°C (Tabla 6), recuerda mucho a la que presentaba con las muestras sin tratar (Figuras 1 a 6). La diferencia estriba en un ligero aumento de la proporción precipitada, significativo sólo en algunos casos y también un descenso en la caseína con aceite.

El incremento del calcio precipitado se produjo fundamentalmente a expensas del soluble no iónico, porque el  $\text{Ca}^{++}$  se mantuvo o incluso, a veces se elevó (Tablas 2, 3 y 4).

Parece pues que los posibles ligandos del calcio, que de alguna forma lo mantenían en solución o favorecían las condiciones para ella, han comenzado a sufrir los efectos del calentamiento aunque todavía de una forma no demasiado acusada. Estos hechos coinciden con la idea generalizada de que el calentamiento de la leche a temperaturas moderadas no produce efectos demasiado adversos para su proteína (SCOTT, K.J., 1989), y, en concreto, que si la caseína se calienta por debajo de 100-120°C no sufre modificaciones importantes a no ser que existan en el medio azúcares reductores (SMITH y FRIEDMAN, 1984; KNIPFEL, 1975). En este sentido debe advertirse que las muestras en las que la glucosa y fructosa estaban ya presentes desde el principio, fueron las que ocasionaron una precipitación del calcio significativamente mayor (Tablas 4 y 6), lo cual nos hace pensar en una incipiente reacción de Maillard que, como veremos, se desarrolló con mayor extensión a temperaturas más elevadas. De hecho esas muestras se hallaban ya ligeramente tostadas (Foto 1).

Cuando las muestras se calentaron a 150°C, se produjeron en ellas una serie de modificaciones que drásticamente alteraron las formas del calcio en solución: el soluble total se redujo significativa y copiosamente en todos los casos (Tablas 9 a 14, figuras 1 a 6), pero los valores más pequeños aparecieron con las muestras que

contenían caseína sola o ésta acompañada de glucosa y fructosa (Tabla 3), produciéndose paralelamente un incremento del precipitado (Tabla 4), que se originó en detrimento de la forma soluble no iónica que, como puede verse en las figuras 1 a 6, prácticamente desapareció en todos los casos, pero el efecto no fue exclusivo sobre dicha forma ya que el calcio ionizado también disminuyó, especialmente en las muestras antes señaladas (Tabla 2).

El efecto intenso de la muestra de caseína calentada a 150°C hemos de entenderla a la luz de la influencia del calor sobre esta proteína comentado en 5.1.1. y, teniendo en cuenta que a 150°C se producen ya serias modificaciones estructurales que incluso afectan al contenido aminoacídico (PIENIAZEK y Col., 1975); SMITH y FRIEDMAN, 1984).

Las muestras que contenían glucosa y fructosa presentaban un pardeamiento acusado (foto 1), indicativo de la reacción de Maillard, que a esta temperatura superior, 150°C, debió haberse ocasionado de forma más intensa, ya que, como indican diversos autores (ADRIAN, 1974; CHEFTEL, 1976, BENZING-PURDIE y Col, 1985), su intensidad y las características de los productos formados dependen de la temperatura de calentamiento, de ahí que a la propia influencia de la proteína desnaturalizada deban añadirse las repercusiones negativas de los productos de la reacción de Maillard, premelanoidinas, melanoidinas u otros.

Concretamente los pigmentos insolubles, melanoidinas, actúan como agentes quelantes de cationes (HRDLICKA, 1976; RENDLEMAN e INGLET, 1984) por lo que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la solubilidad del elemento al adherirlo fuertemente y formar con ellos complejos estables que para el caso concreto del  $\text{Ca}^{++}$  ya fueron descritos por RENDLEMAN (1987) tanto en sistemas modelos como en alimentos.

No es raro que en las muestras que contenían sacarosa, comparadas con estas últimas, permaneciera una mayor cantidad de calcio soluble e ionizado; a esta temperatura la sacarosa todavía no se ha hidrolizado (CHEFTEL, 1976), no ha habido reacción de pardeamiento no enzimático y por ello el efecto negativo de las

melanoidinas no ha tenido lugar.

Cabe considerar, por último, que la mayor cantidad de calcio en solución se conservó en los casos en que se añadieron las combinaciones de caseína con algún otro componente que, por sí mismo, no produjo un efecto deletereo adicional, como el comentado para la glucosa y fructosa.

Para entender esto debe recordarse que metodológicamente igualamos siempre la cantidad de muestra añadida, 30 mg, pero en ese peso, el contenido de caseína se veía mermada cuando se añadían otros componentes, quedando en 21,43 mg, 18,75 mg y 15 mg de caseína en las muestras que llevaban aceite, azúcares y aceite con azúcares respectivamente.

Por eso se comprende que si a 150°C la temperatura ejerció ya un efecto importante y si, como decíamos en 5.1.1.1., la cantidad de caseína añadida modula el calcio en solución, de manera importante sólo si previamente ha sido calentada (Tabla 1), se entenderá que en CGF, CS, y CA respecto a C quede más calcio en solución y lo mismo en CSA frente a CS y en CGFA respecto a CGF. A la vez se entenderá que el hecho no haya sido claramente manifiesto a temperaturas inferiores.

En resumen puede decirse que tras el calentamiento de las muestras a 150°C y su adición a la solución cálcica, se observó una verdadera redistribución de las formas del elemento (Tabla 7). Apareció un claro predominio del precipitado, entre 50-80%, en detrimento de la forma soluble, que disminuyó hasta 50-20% aproximadamente. Cabe destacar que en la muestra con glucosa y fructosa esa distribución fue ya la imagen invertida de la que aparecía con la misma muestra sin calentar (Tabla II, figura 3).

Al poner la solución cálcica en presencia de las muestras calentadas a 200°C se agudizaron los efectos ya comentados a 150°C; es decir, se incrementó aún más el calcio precipitado en detrimento del soluble que también ahora era todo iónico (Tabla 2, 3, 4). Todo lo cual se comprende si se tiene en cuenta que al aumentar la temperatura se acrecienta el daño a la proteína y que el desarrollo de la reacción de

Maillard y los productos formados pueden ser diferentes (BENZING-PURDIE y Col, 1985).

Ese incremento fue especialmente acusado en las muestras que contenían sacarosa (Tablas 10 y 13, figuras 2 y 5), y que a 150°C todavía conservaban mayor cantidad de calcio en solución al ser la sacarosa un azúcar no reductor que en principio no participaría en la reacción de Maillard.

No obstante, como indican HURRELL y CARPENTER (1977), a temperaturas superiores a 150°C se produce el desdoblamiento de la sacarosa, con lo que a 200°C ya existen glucosa y fructosa presente en el medio que pueden desarrollar la reacción, de ahí que a esta temperatura, entre las muestras que contenían glucosa y fructosa o sacarosa no aparecieran diferencias sustanciales. El menor contenido de calcio precipitado en CGFA respecto a CSA (Tablas 4 y 8) dada la similitud del soluble (Tabla 3), parece fruto de la baja recuperación que se obtuvo en este caso, más que producto de un efecto específico de la propia muestra.

Nótese que a esta temperatura la distribución porcentual del calcio entre soluble y precipitado fue aproximadamente el reparto inverso al que se producía con las muestras sin calentar: el porcentaje que entonces era soluble ahora ha precipitado y viceversa (Tablas 5 y 8). Esta apreciación se ajusta bastante fielmente a la realidad en las muestras sin aceite; en las que lo llevan resulta más aproximada, lo que sin duda se relacionaría con los menores contenidos de productos que interfieren.

Como resumen puede decirse que, por la presencia de estas muestras en las soluciones de calcio, se produce una redistribución del elemento en forma iónica, soluble no iónica y precipitada.

El calentamiento previo de las muestras a 100°C no altera sustancialmente esta distribución pero, entre 100° y 150°C, tienen lugar importantes modificaciones en la estructura y/o naturaleza de los componentes, previsiblemente con la aparición de nuevos productos, que parecen más acusados en las muestras con azúcares y que, al favorecer la precipitación del elemento, inciden drásticamente sobre la distribución de las formas del calcio soluble y precipitado, hasta el punto de invertirla cuando la

temperatura alcanza los 200°C (Figuras 1 a 6).

#### 5.1.1.2.2. Influencia sobre la digestibilidad "in vitro"

En este estudio preliminar de digestibilidad "in vitro" se ensayaron exclusivamente las muestras de caseína y caseína con glucosa y fructosa, sin calentar o calentadas a 150°C y 200°C. Se descartó la temperatura de 100°C porque, a la vista de los ensayos 5.1.1.2.1., no existían diferencias importantes respecto a las muestras sin calentar. Entre la caseína con glucosa y fructosa o con sacarosa se eligió la primera, dado que la influencia de la sacarosa, una vez desdoblada, era similar, y en la mezcla CGF la glucosa y la fructosa estaban ya presentes a todas las temperaturas. Posteriormente, cuando las muestras formaron parte de una dieta en la que se estudió la digestibilidad "in vitro" del calcio se ensayó también la influencia del aceite.

En este grupo de experimentos se mantuvo la misma proporción calcio-muestra utilizada en los ensayos anteriormente descritos.

Tras la digestión "in vitro" con la muestra de caseína sin calentar (Tabla 15, figura 7), se observó que aproximadamente un 15% del calcio total dializaba ya tras la primera hora de digestión pancreática, cantidad que se iba incrementando con el tiempo de digestión. Algo menos de la mitad de ese elemento dializado se hallaba en forma iónica (Tabla 20, figura 9).

El restante calcio, que no atravesó la membrana, se encontró preferentemente soluble, en torno al 45-50% del total, pero también una cierta proporción, 35-40%, apareció precipitado, aunque éste iba disminuyendo a medida que transcurría el tiempo de digestión, durante el cual, se solubilizó, dializó y contribuyó a incrementar el calcio total dializado; debe suponerse que preferentemente mediante un aumento del calcio soluble no iónico, ya que la fracción ionizada no se elevó de forma importante ni significativa.

Si se comparan estos datos con los recogidos en la Tabla 9, puede verse

como tras la digestión "in vitro" se originó una mayor precipitación del calcio, y también como durante este proceso se fueron liberando sustancias que de alguna forma fijaban el calcio, lo solubilizaban y favorecían su absorción. En este sentido se sabe que durante la digestión proteica se forman, por una parte, macropéptidos que interactúan con los minerales y normalmente disminuyen su absorción (NAITO, 1986), pero también que, a medida que transcurre el proceso, se liberan pequeños péptidos y aminoácidos que favorecen la solubilidad del calcio.

Concretamente a lo largo de la digestión intestinal de la caseína tiene lugar la formación de fosfopéptidos que incrementan la solubilidad del calcio intraluminal, inhibiendo la precipitación de sus sales y favoreciendo, así, la difusión pasiva del elemento (SATO y Col. 1986).

Cuando en la digestión "in vitro" se empleó caseína calentada a 150°C, la diálisis del calcio no varió cuantitativamente y a la cuarta hora existieron cantidades similares a las obtenidas con ella sin tratar (Tabla 15, figura 7). No obstante, en este segundo caso, la cifra dializada a la primera hora fue mayor y el equilibrio se alcanzó ya a la segunda, a partir de la cual no se produjo incremento significativo. Parece, pues, que el proceso digestivo ha transcurrido con mayor celeridad en la muestra calentada, lo cual no es de extrañar ya que la desnaturalización ocasionada en la proteína por el calentamiento, siempre que no sea excesivo, favorece la digestibilidad (DEL VALLE y Col., 1983).

La mitad del calcio que atravesaba la membrana semipermeable estaba ionizado (Tabla 20, figura 9). Al otro lado de la membrana quedó aproximadamente un 55% de calcio soluble y sobre un 25% precipitado que no dializaron.

En este caso la fracción precipitada fue menor y no disminuyó en el tiempo que empleamos para la digestión. Por el contrario, la porción soluble decreció ligeramente ya que una pequeña cantidad todavía siguió dializando, debido a que durante la digestión, el ataque enzimático, la hidrólisis, etc., que tienen lugar pueden disminuir el tamaño de las moléculas solubles que fijan al calcio, de forma que con el tiempo es posible transportar más elemento a través de la membrana.

Todo esto hace pensar que el calentamiento de la caseína a 150°C ha introducido una serie de alteraciones en su molécula que han modificado sus productos de digestión y de modo indirecto han alterado sus repercusiones sobre la distribución del calcio. Esto explica que el porcentaje precipitado sea ahora menor que con caseína sin calentar y, además, que aparezca una fracción de calcio soluble no iónico (50% en el dializado y aún mayor en el no dializado), que ha debido formarse a expensas de los productos de la digestión ya que no se originaba por la mera presencia de la caseína calentada 150°C en la solución cálcica (Tabla 9).

La diálisis del calcio se modificó sustancialmente tras el empleo de caseína calentada a 200°C, disminuyendo mucho la cantidad de elemento penetrado, ya en la primera hora de digestión intestinal, y más aún a medida que ésta avanzaba (Tabla 15, figura 7), disminución que afecta preferentemente a la fracción ionizada (Tabla 20, figura 9). Mediante análisis matemático se demuestra que existieron diferencias significativas entre las pendientes positivas de las rectas de regresión correspondientes a la variación en el tiempo del calcio total dializado con la caseína sin tratar y la calentada a 150°C respecto a la negativa obtenida con la calentada a 200°C ( $p = 0,0001$ ) (Figura 7). También a lo largo del tiempo se observó una disminución del calcio iónico dializado más acusada en la caseína calentada a 200°C ( $p = 0.007$  y  $p = 0.0085$  para CST y C 150°C frente a C 200°C) (Figura 9).

El calcio que no dializó estaba precipitado casi en su totalidad, sólo una pequeña cantidad apareció soluble y disminuyó con el desarrollo de la digestión. Esta disminución, junto con la que experimentó el dializado, contribuyó a incrementar la precipitación del elemento, siguiendo una tónica inversa a la observada en los casos anteriores, en los que la digestión favorecía la diálisis del calcio mientras que aquí favorece su precipitación.

Así su distribución porcentual en soluble y precipitado coincide con la de la Tabla 9, por lo que la digestión en este caso no ha sido capaz de mejorar la precipitación cálcica que ya se producía por la sola presencia de la caseína calentada a 200°C, pérdida de solubilidad que ya podría tener un significado nutricional además de físico-químico.

La diálisis del calcio, tras la digestión "in vitro" de las muestras que contenían caseína, glucosa y fructosa sin calentar, siguió la misma tónica que la ofrecida por las muestras con caseína sola, pero partiendo de unos valores de calcio dializado significativamente superiores ya a la primera hora de digestión pancreática (Tabla 17).

Por otra parte, en la porción del elemento que no dializa se observó una mayor cantidad soluble y menor precipitado. Ambos habían disminuido a la cuarta hora de la digestión (Tabla 16), lo que contribuyó a enriquecer la transferencia del elemento al interior de la membrana. También a ambos lados se conservaron mayores cantidades de  $\text{Ca}^{++}$  respecto a la muestra de caseína sin tratar (Tabla 17).

El calentamiento previo de la muestra a  $150^{\circ}\text{C}$  ejerció un efecto positivo sobre la diálisis del calcio, que se incrementó a medida que transcurría el tiempo de digestión, al menos hasta la tercera hora (Tabla 16, figura 8). Este aumento se produjo merced al calcio soluble no iónico, ya que la proporción ionizada no se elevó. Paralelamente en la fracción no dializada parece que se favoreció también la forma del calcio total soluble en detrimento del precipitado, cuyo valor fue menor que el de la misma muestra sin calentar e incluso respecto a la caseína calentada a la misma temperatura (Tablas 16 y 18). Ese calcio precipitado se fue redisolviendo y simultáneamente difundiendo por el proceso digestivo, pero ahora con mayor intensidad. A la vista de tal dinámica, cabe pensar que el tratamiento térmico de la mezcla CGF, unido a la digestión, ha favorecido la liberación de posibles ligandos absorbibles del calcio que lo mantienen en solución y favorecen su difusión pasiva. A la vez, los ensayos de digestión "in vitro" sirven para demostrar que ese calcio precipitado no es permanente y que gran parte puede recuperarse y solubilizarse de nuevo, posiblemente unido a moléculas de elevado peso molecular, preferentemente, que lo mantienen en solución pero no permiten su diálisis; ello explicaría que el 18% del calcio soluble iónico de la Tabla 11 se elevara tras la digestión hasta el 80%, del cual, la mayor parte no había dializado y estaba en forma soluble no iónica.

El calentamiento a  $200^{\circ}\text{C}$  en la mezcla CGF, como ya indicábamos para la caseína aislada, trastocó la distribución del calcio tras la digestión "in vitro", en este

caso, incluso de manera más acentuada. Dializó muchísimo menos a la primera hora, la mitad que con la misma muestra calentada a 150°C, y, además, dicha cantidad fue disminuyendo a medida que transcurría el tiempo de digestión, de forma que a la cuarta hora sólo supuso aproximadamente un 5% del total (Tabla 16, figura 8) y se hallaba exclusivamente en forma iónica, por lo que nada del calcio que atravesó la membrana estaba ligado en ese momento. En la Tabla 20 y figura 10, puede apreciarse como la proporción de  $\text{Ca}^{++}$  del total dializado fue en este caso siempre la más alta y, además, como se elevó hasta alcanzar el 100% al final del periodo, en contraposición con el comportamiento del ión en las muestras sin calentar o calentadas a 150°. La elevación del porcentaje del  $\text{Ca}^{++}$  en función del tiempo de diálisis fue significativa,  $p=0.0001$ , respecto a la ligera disminución ocurrida con CGF ST y CGF 150°C.

De forma complementaria se observó un incremento sustancial en el calcio no dializado, a base del extraordinario aumento del elemento precipitado, ya que el soluble a este lado de la membrana disminuyó también en gran cuantía, y apareció en su totalidad como  $\text{Ca}^{++}$  (Tabla 16). Posiblemente este hecho, unido a la menor cantidad de calcio dializado, sea la diferencia más destacable con la caseína sola calentada a la misma temperatura, en la que el  $\text{Ca}^{++}$  suponía una fracción muy pequeña del total soluble, dializado y no dializado, por lo que al contrario que aquí, se conservaban ligandos solubles del elemento (Tabla 19).

Además, a medida que avanzaba el tiempo, ese calcio precipitado se iba incrementando debido a la disminución paralela que experimentaba la cantidad soluble a ambos lados de la membrana. Por tanto, puede decirse que el proceso digestivo, en este caso, tampoco ha sido capaz de modificar sustancialmente la distribución que se producía entre el calcio soluble y no soluble por la presencia de la mezcla CGF calentada a 200°C en la solución (Tabla II), algo parecido a lo que ocurría con la caseína sola calentada a la misma temperatura.

De todo esto podemos deducir que, el calentamiento a 200° durante una hora de la caseína sola o en unión de glucosa y fructosa produce una serie de alteraciones que no son corregidas por el proceso digestivo, e inciden negativamente en la

disponibilidad del calcio.

A este respecto podría añadirse que a elevadas temperaturas, incluidas los 200°C, tiene lugar la formación de isopéptidos resistentes a la acción de los enzimas proteolíticos y por ello a la digestión (PIENIAZEK y Col., 1975 ; HURRELL y CARPENTER, 1976), lo cual, de alguna forma, podría entorpecer la utilización del Ca.

Además, en el caso de la mezcla CGF calentada a 200°C, es factible también el efecto negativo de las melanoidinas, de naturaleza diferente en función de la temperatura en que fueron formadas (BENZING - PURDIE y Col., 1985) y de las que se ha descrito que a medida que el pardeamiento de la muestra se vuelve más intenso los complejos de Maillard formados resultan más inertes a la digestión, lo que compromete su biodisponibilidad (WHITELAW y WEAVER, 1989). De hecho nuestros resultados demuestran que por el calentamiento a 200°, pero no a 150°C, y tras la digestión, se liberan una serie de sustancias que contribuyen a la precipitación del Ca no dializado, e indirectamente del que dializa, al favorecer el gradiente de concentración a ambos lados de la membrana que hace salir parte del elemento que ya había penetrado a la primera hora, de forma más intensa cuando la muestra contenía los azúcares reductores (Tabla 19).

Para estudiar de una forma más real la influencia de los tipos de muestras ensayados y su calentamiento sobre la biodisponibilidad del calcio, como se ha señalado en la metodología, las muestras se emplearon para preparar dietas semisintéticas, utilizándolas como única fuente de proteína y, en su caso, como aporte parcial de grasa y/o hidratos de carbono. Con ellas se realizaron estudios de digestibilidad "in vitro" y de balance en ratas, y en ellas se estudió la disponibilidad de los elementos minerales, en este caso del calcio, contenidos en dichas dietas. Para estos ensayos se descartó el calentamiento a 200°C por los resultados negativos, ya comentados en el apartado anterior, que hacían a las distintas muestras inadecuadas para la alimentación animal.

Los estudios de digestibilidad "in vitro" reflejan que la fracción del calcio

dietético que dializó se aproximaba en todos los casos al 20%, porcentajes que recuerdan a los obtenidos con las muestras aisladas (Tabla 21, figura 11). No obstante, entre las distintas muestras existieron diferencias significativas que no fueron cuantitativamente demasiado importantes, y en todas ellas se produjo una ligera disminución del calcio dializado a partir de la segunda hora. Los valores más bajos correspondieron a las dietas que contenían C 150°C, CA 150°C y CGF 150°C, pero sin diferencias entre ellas a la primera hora.

El calcio dietético que dializó se encontraba en su mayor parte en forma iónica, 70-85% en las dietas con CA 150°C y CGF 150°C y entre el 95 y 100% en las restantes (Tabla 22, figura 12), por lo que en las dos primeras, todavía parte del mismo permaneció ligado, aunque en menor proporción a la observada con las muestras no incluidas en dietas (Tabla 20). Las razones de este cambio podríamos achacarlas a la distinta naturaleza del calcio, la solución cálcica (qualicheck) de los ensayos del punto 5.1.1.1. y el calcio del corrector mineral, así como a los restantes componentes dietéticos.

La presencia de esos componentes, por ejemplo la fibra dietética, podrían explicar la mayor proporción de precipitado en el calcio que no dializó. En él, la forma soluble, cuantitativamente menor, tendió a disminuir excepto con la dieta de caseína sin calentar, y ello, junto con la disminución del calcio dializado, contribuyó a incrementar el precipitado, cuyos valores fueron significativamente superiores con las dietas que contenían C 150°C, CA 150°C y CGF 150°C a partir de la segunda o tercera hora de digestión.

#### 5.1.1.2.3. Influencia sobre la biodisponibilidad

En los ensayos de balance, los animales alimentados con las distintas dietas no mostraron variaciones significativas en sus consumos alimentarios, aunque es cierto que el mayor valor de ingesta correspondió al grupo control, caseína sin tratar (Tabla 32).

Los pesos de las ratas a lo largo del ensayo tampoco variaron

significativamente (Figura 22) aunque al igual que con la ingesta, el grupo de caseína tuvo una evolución ponderal siempre por encima de las restantes, y el de CGF 150°C, tras la adaptación, por debajo.

Nótese que los animales partían de pesos idénticos y que a lo largo del ensayo algunos grupos tendieron a distanciarse, pero la influencia debía ser de poca intensidad y no llegó a manifestarse de forma significativa en los 17 días del ensayo (Tabla 32).

No obstante, cuando ambas influencias se unen y se analiza la ganancia de peso en relación con el alimento consumido, en el Coeficiente de Eficacia Alimentaria (C.E.A.) se apreció un deterioro significativo en los grupos que ingirieron las muestras con glucosa y fructosa, preferentemente en CGF 150°C, mientras que la dieta que se utilizó con mayor eficacia fue la control de caseína sin calentar (Tabla 32).

El estudio del balance de calcio (Tabla 33) refleja que aun sin diferencias significativas en la ingesta, la excreción fecal varió ligeramente, alcanzando los mayores valores el grupo control, cuyas cifras de ingesta fueron también las más altas, lo que podría explicarlo. Por el contrario, en los animales del grupo CGF 150°C, la menor ingesta no se correspondió con la menor excreción. Algo parecido aunque más atenuado podría decirse de CGFA 150°C, así que ambos resultados hacen pensar en la posibilidad de algún factor negativo común que también esté incidiendo.

Estos cambios en la excreción fecal del calcio fueron cuantitativamente tan pequeños que, unidos a la ingesta, no llegaron a afectar de forma significativa la absorción del elemento. Pero otra vez aquí se manifiesta que los más bajos valores correspondieron a los grupos con glucosa y fructosa, especialmente CGF 150°C, que fue también con el que en los ensayos "in vitro" dializaba menor proporción de calcio a todas las horas (Figura 11).

Estas pequeñas variaciones no significativas en el calcio absorbido, unidas a

los cambios también escasos de la ingesta pero de sentido contrario, hicieron que sobre el % A/I se observara un ligero incremento en los grupos alimentados con C 150°C y CA 150°C.

En general los valores de absorción "in vivo", en sus diversas expresiones, no son numéricamente equiparables a los obtenidos "in vitro", lo cual queda sobradamente recogido en la bibliografía.

Resulta lógico que la absorción "in vivo" sea superior, ya que además de la difusión, que podría explicar la diálisis, en el animal intervienen todos los procesos de transporte activo, sometidos de forma especial a la regulación biológica que durante el crecimiento, periodo en el que se hallaban las ratas, juega a favor de una mayor transferencia cálcica.

Se sabe que en esta época la STH, entre otros factores, estimula a la  $1,\alpha$ -hidroxilasa renal necesaria para la síntesis del  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , y este metabolito favorece la absorción intestinal del calcio.

Por otra parte, tampoco en su eliminación por orina se alcanzaron variaciones significativas dadas las grandes variaciones existentes entre los animales de los grupos CGF 150°C y CGFA 150°C, cuyos valores aun sin diferencias estadísticas, fueron apreciablemente más elevados. Esto podría atribuirse a las premelanoidinas, compuestos absorbibles que actúan como ligandos de metales y favorecen su eliminación urinaria (HURRELL, 1990), hecho demostrado en ratas e incluso en humanos tras la administración parenteral de sueros glucosados con aminoácidos en los que la reacción de Maillard se había producido por la esterilización conjunta (FREEMAN y Col., 1975).

No obstante, estos ligerísimos cambios en absorción y eliminación urinaria todavía no se reflejan de forma clara en el balance cálcico.

Los valores de retención diaria en CGF 150°C y CGFA 150°C fueron los más pequeños, pero no significativamente diferentes. Sólo cuando se refiere a

eficacia de utilización a nivel metabólico, % R/A, se observó que los animales de esos dos grupos utilizaron la menor proporción del calcio absorbido e incluso también fueron los que mantuvieron una menor eficacia en la utilización nutritiva global. Por el contrario, la mejor biodisponibilidad del elemento se desarrolló en los grupos que consumieron la caseína, sola o con aceite, calentada a 150°C.

De todo ello puede deducirse que, aunque con diferencias cuantitativamente poco importantes, la presencia en la dieta de caseína calentada a 150°C en unión de azúcares reductores parece ejercer una influencia discretamente negativa que se ejerce de forma preferente o exclusiva a nivel metabólico, que suavemente desplaza el equilibrio hacia la eliminación y por ello tiende a deprimir la biodisponibilidad del calcio.

#### 5.1.2. Influencia del calentamiento de la caseína sola o en presencia de azúcares y/o aceite sobre la biodisponibilidad del magnesio

En el transcurso de la digestión "in vitro", la diálisis del magnesio, integrante de las dietas estudiadas, no se estabilizó hasta la segunda o tercera hora de digestión, si bien a la primera ya se había transferido la mayor parte en todas las dietas excepto en las fabricadas con las muestras con glucosa y fructosa, en las cuales el incremento entre la primera y segunda hora fue más acusado (Tabla 23, figura 15). Este distinto comportamiento no puede achacarse, en principio, a un retraso generalizado del proceso digestivo para estas dietas, ya que no se observó en el caso del calcio, por lo que habría que pensar en un efecto específico referido al magnesio. Aún así con la dieta que contenía la muestra CGF 150°C se produjo la menor diálisis de magnesio a todas las horas. Paralelamente, la fracción de magnesio soluble no dializado tendió a disminuir a todas las horas y en todas las dietas lo cual contribuyó a mejorar la diálisis del elemento, ya comentada, y a la aparición o al incremento de la porción precipitada.

A la primera hora esta última fracción sólo existía claramente en la dieta con CGF 150°C, y en ella se mantuvo a lo largo del tiempo, pero en la de caseína sin calentar y, algo también en la dieta con caseína calentada a 150°C, en el transcurso

de la digestión intestinal fue apareciendo una cierta cantidad de magnesio precipitado. Cabe destacar que esta precipitación no se produjo en las muestras que contenían el aceite al ser calentadas.

Aproximadamente un 30% del magnesio dietético dializó y el resto quedó fuera preferente o exclusivamente en forma soluble, de lo que se deduce que debió encontrarse formando parte de complejos no absorbibles.

Llama la atención que esta fracción de Mg soluble que no dializa fue la más baja en CGF 150°C, y la más alta en CGFA 150°C, seguida de CA 150°C. Ello puede indicar que la presencia del aceite durante el calentamiento introdujo cambios que, unidos a la digestión, de alguna forma favorecieron la solubilidad del elemento y, sobre todo, impidieron su precipitación, a la par que ejercieron un efecto positivo sobre su difusión, poco importante cuantitativamente.

En los ensayos "in vivo", el consumo diario de magnesio de las ratas a lo largo del balance no alcanzó diferencias significativas, si bien los valores más bajos correspondieron a los grupos C 150°C y CA 150°C (Tabla 34), lo cual hay que atribuirlo a las pequeñas desviaciones de ingesta no significativas, ya comentadas, y a las levísimas variaciones en las concentraciones de magnesio en las distintas dietas que fueron coincidentes en el mismo sentido. A pesar de la falta de significación, este hecho se señala porque parece haber incidido en los cambios que a continuación se comentan.

Las excreciones fecales y urinarias fueron muy similares en todos los grupos, de ahí que las variaciones que aparecen en el magnesio absorbido o retenido, levemente inferior en CA 150°C y C 150°C, reflejen fundamentalmente esos pequeñísimos cambios de la ingesta. No descartamos totalmente la posibilidad de algún otro factor coadyuvante de escasa importancia que no se manifiesta con nitidez.

De ahí que esas diferencias prácticamente desaparezcan cuando se refieren porcentualmente a la ingesta, % A/I, y así, la utilización nutritiva global del

magnesio ofreció una eficacia similar en todos los grupos.

La misma similitud entre las ratas se manifestó en relación a las cantidades o concentraciones de magnesio en los diferentes órganos. Los contenidos del elemento en el hígado y el bazo de todos los animales, en valores absolutos y relativos, ofrecieron unas cifras completamente homogéneas (Tablas 38, 39, 40 y 41).

De esta estabilidad sustancial en el balance y en la composición corporal del magnesio cabe deducir que la presencia en las dietas de las muestras de caseína o los cambios que en ellas introduce el calentamiento no han modificado de forma apreciable la utilización nutritiva de este elemento.

### **5.1.3. Influencia del calentamiento de la caseína sola o en presencia de azúcares y/o aceite sobre la biodisponibilidad de los elementos cobre, hierro y zinc.**

Al realizar los ensayos de digestión "in vitro" en las dietas antedichas, manteniendo las proporciones señaladas entre dieta y líquido de diálisis, idóneas para los elementos mayoritarios, se observó que el cobre, hierro y zinc no aparecían en el dializado. A la vista de ello, teniendo en cuenta sus concentraciones dietéticas y el citado volumen, para el caso del cobre se vió que existía un problema de detección, ya que la determinación del elemento se realizaba por espectrofotometría de absorción atómica pero sin cámara de grafito. Hierro y zinc se hallaban a unas concentraciones dietéticas suficientes o no para permitir su detección, dependiendo del porcentaje de diálisis. Por ello y como de acuerdo con la bibliografía se preveían bajos porcentajes, se decidió realizar nuevos experimentos de digestión "in vitro" en los que, manteniendo el volumen de líquido, se incrementaba hasta 50 g la cantidad de dieta empleada en la digestión.

Con estas nuevas proporciones el cobre pudo medirse en el dializado pero, hierro y zinc seguían sin aparecer y mantenían fuera de la membrana el mismo reparto entre la forma soluble y precipitada que se observó cuando se empleaban

solo 6 g de muestra.

A la vista de ello quisimos cerciorarnos de la ausencia de un problema específico para estos elementos, relacionado o no con la forma en que eran aportados por el corrector dietético, e incluso estudiar la posible influencia de los otros componentes, distintos de la proteína, sobre sus procesos de difusión, para separarlos del previsible efecto negativo de la caseína que ya sospechábamos de acuerdo con la bibliografía (HURRELL y Col., 1989). Así se realizó la digestión "in vitro" del propio corrector, en la misma proporción que lo aportaban esos 6 g de dieta, y de la dieta sin proteína. Se vió entonces que la diálisis del hierro y zinc del corrector era posible, y en el caso concreto del zinc, tras la primera hora se había transferido aproximadamente un 23%, mientras que con la dieta sin proteína, también atravesaba la membrana semipermeable pero en menor proporción, sólo en torno al 12% después del mismo tiempo.

Por tanto nuestros resultados se unirían a los de los numerosos autores que consideran disminuida la biodisponibilidad de los elementos hierro, cobre y zinc en asociación a las micelas de caseína (SANDSTRÖM y Col., 1983), lo que ha sido achacado también a la formación durante el proceso digestivo de grandes fosfopéptidos que ligarían estos cationes, manteniéndolos solubles, pero que impedirían sus respectivas absorciones, ejerciendo, por lo tanto, un efecto contrario al que mantienen en el caso del calcio (NAITO y Col, 1974, 1989; SATO y Col, 1986).

#### 5.1.3.1. Utilización del cobre

Hasta la tercera hora de digestión no se produjo la diálisis del cobre. Durante las dos primeras, todo el elemento apareció en el lado externo de la membrana, fundamentalmente en forma soluble no dializable, entre el 85-90%, y el resto precipitado, fracción que levemente tendió a incrementarse durante la segunda hora (Tabla 24, figura 17).

Tras la tercera hora esa tendencia se invirtió marcadamente, apareció ya una

fracción de cobre dializado, cercana al 10%, que se produjo a costa de la redisolución de la fracción precipitada y, en algunos casos, merced también al leve descenso que experimentó la porción soluble no dializada. Todavía en la cuarta hora se favoreció ligeramente la diálisis, especialmente en C ST y CA 150°, que fueron también las dietas en las que más disminuyó el precipitado en ese tiempo, por lo que se evidenciaba aún más, la relación inversa de ambos mecanismos.

De todo esto cabe deducir que, como ha sido descrito (SANDSTRÖM y Col., 1983) y comentábamos antes, la caseína no es una proteína favorecedora de la utilización digestiva del cobre, ya que algunos de sus productos de digestión, presumiblemente de gran tamaño, deben unir al elemento, manteniéndolo soluble pero impiden su diálisis; de hecho, la fracción de cobre soluble no dializado prácticamente no varió con importancia cuantitativa en el transcurso de las cuatro horas de digestión pancreática en ninguna de las dietas ensayadas, y en las dietas de la caseína, sola sin calentar o calentada, fue, junto con el dializado, casi exclusivamente la forma de cobre presente, dada la escasísima cuantía del precipitado. A este respecto la bibliografía señala que en el tracto gastrointestinal pueden formarse complejos de cobre con macromoléculas procedentes de diversos alimentos que impiden su difusión (HAZELL, 1985).

El incremento en la precipitación del cobre visto en CA 150°C, CGF 150°C y CGFA 150°C hay que considerarlo fruto de las transformaciones que se produjeron cuando el calentamiento se practicó en presencia de aceite y más aún de glucosa y fructosa. A este respecto se describió hace ya tiempo que los productos derivados de la reacción de Maillard pueden quelar al cobre "in vitro" (PETIT, 1956).

En la digestibilidad "in vivo" del cobre no se apreciaron diferencias significativas en función de las dietas ensayadas, ni en la ingesta ni en la excreción fecal, y por ello, tampoco varió la absorción del elemento o su eficacia (Tabla 35).

Los relativamente bajos valores de digestibilidad aparente, % A/I, respecto a cifras más frecuentes, 40-60% (HAZELL, 1985), deben relacionarse con la edad

de los animales, ya que en la primera época de la vida, y estos animales estaban recién destetados, las grandes reservas hepáticas de cobre son utilizadas con fines metabólicos hasta que se agotan durante el crecimiento (WIENER y Col, 1984). De ahí que, puesto que el cobre es regulado en función de las necesidades y del estado nutricional, no fuera preciso forzar los mecanismos absorbivos.

En concordancia con lo anterior hay que señalar que en esta época las ratas conservaban en sus hígados niveles de cobre todavía muy superiores a los que, como veremos, presentaron ratas de más edad. Sin embargo, ni los valores ni las concentraciones hepáticas y esplénicas de cobre ofrecieron variaciones por las dietas consumidas (Tablas 38, 39, 40 y 41).

#### 5.1.3.2. Utilización del Hierro

Los resultados de la digestión "in vitro" confirmaron el efecto negativo de la caseína sobre la diálisis del hierro, ya que como comentábamos, el elemento no dializó en ninguno de los tiempos estudiados, lo que coincide con los datos obtenidos por distintos autores utilizando diversos tipos de caseína.

Este efecto lo achacan a la influencia de los productos de la digestión proteica que unen fuertemente al hierro e impiden su diálisis. Así, cuando la proteína se hidroliza previamente, se consigue mejorar el proceso de transferencia (KANE y MILLER, 1984, HURRELL y Col, 1989).

Además, la propia composición de las caseínas puede también tener importancia pues el aminoácido que se señala como favorecedor de la absorción férrica, la cisteína (MARTINEZ-TORRES y LAYRISSE, 1970), no está presente en las fracciones  $\alpha$  y  $\beta$  caseína y sólo aparece un resto en la fracción  $\kappa$ . Por último, tampoco puede descartarse un efecto adicional de otros elementos presentes, incluidos el calcio y fósforo (MONSEN y COOK, 1976; HALLBERG y Col., 1992).

El hierro, por tanto, quedó en el volumen no dializado, donde

aproximadamente dos terceras partes aparecieron en forma soluble y el resto precipitado (Tabla 25, figura 18).

Esta distribución del elemento en favor de mayor soluble y menor precipitado, que se observó desde el principio en todas las muestras aunque con diferencias significativas de poca cuantía, se mantuvo en las dietas con C ST, CGF 150°C y CGFA 150°C mientras que en las otras la fracción soluble fue disminuyendo con el paso de la digestión hasta casi igualarse con el precipitado. Las pendientes de las rectas de regresión obtenidas con las dietas que contenían C 150°C y CA 150°C difirieron significativamente del resto de las dietas y a la vez fueron distintas entre sí ( $p < 0.001$ ).

Parece pues que, con la digestión, una parte del hierro dietético precipita y se mantiene así a lo largo del proceso en todas las dietas, pero además, en las que contenían caseína calentada sola o con aceite, se va produciendo una precipitación adicional del elemento a medida que avanzan las horas del ensayo "in vitro".

Al comparar estos datos con los obtenidos en los animales (Tabla 36), se observa que, aún sin diferencias claras en la ingesta, las ratas de los grupos C 150°C y CA 150°C tuvieron los menores valores de excreción fecal, lo cual, dado su cuantía y las cifras de hierro ingerido, no condujo a cambios claros en los valores de absorción pero sí a una leve mejora de su eficacia.

Aunque este incremento de la digestibilidad aparente puede en parte relacionarse con la ingesta, debe resaltarse una observación que en principio parecería contradictoria, pero que, tal vez, incluso pueda contribuir a explicarlo.

Es el hecho del incremento del precipitado que se observó en la diálisis "in vitro" de estas dietas. Mientras en los otros casos el hierro soluble no dializable no se altera por el proceso digestivo, en éstos cambió y fue disminuyendo. Es posible que "in vivo", ese hierro, que experimenta algún cambio, pueda unirse a transportadores y ser absorbido mediante mecanismos de transporte activo que se estimulan cuando las necesidades así lo requieren.

Ello favorecería esta vía de transferencia y, en consecuencia, la eficacia global del proceso.

Esta posibilidad se señala como mera hipótesis intuitiva ya que también se perfiló en el caso del cobre y en el del calcio con alguna de las dietas, pero por el momento carecemos de base sólida que lo avale.

El calentamiento previo de la caseína alimentaria tendió a favorecer la excreción de hierro en la orina, más aún si se realizaba en presencia de azúcar o aceite, y de forma aún más acusada cuando coincidían ambos. Esto repercutió sobre los balances y, aunque no de forma significativa, los animales de CGF 150°C y CGFA 150°C tuvieron los valores más bajos de retención diaria, lo cual se mostró con mayor nitidez en los porcentajes R/A en los que, por efecto del calentamiento, se observó una depresión, especialmente notable, cuando se había practicado en presencia de azúcares y aceites. A este respecto puede decirse que el tratamiento por calor de las proteínas integrantes de las dietas se asoció con reducciones en la retención de hierro mediante mecanismos independientes de la reacción de Maillard (LYKKEN y Col., 1986), y ello podría contribuir a explicar el deterioro en las dietas con muestras calentadas. Además, en los que el calor se unió a la presencia de compuestos capaces de desarrollar la citada reacción (HURRELL, 1990), las premelanoidinas derivadas pudieron haber ejercido también su influencia, ya que estos compuestos, preferentemente si se administran por vía parenteral, son capaces de acomplejar al hierro e incrementar su eliminación urinaria.

El ligero incremento que experimentó el aprovechamiento digestivo en C 150°C y CA 150°C compensó las pequeñas pérdidas a nivel metabólico y de ahí que la utilización nutritiva global del hierro en estas dietas fuera de igual magnitud que en la dieta patrón.

Por el contrario, en las que contenían muestras calentadas con azúcares se unieron las tendencias digestivas y metabólicas y ello hizo que descendiera la eficacia de utilización global del elemento, % R/I, especial y significativamente en la dieta que contenía la mezcla de caseína, glucosa, fructosa y aceite.

No obstante, esos cambios en la utilización digestiva y metabólica no tuvieron una repercusión clara en los almacenes férricos, y su contenido hepático o su concentración en dicho órgano no mostró variaciones significativas entre grupos. Por el contrario, el hierro del bazo presentó pequeñas variaciones de signo diverso entre las ratas sometidas a los diversos regímenes alimentarios.

#### 5.1.3.3. Utilización del zinc

Al igual que ocurría con el hierro, en la digestión "in vitro" de estas dietas el zinc no dializó y aunque este hecho no haya sido descrito en la bibliografía de una forma tan específica como para el hierro, existen datos que inducen a su deducción. Así la más baja disponibilidad del zinc en la leche de vaca, 15%, frente al 28% de la leche humana (SANDTROM y Col., 1983), se ha atribuido al mayor contenido de caseína en la primera, a la presencia de aminoácidos fosforilados y de fosfato cálcico coloidal que interfieren la absorción del elemento (SANDSTROM y Col., 1983), a lo que podría añadirse, como otro factor negativo, el pobre contenido en cisteína de la caseína (LÖNNERDAL, 1985).

El zinc apareció en el lado externo de la membrana en una porción precipitada de mayor cuantía que en los otros elementos traza (Tabla 26, figura 20), mostrando una distribución más parecida a la que adoptaba el calcio, con cuya precipitación pudo estar relacionada por su asociación al fosfato cálcico coloidal y porque en la leche se ha observado coprecipitación de zinc con calcio y fósforo por efecto del calentamiento y subida del pH por encima de 6,7 (SINGH y Col., 1989).

Las porporciones de zinc soluble y precipitado que se producían con las distintas dietas mostraron ya diferencias desde el principio de la digestión. La mayor cantidad soluble y menor precipitada apareció con la caseína sin calentar y esta distribución no varió a lo largo de la digestión, lo cual vemos también en el caso del hierro. De forma parecida, pero con algunas variaciones, se mostró la distribución del elemento en las dietas que contenían las muestras CGF 150°C, y CGFA 150°C. En ellos, partiendo de valores inferiores de zinc soluble y, en consecuencia, mayores de precipitado, los cambios a lo largo del tiempo tuvieron

poca importancia. Por el contrario, en las dos restantes, al igual que había ocurrido con el hierro, el zinc soluble disminuyó acrecentando la forma precipitada que a la cuarta hora de digestión presentaba los valores más altos. Las pendientes de C 150°C y CA 150°C fueron las más negativas de todas y difirieron significativamente de las de C ST y CGFA 150°C.

Aun sin diferencias significativas, los animales que tomaron la dieta control mantuvieron los mayores valores de zinc ingerido, respecto a los restantes grupos cuyas cifras fueron bastante similares. Esto no se tradujo en un incremento de su excreción fecal que sólo se elevó claramente en los grupos mantenidos a base de caseína calentada con los azúcares (Tabla 37), y más significativamente en los que tomaron la muestra cuyo calentamiento se había realizado en presencia de aceite; precisamente en la diálisis de esa dieta, la fracción de zinc precipitado fue comparativamente superior. En este caso las cifras de zinc en heces igualaron e incluso superaron al ingerido, lo que se tradujo en una absorción nula o negativa, que hace pensar en que parte del zinc eliminado sea de procedencia endógena.

Se patentiza en el caso del zinc algo que con otros elementos, concretamente, con el calcio, no advertíamos de forma significativa. Los productos avanzados de la reacción de Maillard, las melanoidinas, no son de fácil digestión para la rata (FINOT y MAGNENAT, 1981; NAIR y Col., 1981), ni tampoco para el hombre (STEGINK y Col., 1981) y estos compuestos ennegrecidos pueden quelar al zinc, arrastrarlo con ellos en las heces e impedir su absorción (LYKKEN y Col, 1986). Esta posibilidad de secuestrar al elemento no se circunscribe al de origen dietético ya que en el lumen no se distingue entre el de procedencia alimentaria o endógena, así que este último, al volver a la luz intestinal, podría ser fijado de igual manera, lo que impediría su reutilización. Además, la coincidencia de ambas sustancias durante el proceso digestivo es posible porque en ese tiempo aumenta la concentración intraluminal de zinc debido al que se secreta endógenamente (MATSESHE y Col, 1980); piénsese, por ejemplo, que la bilis es una vía de excreción preferencial del elemento. Por otra parte, el desarrollo de la reacción de Maillard acarrea un daño a la proteína disminuyendo la disponibilidad de sus aminoácidos con merma en su digestibilidad. En nuestro caso se observó que el

coeficiente de digestibilidad de la proteína disminuyó en las dietas que contenían las mezclas de caseína calentada con azúcares, más aún si se hizo en presencia de aceite (Datos no incluidos en la memoria).

De todo ello cabe deducir que las melanoidinas, originadas durante el proceso, que no valoramos directamente, pero cuyo color marrón oscuro comprobamos (foto 1), podrían responsabilizarse del deterioro que se produjo en la absorción del zinc.

La eliminación urinaria de zinc tendió a incrementarse en todos los grupos que ingirieron las muestras calentadas, aunque, dadas las variaciones entre animales, las diferencias sólo alcanzaron significación estadística cuando fueron más acusadas, es decir, en los grupos de la glucosa y fructosa, sobre todo en CGFA 150°C. Se adquiere una conciencia más clara de este aumento tras una mirada a las cifras de absorción. Ante ellas, se aprecia como todos estos animales eliminaron vía urinaria cantidades de zinc iguales o superiores a las del grupo control, cuya absorción ofreció valores bastante superiores. De ahí que el porcentaje R/A que refleja matemáticamente esta relación, ya aparezca con diferencias más acusadas entre los grupos.

De cuanto antecede, se deduce que el calentamiento de la caseína, si se realiza en presencia de aceite, aún más con azúcares y, sobre todo, en unión de ambos, produce una serie de cambios que inciden negativamente en la utilización del zinc a nivel metabólico.

Sin descartar la posible influencia de productos derivados de la desnaturalización y digestión de la proteína, cuyas secuelas se describen para diversos elementos, que han podido actuar en los animales que consumieron todas las dietas de caseína calentada, hemos de referirnos de nuevo a las consecuencias de la reacción de Maillard.

En tal sentido se sabe que las premelanoidinas, formadas en las etapas iniciales de la citada reacción, pueden quelar al zinc en el lumen o después de su

absorción y ser eliminadas en la orina (FURNISS y Col., 1989) o bien ejercer un efecto directo sobre los procesos reabsortivos del riñón (STEGINGK y Col., 1977; FURNISS y Col., 1989). Seguramente la controversia sobre el mecanismo de acción radica en que mientras el efecto de las premelanoidinas administradas vía parenteral no ofrece dudas y tras su administración se ha comprobado el incremento de la eliminación urinaria de zinc y otros cationes unidos a moléculas de elevado peso molecular, algunos autores dudan de su efectividad a nivel digestivo ante la controversia de su completa absorción (STEGINK y Col., 1977; JOHNSON y Col., 1983). No obstante ya existen datos que confirman el aumento de la excreción urinaria de diversos minerales tras el consumo de alimentos que han sufrido pardeamiento (LIKKEN y Col., 1986). Nuestros resultados se unirían a estos últimos y apoyarían las tesis de que las premelanoidinas pueden absorberse y que a nivel metabólico favorecen la eliminación de diversos cationes preferentemente del zinc.

Por tanto, la influencia de las melanoidinas a nivel digestivo y de las premelanoidinas en el metabólico contribuirían a explicar los balances de zinc negativos que presentaron las ratas de los grupos CGF 150°C y CGFA 150°C (Figura 24) y por ello la prácticamente nula biodisponibilidad del elemento en esas dietas.

No descartamos la posibilidad de actuación de compuestos parecidos, que también deprimieron la eficacia de utilización del zinc a nivel metabólico, en el grupo que ingirió la caseína calentada sólo con aceite.

Es bien conocida la posibilidad del desarrollo de una reacción tipo Maillard en la que el grupo carbonilo procede de lípidos oxidados (MAURON, 1977), fenómeno que sin duda favorece el calentamiento, aunque lógicamente los productos formados serán diferentes y por ello la intensidad de sus consecuencias.

A pesar de las elevadas pérdidas urinarias de zinc a causa de las premelanoidinas, diversos autores (FURNISS y Col., 1989; HURRELL, 1990) coinciden al señalar que no conllevan cambios tisulares. Nosotros tampoco observamos alteraciones en la cantidad de zinc en hígado o piel, pero en el bazo se

produjo un descenso significativo en las concentraciones del elemento en las ratas de los grupos CGF 150°C y CGFA 150°C (Tablas 38, 39, 40, 41 y 42).

El calentamiento previo de la caseína, sola o en presencia de glucosa y fructosa y/o aceite a 150°C, no modificó la diálisis del magnesio de las dietas en las que fueron incluidas. Tampoco la del calcio sufrió cambios sustanciales pero disminuyó la proporción de la forma iónica que dializaba en CA 150°C y CGF 150°C.

Con ninguna de las dietas se observó diálisis de hierro y zinc y la del cobre sólo se produjo a partir de la tercera hora de digestión.

Todo esto, unido a los resultados de los balances, nos permite decir que los posibles cambios introducidos en la caseína o en sus mezclas, consecuentes al proceso térmico y referido a la biodisponibilidad de los minerales mayoritarios, no modifican la relación que guardan con la utilización del magnesio, la cual no se modifica cuando dichas muestras se utilizan como fuente proteica, y en su caso, parcialmente grasa y/o de hidratos de carbono.

Tampoco la biodisponibilidad del calcio sufre variaciones apreciables por el empleo de caseína calentada sola o con aceite, pero cuando el calentamiento se realiza en presencia de azúcares, se observa una tendencia hacia el menor aprovechamiento metabólico, en el que podrían estar implicadas las premelanoidinas.

El diferente comportamiento de ambos cationes, calcio y magnesio, más reactivo el del primero, se justifica por sus características físico-químicas y por las de los compuestos con los que suponemos interaccionan. Las melanoidinas y premelanoidinas se describen como agentes quelantes capaces de acomplejar metales. En este sentido se sabe que el calcio, frente al magnesio, tiene mayor facilidad para formar uniones múltiples o quelatos con las moléculas que poseen grupos donadores (LEVINE y WILLIAMS, 1982). Además los complejos del calcio con los aniones

multidentados, frente a los del magnesio, presentan una estabilidad superior dada la mayor entropía que genera su enlace (MOELLER y HORWITZ, 1960).

Sobre la utilización nutritiva de los elementos traza en esas dietas se ejercen también algunas modificaciones, aunque la biodisponibilidad del cobre no sufre alteraciones apreciables. No obstante el efecto poco perceptible que observábamos sobre la utilización del calcio se agudiza con el hierro y, sobre todo, con el zinc, en el que al unirse también la influencia negativa de las melanoidinas a nivel digestivo, conllevan a la pérdida total de biodisponibilidad del zinc dietético.

La similitud y las diferencias entre calcio y zinc que observamos resultan ampliamente conocidas en biología y conducen a actividades paralelas pero muchas veces distintas. Ambos iones son de extrema importancia en el mantenimiento de enlaces cruzados, pero se usan de forma diferente: el calcio se une preferentemente a los ligandos donadores de oxígeno, mientras que el zinc lo hace a los donadores de azufre o nitrógeno (WILLIAMS, 1989), quizá estas afinidades, unidas a la sensibilidad de aminoácidos específicos, por ejemplo los azufrados, a los procesos térmicos, podría dar cuenta del comportamiento parecido de ambos cationes, pero mucho más intenso en el caso del zinc.

## 5.2. REPERCUSIONES DEL CONSUMO DE SARDINAS FUNDAMENTALMENTE COMO FUENTE PROTEICA DE LA DIETA, SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE MINERALES.

### 5.2.1. Efectos sobre el calcio

La diálisis del calcio en las dietas que contenían las sardinas crudas y fritas o sus proteínas fue similar a la de la dieta elaborada con caseína, especialmente a la primera hora en la que no se apreciaron diferencias entre grupos. Dializó también una fracción cercana al 25%, quedó fuera en forma soluble aproximadamente un 35% y el resto precipitó (Tabla 27, figura 13).

Conviene destacar, no obstante, que mientras con la caseína casi todo el calcio que difunde está en forma iónica, con las dietas de sardinas aproximadamente la mitad era  $\text{Ca}^{++}$  (Tabla 28, figura 14), y la otra mitad soluble pero no ionizado, es decir, debía hallarse unido a moléculas también absorbidas, lo que hace pensar en diferentes productos de digestión ligados a la naturaleza de la proteína que no han debido ser modificados por la fritura, ya que entre las distintas muestras de sardina no se apreciaron diferencias.

En la figura 13 se aprecia la tendencia al incremento del calcio dializado a la segunda hora para luego descender en todas las dietas.

Sin grandes diferencias entre ellas, se observa también como la difusión del elemento en la dieta de proteína frita estuvo siempre por encima de las demás, seguida de la que se produjo con la sardina frita. Por el contrario, la de caseína evolucionó siempre por debajo, lo cual puede hacer pensar en un efecto favorecedor de la fritura que encajaría con la idea de que, en muchos casos, el cocinado favorece la digestibilidad de los alimentos (DEL VALLE y Col., 1983).

Mientras que con la caseína la fracción soluble no dializada permaneció estable a la digestión, con las sardinas experimentó un ligero descenso que propició las pequeñas diferencias entre grupos y contribuyó, junto con el descenso del

dializado, a incrementar la precipitación del calcio.

De estos resultados podría deducirse que el paso del tiempo de la digestión intestinal en las dietas con sardina está favoreciendo la presencia de sustancias precipitantes del calcio o las condiciones que la favorecen; sin embargo, su completa extrapolación al organismo vivo no sería exacta ya que en éste el calcio absorbido no podría, tan fácilmente, volver de inmediato al lumen.

Las ratas alimentadas con las dietas de sardina cruda o frita, o sus proteínas, respecto al control de caseína-DL metionina, mantuvieron el consumo alimentario y a lo largo de las cuatro semanas del ensayo no apareció ninguna diferencia clara en la ingesta (Tabla 44), si bien, la de los animales del grupo control, a partir de la tercera semana, presentó valores ligeramente más bajos. Igualmente, la evaluación ponderal fue muy uniforme (Tabla 43, figura 23) y de ahí que los pesos finales alcanzados mostraran valores homogéneos. Consecuentemente, el Coeficiente de Eficacia Proteica para el Crecimiento (PER) de todos los grupos y en todas las semanas (Tabla 44), así como los coeficientes de eficacia alimentaria (Tabla 45), tampoco variaron, lo cual, una vez más, pone de manifiesto que la proteína de sardina es tan eficazmente utilizada como la del patrón caseína-DL metionina para permitir el crecimiento de la rata.

Aun sin alcanzar variaciones significativas, el consumo de calcio de los grupos que ingerían las sardinias tuvo cifras levemente más altas que el del control (Tabla 46), y ello, sin descartar otras posibles influencias directas, condicionó los mayores contenidos de calcio en heces, significativas en los grupos de mayor ingesta, lo que, como consecuencia de los mecanismos de regulación del elemento a este nivel, propicia esas eliminaciones para que al organismo penetre sólo la cantidad necesaria. De ahí que, a pesar de las diferencias en el calcio fecal, su absorción diaria fuera similar en todos los grupos.

Las desviaciones que aparecieron en la orina, aunque significativas en algunos casos, resultaron poco importantes y en ningún caso ofrecieron variaciones claras respecto al grupo control. Quizá merezca destacarse la mayor excreción

urinaria de calcio en el grupo que consumió la sardina cruda respecto a los de su proteína; dado que la diferencia entre ellas es la grasa de sardina que tiene esta dieta, ambas circunstancias podrían relacionarse.

De hecho, aunque a nivel metabólico se sabe poco de la influencia del tipo de grasa dietética sobre la utilización del calcio, mucho menos si se refiere a grasa de pescado, sí se conoce la modulación de la cantidad-calidad de grasa sobre su absorción (KIES, 1985; NAVARRO y Col., 1985) con un efecto positivo de los poliinsaturados esenciales, de ahí que una influencia calciurética indirecta, a través de la absorción, o incluso directa, podría contemplarse.

No obstante, estas modificaciones en ningún caso afectaron el balance que siempre se mantuvo estable, por lo que su importancia debió ser menor.

De forma global puede decirse que el consumo de sardinas o de sus proteínas, al igual que ya había sido demostrado para la proteína de otros pescados (GARCIA-ARIAS, 1989), permite de forma idónea mantener el balance cálcico y no modifica sustancialmente la biodisponibilidad del elemento. Los cambios en la eficacia digestiva, metabólica o nutritiva global, fueron pequeños y relacionados muchas veces con la ingesta.

En concordancia con cuanto antecede, la calcemia no varió (Tabla 57), pero con sorpresa se observó una disminución en su contenido en la piel (Tabla 55), significativa en los grupos con proteína de sardina, que resulta totalmente inexplicable, y que está sujeto a ulteriores comprobaciones.

### 5.2.2. Efectos sobre el magnesio

En el transcurso de la digestión "in vitro", las distribuciones del magnesio entre porción dializada y no dializada, y dentro de ésta, la fracción soluble y precipitada, fueron similares en las dietas cuya proteína era caseína o sardina cruda o frita (Tabla 29, figura 16). Ni en la primera ni en la cuarta hora se apreciaron diferencias, y sólo en tiempos intermedios se observó una cierta subida del magnesio

dializado en las dietas que contenían la sardina cruda o su proteína, para terminar igualándose.

Aproximadamente un 30% del magnesio dietético difundió, quedó soluble en torno al 65% y el resto precipitó. Con el tiempo, la fracción soluble no dializada fue disminuyendo en todos los grupos para contribuir al ligero incremento de su difusión y a la también pequeña elevación del precipitado.

En este caso constatamos una estrecha concordancia entre los resultados de la digestión "in vitro" e "in vivo"; la gran similitud, antes descrita, se sigue conservando en la utilización digestiva que los animales hacen del magnesio en las diferentes dietas (Tabla 47). Así, las ingestas y las excreciones fecales fueron muy similares en todas las ratas y, por ello, también muy próximas las absorciones y los coeficientes que cuantifican su eficacia.

Por otra parte, tampoco varió la excreción urinaria de magnesio y así los balances permanecieron estables.

En conjunto puede indicarse que el magnesio fue igualmente bien utilizado en las dietas de caseína o de sardina, que la pequeña cantidad de grasa que aportaba la sardina no ejerció ningún efecto adicional, que la fritura no modificó ese aprovechamiento, y que, por tanto, el magnesio tiene la misma biodisponibilidad en dietas cuya proteína es caseína-DL metionina o sardina frita.

### 5.2.3. Efectos sobre el cobre

No se pueden presentar resultados de digestión "in vitro" para el cobre porque con 6 g de muestra el elemento no se hallaba en concentraciones idóneas para ser correctamente detectado, como ya vimos, y se carecía de la cantidad de dieta de sardina suficiente para repetir esas pruebas.

En los experimentos "in vivo" (Tabla 48) hablaremos de balances aunque sólo hemos contabilizado la excreción fecal ya que como la orina es una ruta muy

minoritaria en la excreción del elemento, de una forma muy próxima a la realidad, la absorción puede equipararse con la retención. Además, en las orinas de todos los grupos de animales se intentó determinar el cobre por si algún tratamiento hubiera incrementado su eliminación urinaria, pero en ningún caso se alcanzó el límite de detección, lo cual confirmó la poca importancia de esta vía también en estos ensayos, como era lógico suponer.

Lo primero que llama poderosamente la atención es la digestibilidad aparente que tiene el cobre en la dieta patrón de caseína, muy por encima de la que se ofrece en la Tabla 35. Este hecho, que parece irregular, hay que relacionarlo con la edad de los animales y con los condicionantes fisiológicos del estadio. En los ensayos que se recogen en la Tabla 35, las ratas comenzaron el experimento al destete y, tras cuatro días de adaptación, se hizo el balance. En este segundo caso el periodo experimental se inició también con ratas al destete, pero los balances no se realizaron hasta el comienzo de la cuarta semana.

Se sabe que el cuerpo de los recién nacidos y de los animales muy jóvenes es más rico en cobre que el de los adultos y que al nacimiento, el hígado cuenta con unas reservas específicas del mineral que suelen mantenerse durante la lactancia pero que van descendiendo continuamente en la época de crecimiento hasta alcanzar los niveles adultos (DAVIS y MERTZ, 1987). De ahí que nuestros animales más jóvenes absorbieran menos cobre, porque estaban utilizando sus propias reservas hepáticas (13,2  $\mu\text{g/g}$ ), mientras que los segundos, que finalizaban la época de máximo crecimiento de la rata y tenían sus depósitos hepáticos depauperados (4,2  $\mu\text{g/g}$ ) necesitaron absorber mayor cantidad del elemento para restaurarlo y, por ello, utilizaron la misma dieta con mayor eficacia.

En la Tabla 48 se observa que con unas ingestas muy próximas, las ratas alimentadas con las dietas de sardina, especialmente las de proteína sola, excretaron mucho más cobre que las que comieron las de caseína. De estos datos, sin embargo, no puede deducirse que la sardina o su proteína deprima la biodisponibilidad de este mineral ya que, siguiendo con el razonamiento anterior, puede verse que las ratas que desde el destete ingirieron la dieta de sardina tenían unos niveles séricos (Tabla

57) y unas reservas hepáticas de cobre significativamente superiores (Tablas 51 y 52). Ello sugiere por una parte, que esta dieta ha evitado en cierta medida el agotamiento o ha propiciado una más rápida recuperación y, por otra, que al encontrarse los animales en una mejor situación nutritiva, regulan la utilización del elemento y, en función de las necesidades, la derivan hacia una menor eficacia. En apoyo de esta hipótesis puede verse que el porcentaje de absorción del cobre en las dietas con sardina fue igual o superior al que presentaron los animales más pequeños que ingerían la dieta patrón y que tenían unas reservas hepáticas incluso levemente superiores.

Al comparar entre sí la utilización digestiva del elemento en las dietas elaboradas con las diferentes muestras de sardina, parece apreciarse un leve efecto negativo de la fritura que merma ligeramente la disponibilidad del cobre en las raciones que contienen la sardina o su proteína fritas, que se observó con mayor intensidad en el zinc, y que podría relacionarse con los cambios que el proceso introduce en la proteína. De hecho, la absorción de este elemento es muy dependiente de la presencia de aminoácidos y pequeños péptidos que actúan como ligandos (HAZELL, 1985) y la fritura, aunque suavemente, puede haberlos modificado.

#### 5.2.4. Efectos sobre el hierro

En los experimentos de digestión "in vitro" tampoco, en este caso, se detectó hierro en el dializado ni con la dieta de caseína, como ya se comentó, ni con las de sardina. En realidad, aunque no hemos encontrado datos en la bibliografía referentes a la diálisis del elemento en comidas a base de pescado, este hecho tampoco debe extrañarnos si pensamos que el mayor porcentaje de diálisis descrito para el hierro en distintas comidas a pH 7 se sitúa en torno al 5% y, concretamente, para el  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , sal constituyente del corrector empleado, las cifras se aproximan al 2% (FORBES y Col., 1989). Según estos valores, calculando el hierro procedente del corrector y de la propia sardina, teniendo en cuenta la cantidad de dieta empleada en la digestión in vitro, así como considerando que la cantidad dializada estuviera dentro de esos márgenes, nos encontraríamos en el límite de detección para la

espectrofotometría de absorción atómica de llama, que fue el método empleado.

Ya que en este caso carecíamos de dieta para repetir los ensayos con más cantidad de muestra, no podemos asegurar de modo tajante que nada de hierro dializara, pero puede decirse que si lo hizo fue en una proporción muy baja que no pudo detectarse.

Además tampoco puede olvidarse que durante el proceso digestivo el hierro se une fácilmente a ligandos los cuales, según su naturaleza, favorecen o deprimen su absorción, proceso realizado fundamentalmente a través de las células; por ello, cuando este transporte vía celular no puede darse, es más difícil observar su transferencia. Esto, a la vez, ayudaría a explicar los mayores valores de transferencia al interior del organismo observados "in vivo".

A la primera hora de digestión, en el volumen no dializado, se encontró en forma soluble aproximadamente un 55% del hierro en las dietas con sardina y el resto precipitado (Tabla 30, figura 19). Como puede verse, especialmente en las que contienen la sardina entera, la fracción soluble fue con estas dietas inferior a la que aparece con la de caseína, lo cual puede achacarse a la distinta naturaleza del propio hierro, aportado totalmente por el corrector en forma de sulfato ferroso en la dieta patrón y en las de sardina repartida entre 65% del corrector y 35% procedente del pescado; a la influencia del tipo de proteína, láctica o de pescado y sus posibilidades de ligar al elemento; e incluso, a la presencia de la grasa del pescado en las de sardina entera, la cual seguramente se responsabilizaría también de la ligera diferencia que apareció entre las muestras con sardina entera o sus proteínas que, aunque desaparecieron a la segunda hora, conservaron siempre distinto comportamiento que la caseína.

Globalmente los resultados hacen pensar que la presencia de sardinas en la dieta propician unas condiciones para la digestión del hierro y posiblemente aportaron unos ligandos específicos que lo mantienen en solución o inducen su precipitación, que no parecen ser modificados por el proceso de fritura, lo cual compagina con la idea de que la fritura, en contra de una antigua opinión poco

fundada, no es un proceso culinario especialmente lesivo (VARELA, 1977). Con esto no queremos decir que no haya podido producirse ningún cambio, sino que los habidos no han afectado de modo adverso al aprovechamiento del hierro, sino más bien al contrario.

Sin diferencias en la ingesta férrica, la excreción fecal fue menor con las dietas de sardina, significativamente en la de sardina entera o su proteína frita comparadas con la dieta patrón (Tabla 49). Ello se tradujo en un incremento de la absorción diaria que podría relacionarse con la forma del elemento, distinta como se ha dicho en ambos casos, y con un contenido de hierro orgánico en las dietas de sardina, inexistente en la de caseína, que es mejor utilizado por el hombre, pero que no resulta tan importante en la rata porque ella aprovecha el hierro inorgánico con una eficacia igual o superior al hémico (UNDERWOOD, 1977), si bien en el pescado, en opinión de MARTINEZ-TORRES y Col. (1975), sólo un 2% del Hierro es hémico mientras que la mayor proporción, 85%, se asocia a la ferritina.

Además, la naturaleza del alimento, concretamente la de su proteína, parece jugar también un papel destacado. A ella parcialmente se atribuye el efecto favorecedor sobre la utilización del hierro de los alimentos de origen animal respecto a los vegetales (LAYRISSE y Col., 1971) y más concretamente, al llamado "factor carne", común a la vaca, cordero, cerdo, pollo, hígado o pescado, que hace a estos alimentos más estimulantes de la utilización digestiva del hierro que otros también de origen animal como la leche o los huevos (BJORN-RASMUSSEN y HALLBERG, 1979).

De ahí que, por alguno de estos factores o por la suma de ellos, sea fácil entender la tendencia hacia mejor digestibilidad aparente del hierro en las dietas de sardina, de forma especial en la de sardina entera.

Precisamente por esto último nuestros resultados sugieren también la posibilidad de una influencia positiva de la grasa cruda que se merma con la fritura. De hecho, la interacción naturaleza de la grasa-digestibilidad del hierro es una observación perfectamente contrastada (LUKASKI y Col., 1982; VAN DOKKUM,

1983) aunque nunca referida a la grasa del pescado.

No obstante, un análisis rápido de los resultados del balance de hierro parecería, en principio, contradecir esta hipótesis, ya que la proteína de sardina frita también mejoró la absorción del mineral. Pero, tras el estudio del balance de zinc, llegamos a la conclusión de que en este caso la mejor absorción del hierro puede ser fruto de un mecanismo indirecto, vía la depresión de la absorción del primero, que comentaremos a continuación, ocasionado por la competencia existente entre los mecanismos de absorción de ambos cationes (FERRANDO, 1987).

Además, el efecto favorecedor de las sardinas sobre la utilización del hierro no parece circunscribirse exclusivamente al terreno digestivo. Los mayores valores de absorción no se acompañaron de mayores excreciones urinarias, eliminación que no varió respecto a la de las ratas alimentadas con la dieta de caseína, cuya absorción había sido inferior; y por ello se ocasionaron las variaciones en el balance férrico, más positivos en los grupos de mayores absorciones, y se observaron unos aprovechamientos metabólicos superiores (% R/A) en todas las ratas que tenían en su dieta la sardina.

Ambas tendencias sumadas propiciaron una mejor biodisponibilidad del hierro en las dietas a base de sardinas, que se atenuó en la que contenía la sardina frita entera, que indica un efecto positivo, individual o compartido, de la forma del elemento, la proteína y/o la grasa.

En el hierro sérico (Tabla 57) no se observaron modificaciones en función de la dieta consumida, pero sobre los contenidos tisulares se manifestó un suave incremento del hierro en el bazo de las ratas que comieron la sardina (Tablas 53 y 54) que sólo alcanzó significación estadística con la sardina o su proteína cruda. Por el contrario, en la piel se apreció un descenso de la concentración férrica (Tabla 55) que se hizo significativo sólo en el caso de las proteínas de sardina. Esta tónica se produjo igualmente para el calcio y el cobre con las mismas dietas.

En el hígado, como en la piel, los contenidos y concentraciones de hierro

fueron inferiores en las dietas con sardina (Tablas 51 y 52).

Estas concentraciones tisulares, unidas a la mejor biodisponibilidad del hierro en las dietas con sardina, sugieren que este alimento parece favorecer el dinamismo corporal del hierro, es decir, el componente esencial en detrimento del hierro almacenado, lo cual corrobora el conocido poder hematopoyético que desde antiguo se le atribuye al pescado.

#### 5.2.5. Efectos sobre el zinc.

Con la cantidad de dieta empleada para la digestión "in vitro" tampoco se detectó zinc en el dializado por lo que, si algo del mismo atravesó la membrana, debió hacerlo en muy escasa proporción. Esto es muy posible si consideramos que los datos hallados en la bibliografía cifran los porcentajes de diálisis en torno al 2-5% y que, como veremos en los animales, que además cuentan con mecanismos de transporte activo, se obtuvieron unos porcentajes de absorción muy bajos.

En el volumen que no dializó la distribución entre forma soluble y precipitada varió con respecto a la dieta de caseína (Tabla 31, figura 21), existiendo menos proporción de soluble en las dietas con sardinas y aún menos en las preparadas con sus proteínas. Estas diferencias podrían relacionarse con la distinta naturaleza de las proteínas y sus posibilidades de formar o no ligandos (KIRCHGESSNER y Col., 1977) y contribuir, en el caso de la sardina, a una mayor precipitación del elemento, unido a sustancias que lo precipitan o en forma de hidróxido, ya que el zinc en solución acuosa al elevarse el pH, si no es acomplejado por péptidos, proteínas u otros quelatos presentes en el medio, forma hidróxido y precipita (O'DELL y CAMPDELL, 1970).

A la segunda hora de digestión, la fracción soluble descendió en todos estos casos, (Figura 21), pero conservó las diferencias. A partir de este tiempo varió de forma anárquica en las cuatro dietas de sardinas, mientras que en la de caseína como ya vimos, permaneció estable.

Los resultados de los balances (Tabla, 50) muestran que los animales alimentados con la dieta control tuvieron un aprovechamiento del zinc mucho más bajo que el obtenido en los ensayos que recoge la Tabla 37. Concretamente, la mitad de los animales empleados entraron en balance negativo y esos fueron todos ratas hembras. La dieta era la misma que la empleada en el ensayo anterior, por ello, el diferente comportamiento debe achacarse a la edad de los animales que, como ya hemos comentado, tenían aproximadamente 20 días más, y pesaban en torno a los 115 g frente a los 50 g de los del otro experimento.

Aunque la dieta, de acuerdo con el NRC, es idónea para ambas edades, las ratas mayores, preferentemente las hembras, utilizaron el zinc con menor eficacia que las más jóvenes y que los machos de la misma edad. Por ello, la diferencia debe juzgarse como una interacción dieta-edad-situación fisiológica, que no se manifiesta en las dietas con sardina.

Entre los grupos alimentados con la dieta de caseína o con las de sardina no existieron variaciones significativas en el consumo alimentario. Aun así, el grupo control ofreció los valores más bajos de ingesta (Tabla 50).

Las diferencias que aparecieron en el zinc fecal fueron parcialmente dependientes de los valores de ingesta, pero, al menos, en el grupo que comió la proteína de sardina frita, debió existir una influencia adicional que incrementó la excreción fecal del zinc hasta valores incluso superiores a la ingesta en el 62% de los animales, comprometiendo, por tanto, al de procedencia endógena. Esta influencia se debió posiblemente a las modificaciones producidas en la proteína durante la fritura que, aunque no modifican su valor biológico (MOREIRAS-VARELA y Col., 1988, 1990), podrían alterar sus productos de digestión y ello condicionar la presencia de ligandos específicos del zinc y las condiciones de solubilidad y absorción del elemento.

Ese aumento fecal condicionó la absorción, y así los animales que tuvieron en su dieta la proteína de sardina mostraron, como el grupo control, absorciones nulas o negativas, la más acusada la de la proteína de sardina frita, aunque dada la

dispersión entre animales, sin diferencias significativas.

También la eliminación urinaria de zinc en este grupo tendió a ser superior a la de los otros alimentados con las distintas sardinas, y ello deprimió aún más el balance.

Como resumen, del estudio comparativo de la utilización de zinc (Figura 25), podría deducirse que, frente a la caseína, la sardina entera como fuente proteica y parcialmente grasa de la dieta y quizá como influencia conjunta de ambos nutrientes, parece mejorar levemente la utilización del zinc, aunque este efecto positivo se deprime por la fritura. Ambos hechos, benéfico del pescado y negativo de su calentamiento, los describimos con el atún blanco crudo, cocido o enlatado (GARCIA-ARIAS, 1989).

Esto se sugiere porque en alguna medida puede ser relevante dados los valores encontrados, aunque a nivel de los porcentajes de eficacia no se apreciaron diferencias significativas claras, seguramente por el tratamiento estadístico empleado, por el variado comportamiento entre los animales y sobre todo, porque en los casos de valores de absorción o retención negativos los porcentajes que cuantificaban su eficacia se incluían como cero y esto, obviamente, aminoraba su influencia sobre la media y minimizaba el efecto que en realidad fue más acusado. Por otra parte, ni las concentraciones séricas ni el zinc en hematíes o en bazo (Tablas 53, 54, 56 y 57) variaron en función de la dieta consumida, pero el elemento almacenado en el hígado (Tablas 51 y 52) se acrecentó en un cierto grado bajo los regímenes dietéticos que incluían las sardinas. Además, en el zinc de la piel (Tabla 55) puede observarse como los mayores valores, paradójicamente, correspondieron a los grupos con mayores eliminaciones, de forma significativa en los que tuvieron en su dieta la proteína de sardina frita. Este hecho, aparentemente contradictorio, ha sido observado también en situaciones de mala utilización del elemento (PEKAREK y Col., 1979) y nosotros pudimos constatarlo en jóvenes que padecían anorexia y tenían incrementada la eliminación de zinc (VARELA y Col., 1992).

Como resumen puede indicarse que el consumo de sardina entera o de su proteína, como fuente proteica y parcialmente grasa de la dieta, no cambia la biodisponibilidad del magnesio ni prácticamente la del calcio respecto a la dieta patrón con proteína láctica, considerada idónea para el aprovechamiento del calcio. Mantiene o incide de forma favorable sobre la utilización del cobre; claramente mejora la biodisponibilidad del hierro y, probablemente la sardina entera, también la del zinc.

La fritura de la sardina no introduce modificaciones en el alimento que alteren la relación que guarda con la utilización del calcio o del magnesio, no obstante, deben producirse algunos cambios, quizá no demasiado acusados y referidos en especial a su proteína, que repercuten de forma negativa sobre el cobre, y en mayor medida sobre el zinc, aunque nunca con un efecto muy marcado. Por el contrario, esos cambios, por vía directa o indirecta, mejoran la utilización del hierro dietético.

Todo ello contribuye a afirmar una vez más el convencimiento de que la fritura de la sardina, aunque introduzca cambios en su proteína o en su grasa que conlleven repercusiones de signo positivo o negativo sobre los demás nutrientes, concretamente sobre la biodisponibilidad de la mayor parte de los minerales estudiados no incide desfavorablemente.

Quizá este hecho sorprenda al recordar los 180°-140°C del baño de aceite, las posibilidades de peroxidaciones lipídicas y las interacciones proteínas lípidos oxidados. A este respecto conviene recordar que durante la fritura la temperatura en el interior del alimento no sobrepasa los 100°C mientras haya agua evaporándose (FELLOWS, 1985) y, además, que este proceso se realiza en sólo unos minutos (GUILLAUMIN, 1988), cuatro se emplearon con las sardinas.

Si a ello se une que en los ensayos con caseína el calentamiento a 100°C en presencia de aceite no tuvo una influencia negativa adicional, será fácil entender que tras la fritura de la sardina, se mantenga en gran medida la influencia positiva del pescado sobre la utilización de los minerales.

6.- *RESUMEN Y CONCLUSIONES*

Se ha estudiado la influencia que los procesos térmicos ejercen sobre la interacción proteína-minerales de la dieta.

Inicialmente se analizaron los cambios que una proteína patrón, caseína, introducía en la forma fisico-química del calcio y como estos cambios variaban en función de la cantidad de proteína y de su calentamiento a 200°C durante una hora.

A continuación, la caseína no se procesó únicamente de forma aislada sino también en presencia de otros nutrientes: azúcar y/o aceite de oliva y el conjunto se calentó a 100°C, 150°C y 200°C durante una hora.

Con las muestras de caseína y caseína con glucosa y fructosa sin tratar y calentadas a 150°C y 200°C se realizaron ensayos de digestibilidad "in vitro" con el objeto de conocer si los cambios producidos en la forma del calcio se mantenían a lo largo del proceso digestivo, si desaparecían o si se originaban nuevas modificaciones.

Posteriormente, con las muestras calentadas a 150°C se prepararon dietas semisintéticas en las que se estudió no sólo la digestibilidad "in vitro" del calcio, sino también la del magnesio, cobre, hierro y zinc contenidos en ellas.

Para concluir el estudio, con las dietas se realizaron ensayos biológicos de balance mineral (Ca, Mg, Fe, Cu y Zn) con ratas al destete.

Una vez conocidos los cambios que una proteína patrón, no tratada o calentada, de forma aislada o en presencia de otros nutrientes, introducía en la biodisponibilidad de los minerales citados, se amplió el estudio a un alimento real, la sardina, para ver lo que sucedía cuando la proteína se calentaba formando parte de un alimento en el que además existían otros nutrientes. Este alimento y su proteína, crudos y fritos, se emplearon para la elaboración de dietas semisintéticas con las que también se realizaron ensayos de digestibilidad "in vitro" y de balance mineral de los elementos antes señalados.

Los resultados del estudio nos permiten concluir lo siguiente:

## CONCLUSION PRIMERA-RESPECTO AL CALCIO

### ENSAYOS CON CASEINA

- La presencia de caseína en una solución de calcio iónico cambia la forma físico-química del elemento y lo redistribuye en soluble, iónico o ligado, y precipitado. Por efecto del calentamiento previo de la caseína disminuye la fracción soluble, alterándose preferentemente la forma ligada. Su intensidad es dependiente de la cantidad añadida y de la temperatura alcanzada; así, el calentamiento de la proteína a 100° no altera sustancialmente la distribución cálcica, pero a 150°C tienen lugar importantes modificaciones que a 200°C llegan a invertir las proporciones de calcio soluble por precipitado.

El tratamiento térmico a 150°C y en presencia de glucosa y fructosa agrava la precipitación cálcica, lo cual podría relacionarse con los productos formados en la reacción de Maillard. Esta influencia negativa, en el caso de la sacarosa sólo se manifiesta a 200°C cuando el disacárido ya se ha desdoblado.

El aceite de oliva no ocasiona ningún efecto deletéreo adicional.

- El calcio precipitado por acción de la caseína calentada a 150°C, sola o en presencia de aceite y/o glucosa-fructosa, no es estable al proceso digestivo y parte se redisuelve, de forma que la porción dializada no varía por efecto del calentamiento. No obstante, el tratamiento térmico a esta temperatura favorece la liberación de ligandos solubles del calcio durante el proceso digestivo.

Por el contrario, si la temperatura alcanza los 200°C los efectos precipitantes producidos no revierten por la digestión "in vitro". Disminuye mucho la diálisis del calcio, el cual se halla exclusivamente ionizado con la muestra de caseína-glucosa-fructosa.

- El empleo en las dietas de caseína calentada a 150°C, sola o con aceite y/o glucosa-fructosa, no modifica con nitidez la biodisponibilidad del calcio dietético, si bien, la presencia de los azúcares reductores durante el tratamiento parece ocasionar una influencia discretamente negativa que se ejerce de forma preferente o exclusiva a nivel metabólico, lo cual se podría relacionar con las premelanoidinas que han debido formarse. En consecuencia se desplaza el equilibrio hacia la eliminación, y por ello se produce un detrimento de la biodisponibilidad del calcio.

#### ENSAYOS CON SARDINA

- La presencia en la dieta de sardina o de su proteína, tanto crudas como fritas, no modifica la cantidad de calcio dializado, frente a la dieta con caseína-DL metionina, pero favorece la proporción del mismo en forma soluble no iónica.

De manera global, parece que el consumo de sardinas modula la utilización del calcio alimentario tan eficazmente como la proteína láctica.

#### CONCLUSION SEGUNDA. RESPECTO AL MAGNESIO

##### ENSAYOS CON CASEINA

- El tratamiento térmico de la caseína a 150°C en las condiciones señaladas no cambia la disponibilidad del magnesio, aunque si éste se practica en presencia de aceite los cambios introducidos parecen favorecer la solubilidad del elemento. No obstante, la biodisponibilidad del mismo no se modifica de forma apreciable en ninguna de las dietas ensayadas.

##### ENSAYOS CON SARDINA

- La utilización nutritiva global del magnesio no varía en función del consumo de sardinas o de su proteína respecto a la de la dieta patrón, ni tampoco se altera por efecto del proceso de fritura realizado en el pescado.

## CONCLUSION TERCERA. RESPECTO AL COBRE

### ENSAYOS CON CASEINA

- La caseína no es una proteína favorecedora de la utilización digestiva del cobre ya que algunos de sus productos de digestión, presumiblemente de gran tamaño, deben unirse al elemento manteniéndolo soluble pero impidiendo su diálisis. Esta modulación no cambia por el calentamiento previo de la proteína, pero si éste se realiza en presencia de aceite y/o glucosa y fructosa, se tiende a favorecer la precipitación del elemento. No obstante, este efecto es de poca cuantía y puede ser compensado "in vivo". Así, la digestibilidad aparente del cobre no varía significativamente con ninguna de las dietas, ni se alteran sus concentraciones a nivel tisular.

### ENSAYOS CON SARDINA

- Aunque el coeficiente de digestibilidad aparente del cobre en las dietas de sardinas es inferior al de la dieta con caseína-DL metionina, el consumo de pescado permite a los animales mantener o reponer sus reservas corporales. El proceso de fritura introduce cambios, en la sardina o en su proteína, que repercuten en la utilización digestiva del elemento.

## CONCLUSION CUARTA. RESPECTO AL HIERRO

### ENSAYOS CON CASEINA

- La diálisis del hierro no se produce en las dietas que contienen las distintas caseínas; en la fracción no dializada, dos terceras partes del elemento quedan en forma soluble y el resto precipitado. El calentamiento previo de la caseína a 150°C, sola o con aceite, hace disminuir esa porción soluble a medida que avanza la digestión, pero eso no supone la inutilización del elemento "in vivo".

El tratamiento térmico ocasiona reducciones en la retención del hierro mediante mecanismos, en principio, independientes de la reacción de Maillard. Pero si éste se realiza en presencia de compuestos capaces de desarrollarla, la pérdida de eficacia metabólica se agrava y se traduce en pérdidas globales de la biodisponibilidad del elemento.

### ENSAYOS CON SARDINA

La sardina favorece la digestibilidad del hierro propio y/o de la dieta en la que se incluye, mediante un efecto individual o compartido de la forma del elemento, la naturaleza de la proteína y el tipo de grasa. Este efecto se merma por la fritura.

Dicha influencia beneficiosa se ejerce también a nivel metabólico mejorándose la retención del hierro absorbido, efecto que, por el contrario, no se altera con el proceso de fritura.

### CONCLUSION QUINTA. RESPECTO AL ZINC

#### ENSAYOS CON CASEINA

- En las dietas que tienen como proteína caseína sin tratar o calentada, la difusión pasiva del zinc no se produce y en la fracción no dializada el elemento aparece precipitado en una proporción similar a la del calcio y superior a la de los otros trazas, cantidad que se incrementa por efecto del calentamiento. Por este tratamiento, fundamentalmente si se realiza en presencia de aceite, aún más de glucosa-fructosa y sobre todo en unión de ambos, se producen una serie de cambios que inciden negativamente en la utilización del zinc.

Estos efectos han de relacionarse, además de con modificaciones consecuentes a la desnaturalización proteica, con la posible presencia de melanoidinas a nivel digestivo que comprometen incluso la reabsorción del zinc endógeno, y de

premelanoidinas absorbidas que favorecen su excreción renal. Ambos efectos sumados hacen no biodisponible al zinc dietético.

### ENSAYOS CON SARDINA

---

- La sardina entera, como fuente proteica y parcialmente grasa de la dieta, tiende a mejorar levemente la utilización del zinc. Este efecto positivo, que se deprime por la fritura, se manifiesta a nivel tisular.

7.- *BIBLIOGRAFIA*

- ABRAMS, S.A., VIEIRA, N.E., YERGEY, A.L. (1990) "Unequal distribution of a stable isotopic calcium tracer between casein and whey fractions of infant formulas, human milk and cow's milk". *J. Nutrition*, vol. 120 (12), pp 1672-1676.
- ADRIAN, J. (1963). "La réaction de Maillard" 2. Etude du comportement de six acides aminés purs". *Ann. Nutr.*, 17: 1-35.
- ADRIAN, J. (1965). "La réaction de Maillard. 3. Etude du comportement du tryptophane pur." *Ann. Nutr.*, 19, 27-45.
- ADRIAN, J. (1974). "Nutritional and Physiological consequences of the Maillard reaction". *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 19, pp. 71-122.
- AESCHBACHER, H.U. (1982). "The significance of mutagens in food". En: "Mutagens in our environment", pp. 349-362. Liss, New York.
- AESCHBACHER, H.U., WOLLEB, U., HEYLAND, S., BUCHLER, M. (1983). "Influence of Maillard reaction factors on mutagenicity. *Int. Res. Rep.* (Nestlé Research Department. La Tour-de-Peilz).
- AITKEN, A., CONNELL, J.L. (1979). "Effets of heating on foodstuffs". pp. 219-254. Ed. R.J. Priestley ed. Applied Science Publishers. London.
- ALAIS, C., JOLLES, P. (1961). "Etude comparée des caséino-glycopeptides. II. Etude de la partie non peptidique". *Biochim. biophys. Acta* 51: 315-322. Citado por ALAIS, C., BLANC, B (1975). "Milk proteins: Biochemical and biological aspects". *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 20, pp. 66-167.
- ALAIS, C., BLANC, B. (1975). "Milk proteins: Biochemical and biological aspects". En: *World Review of Nutrition and Dietetics*, Vol. 20, pp 66-167.

- AMES, J.M. (1986). Chem. Ind., 362-363. Citado por LINGNERT, H. (1990). "Development of the Maillard reaction during food processing". En: "The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology". pp. 171-185. Advances in Life Sciences. Birkhäuser Verlag Basel.
- AMINE, E.K., HEGSTED, D.M. (1975). "Effect of dietary carbohydrates and fats on inorganic iron absorption". J. Agric. Food. Chem. 23: 204-208.
- ANDUJAR, M.M., MOREIRAS-VARELA, O., GIL EXTREMERA, F. (1983). "Tablas de Composición de Alimentos". Instituto de Nutrición (C.S.I.C.) España.
- A.O.A.C. (1975). Association of Official Analytical Chemists "Official methods of analysis". 12<sup>a</sup> ed. Association of official analytical chemists, Washington. pp. 15-17.
- ASCHECHOUG, V., KRINGSTAD, H., LUNDE, G. (1939). J. Soc., Chem. Ind., 58, 220-222. Citado por BORGSTROM, G. (1962). "Fish as Food.II". pag 195. Academic Press. New York and London.
- ASHMEAD, D.H. (1989). "A peptide dependent intestinal pathway for the absorption of essential minerals". En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 122-124. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Thomas Graham House, Cambridge. England.
- ASHMEAD, D.H., GRAFF, D.J., ASHMEAD, H.H. (1985). "Intestinal absorption of metal iron and chelates". Thomas, springfield, IL. Citado por ASHMEAD, D.H. (1989). En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Eds. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
- ASHOOR, S.H., ZENT, J.B. (1984). "Maillard browning of common amino

- acids and sugars". J. Food Sci. 49, 1206.
- ATWATER, W.O., (1901). "On the digestibility and availability of food materials". Conn (storrs) Exp Sta 14 Ann Report.
  - AURAND, L.W., BOONE, N.H., GIDDING, G.G. (1977). J. Dairy Sci., 60, 363. Citado por KHAYAT, A., SCHWALL, D. (1983). "Lipid oxidation on seafood". Food Technology, 37, 130-140.
  - BACHARACH, A.L., CRUICKSHANK, E.M. HENRY, K.M. LOVERN, J.A., MOORE, T., MORTON, R.A. (1942). Brit. Med. J., 2, 691-693. Citado por BORGSTROM, G. (1962). "Fish as Food. II" pag 195. Academic Press. New York and London.
  - BAILEY, B.E. (1943). Fisheries Research Board Can. Prog. Repts. Pacific. Coast stas, 57, 11. Citado por BORGSTROM, G. (1962). "Fish as Food, II." pag 191. Academic Press. New York and London.
  - BASU, K.P., DE, H.N., BASAK, M.N. (1942). Citado por CAUSERET, J. (1962). "Fish as a source of mineral nutrition". En: "Fish as Food. II". pag. 222. Ed. Borgstrom, G. Academic Press. New York and London.
  - BEAMONTE, A. (1988). "Estabilidad del triptófano durante los procesos térmicos culinarios de preparación de un pescado graso (sardina pilchardus). Influencia del almacenamiento al estado congelado". Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. U.C.M.
  - BEAMONTE, A., CASTRILLON, A.M. (1989). "Variaciones en el contenido de triptófano en sardina (pilchardus) originadas por los procesos térmicos culinarios. Papel de la grasa". Grasas y Aceites, vol. 40 (3), 194-198.
  - BEISEL, W.R., PEKAREK, R.S., WANNEMACHER, R.W. (1976). En

- "Trace elements in human health and disease". Vol. 1, 87. Academic Press. New York. Citado por HAMBIDGE, K.M., CASEY, C.E., KREBS, N.F. (1986). En: "Trace elements in human and animal nutrition" pp. 1-109. Ed. Mertz, W. Academic Press. London.
- BENDER, A.E. (1972). PAG. BULL., 2 (1), 10. Citado por AITKEN, A., CONNELL, J.J. (1979). "Effects of heating on Foodstuffs". pp. 219-254. Ed. R.J. Priestley ed. Applied Science Publishers. London.
  - BENDER, A.E. (1977) "The effect of heat on protein rich foods". En: "Food Quality and Nutrition". Ed. Downey, W. Applied Science Publishers. London. pp. 411-426.
  - BENDER, A.E. (1978 a). "Food Processing and Nutrition." pp. 59-78. Academic Press. London.
  - BENDER, A.E. (1978 b). "Food processing and nutrition". pp. 130-133. Academic Press. London.
  - BENDER, A.E. (1984). "Protein quality. Determination and usefulness". En: "Proc. M.O.C.C.A., vol II, Valencia, pp. 38-90.
  - BENDER, A.E. (1989). "Nutritional significance of Bioavailability". En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 3-9. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
  - BENZING-PURDIE, L., RIPMEESTER, J.A., RATCLIFFE, C.I. (1985). "Effect of temperature on Maillard reaction products". J. Agric. Food Chem., 33, 31-33.
  - BERG, C.P. (1959) "Utilization of D-aminoacids: in Albanese". Protein and amino acid nutrition. pp. 57-96. (Academic Press, New York).

- BIRCH, G.G., SPENCER, M., CAMERON, A.G. (1977). "Food Science". Pergamon Press. Oxford, pp. 106-130.
- BJARNASON, J. y CARPENTER, K.J. (1970). "Mechanisms of heat damage in proteins. 2. Chemical changes in pure proteins". *British J. Nutr.*, 24, pg 313.
- BJORN-RASMUSSEN, E., HALLBERG, L (1979). "Effect of animal proteins in the absorption of food iron in man". *Nutr. Metab.* 23, 192-202.
- BODWELL, C., WOHMACK, M. (1978). "Effects of heating methods on protein nutritional value of five fresh or frozen prepared food products". *J. Food Sci*, 43, 1543-1549.
- BORGSTROM, G. (1961). "Shellfish protein-nutritive aspects". En: "Fish as Food. II". pag. 117. Ed. Borgstrom, G. Academic Press. New York and London.
- BOWERING, J., MASCH, G.A., LEWIS, A.R. (1977) "Enhancement of iron absorption in iron depleted rats by increasing dietary fat. *J. Nutrition* 107: 1687-1693.
- BOYD, L.O. (1984). "Bioavailability of trace elements". *Nutr. Rev.* 42: 301-308.
- BRUNNEL, E.M., QUARESIMO, A., PARMAN, G.K. (1961). *Am. J. Clin. Nutr.*, 17, 1. Citado por LANG, K. (1970). "Influence of cooking on foodstuffs". *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol.12, pp. 266-317.
- BRZOZOWSKA, A., SICINSKA, A., WITKOWSKA, J., ROSZKOWSKI, W. (1989). "Effect of protein quality and dietary levels of iron, zinc and cooper on apparent absorption and tissue trace elements concentration in the rats". En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp.

206-208. Ed. Southgate. D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.

- CAMPBELL, J. (1935), J. Biol. Bd. Canadá, 1, 179. Citado por Navarro, M.P. (1991). En: "Valor nutritivo del pescado. I. Pescado fresco. Agroquímica y Tecnología de Alimentos, vol 31 (3) pp. 330-342.
- CASTRILLON, A.M., NAVARRO, M.P., GALLARDO, J.M., ORTEGA, R., PEREZ-MARTIN, R., VARELA, G. (1984). "Effect of processing on the quality and nutritional values of fish preserves". En: "Proc. IUFOST Int. Sym. Chemical Changes During Food Processing (M.O.C.C.A.) vol.I. Valencia, pp. 33-37.
- CASTRILLON, A.M., NAVARRO, M.P., VARELA, G. (1987). "Efficacité pour la croissance de la proteine de pates de sardines maintenues en congelation avec ou sans additifs". Méd. Nutr., XXIII/1, 32-36.
- CAUSERET, J. (1962) "Fish as a source of mineral nutrition". En: "Fish as Food. II". pp 205-228. Ed. Borgstrom, G. Academic Press. New York and London.
- CHAO, I.S., GORDON, D.T. (1983). "Influence of fish on the bioavailability of plant iron in the anemic rat". J. Nutrition, 113, 1643-1652.
- CHEFTEL, J.C., CHEFTEL, H. (1976). "Brunissement non enzymatique". En: "Introduction a la biochimie et a la technologie des aliments". Vol I. pp. 333-352. Soc. P.I.C., Parfs.
- CHEFTEL, J.C. (1977). "Chemical and nutritional modifications of food proteins due to processing and storage". En Whitaker, Tannenbaum, Food proteins, pp. 401-445. (Avi Publishing, Westport).
- CHICHESTER, C.O. (1973). "Nutrition in food processing". En: World

Review of Nutrition and Dietetics, vol.16, pp 318-333.

- DAGERSKOG, M. (1977). "Time-temperature relationships in industrial cooking and frying". En: "Physical Chemical and Biological Changes in Food Caused by Thermal Processing." Ed. Hoyem, T., Kvale, O. Applied Science Publishers. London. pp. 77-100.
- DANEHY, J.F., PIGMAN, W.W. (1951). Adv. Food Res., 3, 241-290. Citado por ADRIAN, J. (1974). "Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction". World Review of Nutrition and Dietetics, 19, 71-122.
- DANEHY, J.P. (1986). "Maillard reactions: Nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavor". Advances in Food Research, 30, pp. 77-138.
- DAVIS, G.K., MERTZ, W. (1987). "Copper". En: "Trace elements in human and animal nutrition" Ed. MERTZ, W. Academic Press, Inc. pp. 301-350.
- DEL VALLE, F.R., PICO, M.L. CAMACHO, J.L., BOURGES, H. (1983). "Effects of processing parameters on trypsin inhibitor and lecithin content of tortillas from whole raw corn-soybean mixture". J. Food Sci., 48, 246-249.
- DEUEL, H.J., HRUBETZ, M.C., JOHNSTON, C.H. WINZLER, R.J., GEIGER, E., SCHNAKEMBURG, G. (1946). "Studies on the nutritive value of fish proteins. I. Evaluation by the rat growth method and by the McCann method". J. Nutrition, 31, 175-185.
- DOWNEY, W.K. (1977). "Food Quality and Nutrition". Applied Science Publishers. London.

- DUBROW, D.L., STILLINGS, B.R. (1970) "Effect of heat on the chemical and nutritive stability of fish protein concentrate (FPC)". *J. Food Sci.*, 35, pp. 677-680.
- DUTSON, T.R., ORCUTT, M.W. (1984). "Chemical changes in proteins produced by thermal processing." *J. Chem. Education*, vol. 61 n° 4 pp. 303-307.
- DWORSCHAK, E., HEGEDUS, M. (1974). *Acta Alim.* 3, pag 337. Citado por HURRELL, R.F., CARPENTER, K.J. (1982). "The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions". *Nestlé Research News*, pp. 78-86.
- EL RAWI, I., GEIGER, E. (1952). "The growth promoting effect of commercial strained meat and fish products investigated with infantile rats". *J. Nutrition*, 47, 119-132.
- EL-ZEANY, B.A., ABDEL FATTAH, L.C. (1982). "Reacción de oscurecimiento en lípidos-proteínas oxidados. Parte 6. Oscurecimiento producido por las interacciones de ácidos grasos libres con proteínas". *Grasas y Aceites*, 33, 216-219.
- ELLIS, G.P. (1959). *Adv. Carbohydr. Chem.*, 14, 63-134. Citado por ADRIAN, J. (1974). "Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction". *World Review of Nutrition and Dietetics*, 19, 71-122.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. (1987). *Nutr. Res.* 7. 319-325. Citado por BENDER, A.E. (1989) En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 3-9. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge England.
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J., SYMSS, L.L. (1989). "The effect of Maillard reaction products on zinc bioavailability". En: "Nutrient availability:

- Chemical and biological aspects". pp. 229-231. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
- FELLOWS, P. (1988) "Frying" En: "Food Processing Technology" pp. 331-339. Ellis Horwood Ltd., Chichester. England.
  - FENNEMA, O. (1986). "Food processing and nutrition: an overview". Food Processing, pp. 762-765.
  - FERRANDO, R. (1987) "From analysis to reality: Bioavailability in nutrition and toxicology. A misunderstood concept." En: World Review of Nutrition and Dietetics, vol.53 pp.28-68.
  - FIELDS, M. (1988). "Experimental studies of cooper absorption". Front. gastrointest. Res., vol. 14, pp. 111-116.
  - FIGUEROA, B. (1984). "Grasas dietarias en frituras repetidas". Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. U.C.M.
  - FINOT, P.A., BUJARD, E., MOTTU, F., MAURON, J. (1977 a). En: "Protein Crosslinking B. Nutritional and Medical Consequences", edited by Friedman M., Plenum Press, New York p. 321. Citado por Hurrell R.F., Carpenter, K.J. (1982). "The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reaction". Nestlé Research News, 78-86.
  - FINOT, P.A., BUJARD, E., MOTTU, F., MAURON, J. (1977 b). "Availability of the true Schiff's bases of lysine and lactose in milk". En: "Protein Crosslinking-B. Nutritional and Medical Consequences. Friedman, M. Ed. Plenum: New York, pp. 343-365.
  - FINOT, P.A., MAGNENAT, E. (1981). "Metabolic transit of early and advanced Maillard products". Prog. Food Nutr. Sci. 5, 193-207.

- FINOT, P.A. (1982). "Modification of proteins. Food nutritional and pharmacological aspects." R.E. Feeney y J.R. Whitaker. Ed. Am. Chemical. Soc. USA.
- FINOT, P.A., AESCHBACHER, H.U., HURRELL, R.F. LIARDON, R. (1990). "The Maillard reaction in food processing human nutrition and physiology". Birkhäuser Verlag, Basel. Switzerland.
- FLYNN, A., POWER, P. (1985). "Nutritional aspects of minerals in bovine and human milks". En: "Developments in dairy chemistry-3. Lactose and minor constituents". Ed. Fox, P.F. Elsevier. Applied Science Publishers. LTD.
- FORBES, A.L. (1989). "Comparison of in vitro, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability". Am. J. Clin. Nutr. 49, 225-238.
- FORD, J.E., HURRELL, R.F., FINOT, P.A. (1983). Brit. J. Nutr. 49, 355-364. Citado por HURRELL, R.F. (1990). "Influence of the Maillard reaction on the nutritional value of foods". En: "The Maillard reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology". Ed. Finot, P.A., AESCHBACHER, H.U., HURRELL, R.F., LIARDON, R. Advances in Life Sciences. BIRKHÄUSER VERLAG. BASEL.
- FOX, M., LONCIN, M., WESS, M. (1982). "Investigations in to the influence of water activity, pH and heat treatment on the velocity of the Maillard reaction in Foods". J. Food Proc. Preserv., 6, 103.
- FRAGNE, R., ADRIAN, J. (1967). Ann. Nutrit. 21: 63 Citado por LANG, K. (1970). "Influence of cooking on foodstuffs". World Review of Nutrition and Dietetics, vol, 12, pp. 266-317.

- FREEMAN, J.B., STEGINK, L.D., MEYER, P.D., FRY, L.K. DENBESTEN, L (1975). "Excessive urinary zinc losses during parenteral alimentation". *J. Surg. Res.*, 18, pp. 265-278.
- FRIEDMAN, M., ZAHNLEY, J.C., MASTERS, P.M. (1981). "Relationship between in vitro digestibility of casein and its content of lysinoalanine and D-amino acids. *J. Food Sci.*, 46, 127-134.
- FRIEDMAN, M., GUMBMAN, M.R., BRANDON, D.L. (1988). "Nutritional, toxicological and immunological consequences of food processing". *Front Gastrointest. Res.*, vol. 14, pp 79-90.
- FURNISS, D.E., HURRELL, R.F., FINOT, P.A. (1986). "Modification of urinary zinc excretion in the rat associated with the feeding of Maillard reaction products". *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 59, 57, 188-191.
- FURNISS, D.E., VUICHOUD, J., FINOT, P.A., HURRELL, R.F. (1989). "The effect of Maillard reaction products on zinc metabolism in the rat". *British J. Nutr.*, vol. 62 (3), 739-749.
- GADNER, H.W. (1979). "Lipid hydroperoxide reactivity with protein and amino acids: a review". *J. Agric. Food Chem.*, 27, pp. 220-229.
- GALL, K.L., OTWELL, W.S., KOBURGER, J.A., APPLIEDORF, H. (1983). "Effects of four cooking methods on the proximate mineral and fatty acid composition of fish fillets". *J. Food Sci.*, 48, pp. 1068-1074.
- GARCIA ARIAS, M.T. (1989). "Influencia del modo de cocción y tiempo de esterilización y almacenamiento en el valor nutritivo de conservas de atún blanco." Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- GARCIA-ARIAS, M.T., CASTRILLON, A.M., NAVARRO, M.P. (1991).

- "Dietary iron bioavailability of diets containing raw and white tuna". En: "Trace elements in man and animals 7". pp. 25-24, 25-25. Momcilovic. B. Ed. Seventh International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (TEMA-7). IMI, Zagreb.
- GAZZANI, G., VAGNARELLI, P., CUZZONI, M.T., MAZZA, P.G. (1987). "Mutagenic activity of the Maillard reaction products of ribose with different amino acids". J. Food Sci., vol. 52 (3), 757-760.
  - GEIGER, E., BORGSTROM, G. (1962) "Fish protein-nutritive aspects". En: "Fish as Food, II". pag 29. Ed. BORGSTROM, G. Academic Press. New York and London.
  - GILLOOLY, M., ROTHWELL, T.H., TORRANCE, J.D., Mc PHAIL, A.P., DERMAN, D.P., BEZWODA, W.R., MILLS, W., CHARLTON, R.W., MAYET, F. (1983). Br. J. Nutr., 49, 331. Citado por LÖNNERDAL, Bo. (1989). En: "Nutrient availability: Chemical and Biological aspects". pp. 131-139. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
  - GOMEZ PIÑOL, J.M., TORRE BORONAT, M.C. de la (1989). "Influencia de la tecnología en el valor nutritivo de los alimentos. I Proteínas." Alimentaria nº 204 pp. 15-21.
  - GOODNIGHT, S.H. Jr., HARRIS, W.S., CONNO, W.E., ILLINGWORTH, R.D. (1982). "Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia and thrombosis". Arteriosclerosis, 2, 87.
  - GREENBERG, R., GROVES, M.L., DOWER, H.J. (1984). "Human  $\beta$ -Casein aminoacid sequence and identification of phosphorylation sites". J. Biol. Chem. 259: 5132-5138.

- GROPPPEL, B., HENNIG, A. (1971). Arch. Exp. Veterinaermed, 25, 817. Citado por HAMBIDGE, K.M., CASEY, C.E. KREBS, N.F. (1986). En: "Trace elements in human and animal nutrition". pp. 1-109. Ed. Metz, W. Academic Press. London.
- GUILLAUMIN, R. (1988) "Kinetics of fat penetration in food". En: "Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches". Ed. Varela, G., Bender, A.E., Morton, I.D. Ellis Horwood Ltd. Chichester (England). pp. 82-90.
- HAGAN, S.N., HORN, M.J., LIPTON, S.H., WOMACK, M. (1970). "Availability of amino acids. Fructose-glycine as a source of nonspecific nitrogen for rats". J. Agric. Food Chem., 18 pp. 273.
- HALLBER, L. (1981). Ann. Rev. Nutr., 1.123. Citado por LÖNNERDAL, Bo (1989). En: "Nutrient availability: Chemical and Biological Aspects". pp. 131-139. Ed. Southgate. D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, England.
- HALLBER, L., ROSSANDER-HULTEN, L., BRUNE, M., GLEERUP, A. (1992). "Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance". European Journal of Clinical Nutrition, 46, 317-327.
- HARRIS, R.S., VON LOESECKE, H. (1960). "Nutritional evaluation of food procesing". John Wiley and sons, Inc. New York and London.
- HASHIBA, H. (1982). "The browning reaction of Amadori compounds derived from various sugars". Agric. Biol. Chem. 46: 547.
- HAWTHORN, J. (1983). "Otros temas de interés: Reacciones de pardeamiento no enzimático". En: "Fundamentos de ciencia de los alimentos", pp. 158-196. Ed. Acribia. Zaragoza.
- HAYASE, F., KATO, H., FUKIMAKI, M. (1975). "Racemization of amino

- acid residues in proteins and poly (L-amino acids) during roasting". *J. Agric. Food. Chem.*, 23, 491-494.
- HAZELL, T. (1985). "Minerals in Foods: dietary sources, chemical forms, interactions, bioavailability". En: *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol, 46, pp. 1-123.
  - HEEPE, F. (1961). "Die vitamine in der diat und kinderpraxis". p. 58. Steinkooff. Darmstadt. Citado por: LANG, K. (1970). "Influence of cooking on foodstuffs". *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 12, pp. 226-317.
  - HERNANDEZ MUÑOZ, I. (1989). "Tecnología de la fritura: Evaluación de la termoxidación de un aceite de oliva empleado en frituras de patatas". Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. U.C.M.
  - HEROLD, P.M., KINSELLA, J.E. (1986). "Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: A comparison of findings from animal and human feeding trials". *Am. J. Clin. Nutr.*, 43, 566.
  - HODGE, J.E. (1953). "Chemistry of browning reactions in model systems". *J. Agric. Food Chem.*, 1, 928-943.
  - HORN, M.J., LICHTENSTEIN, H., WOMARCK, M. (1968). "A methionine-fructose compound and its availability to microorganisms and rats". *J. Agric. Food Chem.*, 16 pag. 741.
  - HRDLICKA, J. (1976). "Changes during thermal and hydrothermal reactions XX. The effect of heavy metals on the course of nonenzymic browning". *Sb. Vys. SK. Chem-Technol. Praze, Potraviny* E48:65.
  - HUANG, Y.S., NASSAR, B.A., HORROBIN, D.F. (1986). "Changes of plasma lipids and long chain n-3 and n-6 fatty acids in plasma, liver, heart

and kidney phospholipids of rats fed variable levels of fish oil with or without cholesterol supplementation". *Biochemica et Biophysica Acta*, 879, 22-27.

- HUNT, J.R., JOHNSON, P.E., SWAN, P.B. (1987). "Dietary conditions influencing relative zinc availability from foods to the rat and correlations with in vitro measurements". *J. Nutrition*, 117, pp. 1913-1923.
- HURRELL, R.F., CARPENTER, K.J. (1976). "Mechanisms of heat damage in proteins. 7. The significance of lysine-containing isopeptides and of lanthionine in heated proteins". *Br. J. Nutr.*, 35, 383.
- HURRELL, R.F., CARPENTER, K.J. (1977). "Nutritional significance of crosslinking formation during food processing." En: "Protein crosslinking: nutritional and medical consequences." pp. 225-259. Ed. M. Friedman. Plenum Press. New York.
- HURRELL, R.F., CARPENTER, K.J. (1977). "Mechanisms of heat damage in proteins. 8. The role of sucrose in the susceptibility of protein foods to heat damage". *British J. Nutr.* Vol.38 pag. 285.
- HURRELL, R.F., CARPENTER, K.J. (1982). "The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions". En: "Nestlé Research News". pp. 78-86.
- HURRELL, R.F., FINOT, P.A., FORD, J.E. (1983). "Storage of milk powders under adverse conditions. 1. Losses of lysine and other essential amino acids". *British J. Nutr.* 49, 343-354.
- HURRELL, R.F., FINOT, P.A. (1983). En: "Nutritional Adequacy, Nutrient Availability and Needs". (J. Mauron ed.) *Experientia supp.* Vol. 44, Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 135.

- HURRELL, R.F. (1984). En: "Developments in Food Proteins", vol. 3. (B.J.F. Hudson, ed) Elsevier, London, pp. 213-244.
  
- HURRELL, R.F., LYNCH, S.R., TRINIDAD, T.P., DASSENKO, S.A., COOK J.D. (1989). "Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins". *Am. J. Clin. Nutr.* 49. pp 546-552.
  
- HURRELL, R.F. (1990). "Influence of the Maillard reaction on the nutritional value of foods". En: "The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology". Ed. by Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F. y Liardon, R. Birkhäuser Verlag. Basel.
  
- IGENE, J.O., KING, J.A., PEARSON, A.N., GREY, J.I. (1976). "Influence of heme pigments, nitrite and non-hemo iron on development of warmed-oven flavor in cooked meat". *J. Agric. Food Chem.*, 47, 833.
  
- "Interaction of iron, cooper and zinc". (1987). *Nutrition Reviews*, vol. 45, n° 6, pp. 167-169.
  
- JOHNSON, G.H.; BAKER, D.H., PERKINS, E.G. (1977) "Nutritional implications of the Maillard reaction: the availability of fructose-phenylalanine to the Chick". *J. Nutrition*, 107, 1659-1664.
  
- JOHNSON, P.E., LYKKEN, G., MAHALKO, J., MILNE, D., INMAN, L., SANDSTEAD, H.H. (1983). "The effect of browned and unbrowned corn products on absorption of zinc, iron and copper in humans". En: "The Maillard reaction in foods and nutrition". Waller, G.R. y Feather, M.S. Ed. *Am. Chem. Soc. USA*.
  
- KAJIMOTO, G., YOSHIDA, H. (1973). "Loss ratio of amino acids by autoxidised and thermally oxidised oils". *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 47, 515.

- KANE A.P., MILLER, D.D. (1984). "In vitro estimation of the effects of selected proteins on iron bioavailability". *Am. J. Clin. Nutr.*, 39, 393, 401.
- KARMAS, E., HARRIS, R.S. (1987). "Nutritional Evaluation of Food Processing". 3<sup>a</sup> ed. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- KATO, Y., MATSUDA, T., KATO, N., NAKAMURA, R. (1988). "Browning and protein polymerization induced by amino-carbonyl reaction of ovalbumin with glucose and lactose". *J. Agric. Food Chem.*, vol. 36, 806-809.
- KATO, Y., MATSUDA, T.; KATO, N., NAKAMURA, R. (1989) "Maillard reaction of disaccharides with protein: Suppressive effect of non reducing end pyranoside groups on browning and protein polymerization". *J. Agric. Food Chem.*, vol.37, 1077-1081.
- KE, P.J., ACKMAN, R.G. (1976). *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 53, 636. Citado por KHAYAT, A., SCHWALL, D. (1983). "Lipid oxidation on seafood". *Food Technology*, 37, 130-140.
- KEUNING, R., BEEK, W.J. (1983). "Proceedings of the Fourth European Nutrition Conference", E.M.E. van den Berg, Bosman, N., Breedveld, B.G. (Eds), The Hague, Voorlichtingsbureau Voor de Voeding, 1985, 51.
- KHAYAT, A., SCHWALL, D. (1983). "Lipid oxidation on seafood". *Food Technology*, 37, 130-140.
- KIES, C., FOX, A. (1975). "Comparative value of L-, DL- and D-methionine supplementation of an oat-based diet for humans. *J. Nutr.* 105: 809-814.
- KIES, C. (1985) "Effect of dietary fat and fiber on calcium bioavailability". En: Kies, C., ed. "Nutritional bioavailability of calcium". Washington D.C.

American Chemical Society, 175-187.

- KIES, V. (1988). "Mineral utilization of vegetarians: impact of variation in fat intake". *Am. J. Clin. Nutr.* 48, 884-887.
- KIM, S.B., HAYASE, F., KATO, H. (1986). En: "Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems" (M. Fujimkai, M. Namiki, H. Kato Eds). Kodanska Ltd., Tokyo, pp. 383-392. Citado por LINGNERT, H. (1990). "Development of the Maillard reaction during food processing". En: *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. pp. 171-185. Ed. Finot, P.A., Aeschbacher, H.U., Hurrell, R.F., Liardon, R. *Advances in Life Sciences*. Birkhäuser Verlag. Basel.
- KINSELLA, J.E., SHIMP, J.L., MAI, J., WEIHRAUCH, J.J. (1977). *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 54 (10), 424. Citado por BRUCE GERMAN, J., KINSELLA, J.E. (1985). "Lipid oxidation in fish tissue. Enzymic Initiation via lipoygenase". *J. Agric. Food Chem.*, 33, 680-683.
- KINSELLA, J.E. (1987). "Seafoods and fish oils in human health and disease". Marcel Dekker Inc. New York.
- KIRCHGESSNER, M., HARTEL, J. (1977). "Zur intermediären zinkverfügbarkeit 15 verschiedener zinkverbindungen *Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futter mittelk*, 38: 138-146.
- KIRK, J.R. (1984). "Biological availability of nutrients in processed foods." *J. Chem. Education* vol.61 n°4 pg.364.
- KNIPFEL, J.E. (1975). "Nutritional quality of several proteins as affected by heating in the presence of carbohydrates". En: "Protein nutritional quality of foods and feeds". pp 375-391. Ed. FRIEDMAN, M., MARCEL DEKKER, Inc. New York.

- KNIPFEL, J.E., Mc LEOD, J.G., Mc CAIG, T.N. (1983). "Nutritional value of foods and feeds of plant origin: relationship to composition and processing". En: "The Maillard reaction in foods and nutrition". Waller, G.R. y Feather, M.S. Ed. Am. Chem. Soc. USA.
- LANDS, W.E.M. (1986). "Fish and Human Health". Academic Press, Inc. Orlando.
- LANG, K. (1970). "Influence of cooking on foodstuffs". World Review of Nutrition and Dietetics, Vol. 12, pp. 266-317.
- LAYRISSE, M., MARTINEZ-TORRES, C., ROCHE, M. (1968). "Effects of interaction of various foods on iron absorption". Am. J. Clin. Nutr., 21, 1175-1183. Citado por HURRELL, R.F. y Col. (1989). "Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins". Am. J. Clin. Nutr. vol. 49, 546-552.
- LAYRISSE, M., MARTINEZ-TORRES, C. (1971). "Food iron absorption: iron supplementation of food". Brown, Moore, Progress in hematology, vol. VII.
- LAYRISSE, M., MARTINEZ-TORRES, C. (1972). "Model for measuring dietary absorption of heme iron: test with a complete meal". Am. J. Clin. Nutr. 25: 401-411.
- LAYRISSE, M., MARTINEZ-TORRES, C., COOK, J.D., WALKER, R., FINCH, C.A. (1973). "Iron fortification of food: its measurements by the extrinsic tag method. Blood, 41, pag. 333.
- LAYRISSE, M., MARTINEZ-TORRES, C., LEETS, I., TAYLOR, P., RAMIREZ, J. (1984). J. Nutr. 114, 217. Citado por: MORRIS, E.R. (1986). En: "Trace elements in human and animal nutrition". pp. 79-126. Ed. METZ, W. Academic Press. London.

- LEA Y HANANN (1949). Citado por HARRIS, R.S, VON LOESECKE, H. En: "Nutritional evaluation of food processing". (1960). Ed. Wiley, J. New York. London.
- LEDWARD, D.A. (1979). En: "Effets of heating on foodstuffs". pp.26-33. Ed.: J.R. Priestley. Applied Science Publishers, Ltd. London.
- LEVINE, B.A., WILLIAMS, R.J.P. (1982). "Calcium binding to proteins and anion centers". En: Cheung W.Y. (ed). Calcium and cell function, vol. 2. Academic Press. New York, pp. 1-38.
- LIARDON R., HURRELL, R.F. (1983). "Amino acid racemization in heated and alkali-treated proteins". J. Agric. Food Chem., 31: 432-437.
- LINGNERT, H. (1990). "Development of the Maillard reaction during food processing". En: "The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology. Ed. Finot, P.A.; Aeschbacher, H.U.; Hurrell, R.F. y Liardon, R. Birkhäuser Verlag. Basel.
- LÖNNERDAL, Bo., STANISLOWSKI, A.G., HURLEY, L.S. (1980). J. Inorg. Biochem., 12,71. Citado por LÖNNERDALL, Bo (1989). En: "Nutrient availability chemical and biological aspects". pp. 131-139. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Cambridge. England.
- LÖNNERDAL, Bo. (1985). "Biochemistry and physiological function of human milk proteins". Am. J. Clin. Nutr., 42, 1299-1317.
- LÖNNERDAL, Bo, KEEN, C.L., BELL, J.G., HURLEY, L.S. (1985). En: C.F. Mills, I. Bremner, J.K., Chesters eds. Trace Elements in Man and Animals (TEMA)-5, pp. 427-430. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, United Kingdom.

- LÖNNERDAL, Bo. (1989). "Food and dietary factors influencing levels and bioavailability of trace elements". En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 131-139. Ed. Southgate, D., Johnson, F., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House. Cambridge. England.
  
- LOPEZ-MATAS, A., FELLERS, C.R. (1948). *Food Research*, 13, 387-396. Citado por BORGSTROM, G. (1962). "Fish as Food. II". pag. 191. Academic Press. New York and London.
  
- LOVERN, J.A. (1946). Citado por CAUSERET, J. (1962). "Fish as a source of mineral nutrition". En: "Fish as Food. II". pag. 216. Ed. Borgstrom, G. Academic Press. New York and London.
  
- LUKASKI, H.C., KLEVAY, L.M., BOLONCHUK, W.W., MAHALCO, J.M., MILNE, D.B., JOHNSON, L.K, SANDSTEAD, H.H. (1982). "Influence of dietary lipids on iron, zinc and copper retention in athletes". *Fed. Proc.* 41: 275.
  
- LUNDE, G. (1937). *Fischwarenu-Feinkost Ind.*, 9, 88-137. Citado por BORGSTROM, G. (1962). "Fish as Food. II". pag 191. Academic Press. New York and London.
  
- LUNDE, G., LIE, J. (1940). Citado por CAUSERET, J. (1962). "Fish as a source of mineral nutrition". En: "Fish as Food. II". pag. 222. Ed. Borgstrom, G. Academic Press. New York and London.
  
- LYKKEN, G.I., MAHALKO, J., JOHNSON, P.E., MILNE, D., SANDSTEAD, H.H., GARCIA, W.J., DINTZIS, F.R., INGLETT, G.E. (1986). "Effects of browned and unbrowned corn products intrinsically labeled with <sup>65</sup>Zn on absorption of <sup>65</sup>Zn in humans". *J. Nutrition*, 116, pp. 795-801.

- MACKINLAY, A.G., WAKE R.G. (1965). "Fraccionation of S-carboxymethyl-K-casein and characterization of components". *Biochem. biophys. Acta* 104: 167-180. Citado por ALAIS, A., BLANC, B. (1975) "Milk proteins: Biochemical and biological aspects". *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 20, pp. 66-167.
- MAILLARD, L.C. (1912). "Action des acides amines sur les sucres: Formation des melanoidines par voie methodique." *C.R. Hebd. Seances. Acad. Sci.*, 154, 66-68.
- MARTINEZ-TORRES, C., LAYRISSE, M. (1970). "Effect of amino acids on iron absorption from a stable vegetable food". *Blood*, 35, 669-682.
- MARTINEZ-TORRES, C., LEETS, I., LAYSISSE, M. (1975). "Iron absorption by humans from fish". *Arch. Lat.-Am. Nutr.* , 25, 199-210.
- MARTINEZ-TORRES, C., ROMANO, E., LAYRISSE, M. (1981). *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 322. Citado por LÖNNERDAL, Bo (1989). En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 131-139. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
- MATSESHE, J.W., PHILLIPS, S.F., MALAGELADA, J.R., MCALL, J.T. (1980). "Recovery of dietary iron and zinc from the proximal intestine of a healthy man: studies of different meals and supplements". *Am. J. Clin. Nutr.* 33, 1946-1953.
- MAURON, J. (1977). "General principles involved in measuring specific damage of food components during thermal processes". En: "Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing". T. HOYEN, O. KUALE. Applied Science. London. pp. 328-359.
- MAURON, J. (1985 a). "Influence of processing on protein quality." *Bibl.*

Nutr. Dieta, 34, pp. 56-81.

- MAURON, J. (1985 b). "Effects of processing on proteins." Proceedings of the XIII international congress of nutrition. pp. 780-785.
  
- Mc CANCE, R.A., WIDDOWSON, E.M., LEHMANN, H. (1942). "The effect of protein intake on the absorption of calcium and magnesium". *Biochem. J.*, 36, 686-691. Citado por HAZELL T. (1985). "Minerals in Foods: Dietary sources, chemical forms, interactions bioavailability". En: *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol, 46, pp. 1-88.
  
- Mc CANCE, R.A., WIDDOWSON, E.M. (1978). "The composition of foods". Ed. Paul, A.A., Southgate, D.A.T. Elsevier north-Holland biomedical press. Fourth edition. Amsterdam, New York, Oxford.
  
- Mc MILLAN, E.M., ROWE, D.J.F. (1982). *Clin. Exp. Dermatol.* 7, 629. Citado por HAMBIDGE, K.M., CASEY, C.E., KREBS, N.F. (1986). En: "Trace elements in human and animal nutrition". pp. 1-109. Ed. METZ, W. Academic Press. London.
  
- Mc PHERSON, E.A., BEATTIS, I.S., YOUNG, G.B. (1964). *Nord Veterinaarmed.* 16, Suppl. 1, 533. Citado por HAMBIDGE, K.M., CASEY, C.E., KREBS, N.F. (1986). En: "Trace elements in human and animal nutrition". pp. 1-109. Ed. METZ. W. Academic Press. London.
  
- MEDINA, R. (1986). "Cambios y posibles interacciones entre las grasas de fritura y del interior del alimento, durante el proceso de frituras repetidas de un pescado azul". Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. U.C.M.
  
- MELLANDER, O. (1939). "Electrophoretic studies on casein". *Biochem. Z.* 300: 240-245. Citado por Alais C., BLANC, B. (1975). "Milk proteins: Biochemical and biological aspects". *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 20, pp. 66-167.

- MILLER, D.D., SCHRICKER, B.R., RASMUSSEN, R.R. VAN CAMPEN, D. (1981). "An in vitro method for estimation of iron availability from meals". *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 2248-2256.
- MOELLER, T., HORWITZ, E.P. (1960). "Chelation". En: Comar C.L., Bronner, F. (eds). *Mineral metabolism*, vol. IA. Academic Press, New York, pp. 101-118.
- MONSEN, E.R., COOK, J.D. (1976). "Food iron absorption in human subjects. IV. The effects of calcium and phosphate salts on the absorption of nonheme iron". *Am. J. Clin. Nutr.* 29, 1142-8.
- MOORE, C.V., DUBACH, R. (1951). "Observations on the absorption of iron from foods tagged with radioiron". *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 64, pag 245.
- MOREIRAS TUNI, O. (1966) "Variaciones estacionales en la composición cuali-cuantitativa de la porción comestible y de los residuos de algunos pescados de consumo en España." *Anales de Bromatología*, 18, 161-233.
- MOREIRAS-VARELA, O., RUIZ-ROSO, B. (1986). "Utilización nutritiva del pescado graso". En: "Pescado graso, colesterol y enfermedades cardiovasculares". Publicaciones de la Fundación Española de la Nutrición. Serie Divulgación nº6, 11-21.
- MOREIRAS-VARELA, O., RUIZ-ROSO, B., VARELA, G. (1988). "Effects of frying on the nutritive value of food". En: "Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches". Ellis Horwood. Chichester. England. pp 93-102.
- MOREIRAS-VARELA, O., RUIZ-ROSO, B., BELMONTE, S., PEREZ, M. (1990). "Influencia de dos procesos culinarios utilizando aceite de oliva y margarina sobre la bioutilización de la proteína y el contenido en vitamina

C de algunos alimentos". *Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, vol. 30, n° 3, pag. 387.

- MORR, C.V. (1967). "Effect of oxalate and urea upon ultra centrifugation properties of raw and heated skimmilk casein micelles". *J. Dairy Sci.*, 50, pp. 1744-1751. Citado por ALAIS, A., BLANC, C. (1975). *World Reviews of Nutrition and Dietetics*, vol. 20, pp. 61-167.
  
- MORRIS, E.R., ELLIS, R. (1985). En: "Trace element metabolism in man and animals-5". CAB Publications, Farnham Royal, U.K. Citado por HAMBIDGE, K.M., CASEY, C.E., KREBS, N.F. (1986). En: "Trace elements in human and animal nutrition". pp. 1-109. Ed. METZ. Academic Press. London.
  
- NAKAJIMA, S., ENDOH, S., KAKUDA, Y., TSUCHIYA, T., MATSUMOTO, J.J. (1988). "Nutritive values and effects of niboshi on body composition of rat". *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 54 (9), 1607-1610.
  
- NAIR, B.M., OSTE, R., ASP, N.G., PERNEMALM, P.A. (1981). "Absorption and distribution of a C<sup>14</sup>-glucose lysine reaction mixture in the rat". *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, 217-228.
  
- NAITO, H., SUSUKI, H. (1974). *Agr. Biol. Chem.*, 38: 1543-5. Citado por HURRELL, R.F. y Col. (1989). "Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins". *Am. J. Clin. Nutr.* vol. 49, 546-552.
  
- NAITO, H. (1986). "Intestinal protein digestion and mineral protein bioavailability with special reference to casein phosphopeptide on Ca absorption". *Bifidobacteria and Microflora*; 6; 1; 1-6.
  
- NAITO, H., GUNSHIN, H., NOGUCHI, T. (1989). "Bioavailability of calcium affected by luminal and mucosal factors in the small intestine". En:

"Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 253-255. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R., Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.

- NAMIKI, S., NAGOYA, J. (1934). *J. Med. Sci.*, 7, 206. Citado por NAVARRO, M.P. (1991). En: "Valor nutritivo del pescado I. Pescado fresco." *Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, vol. 31 (3), pp. 330-342.
- NAMIKI, M. (1988). "Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reactions mechanism and the development of antioxidants and mutagens". *Advances in Food Research*, vol.32.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (1978). *Nutrient requirements of laboratory animals*. 3<sup>a</sup> ed. National Academy of Sciences. Washington D.C.
- NAVARRO, M.P., VAQUERO, M.P., CASTRILLON, A.M. y VARELA, G. (1985). "La utilización nutritiva de la proteína y de los minerales modulada por el tipo de grasa dietética". *Grasas y Aceites*, 36, 25-28.
- NAVARRO, M.P., CASTRILLON, A.M., VARELA, G. (1987). "Effect of frozen storage on protein quality of sardines". *Int. J. Food Sci. Technol.*, 22, 77-80.
- NAVARRO, M.P. (1991 a). "Valor nutritivo del pescado. I. Pescado fresco". *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 31/1, pp 330-342.
- NAVARRO, M.P. (1991 b) "Valor nutritivo del pescado. II. Pescado elaborado". *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 31/4, pp.459-472.
- NAVARRO, M.P., GARCIA-ARIAS, M.T. (1992). "Influencia del consumo de atún crudo o elaborado sobre la utilización del zinc dietético". *Revista de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. En Prensa.

- NAWAR, W.W. (1984). "Chemical changes in lipids produced by thermal processing". *J. Chem. Education*, 61, 299-302.
- NEELIN, J.M. (1964). "Variants of K-casein revealed by improved starch gel electrophoresis". *J. Dairy Sci.*, 47, pp. 506-509. Citado por ALAIS, C., BLANC, B. (1975). "Milk proteins: Biochemical and biological aspects". *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol.. 20, pp. 66-167.
- NESTEL, P.J. (1986). "Fish oil attenuates the cholesterol induced rise in lipoprotein cholesterol". *Am. J. Clin. Nutr.*, 43, 752-757.
- NIELSEN, H.K. (1984). "Nutritional aspects of reactions between oxidizing lipid and protein with emphasis on tryptophan. Tesis Doctoral n° 865. Universidad de Fribourg. Citado por Mauron, J. (1985). "Influence of Processing on Protein Quality". *Bibl. Nutr. Dieta*, n° 34. pp 00-00.
- O'BRIEN, J., WALKER, R. (1988) "Toxicological effects of dietary Maillard reaction products in the rat". *Food and Chemical Toxicology*, 26 (9), 775-783.
- O'DELL, B.L., CAMPBELL, B.J. (1970). "Trace elements: metabolism and metabolic function". En: Florkin, Stolz, *Metabolism of vitamins and trace elements* (Elsevier, Amsterdam).
- O'DELL, B.L., BURPO, C.E., SAVAGE, J.E. (1972). "Evaluation of zinc availability in foodstuffs of plant and animal origin. *J. Nutrition*, 102, 653-660.
- ÖSTE, R.E., SJÖDIN, P. (1984). "Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vivo studies on rats". *J. Nutrition*, 114, 2228-2234.
- ÖSTE, R.E., DAHLOVIST, A., SJÖSTRÖM, H. (1986). "Effect of Maillard reaction products on protein digestion In vitro studies". *J. Agric.*

Food Chem., vol 34, 355-358.

- ÖSTE, R.E., MILLER, R., SJÖSTRÖM, H., NOREN, O. (1987) "Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds". J. Agric. Food Chem., vol 35 (6), 938-942.
- PAYENS, T.A.J., SCHMIDT, D.J. (1966). "Boundary spreading of rapidly polymerization  $\alpha$ s 1-casein during sedimentation". Arch. Biochem. Biophys. 115, pg 134. Citado por ALAIS, A., BLANC, B. (1975). "Milk proteins: Biochemical and biological aspects". World Review of Nutrition and Dietetics, vol. 20, pp. 61-167.
- PEKAREK, R., SANDSTEAD, H.H., JACOB, R., BARCOME, D. (1979). "Abnormal cellular immune responses during acquired zinc deficiency". Am. J. Clin. Nutr. 32, 1466-1471.
- PEPRIELLA, C., KUSNIK, S.L., LOZANO, K.D., CHIKIFE, J. (1985). "Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: color changes due to non-enzymatic browning". J. Food Sci., 50, 622.
- PEREZ ALVAREZ-QUIÑONES, M. (1990). "El proceso de enlatado de sardinas, repercusiones nutricionales y sensoriales de la fritura y de las diferentes fases de elaboración y maduración". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. U.C.M.
- PEREZ-MARTIN, R.I. (1986) "Estudio de los procesos térmicos en la fabricación de conservas de atún blanco y su incidencia en la calidad". Tesis Doctoral. Facultad de Química. Universidad de Santiago de Compostela.
- PETIT, L. (1956). "Complexion du cuivre par les produits de la réaction de Maillard, dosage d'un intermédiaire de la formation des melanoidines". C.R. Acad. Sci. París 242, 829-831.

- PIENIAZEK, D., RAKOWSKA, M., KUNACHOWICZ, H. (1975). "The participation of methionine and cysteine in the formation of bonds resistant to the action of proteolytic enzymes in heated casein". *British J. Nutr.*, 34, 163.
- PIGOTT, G.M., TUCKER, B.W. (1990), "Seafood effects of technology on nutrition". Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 85-174.
- PLAKAS, S.M., LEE, T.C., WOLKE, R.E., MEADE, T.L. (1985). "Effect of Maillard browning reaction on protein utilization and plasma amino acid response by rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". *J. Nutrition*, 115, pp 1589-1599.
- POKORNY, J. (1980). "Effets of substrates on change of fats and oil during frying". *Rev. Ital. Sostance Grasse*, LVII, 222-225.
- POWRIE, W.D., WU, C.H., ROSIN, M.P., STICH, H.F. (1981). "Clastogenic and mutagenic activities of Maillard reaction model systems". *J. Food Sci.*, 46, 1433-1438.
- REEVES, M.J. (1973). "Effects of processing on protein in food". *Food technology*, New Zealand, 8, 15.
- RENDLEMAN, J.A., INGLETT, G.E. (1984). "Influence of cupric ion in the Maillard reaction of glucose with glycine". Paper presented at 187 th ACS National Meeting. St. Louis, M.O. April, 8-13.
- RENDLEMAN, J.A. Jr. (1987). "Complexation of calcium by melanoidin and its role in determining bioavailability." *J. Food Sci.*, 6, 52, 1699-1705.
- RIBADEAU-DUMAS, B., GARNIER, J. (1969). "Structure de la micelle de caséine bovine. Répartition des protéines constitutives". *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 268: 2504-2506. Citado por Alais, A., Blanc, B. (1975). *World*

Review of Nutrition and Dietetics, vol. 20, pp. 61-167.

- ROSE, D., COLVIN, J.R. (1966). "Appearance and size of micelles from bovine milk". *J. Dairy sci*, 49: 1091-1097. Citado por ALAIS, A., BLANC, B. (1975). "Milk proteins: Biochemical and biological aspects". *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol 20, pp. 61-167.
- ROSE, D. (1969) "A proposed model of micelle structure in bovine milk". *Dairy Sci.*, *Abstr.* 31: 171-175. Citado por Alais, A., Blanc, B. (1975). *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 20, pp. 61-167.
- ROSSANDER, L., HALLBERG, L., BJÖRN-RASMUSSEN, E., (1979). *J. Clin. Nutr.* 32, 2484. Citado por LÖNNERDAL, Bo (1989). En: "Nutrient availability: Chemical and Biological aspects". pp. 131-139. Ed. Southgate, D., Johnson, I. Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
- ROTH, H.P., KIRCHGESSNER, M. (1985). *J. Nutrition*, 115, 1641. Citado por RENNER, E., SCHAAFSMA, G., SCOTT, K.J. (1989). En: "Micronutrients in milk and milk-based food products". Ed. RENNER, E. Elsevier Applied Science, London and New York.
- RUBENTHALER, G., POMERANZ, Y. FINNEY, K.F. (1963). "Effets of sugars and certain free amino acids on bread characteristics". *Cereal Chem.*, 40, pp. 658-665.
- RUIZ-ROSO, B. (1983). "Influencia del sistema (CFR) (Fritura - congelación - recalentamiento) sobre la calidad nutritiva de la proteína de algunos alimentos de origen animal". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. U.C.M.
- SABBIONI, E., EDEL, J., GOETZ, L. (1985). *Nutr. Res.*, 1, 32. Citado por van Dokkum, W. (1989). En: "Nutrient availability: Chemical and

- biological aspects". pp 89-96. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, England.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J., MEDINA, R., HIGON, E., VIEJO, J.M. (1990). "Aceites de oliva y girasol y manteca de cerdo en frituras repetidas de sardinas. Valoración del rendimiento y grado de alteración. "Grasas y aceites, 41, 256-262.
  - SANCHEZ-MUNIZ, F.J., VIEJO, J.M., MEDINA, R. (1991) "Consideraciones sobre el consumo de pescado azul y riesgo cardiovascular con especial referencia a la composición en ácidos grasos de las familias n-9, n-6 y n-3. Nutr. Clin. 11, 30-40.
  - SANDSTEAD, H.H. (1985). En: "Trace element metabolism in man and animals-5". (C.F. Mills, P.A. Aggett, I. Bremner, J.K. Chesters, eds.) CAB Publications, Farnham Royal, U.K. Citado por HAMBIDGE, K.M., CASEY, C.E., KREBS, N.F. (1986). En: "Trace elements in human and animal nutrition": pp. 1-109. Ed. MERTZ, W. Academic Press. London.
  - SANDERS, T.A.B. (1985). "The importance of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids". En: "The role of fats in human nutrition". Ed. PADLEY, F.B., PADMORE, J., Ellis Horwood. Chichester. England. pp 101-116.
  - SANDSTRÖM, B., CEDERBLAD, A., LÖNNERDAL, Bo, (1983). Am. J. Dis. Child, 137, 726. Citado por LÖNNERDAL, Bo (1989). En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 131-139. Ed. Southgate, D. Johnson, I, Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
  - SANDSTRÖM, B., KEEN, C.L., LONNERDAL, B. (1983). "An experimental model for studies of zinc bioavailability from milk and infant

- formulas using extrinsic labeling". *Am. J. Clin. Nutr.*, 38, 420-428.
- SANDSTRÖM, B., ALMGREN, A. (1989). "Dialyzable zinc after in vitro digestion in comparison with zinc absorption measured in humans". En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 238-240. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick., G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
  - SATO, R., NOGUCHI, T., NAITO, H. (1983). "The necessity for the phosphate portion of casein molecules to enhance Ca absorption from the small intestine". *Agric. Biol. Chem.*, 47, pp. 2415-2417.
  - SATO, R., NOGUCHI, T., NAITO, H. (1986). "Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine". *J. Nutr. Sci. Vitamin*, 32, 67-76.
  - SCOTT, K.J. (1989). "Micronutrients in Milk Products". En: "Micronutrients in milk and milk-based food products". Ed. RENNER, E. Elsevier science publishers LTD, London.
  - SGARBIERI, V.C., AMAYA, J., TANAKA, M., CHICHESTER, C.O. (1973). "Nutritional consequences of the Maillard reaction. Amino acid availability from fructose-leucine and fructose-tryptophan in the rat". *J. Nutrition*, 103, 657-663.
  - SHAH, B.G., BELONJE, B. (1981). "Bioavailability of zinc in beef with and without plant protein". *Fed. Proc.*, 40, pag. 885.
  - SINGER, P., JAEGER, W., WIRTH, M., VOIGT, S., NAUMANN, E., ZIMONTKOWSKI, S., HAJDN, GOEDICKE, W. (1983). "Lipid and blood pressure lowering effect of mackerel diet in man". *Atherosclerosis*, 49, 99.
  - SINGH, H., FLYNN, A., FOX, P.F. (1989). "Zinc binding in bovine

- milk". *J. Dairy Res.*, 56 (2), pp. 249-263.
- SINGH, H.; CREAMER, L.K. (1991). "Aggregation and dissociation of milk protein complexes in heated reconstituted concentrated skim milks". *J. Food Sci.*, vol. 56, n° 1, pp. 238-246.
  - SMITH, G.A., FRIEDMAN, M. (1984). "Effect of carbohydrates and heat on the amino acid composition and chemically available lysine content of casein". *J. Food Sci.*, vol. 49, pp 817-823.
  - SOUCI, S.W., FACHMANN, W., KRAUT, H. (1981). "Food composition and nutrition tables 1981/1982". Wissenschaftliche verlagsgesellschaft mbh Stuttgart. Germany
  - SOUTHGATE, D.A.T. (1989). "Conceptual issues concerning the assessment of nutrient bioavailability". En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 10-13. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, England.
  - SOUTHON, S., FAIRWEATHER-TAIT, S.J., HAZELL, T. (1988). *Proc. Nutr. Soc.*, 47, 27. Citado por SOUTHGATE, D.A.T. En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
  - SPENCER, H., OSIS, D., NORRIS, C., COFFEY, J. (1975). "Availability of protein, minerals and fluoride from fish protein concentrate in adult man". En: "Protein nutritional quality of foods and feeds". Ed. Mendel Friedman. Barcel Dekker, Inc. New York.
  - SPENCER, H., KRAMER, L. (1985). "Effects of certain minerals on the bioavailability of Ca in adult males". *ACS Symp.*, Ser. 275 (Nutr.

Bioavailability Ca, ) pp. 157-164.

- STEGINK, L.D., PITKIN, R.M. (1977). "Placental transfer of glucose-Amino acids complexes present in parenteral solutions". *Am. J. Clin. Nutr.*, 30, pp. 1087-1093.
- STEGINK, L.D., FREEMAN, J.B., DENBESTEN, L., FILER, L.J. (1981). "Maillard reaction products in parenteral nutrition". *Prog. Food Nutr. Sci.*, 5, 265-278.
- STILLINGS, B., HAMMERIE, O., SNYDER, D. (1969). "Sequence of limiting amino acids in fish protein concentrate produced by isopropyl alcohol extraccion of red hake (*Vrophyeis chuss*)". *J. Nutrition*, 97, 70.
- SUGIMURA, T. (1978). "Let's be scientific about the problem of mutagens in cooked food". *Mut. Res.* 55: 149-152.
- SUGIMURA, T. (1985). "Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking processing". *Mut. Res.*, 150, pp. 33-41.
- TARR, H.L.A. (1954). *Food Technology*, 8, 15. Citado por TARR, H.L.A. (1960). "Effects of processing on fish products". En: "Nutritional evaluation of food processing". pp. 283-291. Ed. Harris y Von Loesecke. John Wiley. New York and London.
- TARR, H.L.A. (1962) "Changes in nutritive value in cooking". En: "Fish as food II." pag. 240. Ed. Borgstrom, G. Academic Press. New York and London.
- THALER, H. (1961). *Wiss Veroffl. Dtsch. Ges Ernahr.*, 9, 327. Stein Kopff. Darmstadt. Citado por LANG, K. (1970). "Influence of cooking on foodstuffs". *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 12, pp. 226-317.

- TOOLEY, P.J. (1972). "The effect of deep-fat frying on the availability of fish lysine". Proc. Nutr. Soc., 31, 2A.
- TOOLEY, P.J., LAWRIE, R.A. (1974) "Effects of deep fat frying on the availability of lysine in fish fillets". Food Technology, 9, 247-253.
- UNDERWOOD, E.J. (1977). "Trace elements in human and animal nutrition". E.J. Underwood, ed., 4th ed. Academic Press. New York. Cap. 2, Iron. pp. 13-55.
- VAN DOKKUM, W., CLOUGHLEY, F.A., HULSOFF, K.F.A.M., OOSTERVEEN, L.A.M. (1983). "Effect of variations in fat and linoleic acid intake on the calcium, magnesium and iron balance of young men". Am. Nutr. Metab., 27: 361-369.
- VAN DOKKUM, W. (1989). "The significance of speciation for predicting mineral bioavailability". En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 89-96. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
- VAN CAMPEN, D., GROSS, E. (1969). J. Nutr., 99, 68. Citado por LÖNNERDAL, Bo. (1989). En: "Nutrient availability: Chemical and Biological aspects". pp 131-139. Ed. Southgate, D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, England.
- VAN CAMPEN, D.R. (1973). "Enhancement of iron absorption from ligated segments of rat intestine by histidine, cysteine and lysine: effects of removing ionizing groups and of stereoisomerism". J. Nutrition, 103. pp. 139-142.
- VAQUERO, M.P., VAN DOKKUM, W., BOS, K.D., WOLTERS, M.G.E., SCHAAFSMA, G., LUTEN, J.B. (1992). "In vitro availability of

calcium, magnesium, iron, copper and zinc from white or brown bread separately or in combination with other foods". *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 32 (1), pp. 47-58.

- VARELA, G. (1977). "Les graisses chauffées: contribution à l'étude du processus de la friture des aliments". *Bibl. Nutr. Dieta*, 25, 112-121.
- VARELA, G. (1980). "Nutritional aspects of olive oil in the frying process". *Actas del III Congreso Internacional sobre el valor biológico del aceite de oliva*. Creta, 8-12. Septiembre.
- VARELA, G., MOREIRAS-VARELA, O., REQUEJO, A. (1985). *Estudios de nutrición*. Vol. I y II. Publicaciones del Instituto Nacional de Estadística. Madrid.
- VARELA, G., MOREIRAS-VARELA, O., REQUEJO, A. (1985 b). "Estudios de Nutrición". Vol. I y II. Publicaciones del Instituto Nacional de Estadística. Madrid.
- VARELA, G., BENDER, A.E., MORTON, I.D. (1988). "Frying of Food. Principles, Changes, New Approaches". Ellis Horwood, Chichester. England, pp. 1-202.
- VARELA, G., PEREZ, M., RUIZ ROSO, B (1990). "Changes in the quantitative and qualitative composition of the fat from fish, due to seasonality and industrial and culinary processing." *Bibl. Nutr. Dieta*. nº 46. pag 104.
- VARELA, P., MARCOS, A., NAVARRO, M.P. (1992). "Zinc status in anorexia nervosa". *Ann. Nutr. Metab.* (Aceptado para su publicación).
- VIIJO, J.M. (1992). "Utilización de sardinas fritas en aceite de oliva en el tratamiento de hipercolesterolemia experimental inducida por la dieta". Tesis

Doctoral. Facultad de Farmacia. U.C.M.

- VIOLA, P. (1969). "Las grasas en la alimentación humana. El aceite de oliva". Ed. Consejo Oleícola Internacional. Madrid, pp. 135.
  
- WALLER, G.R., FEATHER, H.S. (1983). "The Maillard reaction in foods and nutrition." G.R. Waller Ed. Am. Chem. Soc. USA.
  
- WAPNIR, R.A., KHANI, D.E., BAYNE, M.A., LIFSHITZ, F. (1983). *J. Nutr.* 113, 1346. Citado por LÖNNERDAL, Bo (1989). En: "Nutrient availability: Chemical and biological aspects". pp. 131-139. Ed. Southgate. D., Johnson, I., Fenwick, G.R. Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. England.
  
- WAUGH, D.F., NOBLE, R.W. (1965). "Casein micelles, formation and structure". *J. Am. Chem. Soc.* 87, pg. 2236. Citado por ALAIS, A., BLANC, B. (1975). "Milk proteins: Biochemical and biological aspects". *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 20, pp. 61-167.
  
- WHITELOW, M.L., WEAVER, C.M. (1988). "Maillard browning effects on in vitro availability of zinc". *J. Food Sci.*, 53, nº5, 1508-1510.
  
- WIENER, G., WILMUT, I., WOOLLIAMS, J.A., FIELD, A.C. (1984). *Anim. Prod.* 39. 207.
  
- WILLIAMS, R.P.J. (1989). "An introduction to the biochemistry of zinc". En: "Zinc in human biology". Ed. Mills, C.F. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. New York.
  
- YAMAUCHI, K., AZUMA, N., KOBAYASHI, H. (1981). "Isolation and properties of human K-casein". *J. Biochem.* 90: 1005-1012.
  
- YAÑEZ, R., BALLESTER, D., DONOSO, G. (1970) "Effect of drying

temperature on the quality of fish protein". *J. Sci. Food Agric.*, 21, 426-428.

- ZACHARIAS, R. (1977). "Effets of domestic and large scale cooking on the quality and nutritive value of vegetables and fruits". En: "Food Quality and Nutrition". Ed. Downey, W.K., Applied Science Publishers. London, pp 387-410.
- ZERWEKH, J.E., CYC, P. KAPLAN, R.A. (1980). "Pathogenetic role of  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D in sarcoidosis and absorptive hypercalciuria: Different response to prednisolone therapy". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51, 381-386.
- ZIEZULKA, A.Y., CALLOWAY, D.H. (1976). "Nitrogen retention in men fed isolated soybean protein supplemented with L-methionine, D-methionine, N-acetyl-L-methionine or inorganic sulphate. *J. Nutr.* 106: 1286-1291.
- ZIDLERMAN, I.I., GUMBMANN, M.R., FRIEDMAN, M. (1988). "Thermally-induced toxicity of proteins and their non-maillardian browning with carbohydrates". *Front. Gastrointest. Res.*, vol 14, pp 91-97.