

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

**Caracterización de líneas de trigo para contenido en grano de
hierro (Fe) libre o potencialmente biodisponible y de ácido
fítico**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Especialista en Biotecnología

P R E S E N T A

Anayeli Sarai Morales Dorantes
Ingeniera en Alimentos

México D.F, julio del 2015.

El lector designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Izatapalapa aprobó la idónea comunicación de resultados.

Caracterización de líneas de trigo para contenido en grano de hierro (Fe) libre o potencialmente biodisponible y de ácido fítico


que presentó:

Anayeli Sarai Morales Dorantes

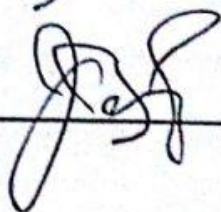
Comité Tutorial:

Directores:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero



Dr. Roberto Javier Peña Bautista



Lector:

Dr. Carlos Guzmán García



ABSTRACT

Wheat grain and wheat-based foods contain micronutrients with different bioavailability degrees. Wheat's micronutrient bioavailability of wheat hinder the potential impact of new wheat cultivars bred to contain high levels of iron (Fe) and zinc (Zn). Bread wheat (*Triticum aestivum* L.), is one of the most consumed cereals in the world, only behind rice, it represents an important source of protein, carbohydrates, vitamins and minerals. However, the presence of considerable amounts of phytic acid (1 -2%) in cereal grains and legume seeds, which primary role is to store phosphorus as a source of energy for the plant, is a great concern, mainly because phytic acid is reduces the uptake of micronutrients such as Fe and Zn, since it can be a minerals chelating agent.

The thesis objectives were: 1) to develop a technique for the determination of free iron or also called potentially bioavailable iron (FePB) and to validate a rapid and functional technique for the quantification of phytic acid present in different varieties of bread wheat; and 2) to determine the effect of fermentation time during the bread-making process on the enhancement of the bioavailability of iron, through the concomitant enhancement of the hydrolysis of the phytate-mineral complex present in the bread making dough.

Analysis of 20 wheat varieties showed a small variability in the concentration of free iron (8.9 - 12.1 mg / kg), while for phytic acid is larger (0.522 - 0.705 g / 100 g).

Correlation analysis also revealed no relationship ($R^2 = 0.0319$) between the concentration of phytic acid and free, potentially bioavailable, iron.

On the other hand leavened bread of 3 known varieties of bread wheat was prepared using five different fermentation times (90, 150, 180, 210 and 240 minutes). The shortest fermentation time (90 min) proved to be enough to degrade about 56% of phytic acid present in wheat flour, while yielding the best volume for bread loaf.

Therefore, the methodologies developed could be used in breeding programs to select lines with lower phytic acid as well as those with higher content of FePB. The goal is to increase the concentration of iron in wheat's grain, as well as the conservation of the quality in products of this cereal as bread and also to obtain products with high nutritional value for vulnerable populations.

RESUMEN

El grano de trigo y los alimentos a base de este contienen micronutrientes con diferente grado de biodisponibilidad. La biodisponibilidad de micronutrientes de trigo puede dificultar el impacto potencial de las nuevas variedades de trigo criadas para contener altos niveles de hierro (Fe) y zinc (Zn). El trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) es uno de los cereales más consumidos en el mundo, sólo por detrás de arroz, representa una fuente importante de proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales. Sin embargo, la presencia de cantidades considerables de ácido fítico (1 -2%) en los granos de cereales y semillas de leguminosas, cuya principal función es almacenar fósforo como fuente de energía para la planta, es de gran preocupación, sobre todo porque el ácido fítico reduce la absorción de micronutrientes tales como Fe y Zn, ya que puede funcionar como un agente quelante de minerales.

Los principales objetivos de esta tesis fueron: 1) el desarrollo de una técnica para la determinación de hierro libre o también llamado hierro potencialmente biodisponible (fepB) y validar una técnica rápida y funcional para la cuantificación de ácido fítico presente en diferentes variedades de trigo harinero; y 2) determinar el efecto del tiempo de fermentación durante el proceso de panificación sobre la mejora en la biodisponibilidad del hierro, a través de la mejora concomitante de la hidrólisis del complejo fitato-mineral presente en la masa para la fabricación de pan.

Análisis de 20 variedades de trigo mostraron la estrecha variabilidad en la concentración de hierro libre (08/09 a 12/01 mg / kg), mientras que para el ácido fítico es grande (0,522-0,705 g / 100 g) variedades. El análisis de correlación también reveló ninguna relación ($R^2 = 0,0319$) entre la concentración de ácido fítico y libre, potencialmente biodisponibles, hierro.

Por otra parte se elaboró pan de caja de 3 variedades conocidas de trigo harinero usando cinco tiempos de fermentación diferentes (90, 150, 180, 210 y 240 minutos). El tiempo de fermentación más corto (90 min) demostró ser suficiente para degradar alrededor del 56% de ácido fítico presente en la harina de trigo, mientras produce el mejor volumen de pan.

Por lo tanto, las metodologías desarrolladas podrían utilizarse en programas de mejoramiento para seleccionar líneas con menor contenido de ácido fítico y así como aquellos con un mayor contenido de FePB. El objetivo es incrementar la concentración de hierro en el grano de trigo, sino también la conservación de la calidad en los productos de este cereal como por ejemplo el pan y de esta manera obtener productos con alto valor nutricional para las poblaciones vulnerables.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a todas y cada una de las personas que me ayudaron a la realización de este proyecto, en especial al Dr. Roberto Javier Peña por darme la oportunidad de seguir preparándome y superándome profesionalmente. Así mismo agradezco al Dr. Carlos Guzmán por brindarme su apoyo, sus conocimientos y proporcionarme las facilidades para la elaboración de este trabajo. Agradezco a la Dra. Alma E. Cruz por haber aceptado ser mi asesora interna dentro de la UAM-I y por haberme brindado su tiempo para las revisiones, además de contribuir con sus conocimientos para la realización de este proyecto y sobre todo por ser paciente conmigo.

También agradezco a mis compañeros del laboratorio de Calidad de Trigo del CIMMYT (Héctor, Cinthia, Sofía, Eber, Orlando, Fausto y Arturo) porque cada uno de ellos de cierta manera me ayudo para poder llevar a cabo mi investigación. En especial agradezco a mi compañero Ing. Gabriel Posadas por ayudarme a montar las técnicas descritas en este trabajo y por aportarme tan valioso conocimiento. Gracias a todos ustedes.

Gracias al Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT) por permitirme llevar a cabo mi investigación dentro del laboratorio de Calidad de Trigo.

Finalmente agradezco a mi familia, mis padres, mis hermanos y mi novio por el amor y apoyo brindado, así como su comprensión y paciencia.

INDICE

ABSTRACT	iii
RESUMEN	v
AGRADECIMIENTOS	vii
INDICE	viii
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABLAS	13
INTRODUCCION	14
ANTECEDENTES	16
El trigo harinero (Triticum aestivum L.)	16
El hierro	21
Formas de hierro en la dieta.....	24
Química del Hierro.....	25
Estados de valencia	25
Solubilidad de Hierro ferroso y férrico.	25
Formación de complejos	26
Generalidades sobre el ácido fítico	26
Propiedades químicas del Fitato	27
Usos del ácido fítico	28
Generalidades de las fitasas	29

Técnicas de detección y cuantificación de hierro	31
Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)	31
Fluorescencia de rayos X (XRF).....	33
Estrategias para reducir la deficiencia de micronutrientes	34
JUSTIFICACION	38
OBJETIVO GENERAL.....	39
OBJETIVOS PARTICULARES.....	39
HIPOTESIS	40
METODOLOGIA	41
Material vegetal	41
Preparación de muestras.....	41
Determinación de hierro potencialmente biodisponible.....	41
Determinación de ácido fítico	46
Determinación de ácido fítico en pan con diferentes tiempos de fermentación	52
Metodología para la elaboración de pan de caja.	53
RESULTADOS.....	56
Hierro Potencialmente Biodisponible (FePB)	56
Ácido Fítico.....	62

Determinación de ácido fítico en pan con diferentes tiempos de fermentación	68
DISCUSION	76
Hierro Potencialmente Biodisponible (FePB)	76
Ácido Fítico	78
Determinación de ácido fítico en pan con diferentes tiempos de fermentación	80
Calidad física del pan	80
Ácido fítico en harina integral y harina refinada para las muestras utilizadas en la elaboración de pan de caja.	81
Ácido fítico en pan	82
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFIA	87

LISTA DE FIGURAS

1. A,B . Efecto de pH y metales en la fisiología natural del fitato	28
2. Productos generados a partir de la hidrólisis del ácido fítico (IP ₆)	30
3. Relación entre repeticiones (1, 2 y 3) para el análisis de hierro potencialmente biodisponible	56
4. Relación entre la técnica de ICP y técnica de Rayos X para la determinación de hierro total	59
5. Variabilidad en la concentración de hierro total medido por ICP y XRF; y variabilidad para FePB de las 20 muestras	60
6. Variabilidad de hierro potencialmente biodisponible (%) respecto a la concentración total de hierro	61
7. Relación entre la concentración total de hierro y el potencial de biodisponibilidad.....	62
8. Relación entre el método comercial de Megazyme y el Micro-método para la determinación de ácido fítico (g/100g)	63
9. Relación entre el método comercial de Megazyme y el micro-método	64
10. Variabilidad en cuanto a la concentración de ácido fítico (g/100g)	66
11. Relación entre el hierro potencialmente biodisponible y ácido fítico	67
12. Relación entre el Hierro potencialmente biodisponible y la relación molar Fitato:Fe	67
13. Efecto del tiempo de fermentación en el volumen de pan.....	70

14. Diferencia en cuanto al volumen de pan para la variedad Torocahui en diferentes tiempos de fermentación.....	70
15. Diferencia del color de la corteza del pan para la variedad Torocahui en diferentes tiempos de fermentación.....	70
16. Contenido de ácido fítico en harina integral y harina refinada para las variedades Kronstad, Roelfs y Torocahui.....	73
17. Relación entre el contenido de cenizas (%) y la concentración de ácido fítico en harina refinada (g/100g)	74
18. Relación entre el contenido de cenizas (%) y dureza de grano.....	74
19. Contenido de ácido fítico en pan para las variedades Kronstad, Roelfs y Torocahui con 4 diferentes tiempos de fermentación (90, 150, 180 y 210 min) .	75

LISTA DE TABLAS

1. Composicion aproximada de nutrientes (%) en el grano de trigo y harina refinada	18
2. Tiempos de fermentación establecidos para la elaboración de pan para las 3 variedades (Kronstad, Roelfs y Torocahui).	54
3. Cuadro de resultados de las 20 muestras analizadas para potencial de biodisponibilidad.....	58
4. Cuadro de resultados de las 20 muestras para contenido de ácido fítico, por dos métodos (Megazyme y Micro-método) y valores de relaciones molares.	65,66
5. Cuadro de resultados para parámetros de calidad de pan de las variedades Kronstad, Roelfs y Torocahui con 5 diferentes tiempos de fermentación.	69
6. Contenido de ácido fítico para las variedades Kronstad, Roelfs y Torocahui en harina integral, harina refinada y en pan con diferentes tiempos de fermentación.....	72

INTRODUCCION

El ácido fítico (myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexafosfato, IP6) es un compuesto formado por inositol esterificado con seis grupos fosfato cargados negativamente. El ácido fítico (AF) interacciona fuertemente con componentes de los alimentos que se encuentren cargados positivamente, tales como minerales (Konietzny y Greiner, 2003), formando fitatos. Debido a que el ser humano presenta una limitada capacidad de hidrolizar el AF y los complejos de fitato, generalmente hay una importante disminución en la absorción de varios micronutrientes tales como el zinc, hierro, magnesio, manganeso y cobre que se encuentren formando complejos de fitato (Konietzny y Greiner, 2004).

El hierro es uno de los micronutrientes más importantes y esenciales para nuestro organismo, debido a que forma parte del grupo hemo de la hemoglobina, la cual es responsable del transporte del oxígeno a las células, además de ayudar a la metabolización de vitaminas. Se sabe que desde hace varias décadas el hierro es ingerido en cantidades insuficientes en la dieta: a nivel mundial aproximadamente 2 mil millones de personas sufren de su deficiencia (Hurrell, 2001), lo que resulta en una baja eficiencia laboral, un alto costo en atención médica, el aumento de las tasas de muerte prematura y la discapacidad permanente de las habilidades cognitivas de los niños (Welch y Graham 2004).

Entre las estrategias que hay en la actualidad para afrontar la falta de micronutrientes en la dieta están la fortificación y biofortificación de los alimentos. La primera se basa en la adición controlada de cantidades específicas de vitaminas y

minerales a los alimentos o a sus materias primas, mientras que la biofortificación consiste en provocar de manera natural (mediante el mejoramiento genético) la presencia de altas concentraciones de micronutrientes como el hierro y el zinc en el grano de trigo del cual se genera harina la cual se utiliza en la elaboración de alimentos. Con base en esta última estrategia, surge el proyecto de la generación de líneas de trigo mejoradas con alto contenido de hierro y zinc que puedan tener una mayor cantidad de estos minerales como una solución para el problema de la carencia de este micronutriente de la dieta de millones de consumidores que tienen como fuente principal de nutrientes a cereales tales como el trigo.

Existen diversas tecnologías para la determinación y cuantificación de diversos elementos como el hierro en el trigo y otros cereales. Entre estas tecnologías se encuentran la Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) y la Fluorescencia de rayos X (XRF), las cuales pueden ser utilizadas para identificar y/o cuantificar un gran número de elementos de la tabla periódica, utilizando protocolos y calibraciones adecuadas. La técnica de ICP fue utilizada en este trabajo como referencia para conocer la concentración total de hierro presente en el grano de trigo.

Para poder estimar la cantidad de hierro potencialmente biodisponible (FePB), en el presente trabajo se utilizó una simulación de las condiciones que ocurren durante el proceso de digestión estomacal (pH, temperatura corporal, tiempo que tarda el organismo durante el proceso de digestión y adición de enzima pepsina). Para esto, diferentes muestras de harina fueron sometidas a estas condiciones para

posteriormente determinar el contenido de hierro libre, el cual es el único que nuestro organismo asimila. Por tal motivo es importante conocer la relación que existe entre la concentración total de hierro y la concentración de hierro libre o potencialmente biodisponible tras un proceso simulado de digestión, así como el saber cómo afecta el proceso de panificación sobre la hidrólisis del ácido fítico.

ANTECEDENTES

El trigo harinero (*Triticum aestivum* L.)

A nivel mundial el trigo es el segundo cereal que más se utiliza en la alimentación humana. La importancia del trigo en la dieta de los seres humanos reside principalmente en su alto valor energético, además que contiene más minerales y proteínas que el maíz y el arroz. A su ventaja nutritiva se suman su alta concentración de fibra dietética y compuestos bioactivos importantes para la salud, así como sus características de procesamiento únicas entre los cereales, que lo colocan entre los que más se utilizan como materia prima para elaborar una gran diversidad de alimentos procesados y varios otros productos no alimentarios (Peña *et al.* 2007).

Los componentes químicos de los cereales se distribuyen de manera variable en diferentes partes del grano. La Tabla 1 proporciona el valor nutritivo que posee el trigo en grano y en harina. El salvado, que representa 7% del grano, contiene la mayoría de la fibra del grano, esencialmente celulosa y pentosanos, es fuente de

vitaminas del grupo B, y el 40-70% de los minerales se concentran en su capa exterior. El endospermo, que es la parte principal del grano (80-85%), contiene principalmente almidón, tiene menor contenido de proteínas y lípidos que el germen y el salvado, y es pobre en vitaminas y minerales. (Preedy *et al.* 2011). El germen representa aproximadamente de 2.5 a 3% del peso del grano y se localiza en un extremo del grano, el cual tiene una alta concentración de aminoácidos, además es rico en vitaminas, proteínas, minerales como el potasio y el fósforo, grasas insaturadas y antioxidantes. El germen es también conocido como embrión y es a partir de esta parte del grano que se origina el crecimiento de una nueva planta.

Tabla 1.- Composición aproximada de nutrientes (%) en el grano de trigo y harina refinada (Preedy *et al.* 2011).

Componentes	Grano	Harina
Energía (kcal)	329	364
Carbohidratos totales (g)	68	76.3
Fibra dietética (g)	12	2.7
Grasa total (g)	1.9	1
Grasa saturada (g)	0.3	0.2
Grasa monoinsaturada (g)	0.3	0.1
Grasa poliinsaturada (g)	0.8	0.4
Proteína (g)	15.4	10.3
Aminoácidos		
Triptofano (mg)	195	127
Treonina (mg)	435	281
Isoleucina (mg)	541	357
Leucina (mg)	1038	710
Lisina (mg)	404	228
Metionina (mg)	230	183
Cistina (mg)	404	219
Fenilalanina (mg)	724	520
Tirosina (mg)	441	312
Valina (mg)	679	415
Arginina (mg)	702	417
Histidina (mg)	330	230
Alanina (mg)	555	332
Ácido Aspártico (mg)	808	435
Ácido Glutámico (mg)	4946	3479
Glicina (mg)	621	371
Prolina (mg)	1680	1198
Cerina (mg)	663	516
Vitaminas		
Vitamina A (IU)	9	-
Vitamina E (mg)	1.0	0.1
Vitamina K (µg)	1.9	0.3
Tiamina (mg)	0.5	0.1
Rivoflavina (mg)	0.1	-
Niacina (mg)	5.7	1.3
Vitamina B ₆ (mg)	0.3	-
Folato (µg)	43	26
Ácido pantoténico (mg)	0.9	0.4
Colina (mg)	31.2	10.4
Minerales		
Calcio (mg)	25	15
Hierro (mg)	3.6	1.2
Magnesio (mg)	124	22
Fósforo (mg)	332	108
Potasio (mg)	340	107
Sodio (mg)	2	2
Zinc (mg)	2.8	0.7
Cobre (mg)	0.4	0.1
Manganeso (mg)	4.1	0.7
Selenio (µg)	70.7	33.9

La calidad del grano de trigo es evaluada mediante ciertos parámetros físicos, químicos y reológicos. Entre los más importantes se encuentran:

- Pureza varietal
- Actividad enzimática del grano
- Peso hectolítrico
- Peso de mil granos
- Porcentaje de granos vítreos
- Contenido de cenizas en grano
- Humedad en grano
- Dureza de grano
- Contenido de proteína en grano
- Características de amasado
- Características de fuerza de gluten
- Sedimentación

A continuación se describen algunos de los parámetros más relevantes evaluados en este proyecto.

Pureza varietal. Los perfiles de proteínas de gluten del grano (gluteninas y gliadinas, separadas en forma de bandas por electroforesis) de una variedad se consideran como las “huellas” o “perfiles de identidad” de la misma, y permite determinar tanto identidad como si una muestra de grano o harina pertenece a una variedad o mezcla de variedades de trigo.

Actividad enzimática del grano. Si la etapa final del cultivo —durante el llenado de grano (madurez)— coincide con exceso de humedad ambiental (debido a la precipitación pluvial o al acame o volcadura de las plantas), es posible que el grano

germine en la espiga y esto a la vez provoque un incremento significativo de actividad enzimática (sobre todo de alfa-amilasa), cuya presencia a niveles elevados afecta negativamente la calidad de las masas de panificación y de la miga del pan. Las cosechas de trigo con valores de Falling Number mayores a 250-300 segundos son generalmente aceptables, ya que estos niveles de actividad enzimática no causan deterioro en la masa durante la fermentación.

Peso hectolítrico. El peso hectolítrico (peso del grano/volumen ocupado) es una medida de la densidad del grano y, por tanto, de la calidad de llenado de grano. Este parámetro se define principalmente por la morfología del grano característico de la variedad. Normalmente, los valores de peso hectolítrico suele considerarse como un indicador del potencial de rendimiento harinero que posee un lote de trigo durante la molienda. Así los lotes de trigo con peso hectolítrico bajo (menos de 75kg/hl en trigo de temporal) suelen mostrar bajos rendimientos de harina.

Contenido de cenizas en grano. El contenido de minerales (cenizas) en el grano es importante ya que si su concentración es alta, sobre todo en granos con bajo peso hectolítrico, puede contaminar de manera significativa la harina de la molienda. Los altos niveles de contaminación con cenizas son particularmente indeseables debido a que las partículas oscurecen la harina. Los niveles de concentración de cenizas en grano que se consideran deseables deben ser menores a 2.0%.

Humedad en grano. Los contenidos de humedad mayores a 14% favorecen el daño que causa la presencia de microorganismos durante el almacenamiento temporal.

Dureza de grano. Tiene gran influencia en la capacidad de absorción de agua de las harinas. En la industria de la panificación se prefiere harina de trigo harinero semi-duro a duro, ya que la mayor cantidad de almidón dañado de estas harinas favorece la fermentación durante la panificación y la retención de humedad durante el periodo de frescura del producto terminado. La harina de trigo suave o blando tiene mayor demanda en la industria galletera por el bajo porcentaje de almidón dañado producido durante el proceso de molienda.

Contenido de proteína en grano. El contenido de proteína indica si la fertilización donde se siembra el trigo son adecuadas o tiene que corregirse. Un bajo contenido de proteína es indicio de que el cultivo no cuenta con suficiente nitrógeno en la fase de llenado de grano.

El hierro

Es un mineral esencial para la mayoría de las diferentes formas vivientes y para la fisiología humana normal. La cantidad promedio de hierro en nuestro organismo es de alrededor de 4.5 g. Este es un micronutriente u oligoelemento indispensable para la vida, ya que funciona como un componente de proteínas, incluyendo enzimas y la hemoglobina, siendo esta última importante para el

transporte de oxígeno a los tejidos de todo el cuerpo. La cantidad diaria recomendada de hierro es de aproximadamente 16 a 18 mg/día; el hierro contenido en los alimentos es hidrolizado en el estómago y después absorbido.

Funciones que desempeña el hierro:

- Es indispensable para el transporte de oxígeno por la sangre hacia los tejidos. El grupo hemo o hem que forma parte de la hemoglobina y mioglobina está compuesto por un átomo de hierro. Estas proteínas transportan y almacenan oxígeno en nuestro organismo. La hemoglobina, proteína de la sangre, transporta el oxígeno desde los pulmones hacia el resto del organismo. La mioglobina juega un papel fundamental en el transporte y el almacenamiento de oxígeno en las células musculares, regulando el oxígeno de acuerdo a la demanda de los músculos cuando entran en acción.
- Forma parte de la estructura de enzimas, como por ejemplo, la catalasa y peroxidasa, que nos defiende contra los radicales libres, como el peróxido de hidrógeno (químico que daña a las células), que es convertido por estas enzimas en oxígeno y agua.
- Es necesario para la metabolización de las vitaminas del grupo B.
- Metabolismo de energía: interviene en el transporte de energía en todas las células a través de los citocromos que tienen al grupo hemo o hem (hierro) en su composición.

- Sistema nervioso: el hierro participa en la regulación de los mecanismos bioquímicos del cerebro, en la producción de neurotransmisores y en otras funciones encefálicas relacionadas al aprendizaje y la memoria como también en ciertas funciones motoras y reguladoras de la temperatura.
- Sistema inmune: la enzima mieloperoxidasa está presente en los neutrófilos que forman parte de las células de la sangre encargadas de defender al organismo contra las infecciones o materiales extraños. Esta enzima, que presenta en su composición un grupo hemo (hierro), produce sustancias (ácido hipocloroso) que son usadas por los neutrófilos para destruir las bacterias y otros microorganismos.

Su déficit puede provocar:

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la deficiencia de hierro se considera el primer desorden nutricional en el mundo. Aproximadamente el 80 % de la población tendría deficiencia de hierro mientras que el 30 % padecería de anemia por deficiencia de hierro. El desarrollo de la deficiencia de hierro es gradual y el comienzo se da con un balance negativo de hierro, es decir, cuando la ingesta de hierro de la dieta no satisface las necesidades diarias; entonces se produce una disminución en el depósito de hierro del organismo el cual se encuentra en la médula ósea, lo cual ocasiona que los niveles de hemoglobina permanezcan normales. Por otro lado la anemia por deficiencia de hierro (anemia ferrotípica) es un estadio avanzado en la disminución del hierro; aquí los niveles de hemoglobina se

encuentran por debajo de lo normal. Cuando se producen deficiencia en el hierro, pueden darse las siguientes situaciones:

- Fatiga.
- Bajo rendimiento.
- Anemia.
- Dificultad para realizar esfuerzos.
- Partos prematuros.
- Inapetencia.
- Uñas y cabello frágiles y quebradizos.
- Dificultad de concentración.
- Debilidad muscular.
- Repercute en el desarrollo mental de bebés y niños.
- Mareos.
- Palidez.
- Taquicardías.
- Mayor susceptibilidad a infecciones.
- Dificultades respiratorias.
- Glositis (inflamación de la lengua).
- Dificultad para mantener la temperatura corporal.
- Dolor de cabeza.
- Irritabilidad.
- Vértigo.
- Pérdida de peso. (NAP, 2001)

Formas de hierro en la dieta

El hierro está presente en los alimentos, tanto en forma inorgánica (férrico y ferroso) y orgánica (principalmente del tipo hemo). El hierro hemo se deriva principalmente de la hemoglobina y la mioglobina de alimentos como la carne,

pescados y aves de corral. Alrededor del 40 % del hierro presente en la carne, el pescado y las aves de corral es del tipo hemo. Otras fuentes de hierro no hemo son los productos lácteos, los huevos y los alimentos vegetales como frijoles, cereales, frutos secos, frutas y verduras.

Química del Hierro

La diferencia en la absorción de hierro de diversos alimentos o comidas depende en parte de las propiedades químicas del hierro.

Estados de valencia

El hierro está presente naturalmente en los alimentos en forma de hierro ferroso (Fe^{2+}) o hierro férrico (Fe^{3+}). La forma férrica se reduce a ferroso con la presencia de ácido clorhídrico y agentes reductores tales como ácido ascórbico.

- Reducción: $\text{Fe}^{3+} + e \rightarrow \text{Fe}^{2+}$
- Oxidación: $\text{Fe}^{2+} - e \rightarrow \text{Fe}^{3+}$, donde e = electrón.

Solubilidad de Hierro ferroso y férrico.

Tanto el hierro ferroso y férrico son fácilmente solubles en las condiciones ácidas del estómago. Con el aumento del pH en el intestino delgado, donde tiene lugar la mayor parte la absorción de hierro, el hierro férrico no es soluble y por lo tanto es menos absorbible.

Formación de complejos

Durante la digestión, el hierro no hemo puede cambiar su estado de valencia y rápidamente formar complejos de hierro-quelatos, con ligandos obtenidos de la dieta tales como el ácido ascórbico, el fitato, taninos, y oxalato. La estabilidad del hierro-quelato aumenta con la concentración del ligando quelante. La resistencia de la unión de hierro-quelato, la solubilidad del complejo, y los factores ambientales tales como el pH y la presencia de otros agentes quelantes, determinan si el hierro está disponible para su absorción por las células de la mucosa.

Generalidades sobre el ácido fítico

El ácido fítico (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexafosfato, IP6) es un compuesto formado por inositol esterificado con seis grupos fosfatos; las sales de éste son conocidas con el término de fitato. El fitato es la principal forma de almacenamiento de inositol y fosfato en las semillas de plantas y en granos. El fitato se forma durante la maduración de las plantas y en la germinación de las semillas, representando el 60-90 % del fosfato total (Loewus, 2001). Debido a los 6 grupos fosfatos, el fitato se encuentra cargado negativamente en un amplio rango de pH, interaccionando fuertemente con componentes de los alimentos que se encuentren cargados positivamente, tales como minerales, elementos traza y proteínas (Konietzny y Greiner, 2003). Esta interacción afecta la calidad nutricional, además del rendimiento y la calidad de los alimentos, ya que el fitato puede quelar fuertemente varios micronutrientes.

Los 6 grupos fosfato del ácido fítico muestran una fuerte capacidad para quelar cationes de minerales como zinc, hierro, magnesio, manganeso y cobre (Konietzny y Greiner, 2003). La formación de complejos de fitato-mineral a valores de pH fisiológico conduce a una pobre biodisponibilidad de estos minerales, ya que estos complejos no son absorbidos en el tracto gastrointestinal de humanos y animales monogástricos. La solubilidad y la estabilidad de los complejos fitato-mineral decrecen a medida que los residuos de fosfato son removidos del fitato, por lo cual la remoción de fosfatos del fitato mejora la absorción de los minerales que interaccionan con éste (Han *et al.* 1994). Por tal motivo el fitato es considerado como un factor anti nutricional debido a su acción quelante sobre cationes divalentes, como Ca^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} , y la interacción con proteínas importantes nutricionalmente disminuyendo la biodisponibilidad de ambos nutrientes (Urbano *et al.* 2000).

Propiedades químicas del Fitato

El fitato puede existir en forma libre o como complejo de fitato-metal dependiendo del pH y la concentración de cationes en la solución (Fig. 1A). A pH ácido, la protonación de los grupos fosfatos del fitato genera una forma libre sin interacciones con metales. En contraste, a pH neutro la desprotonación de los grupos fosfatos cargados negativamente hace que estos interactúen con metales catiónicos divalentes, principalmente Mg^{2+} y Ca^{2+} , formando el complejo fitato-metal.

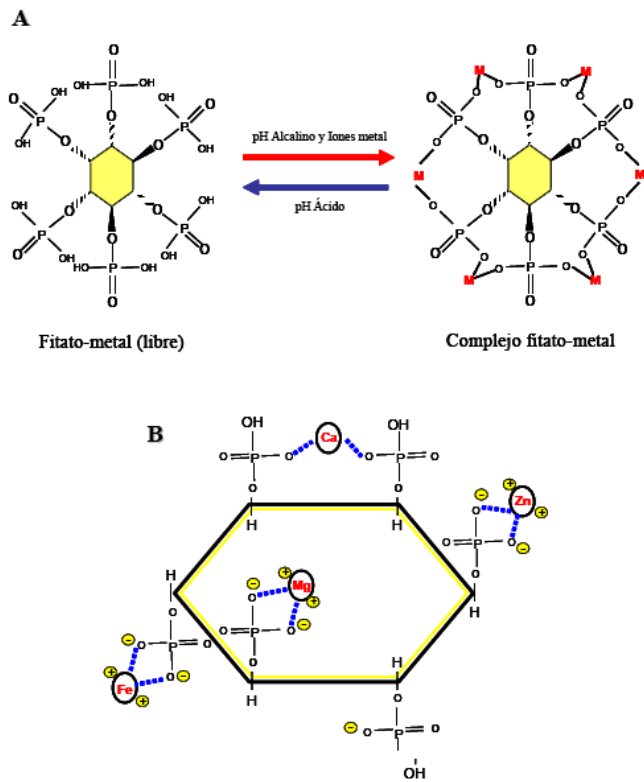


Fig. 1 A, B. Efecto de pH y metales en la fisiología natural del fitato. **A.** El fitato existe en forma libre y como complejo fitato-metal, dependiendo del pH y, de los metales catiónicos divalentes. La magnitud del enlace depende del pH y la relación del metal-fitato. A valores de pH alcalino y alta concentración del catión se forma el complejo fitato-metal debido a la interacción electrostática directa. **B.** Los metales con cationes divalentes enlazan los grupos fosfatos del fitato dependiendo del radio iónico de los cationes.

Para producir la hidrólisis del ácido fítico de una manera eficaz, se hace necesaria la presencia de enzimas con actividad fosfohidrolasa llamadas fitasas.

Usos del ácido fítico

Una serie de beneficios en la salud humana se le han adjudicado al uso del ácido fítico pues es reconocido como un agente anti-cáncer (tejido blando, de colon, cáncer de pulmón metastásico y cáncer de mama), (Owen *et al.* 1996 y Schröterová

et al. 2010) inhibidor para el desarrollo de cálculos renales (Grases *et al.* 2000) y también funciona como agente antioxidante, debido a la capacidad del fitato para unirse al hierro en el tracto gastrointestinal ya que podría prevenir que el hierro inorgánico no absorbido actúe como generador de radicales libres (Febles 1998). Aunque no se le dio al ácido fítico la condición de “Generalmente Reconocido como Seguro” (GRAS) por la Administración de los Estados Unidos de Alimentos y Medicamentos en su lista de 1995, este ha sido ampliamente utilizado como aditivo alimentario fuera de los E.U. El ácido fítico se añade rutinariamente a las carnes, pastas de harina de pescado, mariscos enlatados, frutas, verduras, queso, fideos, salsa de soja, zumos, pan y bebidas alcohólicas para evitar la decoloración del producto y prolongar la vida útil (elevadas concentraciones de ácido fítico previenen el pardeamiento y la putrefacción de varias frutas y verduras mediante la inhibición de la polifenol oxidasa) (Febles 1998). Para 1997, el fitato de sodio fue clasificada como una sustancia GRAS y se ha utilizado como un conservante para productos horneados en los E.U. (Hix *et al.* 1997). El ácido fítico también se puede utilizar en el tratamiento de metales para evitar la oxidación.

Generalidades de las fitasas

Las fitasas son enzimas que hidrolizan el ácido fítico a derivados de inositol fosfato con un menor número de fosfatos e incluso a inositol libre (Frontela *et al.* 2008) (Fig. 2). La fitasa (inositol hexafosfato fosfohidrolasa) se encuentra de forma común en la naturaleza, pudiendo ser de origen microbiano, vegetal o animal. La

Unión Internacional de Química Aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB 1975) clasificaron las enzimas en dos grupos: la 3-fitasa (hexafosfato de inositol 3-fosfohidrolasa) y 6-fitasa (hexafosfato de inositol 6-fosfohidrolasa), basados en la posición específica de la hidrólisis inicial del fitato. La 3-fitasa hidroliza primero el grupo fosfato de la posición 3, mientras que la 6-fitasa hidroliza primero el de la posición 6, dando lugar al 1, 2, 4, 5, 6-pentafosfato de inositol y el 1, 2, 3, 4, 5-pentafosfato de inositol, respectivamente.

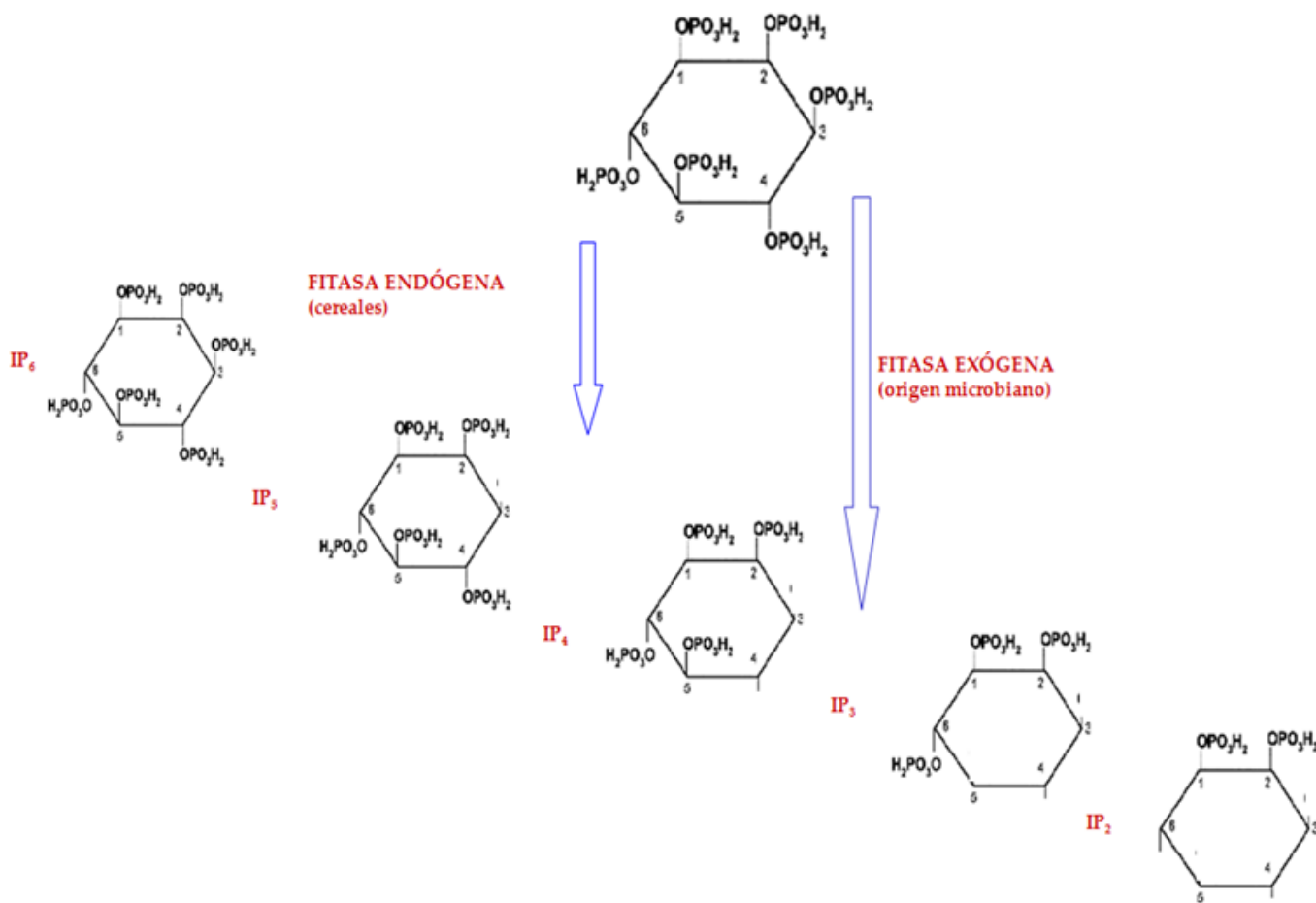


Fig. 2.- Productos generados a partir de la hidrólisis del ácido fítico (IP₆)

Las fitasas son usadas como aditivos en alimentos para animales, mejorando la biodisponibilidad de fosfato y reduciendo la pérdida de fosfatos y cationes divalentes del fitato.

Las sustancias en la cual actúan las enzimas fitasas se denominan de tres formas diferentes en la literatura: fitato, fitina y ácido fítico. Fitato, es el término utilizado con más frecuencia y se refiere a la sal de ácido fítico (myo-inositol hexafosfato). Fitina, a su vez se refiere específicamente al complejo de myo-inositol hexafosfato de potasio con magnesio y calcio que se produce en las plantas; el ácido fítico es el anillo libre myo-inositol hexafosfato (Frontela *et al.* 2008).

Técnicas de detección y cuantificación de hierro

Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)

La técnica de espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES, Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry), es una variante de las técnicas de análisis por espectrometría de masas. Las ventajas principales de esta técnica radican en la alta precisión, bajos límites de detección y medio costo económico, analizando la mayoría de los elementos e isótopos presentes en la tabla periódica de manera simultánea en no más de un par de minutos. Es por lo tanto una técnica ideal en el análisis de aguas, lixiviados de

rocas y minerales, alimentos, etc. Además permite el análisis de elementos trazas y suelos ricos en minerales, fósiles, metales, semiconductores, etc., en un área de muestra de hasta 50 μm . La técnica de ICP-OES combina dos propiedades analíticas que la convierten en un potente instrumento en el campo del análisis de trazas multielemental.

En espectrometría de emisión óptica (OES), la muestra se somete a temperaturas lo suficientemente altas como para causar no sólo la disociación en átomos, sino de causar importantes cantidades de excitación colisional (e ionización) de los átomos de la muestra que tendrá lugar. Una vez que los átomos o iones están en sus estados excitados, puede decaer a estados inferiores a través de transiciones de energía térmica o radiación (emisión). En OES, la intensidad de la luz emitida en longitudes de onda específicas se mide y se utiliza para determinar las concentraciones de los elementos de interés.

Una de las ventajas más importantes de OES resulta de las propiedades de excitación de las fuentes de alta temperatura utilizados, éstas fuentes de excitación térmica pueden llenar un gran número de diferentes niveles de energía de varios elementos diferentes al mismo tiempo. Todos los átomos excitados y los iones a continuación pueden emitir su característica radiación casi al mismo tiempo. Esto da lugar a la flexibilidad de elegir entre diferentes longitudes de onda de emisión de un elemento y en la capacidad de medir emisiones a partir de varios elementos diferentes al mismo tiempo. Sin embargo, una desventaja asociada con esta

característica es que a medida que el número de longitudes de onda de emisión aumenta, también aumenta la probabilidad de interferencias que puedan surgir de las líneas de emisión que son demasiado cercanas en longitud de onda a medir por separado (Boss y Fredeen, 1997).

Fluorescencia de rayos X (XRF)

La fluorescencia de rayos X (XRF, X-ray fluorescence spectrometry) consiste en la emisión de rayos X secundarios (o fluorescentes) característicos de un material que ha sido excitado al ser «bombardeado» con rayos X de alta energía o rayos gamma. Este fenómeno es muy utilizado para análisis elemental y análisis químico, particularmente en la investigación de metales, vidrios, cerámicos y materiales de construcción, así como en la de geoquímica, ciencia forense y arqueología.

Al exponer un material a rayos X de longitudes de onda cortas o a rayos gamma, pueden ionizarse los átomos que constituyen el material. La ionización consiste en eyección de uno o más electrones desde el átomo. Puede ocurrir si a éste se le expone a radiación cuya energía exceda la del potencial de ionización. Tanto los rayos X como los gamma pueden ser suficientemente energéticos para desprender electrones fuertemente ligados en los orbitales internos del átomo. Tal remoción electrónica deja en condición inestable a la estructura electrónica del átomo, y los electrones de orbitales más elevados «caen» hacia el orbital más bajo, que luego ocupan los huecos de los electrones internos desprendidos.

En esta caída, o transición, se genera energía mediante emisión de un fotón. El valor de la energía de este corpúsculo es igual a la diferencia de energía entre los dos orbitales involucrados. Por lo tanto el material emite radiación cuya energía es característica de los átomos componentes del material. El término fluorescencia se usa para denominar el fenómeno por el cual la absorción de radiación de una energía específica genera reemisión de radiación de una energía diferente, generalmente menor (Beckhoff *et al.* 2006).

Estrategias para reducir la deficiencia de micronutrientes

Entre las estrategias más frecuentemente empleadas para reducir la incidencia de malnutrición por déficit mineral están el empleo de suplementos farmacéuticos, el enriquecimiento de los alimentos y una dieta más variada. Una de las intervenciones del sector salud es la fortificación de los alimentos, entre ellos la fortificación de las harinas, la cual puede disminuir los niveles de deficiencia de micronutrientes. El enriquecimiento de los alimentos básicos elaborados con minerales y vitaminas esenciales ha contribuido de manera significativa en los últimos 2-3 años para reducir este déficit. El trigo es una de las principales fuentes de nutrientes en muchos países en desarrollo, y al ser triturado o molido se convierte en harina, la cual se utiliza como materia prima principal para la preparación de diversos alimentos.

La fortificación de la harina ha cobrado gran importancia como un medio rentable y efectivo de suministrar micronutrientes, particularmente a las poblaciones

de bajos ingresos en las poblaciones urbanas y rurales. La fortificación incluye la adición de hierro, zinc, y vitaminas del tipo B (entre otros). En más de 60 países el enriquecimiento de la harina es obligatorio y, por lo tanto, las plantas molineras modernas de varios países han desarrollado equipos para producir automáticamente la fortificación de la harina (Peña *et al.* 2012).

Otra estrategia de origen reciente es la llamada biofortificación, la cual pretende incrementar la concentración natural de los micronutrientes en los alimentos, a través de un programa de fitomejoramiento. Estos programas pueden utilizar en sus cruzas recursos genéticos, como variedades locales (*landraces*) de trigo u otras especies del mismo, entre las que se encuentran las especies ancestrales de los trigos modernos, que pueden funcionar como fuentes de genes asociados a altas concentraciones de hierro y zinc en el grano.

El CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) se ha ocupado en los últimos años de este tipo de investigación, la cual realiza en colaboración con distintos centros de investigación de México y el mundo. Todas las actividades se desarrollan con la finalidad de sumar esfuerzos en pos de erradicar problemas de hambre y malnutrición de la humanidad. CIMMYT participa dentro del proyecto *HarvestPlus* centrado en el incremento de la concentración de nutrientes en los principales alimentos básicos que se consumen en el mundo por todas las poblaciones, principalmente por aquellas donde los niveles de pobreza son más

elevados. *HarvestPlus* se centra en tres micronutrientes fundamentales reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la mayor limitante en dietas: hierro, zinc y vitamina A.

Para llevar a cabo este objetivo, en la primera etapa del proyecto, se identificaron trigos conservados en el Banco de Germoplasma de Trigo del CIMMYT (*landraces* y líneas de otras especies de trigo) cuyos niveles de hierro y/o zinc fueron al menos 40-50% mayor que en trigos comerciales actualmente. Estas líneas fueron seleccionadas y utilizadas como parentales en cruzamientos conjuntos con líneas modernas del Programa Global de Trigo del CIMMYT, que poseen alto rendimiento de grano, resistencia a enfermedades y a estreses abióticos además de tener buena calidad de grano. De esta manera y mediante un fuerte proceso de selección, se están originando líneas con buenas características agronómicas y calidad de grano, así como altos niveles de los micronutrientes hierro y zinc.

Aun cuando ya se ha logrado incrementar el contenido de micronutrientes en grano de trigo de nuevas variedades con el proyecto *HarvestPlus*, persiste la duda de si la biodisponibilidad de estos micronutrientes alcanza niveles satisfactorios que puedan repercutir en una mejor nutrición a los consumidores; por tal motivo este estudio se concentra en conocer los niveles de hierro potencialmente biodisponible de un cierto grupo de muestras del ensayo 5th HPAN 12-13 perteneciente al proyecto *HarvestPlus*.

Para examinar la biodisponibilidad de micronutriente, hay que tomar en cuenta factores tales como puede ser la relación entre la concentración total de micronutrientes en grano y la cantidad de micronutrientes biodisponibles o asimilables del mismo. En este punto, aunque pueden intervenir otros factores, se le atribuye un papel protagonista al ácido fítico, que actúa como inhibidor en la asimilación. La concentración de este componente va a depender del genotipo y de factores ambientales, así como del procesamiento que se le dé al grano para elaborar un determinado producto. De hecho, se ha comprobado que el grado de refinamiento de la harina tiene que ver con la cantidad de fitato presente (así como con la de micronutrientes); así mismo la fermentación de la masa promueve la actividad de la enzima fitasa, que puede reducir las concentraciones de ácido fítico, produciendo de esta manera un importante efecto positivo sobre lo que llamamos potencial biodisponibilidad de micronutrientes. (Velu *et al.* 2014)

JUSTIFICACION

En el presente los esfuerzos para incrementar el contenido de hierro y zinc en trigo, a través del proyecto *HarvestPlus*, no contempla la selección para alto potencial de biodisponibilidad de micronutrientes, nivel de bajo contenido en fitato y/o para alta actividad de la enzima fitasa. Tampoco se ha examinado el posible impacto benéfico de la aplicación de las prácticas favorables de procesamiento (molienda y fermentación). Estos factores en su conjunto deberían tenerse en cuenta al diseñar las estrategias para el desarrollo mediante fitomejoramiento de las variedades biofortificadas.

Reconociendo la importancia de trabajar en pro de un incremento de la concentración y potencial biodisponibilidad de hierro, esta investigación se plantea con la finalidad de obtener un mayor conocimiento sobre las relaciones entre la concentración total de Fe, el FePB y la concentración de ácido fítico en el grano y en un producto de panificación, considerando una variable fundamental de procesamiento.

OBJETIVO GENERAL

- Cuantificar el hierro libre y el ácido fítico presente en las variedades de trigo con características físicas y funcionales contrastantes, mediante la elaboración de una técnica analítica rápida y funcional.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar si existe relación entre el hierro libre o potencialmente biodisponible y la concentración total del mismo en el grano de trigo.
- ✓ Implementar y validar un **método rápido y de bajo costo**, útil en fitomejoramiento para cuantificar el hierro potencialmente biodisponible y el ácido fítico.
- ✓ Determinar si existe una relación entre la concentración de ácido fítico y el hierro potencialmente biodisponible en el trigo.
- ✓ Determinar la variabilidad en cuanto a la concentración de ácido fítico existente entre diferentes variedades de trigo.
- ✓ Determinar la influencia del tiempo de fermentación en la hidrólisis de ácido fítico.

HIPOTESIS

La concentración total de hierro y el potencial de biodisponibilidad no están totalmente relacionados entre sí. El ácido fítico es un constituyente del trigo que no se encuentra en la misma proporción en las diversas variedades de este cereal, por lo que la biodisponibilidad del hierro podría depender de su concentración en el grano, de la concentración de ácido fítico en el mismo, y de las condiciones de fermentación durante la panificación, que influyen en la liberación del hierro a través de la hidrólisis del complejo fitato-hierro.

METODOLOGIA

Material vegetal

Para el presente estudio se usó la población experimental conocida como 5th HPAN 12-13, que forma parte del proyecto *HarvestPlus*, y que está compuesto por 170 variedades y líneas experimentales de trigo, de las cuales se cuenta con datos de concentración total de hierro mediante la técnica de Rayos X (XRF). Con base en estos datos se eligieron 20 muestras las cuales cubrieron un rango amplio de variabilidad en la concentración total de hierro (29.9-45.8 ppm).

Preparación de muestras

Las muestras de las 20 variedades o líneas experimentales seleccionadas para el estudio fueron limpiadas mediante el uso de un tamiz con un tamaño de abertura de 2.85 mm y posteriormente fueron molidas en un molino de impacto con una criba de 1.0 mm de apertura fabricado en acero inoxidable, obteniendo harina integral para la determinación de Fe biodisponible (FePB) y de ácido fítico en grano.

Determinación de hierro potencialmente biodisponible

Para conocer el potencial de biodisponibilidad de hierro se implementó un método, usando como referencia métodos utilizados para obtener la concentración total de hierro en base a digestiones con ácidos fuertes (Choi *et al.* 2007., Miller *et al.* 1980., Akhter *et al.* 2012).

A este método se le hicieron modificaciones y entre las más importantes se trató de simular las condiciones ocurridas durante el proceso de digestión humana:

- Temperatura: 37°C
- pH = 2.0 mediante el uso de HCl (similar a la del estómago en actividad)
- Adición de enzima pepsina, 184 unidades/0.4 mg de harina
- Tiempo que tarda el proceso de digestión estomacal: 2 horas

El método utilizado (Choi *et al.* 2007., Miller *et al.* 1980., Akhter *et al.* 2012) para determinar el potencial de biodisponibilidad de hierro es descrito a continuación:

Extracción

1. Para esta determinación deben usarse al menos 2 blancos, 2 controles o testigos (con concentraciones de hierro conocida) y la curva estándar.
2. Para cada muestra, se pesan 80 mg de harina integral en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
3. Se añaden 800 µl de solución 0.0565 M de HCl con pepsina. Con esto se consigue un pH en torno a 2.
4. Las muestras se agitan en el vortex una por una y posteriormente son colocadas en el bloque del agitador horizontal tipo vortex, thermomixer, para una digestión de 2 horas a 37° C y una agitación de 1000 rpm.
5. Pasado el tiempo se sacan las muestras del thermomixer y se centrifugan a 6000 rpm durante 15 min.

6. Se toman 500 μl de sobrenadante y se transfiere a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml, el cual se vuelve centrifugar a 6000 rpm, durante 5 min.
7. De este sobrenadante se toman 170 μl para medir la absorción de extractos blancos y 170 μl para la reacción colorimétrica lo cual se describe a continuación:

Absorción de los extractos blancos (ruido)

8. De acuerdo al paso 7, el sobrenadante (170 μl) se transfiere con cuidado a tubos nuevos Eppendorf de 1.5 ml.
9. Se añade 340 μl de solución buffer de acetato 1M (pH 4.5) por muestra.
10. Agitar los tubos durante 15 s en vortex.
11. Los tubos Eppendorf se incuban en baño de agua hirviendo durante 5 min, para posteriormente enfriar en hielo durante 10 min.
12. Se centrifugan los tubos a 14000 rpm, durante 10 min.
13. Se transfiere 150 μl por triplicado (3 pozos) en una microplaca de poliestireno, 96 pozos, fondo plano.
14. Leer absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

Reacción colorimétrica

15. Al igual que en los extractos blancos, se toman 170 μl por muestra de sobrenadante (paso 7) y se transfiere con cuidado a nuevos tubos Eppendorf de 1.5 ml.
16. Se añade a cada tubo 170 μl de solución buffer de acetato 1M (pH 4.5).
17. Se agitan los tubos durante 15 s en vortex.
18. Añadir 170 μl de solución 2,2 dipiridilo (reactivo colorimétrico) a cada muestra.
19. Los tubos Eppendorf se incuban en baño de agua hirviendo durante 5 min, posteriormente se enfrían en hielo durante 10 min.
20. Se centrifugan los tubos a 14000 rpm, durante 10 min.
21. Se transfiere 150 μl por triplicado (3 pozos) en la microplaca
22. Se lee absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

Cálculos:

Curva estándar de hierro (curva de calibración)

- Desarrollar una curva de calibración usando cantidades conocidas de hierro (Fe II), que van de 1 a 8 mg/l.
- Trazar la lectura de la absorbancia a 520 nm como una función de la concentración y calcular la recta y su ecuación de la curva estándar.

Cálculo de la concentración de hierro (Fe) en mg de hierro por kg de muestra

(ppm):

$$\text{Fe (mg/kg)} = \{(\text{concentración de Fe (mg/L)} * 0.0008 \text{ (volumen de HCl L)}) / 80 \text{ mg (g de muestra)}\} * 1000000.$$

Soluciones:

- 1) Acido clorhídrico (HCl) 0.0565 M: Diluir 943.5 μl de HCl (37%) en 200 ml de agua des ionizada.
- 2) Ácido clorhídrico (HCl) 1 M: Diluir 4.25 ml de HCl (37%) en 50 ml de agua des ionizada.
- 3) Buffer de acetato: pesar 82.034 g de acetato de sodio anhídrido en alrededor de 800 ml de agua de alta pureza, ajustando el pH a 4.5 con ácido acético y ajustar el volumen a 1 L.
- 4) 12.8 mM de solución 2, 2'dipyridilo: Disolver 1 g de 2, 2'dipyridilo (156.18 g/mol) en un volumen mínimo de ácido clorhídrico 1M y diluir la mezcla con buffer de acetato hasta obtener un volumen de 500 ml.
- 5) Ácido clorhídrico con pepsina: Disolver 15 mg de pepsina en 30 ml de ácido clorhídrico 0.0565 M
- 6) Estándar: 100 mg/l Fe (II) solución stock: Diluir 100 μl de Fe (II) (1000 mg/l) con 100 μl de ácido clorhídrico (HCl) 0.0565 M.

En la segunda etapa del proyecto se utilizó el método comercial Megazyme [Phytic Acid (phytate)/ total phosphorus] como método de referencia para poder validar un método miniaturizado o micro-método el cual permitiera la cuantificación de ácido fítico. La determinación se describe a continuación:

Material Vegetal

Como material vegetal se analizaron las 20 muestras anteriormente utilizadas en el análisis de FePB.

Determinación de ácido fítico

Extracción de la muestra:

1. Se pesa un gramo de harina integral y se coloca en un tubo Falcón de 50 ml.
2. Se añade 20 ml de HCl (0.66M) y se agita hasta disolver en el vortex.
3. Se deja en agitación vertical toda la noche a temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$
4. En la mañana siguiente se retiran del agitador y se transfiere 1 ml de la solución a un tubo de 1.5 ml Eppendorf.
5. Se centrifugan los tubos a 13,000 rpm por 10 min.
6. Se toman 500 μl del sobrenadante y se transfiere a un tubo nuevo de 1.5 ml Eppendorf
7. Al sobrenadante se adiciona 500 μl de NaOH 0.75 M y se agita en vortex.
8. Se transfiere 200 μl de la solución a otro tubo nuevo de 1.5 ml y se añade 200 μl de buffer de HCl (0.66 M) + NaOH (0.75 M) a una relación de 1:1.

9. Se agitan los tubos en vortex.

Reacción enzimática de desfosforilación:

- Para este paso se necesitan 2 tubos, uno para determinar fósforo libre y otro para fósforo total. A cada tubo se le adiciona lo que indica el siguiente cuadro:

	Fósforo libre	Fósforo total
Agua destilada	114 µl	94 µl
Buffer de acetato de sodio (200 mM, pH 5.5)	40 µl	40 µl
Muestra	20 µl	20 µl
Suspensión de fitasa (12,000 U/ml)	-	20 µl
VOLUMEN TOTAL	174 µl	174µl

10. Una vez que a los tubos se les añadió las soluciones, se cierran y se agitan rápidamente en vortex.

11. Los tubos se incuban en Thermomixer a 40°C por 10 min.

12. Terminada la incubación los tubos se mezclan y centrifugan rápidamente 10 segundos, a 13,000 rpm (solo para bajar el líquido evaporado de la tapa del tubo).

13. Se añaden las soluciones según muestra el siguiente cuadro:

	Fósforo libre	Fósforo total
Agua destilada	4 µl	-
Buffer de glicina (400 mM, pH 10.4)	40 µl	40 µl
Suspensión de fosfatasa alcalina (80 U/ml)	-	4 µl
VOLUMEN TOTAL	44 µl	44 µl

14. Se agitan los tubos en el vortex y se vuelven a incubar a 40 °C durante 15 min.

15. Se repite el paso número 12.

16. Se adiciona a los tubos 60 µl de ácido tricloroacético (50 % p/v).

17. Se mezclan los tubos en vortex y se centrifugan a 13,000 rpm X 10 min.

Determinación colorimétrica de fósforos

18. A partir de los tubos centrifugados en la reacción enzimática de desfosforilación, se transfiere 250 µl de sobrenadante a un tubo nuevo para fósforo libre y fósforo total.

19. Se adiciona 125 µl de colorante (mezcla de soluciones A + B)

20. Se agitan rápido en vortex y se incuban a 40 °C durante 1 h en Thermomixer

21. Se repite el paso número 12.

22. Se transfiere 120 µl a cada pozo de la microplaca por triplicado.

23. Se lee absorbancia a 650 nm.

Preparación de la curva estándar para determinación de fósforo

- Los estándares se preparan según el siguiente cuadro:

	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar
	0	1	2	3	4
Agua destilada	2.0	1.98	1.90	1.80	1.70
(ml)					
Estándar de	0	0.02	0.10	0.20	0.3
fósforo (ml)					
Total (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

- Los estándares se tratan igual que las muestras en la sección de determinación colorimétrica de fósforos (paso 18 - 23).
- Se desarrolla una curva de calibración usando concentraciones conocidas de fósforo, que va de 0.5 a 7.5 µg.
- Se traza la lectura de la absorbancia a 655 nm como una función de la concentración y se calcula la ecuación de la curva estándar.

Calculo para la curva de calibración

Teniendo las absorbancias de cada uno de los estándares, se calcula el $\Delta A_{\text{fosforo}}$ para cada estándar donde el valor del estándar 0 se resta a cada uno de los demás estándares (1-4), posteriormente se calcula: $[\mu\text{g}/\Delta A_{\text{fosforo}}]$

$$M = \frac{\text{Fosforo } (\mu\text{g})}{\Delta A_{\text{fosforo}}} \quad [\mu\text{g}/\Delta A_{\text{fosforo}}]$$

Posteriormente se calcula la media de M donde:

$$\text{Media de M} = \frac{(M_{\text{Estándar1}} + M_{\text{Estándar2}} + M_{\text{Estándar3}} + M_{\text{Estándar4}})}{4} \quad [\mu\text{g}/\Delta A_{\text{fosforo}}]$$

Cálculo para contenido de ácido fítico

Una vez determinada la Absorbancia (A_{655}) para fosforo libre y para fosforo total en la misma muestra se procede a obtener el $\Delta A_{\text{fosforo}}$, el cual se obtiene restando el valor de la Absorbancia para fosforo total de la Absorbancia para fosforo libre.

La concentración de fosforo se calcula:

$$C = \frac{\text{media de } M \times 20 \times F}{10000 \times 1 \times v} \times \Delta A_{\text{fosforo}} \quad [\text{g}/100\text{g}]$$

Dónde:

Media de M = Media de valores para los estándares de fósforo ($\mu\text{g}/\Delta A_{\text{fosforo}}$)

20 = Volumen del extracto de la muestra (ml)

F = Factor de dilución

ΔA = Cambio de absorbancia de la muestra

10000 = Conversión de $\mu\text{g}/\text{g}$ a $\text{g}/100\text{g}$

1 = peso de la muestra (g)

v = Volumen de la muestra (usada en la determinación colorimétrica)

Finalmente se calcula la concentración de ácido fítico mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{\text{Fosforo (g/100g)}}{0.282}$$

El cálculo del contenido de ácido fítico asume que la cantidad de fósforo medido se libera exclusivamente a partir de ácido fítico y que este comprende 28.2 % de ácido fítico.

Determinación de ácido fítico en pan con diferentes tiempos de fermentación

Material Vegetal

Para la determinación de ácido fítico tanto en grano como en harina se utilizaron muestras de 3 variedades de trigo harinero, Kronstad F2004, Roelfs F2007 y Torocahui S2004, las cuales fueron sembradas en el ciclo de cultivo Otoño-Invierno Y. 11-12 en Cd. Obregón, Sonora. Estas 3 variedades (Kronstad, Roelfs y Torocahui) son diferentes a las 20 muestras mencionadas anteriormente y además cuentan con diferencias entre sí en cuanto a fuerza de gluten, dureza de grano y variabilidad en la concentración total de hierro (medido mediante el equipo EDXRF, energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry). De estas 3 muestras se necesitó grano suficiente (3 kg aprox.) el cual fue limpiado y acondicionado para la obtención de harina refinada, con la cual se procedió a realizar pan blanco o también llamado pan de caja con 5 diferentes tiempos de fermentación (90, 150, 180, 210 y 240 min). La prueba de panificación se basó en el método oficial de la AACC 10-09 (American Association of Cereal Chemists, AACC, 2000).

Metodología para la elaboración de pan de caja.

Procedimiento

1. En un recipiente plástico con tapa se pesan 3.0 g de manteca vegetal hidrogenada.
2. En ese mismo recipiente se pesan 100.0 g de harina refinada al 14% de humedad (si la harina tiene mayor o menor humedad se ajusta el peso según el método oficial de la AACC 82-24)
3. Se vacía el contenido del recipiente en la olla de la amasadora, y con la ayuda de una espátula se hace un pequeño pozo en el centro para la adición de líquidos.
4. Se añaden 25 ml de la solución de levadura (al12%) y 25 ml de la solución azúcar-sal (20% y 4%, respectivamente).
5. El agua destilada restante, necesaria para completar la absorción de agua de la muestra, se adiciona a la olla de la amasadora después de las soluciones anteriores. (El agua de absorción para cada muestra de harina es determinada mediante la prueba: Capacidad de Retención de Solventes tal como se describe en el método 56-10 y 56-11 de la AACC).
6. La olla se coloca en la amasadora y se amasa hasta alcanzar su desarrollo óptimo.

7. Terminado el tiempo de amasado se retira la masa de la olla, la cual se redondea ligeramente con las manos y se coloca en el fermentador en un recipiente previamente engrasado.
8. Transcurridos los primeros 53 min de la masa en el fermentador (para el caso del pan con tiempo total de fermentación de 90 min) se realiza el 1er punch (des gasificado) de la masa, donde esta se retira del recipiente de fermentación y con las manos se alarga ligeramente para después hacerla pasar a través de los rodillos de una laminadora con una abertura de 5/16 pulgadas (ver Tabla 2).

Tabla 2.- Tiempos de fermentación establecidos para la elaboración de pan para las 3 variedades (Kronstad, Roelfs y Torocahui). (NOTA: el Punch se refiere a la desgasificación de la masa previamente fermentada)

Tiempo de fermentación (min)	1er PUNCH (min)	2do PUNCH (min)	MOLDEO (min)	REPOSO (min)
90	53	25	13	55
150	88	42	21	55
180	105	50	25	55
210	123	58	29	55
240	140	67	33	55

9. Una vez laminada la masa se hacen cuatro dobleces, los primeros 2 se hacen en 3 partes iguales hacia el centro, una vez obtenido un tipo cilindro se toman los dos extremos y de igual manera se doblan hacia el centro de la masa, y se vuelve a colocar en el recipiente de fermentación.
10. El segundo punch se realiza después de 25 min a partir del primer punch donde se vuelve a pasar la masa por los rodillos de la laminadora y se realizan las mismas operaciones del paso número 9, con excepción en la abertura de los rodillos la cual cambia a una abertura de 9/32 pulgadas.
11. Después del segundo punch se reposa la masa en el fermentador durante 13 min y posteriormente se realiza el moldeado, el cual consta de pasar la masa dos veces por la laminadora con una abertura de 5/32 pulgadas y la segunda con una de 1/8 pulgadas.
12. Posteriormente se coloca la masa en una superficie plana y se enrolla la masa del lado superior hasta el lado inferior, una vez enrollada la masa se hacen unas pequeñas costuras en la masa con los dedos para formar un cilindro y evitar que la masa se abra.
13. Formado el cilindro este se coloca en un molde engrasado y se coloca por última vez en el fermentador durante 55 min.
14. Transcurridos los 55 min se toma el molde del fermentador y se coloca en el horno previamente precalentado a 200°C, para hornear durante 25 min.
15. Una vez frío el pan se procede a evaluar la calidad del pan mediante ciertos parámetros: volumen de pan, color de corteza, estructura y color de la miga.

RESULTADOS

Hierro Potencialmente Biodisponible (FePB)

Utilizando el protocolo de referencia para la determinación de hierro total en harina integral de grano de trigo (Iron determination in wheat whole flour with 2,2' dipyridyl reagent), se hicieron pruebas usando 5 muestras con concentraciones conocidas de hierro total, para determinar el potencial de biodisponibilidad. En base a estas 5 muestras y a las modificaciones hechas al método original (uso de la enzima pepsina en condiciones de pH, temperatura y concentración de ácido estomacal), se logró obtener un método que permitiera conocer el hierro libre o potencialmente biodisponible.

La determinación de hierro potencialmente biodisponible para las 20 muestras se realizó por triplicado (R_1 , R_2 y R_3) (Fig. 3), donde se puede observar la relación entre estas repeticiones ($R^2 > 0.70$).

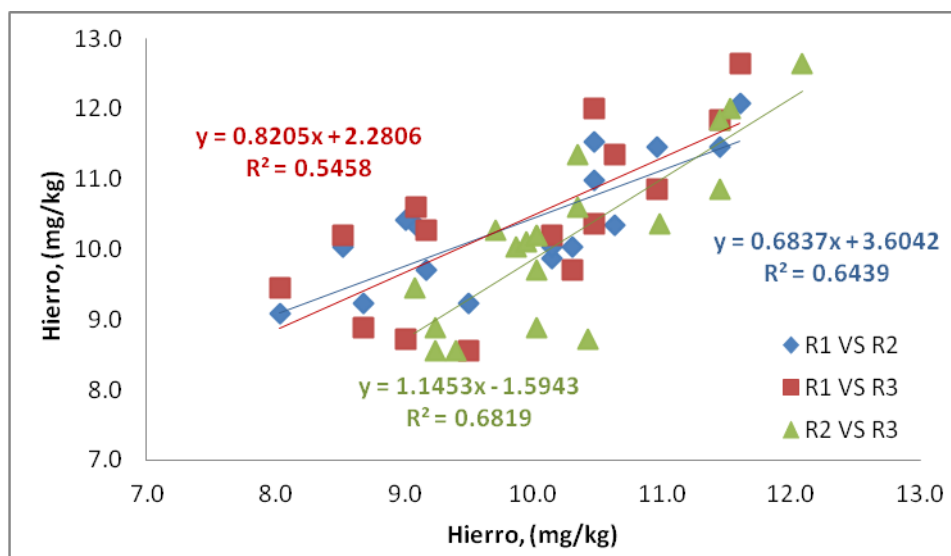


Fig. 3.- Relación entre repeticiones (1, 2 y 3) para el análisis de hierro potencialmente biodisponible.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de hierro potencialmente biodisponible para las 20 muestras y los 2 controles o testigos. En la repetición 1 se omitieron resultados para las muestras: 9, 28, 113, 116 y en la repetición 3 para la muestra: 17, estos datos se omitieron debido a que el valor obtenido resultaba anormal, y con al menos dos repeticiones para algunas muestras se obtuvo el promedio de cada una de estas para el hierro potencialmente biodisponible.

En la figura 4 se muestra la relación entre las técnicas de referencia para la determinación de hierro total (ICP y Rayos X), donde la relación entre estas dos técnicas es relativamente baja ($R^2 = 0.52$), lo cual nos indicaría que la calibración en cuanto a la determinación de hierro en el equipo de Rayos X es un poco inexacta, lo que podemos verificar en la tabla 3, donde se observa que los valores de hierro total para Rayos X son mas altos que para ICP, siendo este último nuestro método oficial de referencia. Por lo tanto al observar las diferencias entre las dos técnicas podemos notar que el equipo de Rayos X esta sobreestimando la concentración de hierro presente en las muestras de trigo analizadas.

Tabla 3.- Cuadro de resultados de las 20 muestras analizadas para hierro potencialmente biodisponible. Donde C1 y C2 son el control 1 y control 2 respectivamente.

Muestra	Hierro total, ICP (mg/kg)	Hierro total, XRF (mg/kg)	Dif, ICP-XRF (%)	Potencial de biodisponibilidad de hierro, (mg/kg).			Promedio (mg/kg)	CV (%)	Hierro biodisponible (%)
				Repetición	Repetición	Repetición			
				1	2	3			
9	37.1	41.7	-12.5	-	10.0	8.9	9.5	8.5	22.7
16	33.4	41	-22.7	10.3	10.0	9.7	10.0	3.0	24.4
17	32.6	38.5	-18.1	10.1	9.9	-	10.0	1.9	26.0
28	32.5	33.9	-4.4	-	9.4	8.6	9.0	6.6	26.5
29	29.7	32.9	-10.9	9.1	10.3	10.6	10.0	8.1	30.4
39	37.3	40.3	-8.1	9.5	9.2	8.6	9.1	5.3	22.6
49	36.1	39.2	-8.7	10.5	11.5	12.0	11.3	6.9	28.9
51	31.6	35.6	-12.6	9.2	9.7	10.3	9.7	5.7	27.3
70	35.5	38	-6.9	11.4	11.4	11.8	11.6	1.9	30.5
77	39.8	39.1	1.8	11.6	12.1	12.7	12.1	4.3	31.0
103	34.7	38.9	-12	8.0	9.1	9.5	8.9	8.3	22.8
113	40.1	37.9	5.5	-	9.9	10.0	9.9	1.2	26.3
116	37.2	40.7	-9.6	-	9.9	10.1	10.0	1.2	24.6
122	33.1	39.6	-19.7	10.1	10.0	10.2	10.1	0.9	25.6
134	41	45.8	-11.7	10.5	11.0	10.4	10.6	3.1	23.1
137	38.8	39.8	-2.6	8.7	9.2	8.9	8.9	3.1	22.4
140	38.7	43.9	-13.3	11.0	11.4	10.8	11.1	2.9	25.2
154	38.9	43.4	-11.6	10.6	10.3	11.3	10.8	4.8	24.8
159	-	41.2		9.0	10.4	8.7	9.4	9.7	22.8
163	-	29.9		8.5	10.0	10.2	9.6	9.6	32.0
C1	40.1	-		9.8	10.8	10.5	10.4	4.9	25.9
C2	31.4	-		8.2	9.2	8.7	8.7	6.0	27.7

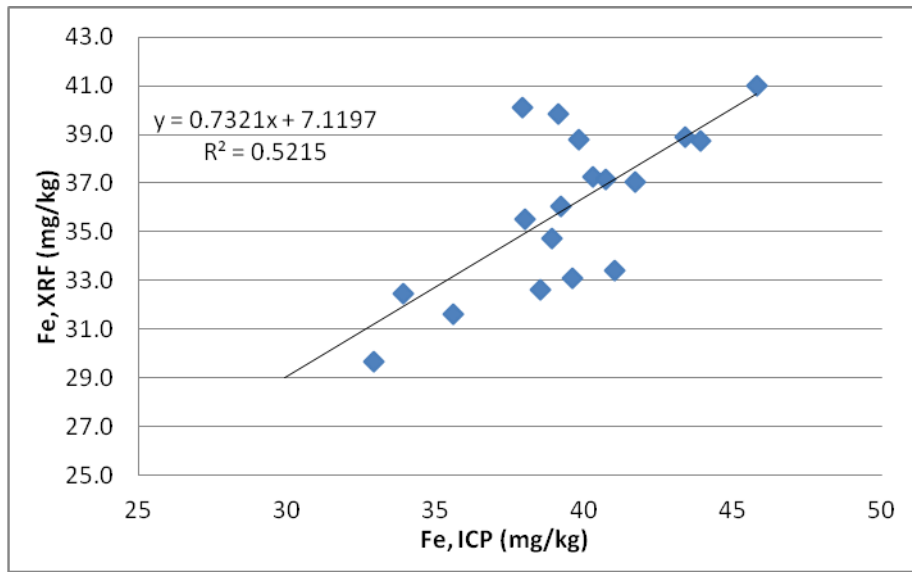


Fig. 4.- Relación entre la técnica de ICP y técnica de Rayos X para la determinación de hierro total.

En la figura 5 se muestra la variabilidad en la concentración total de hierro para ambas técnicas (ICP y XRF), donde en la técnica de ICP solo se tienen valores de concentración de Fe para 18 de las 20 muestras analizadas, teniendo un rango de valores de 29.7 a 41.0 (mg/kg); en cuanto a la técnica de XRF como se mencionó anteriormente los valores fueron mas altos que los determinados por la técnica de ICP teniendo un rango de valores de 29.9 a 45.8 mg/kg para las 20 muestras. En esta misma figura se puede observar la variabilidad determinada para hierro potencialmente biodisponible, donde el rango de concentraciones se encontró en 8.9 a 12.1 mg/kg, lo que indica que aproximadamente el 29.7 % del hierro total determinado por la técnica de ICP es el hierro que se encuentra en forma libre o potencialmente biodisponible.

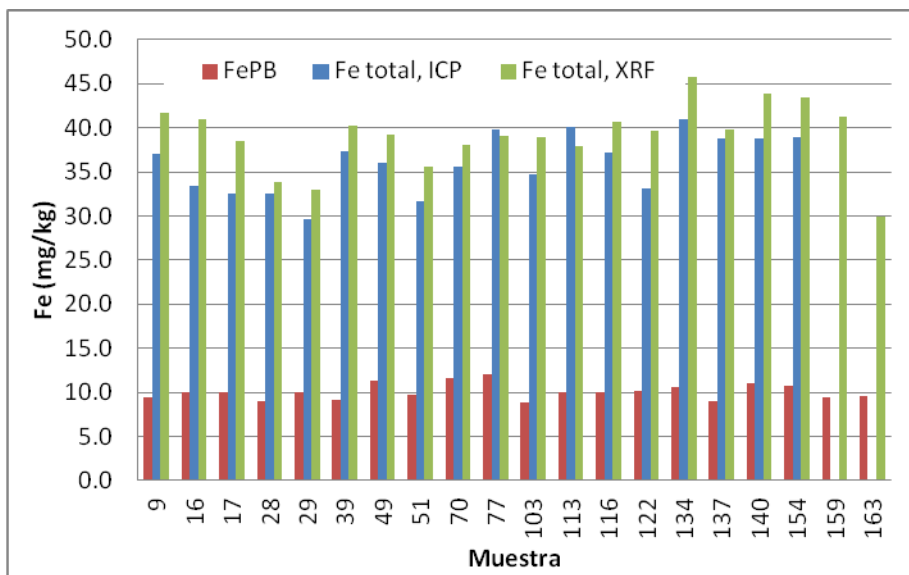


Fig. 5.- Variabilidad en la concentración de hierro total medido por ICP y XRF; y variabilidad para FePB de las 20 muestras.

En la figura 6 se observa la variabilidad de hierro biodisponible respecto a la concentración total de hierro, donde el porcentaje de hierro obtenido se encuentra en un rango de valores de 22.4 a 32 % del hierro total, lo cual nos indica que terminado el proceso de digestión estomacal se encuentra potencialmente biodisponible aproximadamente $\frac{1}{4}$ parte del hierro total del grano de trigo. En este mismo gráfico se puede observar que la muestra 163 presenta la concentración total de hierro más baja entre las muestras (XRF = 29.9 mg/kg) y a su vez cuenta con un valor de 32 % de hierro biodisponible, el cual resulta ser el porcentaje más alto para FePB. Por lo tanto hay que resaltar que no necesariamente las muestras que tienen valores más altos en concentración de hierro total son las muestras que más hierro potencialmente biodisponible tengan.

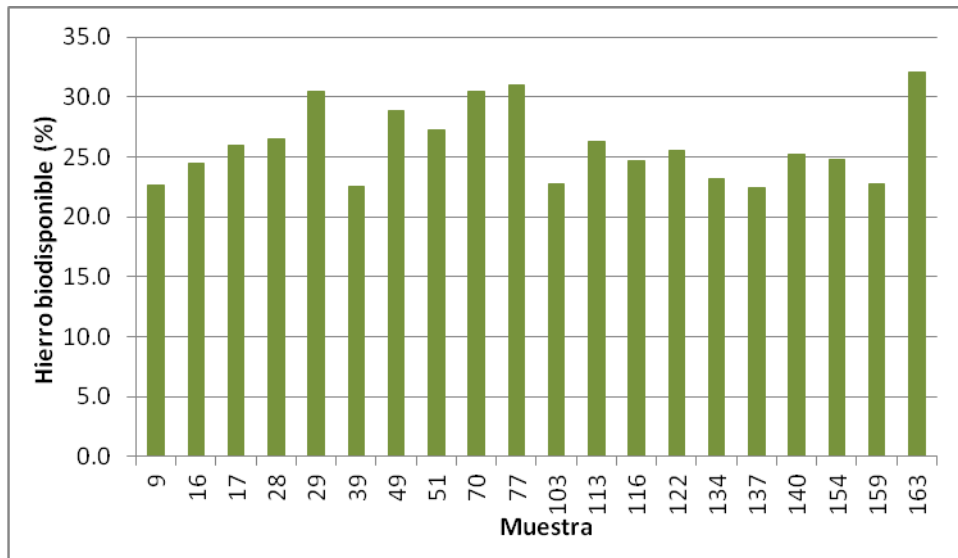


Fig. 6.- Variabilidad de hierro potencialmente biodisponible respecto a la concentración total de hierro.

Para FePB por último se puede observar la relación entre la concentración total de hierro en el trigo y el hierro potencialmente biodisponible (Fig. 7), en donde se observa que a pesar del valor de R^2 tan pequeño (0.0977), existe una ligera tendencia entre los valores de hierro total (ICP) y potencial de biodisponibilidad, que aun cuando presentan concentraciones totales de hierro similares entre sí, sus concentraciones de hierro potencialmente biodisponible se encuentran por arriba o por debajo de la concentración esperada.

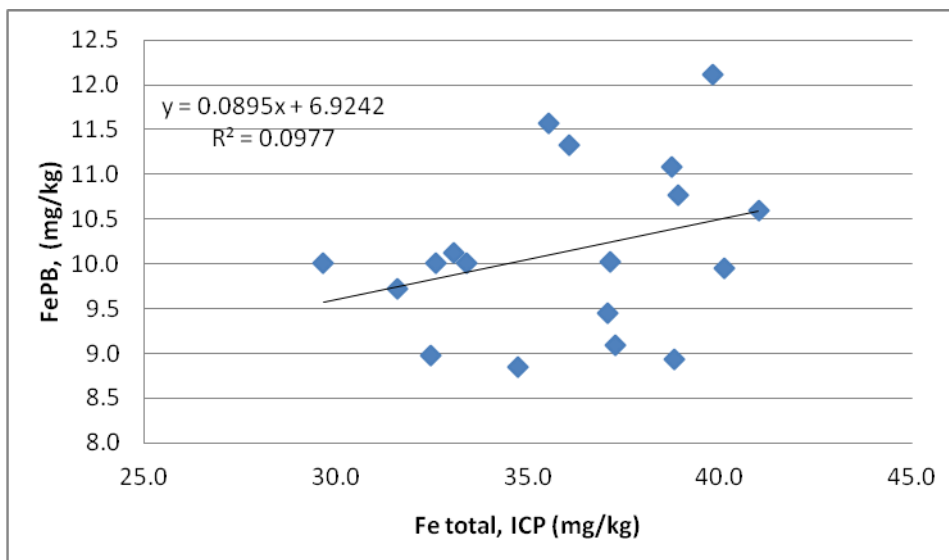


Fig. 7.- Relación entre la concentración total de hierro y el potencial de biodisponibilidad.

Ácido Fítico

Se validó un micro-método para determinar la concentración de ácido fítico en harina integral. Para esta validación se utilizó como referencia un método comercial de Megazyme [Phytic Acid (phytate)/ total phosphorus]; el cual resulta ser caro además de que solo se pueden analizar 50 muestras por kit, por lo cual se procedió a trabajar en desarrollar y validar un método miniaturizado o a escala el cual permitiera analizar mayor número de muestras a un menor costo con los mismos resultados. Para la validación se usaron solo 5 de las 20 muestras analizadas anteriormente para determinar FePB (70, 77, 103, 140 y 163), las cuales cubrieron el rango disponible en cuanto a la concentración total de Fe (XRF); una vez validado el método se procedió a analizar las 15 muestras restantes. Por otra parte también se procedió a analizar el grano de las 20 muestras en cuanto a sus parámetros de

calidad como por ejemplo: peso hectolítico, peso de mil granos, contenido de proteína, etc.

En la figura 8 se muestra la relación existente para el método Megazyme y el micro-método ($R^2 = 0.9071$), donde en promedio el micro-método cuantifica 3.1 % de ácido fóico menos que el método de referencia.

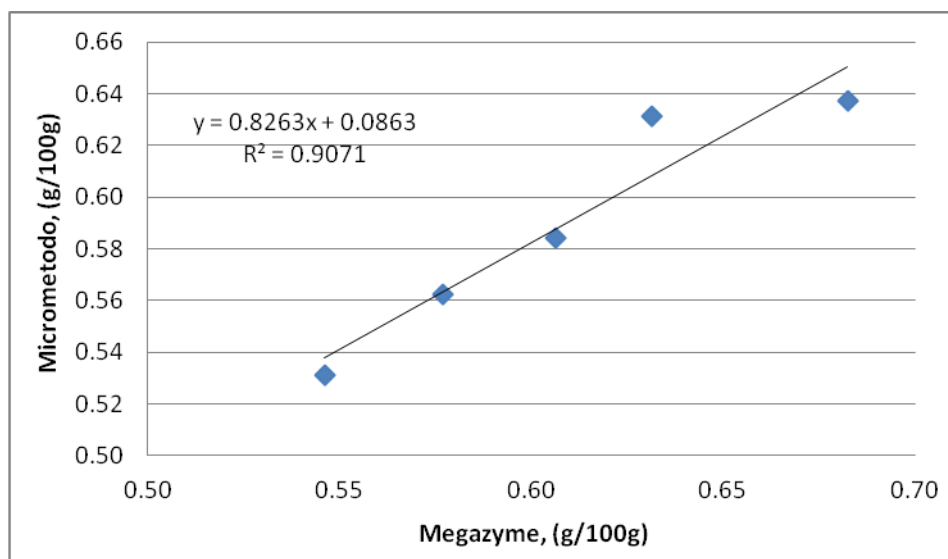


Fig. 8.- Relación entre el método comercial de Megazyme y el Micro-método para la determinación de ácido fóico (g/100g).

Con los resultados obtenidos para las 5 muestras fue posible la validación del micro-método donde para tener una mayor certeza de los resultados se procedió al análisis de las 15 muestras restantes por duplicado para el método de Megazyme y para el micro-método. En la figura 9 se muestra la relación entre ambos métodos y aunque esta relación se vio disminuida respecto a las 5 primeras muestras

analizadas, cumple el propósito de identificar las líneas o muestras de trigo con mayor y menor contenido de ácido fítico y poder hacer selección de este componente en un programa de mejoramiento genético.

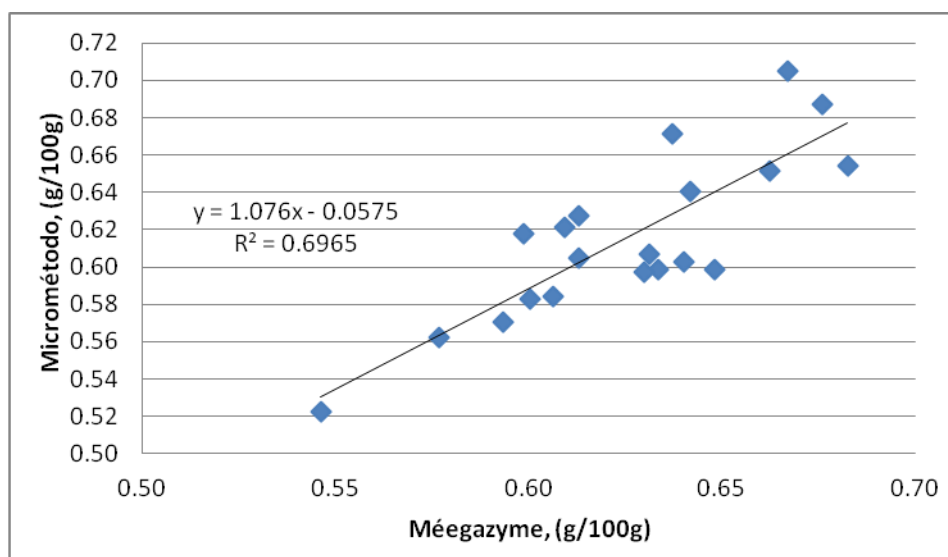


Fig. 9.- Relación entre el método comercial de Megazyme y el micro-método analizando 20 muestras de trigo.

En la tabla 4 se puede observar que para ambos métodos la reproducibilidad fue buena además que al completar el análisis con el micro-método es posible notar que este método se encuentra solo 1.6 % por debajo del método de Megazyme en cuanto a la determinación de ácido fítico (g/100 g). Es sabido que otra manera de reportar al ácido fítico es mediante la relación molar fitato/Fe, esta relación puede ser observada en esta misma tabla donde los valores se encontraron en un rango de 11 a 17.7 (mol/100 g). La determinación de la relación molar se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{Relación molar (Fit:Fe)} = \frac{\text{ácido fítico (g/100 g)}}{660 \text{ (g/mol)}}$$

$$\text{Fe (g/100 g)} / 55.847 \text{ (g/mol)}$$

Tabla 4.- Cuadro de resultados de las 20 muestras para contenido de ácido fítico, por dos métodos (Megazyme y Micro-método) y valores de relaciones molares.

Muestra	Ácido Fítico Megazyme (g/100g)		Promedio (g/100g) Megazyme	CV%	Ácido Fítico Micro- método (g/100g)		Promedio (g/100g) Micro- método	CV%	Dif %, Micromet. vs Megazyme	Relación molar (mol/100g) Fit:Fe
	Repetición	Repetición			Repetición	Repetición				
	1	2			1	2				
9	0.619	0.607	0.613	1.4	0.631	0.578	0.605	6.2	-1.3	12.3
16	0.596	0.591	0.593	0.6	0.545	0.596	0.571	6.3	-3.8	11.8
17	0.611	0.614	0.613	0.4	0.647	0.608	0.627	4.4	2.4	13.8
28	0.580	0.597	0.599	2.0	0.619	0.617	0.618	0.2	3.2	15.4
29	0.668	0.684	0.676	1.7	0.681	0.694	0.687	1.3	1.7	17.7
39	0.654	0.642	0.648	1.3	0.607	0.590	0.599	2.1	-7.7	12.6
49	0.635	0.632	0.633	0.4	0.609	0.588	0.599	2.5	-5.5	12.9
51	-	0.640	0.640	-	0.609	0.596	0.603	1.6	-5.9	14.3
70	0.563	0.530	0.546	4.3	0.531	0.514	0.522	2.4	-4.3	11.6
77	0.632	0.631	0.631	0.2	0.631	0.583	0.607	5.6	-3.9	13.1
103	0.565	0.589	0.577	2.9	0.562	-	0.562	-	-2.5	12.2
113	0.614	0.604	0.609	1.2	0.633	0.609	0.621	2.7	1.9	13.9
116	0.653	0.631	0.642	2.5	0.600	0.682	0.641	9.1	-0.2	13.3
122	0.599	0.602	0.600	0.3	0.606	0.560	0.583	5.6	-2.9	12.5
134	0.653	0.614	0.630	4.3	0.615	0.579	0.597	4.2	-5.2	11.0
137	0.688	0.647	0.667	4.4	0.719	0.691	0.705	2.8	5.7	15.0
140	0.701	0.664	0.683	3.9	0.637	0.672	0.655	3.7	-4.1	12.6
154	0.643	0.632	0.637	1.3	0.673	0.670	0.671	0.4	5.4	13.1
159	0.676	0.648	0.663	3.0	0.678	0.625	0.652	5.8	-1.6	13.4

163	0.611	0.602	0.606	1.1	0.584	-	0.584	-	-3.7	16.5
Promedio									1.6	

En la figura 10 se puede observar que las concentraciones de ácido fítico determinadas con el micro-método se encuentran en un rango de 0.522 a 0.705 (g/100 g), mientras que los obtenidos por el método de Megazyme van de 0.546 a 0.683 (g/100 g), estos valores corresponden a la harina integral que como era de esperarse resultan ser mayores a los reportados para trigos paquistaníes en harina refinada (0.114-0.166 g/100g) (Akhter *et al.* 2012).

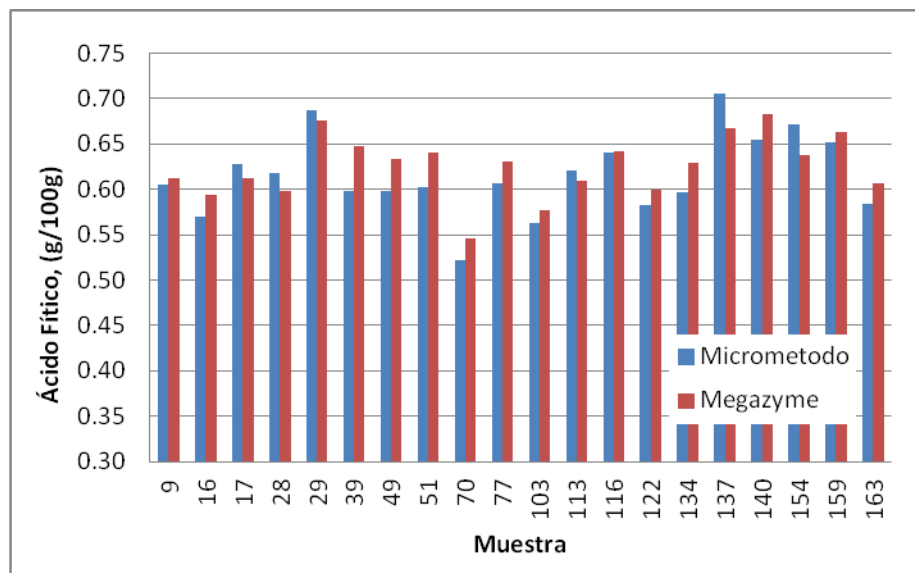


Fig. 10.- Variabilidad en cuanto a la concentración de ácido fítico (g/100g).

Por último respecto al ácido fítico, en la figura 11 se muestra la nula relación entre el FePB y la concentración de ácido fítico ($R^2=0.0319$) así como en la figura 12 se muestra la relación entre el FePB y la relación molar Fitato:Fe ($R^2=0.1033$).

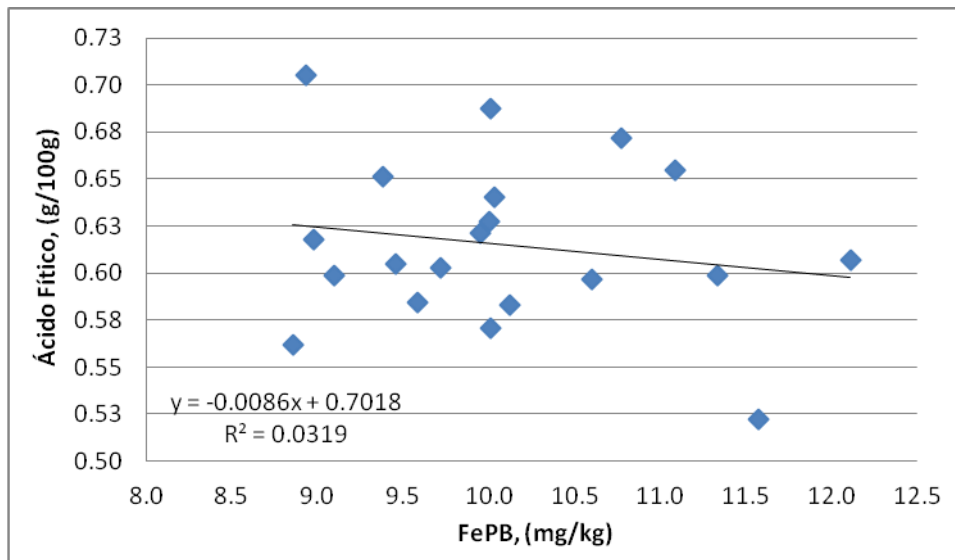


Fig. 11.- Relación entre el hierro potencialmente biodisponible y ácido fítico.

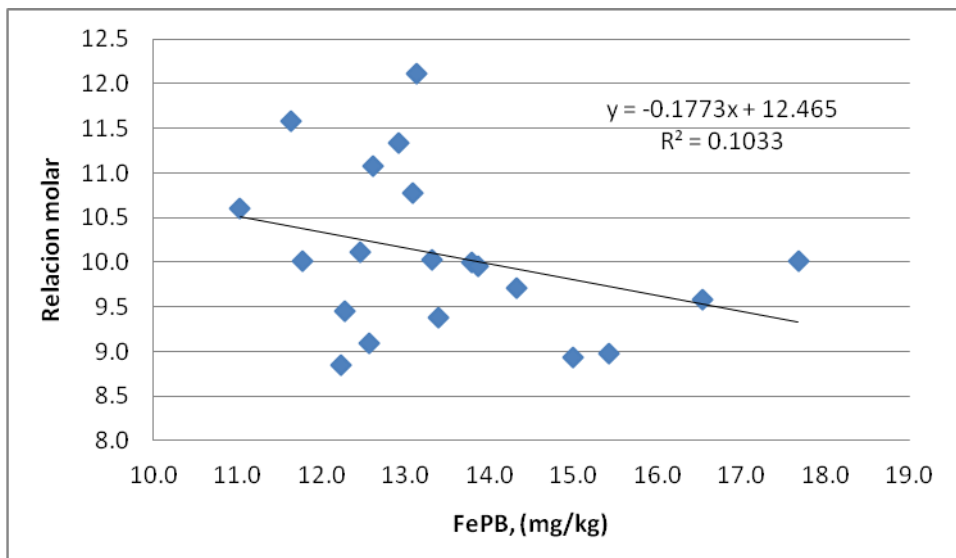


Fig. 12.- Relación entre el hierro potencialmente biodisponible y la relación molar Fitato:Fe.

Determinación de ácido fítico en pan con diferentes tiempos de fermentación

Se determinó Fe total para 5 muestras de grano de trigo harinero, donde se eligieron 3 respecto a la concentración de Fe total, las tres muestras elegidas fueron de la variedad Kronstad, Roelfs y Torocahui, las dos primeras de endospermo duro-semiduro y la tercera de endospermo suave, donde la concentración de Fe total fue de: 33.6, 33.2 y 26.2 mg/kg, respectivamente.

La prueba de panificación o elaboración de pan de caja se realizó con harina refinada de las 3 variedades de trigo mencionadas anteriormente, y el pan se elaboró con 5 diferentes tiempos de fermentación (90, 150, 180, 210 y 240 min). Los resultados para volumen de pan, calidad y color de miga se muestran en la Tabla 5, donde se observa que para las tres variedades analizadas un tiempo corto de fermentación tiene un efecto positivo en la calidad del pan [mayor volumen (Figura 13 y 14), color café oscuro en la corteza del pan (Figura 15) y buena estructura de la miga] mientras que un tiempo largo de fermentación produjo pan con un menor volumen, color amarillo claro en la corteza y una estructura de miga más compacta y cerrada.

Tabla 5.- Parámetros de calidad de pan de las variedades Kronstad, Roelfs y Torocahui con 5 diferentes tiempos de fermentación. (MB: Muy buena, B: Buena y R: Regular).

Muestra	Tiempo de fermentación	Volumen de pan	Estructura de la miga	Colorímetro minolta	
				L	b
Kronstad	90 min	980	MB	76.6	12.2
Roelfs		920	MB	79.1	14.4
Torocahui		960	MB	74.9	13.1
Kronstad	150 min	915	MB	76.7	12.6
Roelfs		865	MB	80.9	14.5
Torocahui		900	MB	76.1	13.7
Kronstad	180 min	890	MB	78.2	12.7
Roelfs		830	B	80.5	14.7
Torocahui		860	B	73.9	14.0
Kronstad	210 min	840	MB	77.2	13.3
Roelfs		825	B	78.9	15.0
Torocahui		795	B	74.9	14.2
Kronstad	240 min	820	B	75.4	13.5
Roelfs		720	B	78.1	15.3
Torocahui		540	R	80.0	15.1

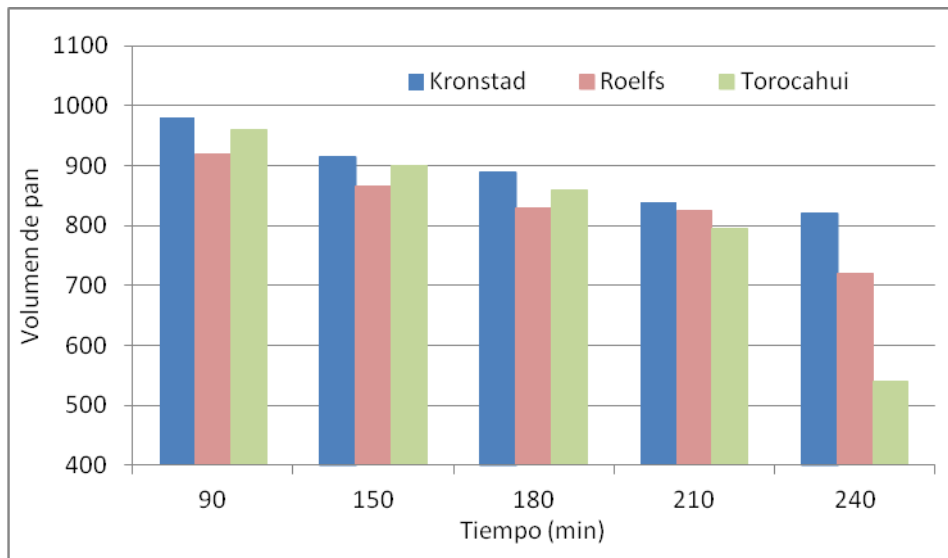


Fig. 13.- Efecto del tiempo de fermentación en el volumen de pan.

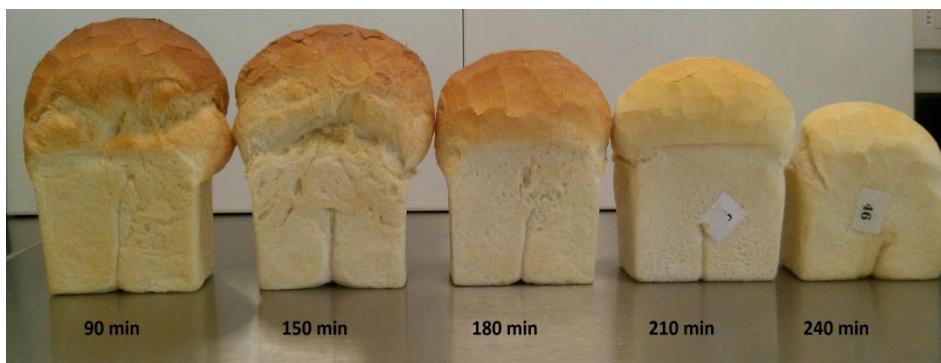


Fig. 14.- Diferencia en cuanto al volumen de pan para la variedad Torocahui en diferentes tiempos de fermentación.

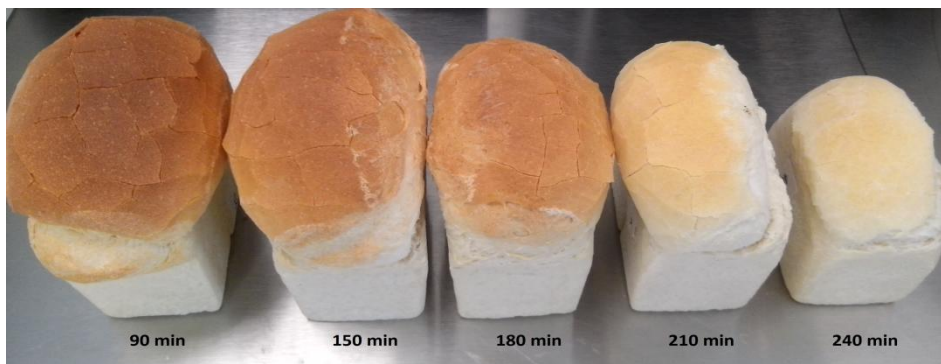


Fig. 15.- Diferencia del color de la corteza del pan para la variedad Torocahui en diferentes tiempos de fermentación.

Debido a la mala calidad de los panes elaborados con un tiempo de fermentación largo (240 min) se decidió descartar del análisis de ácido fítico a los panes elaborados con este tiempo de fermentación puesto que se busca tener relación entre calidad panadera y calidad nutricional del pan.

La determinación de ácido fítico para estas 3 variedades (Kronstad, Roelfs y Torocahui) se realizaron en: harina integral, harina refinada y en producto terminado (pan) con 4 diferentes tiempos de fermentación (90, 150, 180 y 210 min). Los valores para ácido fítico se reportaron (g/100 g) en base seca y en % de sólidos de harina refinada para el caso del pan (Tabla 6). En harina integral en promedio la concentración de ácido fítico fue de 0.7013 g/100 g y para harina refinada de 0.1223 g/100 g (Figura 16), lo que nos indica que durante la molienda en promedio se redujo la concentración de ácido fítico presente en grano (82.6 %), quedando solo un 17.4 % de ácido fítico en harina refinada.

Tabla 6.- Contenido de ácido fítico para las variedades Kronstad, Roelfs y Torocahui en harina integral, harina refinada y en pan elaborado con diferentes tiempos de fermentación.

Variedad	Tipo de muestra	Fe total (mg/kg), XRF	Ácido fítico (g/100g) Promedio	Ácido fítico (g/100g) en base seca y % de sólidos de harina	% Ácido fítico no hidrolizado respecto a		Relación molar (moles/100 g) Phy:FeT	% Cenizas	
					Harina Integral	Harina Refinada			
Kronstad	H. Integral	33.6	0.587	0.659			16.6		
	H. Refinada		0.133	0.152	23.1			0.44	
	Pan	90 min		0.050	0.062	9.4	40.8		
		150 min		0.048	0.061	9.2	39.8		
		180 min		0.046	0.058	8.9	38.4		
210 min			0.044	0.056	8.5	37.0			
Roelfs	H. Integral	33.2	0.615	0.694			17.7		
	H. Refinada		0.107	0.123	17.7			0.41	
	Pan	90 min		0.036	0.045	6.5	36.7		
		150 min		0.032	0.040	5.8	32.6		
		180 min		0.037	0.047	6.7	38.1		
210 min			0.034	0.044	6.3	35.5			
Torocahui	H. Integral	26.2	0.667	0.751			24.3		
	H. Refinada		0.080	0.092	12.2			0.38	
	Pan	90 min		0.046	0.059	7.8	64.0		
		150 min		0.040	0.051	6.8	56.0		
		180 min		0.040	0.051	6.8	55.6		
210 min			0.039	0.049	6.6	53.8			

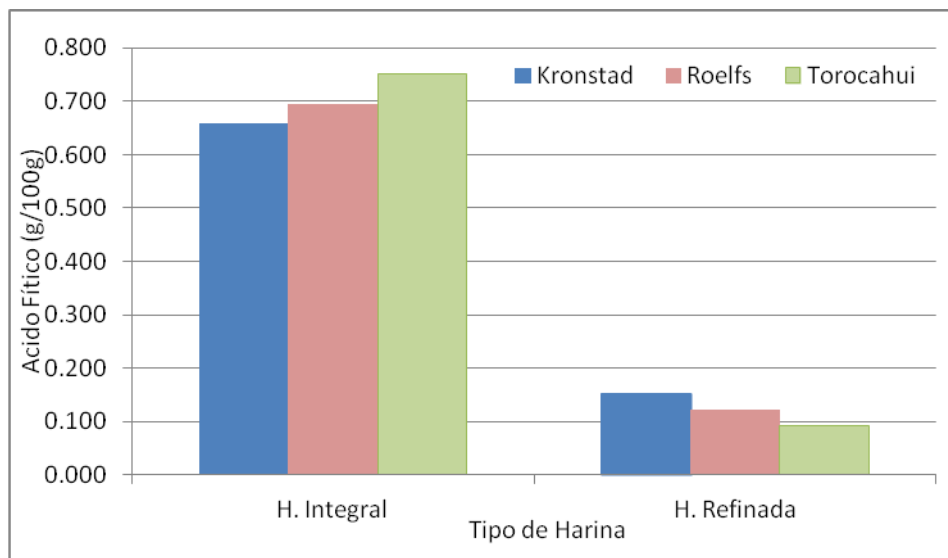


Fig. 16.- Contenido de ácido fítico en harina integral y harina refinada para las variedades Kronstad, Roelfs y Torocahui.

Por otra parte en este estudio se encontró que el contenido de ácido fítico tiene relación directa con el contenido de cenizas ($R^2=0.998$) en la harina refinada (Fig. 17) con valores de 0.44, 0.41 y 0.38 % para la variedad Kronstad, Roelfs y Torocahui, respectivamente, donde estos valores se encuentran dentro del límite aceptable que es de 0.45 - 0.55 %.

Cabe la pena aclarar que esta relación se obtuvo con la utilización de pocas muestras, por lo tanto es necesario validar este resultado en próximos estudios con la utilización de un grupo más amplio de muestras.

Por otra parte también se encontró que el contenido de cenizas en harina refinada tiene relación con el contenido de dureza en el grano (Fig. 18).

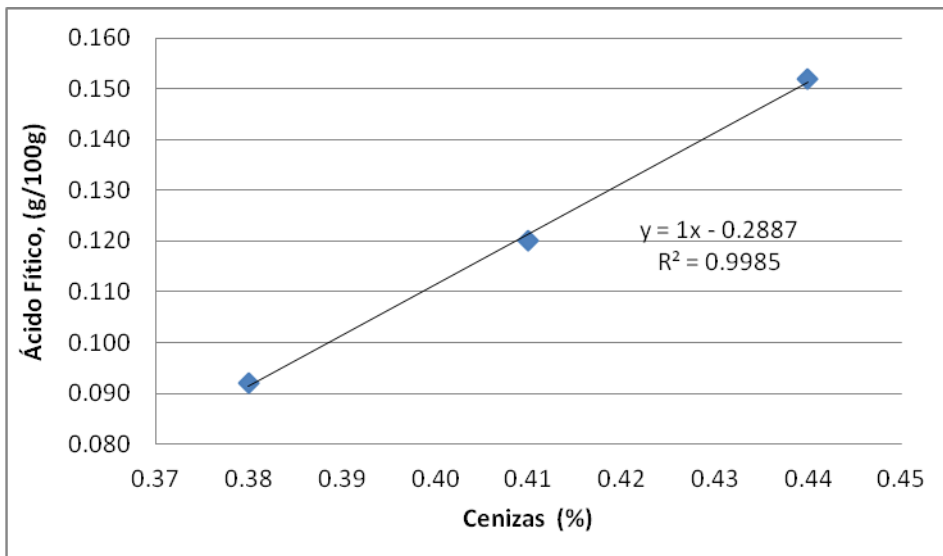


Fig. 17.- Relación entre el contenido de cenizas (%) y la concentración de ácido fítico en harina refinada (g/100g).

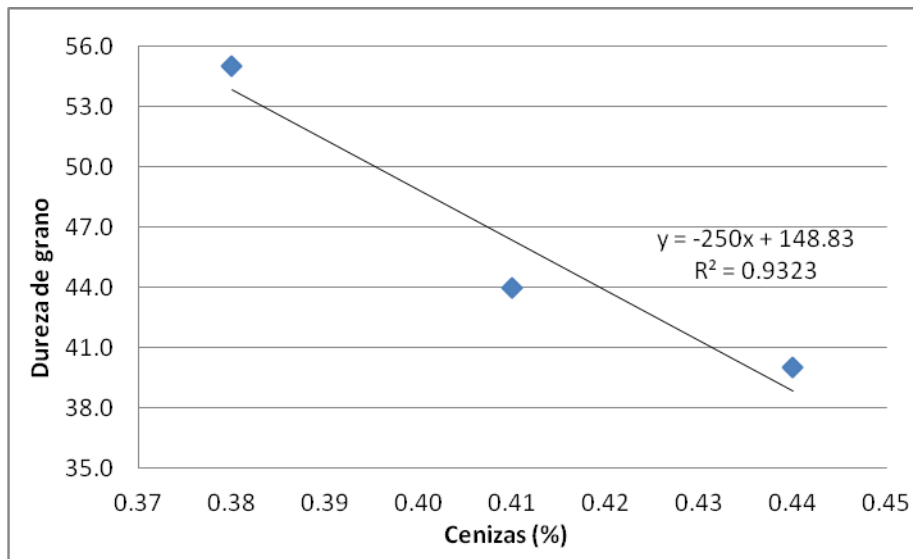


Fig. 18.- Relación entre el contenido de cenizas (%) y dureza de grano

Para producto terminado (pan) se encontró que la fermentación tiene efecto positivo en la hidrólisis de ácido fítico puesto que en promedio después de la

fermentación queda presente aproximadamente solo un 44 % del ácido fítico, lo que indica que durante la fermentación se hidrolizó el 56 % respecto al contenido de ácido fítico presente en la harina refinada. En cuanto al uso de diferentes tiempos de fermentación para las 3 variedades estudiadas se encontró que hay una ligera tendencia al alza para la hidrólisis de ácido fítico (a excepción de la variedad Roelfs), donde tiempos cortos de fermentación producen una menor hidrólisis de ácido fítico y viceversa (Figura 19).

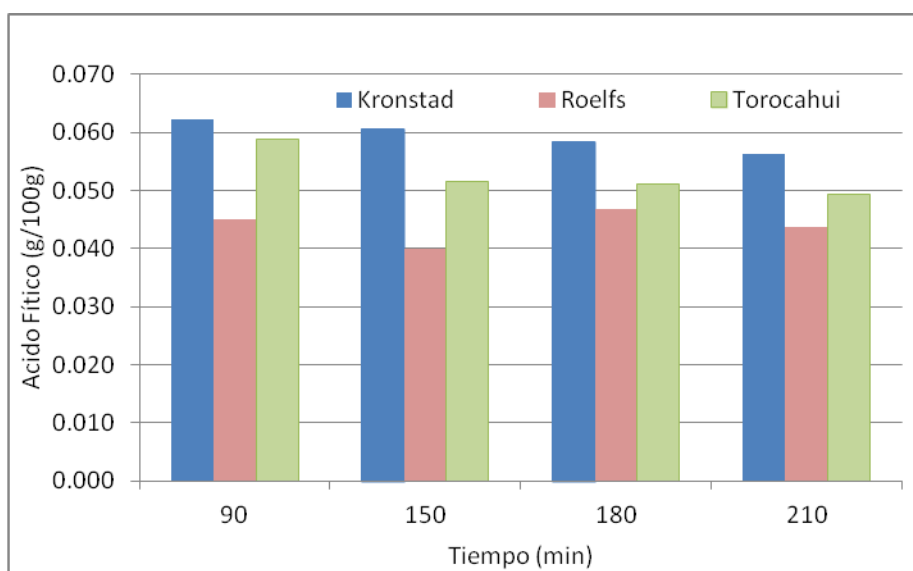


Fig. 19.- Contenido de ácido fítico en pan para las variedades Kronstad, Roelfs y Torocahui a diferentes tiempos de fermentación.

Por último en la tabla 6 se pueden observar los valores para la relación molar fitato:Fe total, la cual como ya se ha mencionado anteriormente es una medida para reportar la biodisponibilidad mineral y donde las variedades Kronstad, Roelfs y

Torocahui reportan valores de 16.6, 17.7 y 24.3 (moles/100 g) en harina integral, los cuales tienden a ser mayores que los reportados anteriormente para las 20 muestras.

DISCUSION

Hierro Potencialmente Biodisponible (FePB)

Para las muestras analizadas se observó variabilidad en la concentración de Fe total en el grano de trigo, teniendo un rango de 29.7-41.0 mg/kg, que resulta ser un rango más estrecho que el que reportan otros autores: 34.1 - 55.5 mg/kg (Akner *et al.* 2012) y 23.5 - 65.8 mg/kg (Salunke *et al.* 2011), es importante tomar en cuenta que la concentración de hierro puede estar influenciada por varios factores como por ejemplo el genético, el tipo de suelo en la que se sembró, la fertilización utilizada, etc.

En este punto fue posible observar que el Fe total guarda cierta relación con parámetros de calidad como lo son: Peso de mil granos (TESTWT), dureza de grano (HARDNES), proteína en grano (GRNPROT), proteína en harina refinada (FLRPROT) y sedimentación (SDS); las relaciones mostraron una R^2 de 0.185, 0.340, 0.284, 0.434 y 0.564, respectivamente, donde se observa que las relaciones más altas son respecto al contenido de proteína. En cuanto al FePB este no muestra gran variabilidad en cuanto a su determinación, teniendo un rango de 8.9 - 12.1 mg/kg. En este punto es importante tomar en cuenta que la determinación de FePB,

es solo una aproximación en lo que respecta a determinar o cuantificar la biodisponibilidad de Fe, debido a que para medir la biodisponibilidad de minerales es necesario utilizar técnicas más avanzadas como lo es la utilización de modelos *in vitro* como el de células Caco2. Es importante señalar que en este trabajo solo se está suponiendo que el Fe que es liberado a partir de la simulación de la digestión estomacal con ácidos fuertes, es el Fe libre o Fe que esta potencialmente biodisponible para ser asimilado por el organismo.

También es importante tomar en cuenta que la biodisponibilidad de hierro a su vez está determinada por una serie de factores dietéticos y relacionados con el huésped. Los factores dietéticos que contribuyen a la reducción de la biodisponibilidad de hierro a partir de dietas a base de cereales incluyen la presencia de varios inhibidores de micronutrientes (ácido fítico, polifenoles, fibras alimenticias, etc.) y/o la ausencia de potenciadores de la absorción de hierro (proteínas musculares, ácido ascórbico, la inulina, la cebolla, el ajo, etc.) (Salunke *et al.* 2011).

De acuerdo a los resultados se puede observar que la relación de Fe total y FePB en este estudio fue nula ($R^2=0.0977$), lo que indica que no necesariamente a mayor concentración de hierro en el grano, es mayor el potencial de biodisponibilidad de hierro determinado por nuestra técnica. Investigaciones realizadas por Salunke *et al.* (2011) para la determinación de biodisponibilidad de hierro mediante un modelo *in vitro* acoplado en digestión/Caco-2 muestra una ligera relación entre el hierro

biodisponible y el hierro total ($r = 0.38$), lo cual es un indicio que el FePB no está determinado en su totalidad en función del Fe total. Por lo tanto, la biodisponibilidad mineral resulta ser un tema complejo que podría verse afectado por diversos factores en el grano como por ejemplo la composición química del trigo (contenido de proteína, dureza y llenado de grano, etc.), además de otros factores mencionados anteriormente.

Ácido Fítico

En cuanto a la presencia de ácido fítico se puede notar que existe variabilidad en su concentración en las diferentes muestras de trigo analizadas. Los valores obtenidos para ácido fítico en harina integral oscilaron entre 0.522 y 0.705 g/100 g, con una media de 0.615 g/100 g los cuales resultan ser menores a los reportados por Febles *et al.* (2002) quien reportó 0.850 g/100 g en harina integral y 0.296 g/100 g en harina refinada. Estos valores de ácido fítico en harina refinada son similares a los reportados por otros autores para diferentes tipos de trigo: Akner *et al.* (2012) con 0.114-0.166 g/100 g, Frontela *et al.* (2008) con 0.209 g/100 g y Gargari *et al.* (2007) con 0.263 g/100 g. Se puede notar que los valores para ácido fítico en harina refinada son menores a los de harina integral, esto se debe a que alrededor del 60 % de los minerales y el 85 % de ácido fítico se localizan en la capa de aleurona del grano (Itkonen *et al.* 2012), el cual al someterse a un proceso de molienda es eliminado. Por tanto el grado de refinamiento de la harina causa efecto en el contenido de ácido fítico al igual que de minerales presentes en la harina.

Por otra parte se encontró que el contenido de ácido fítico no está relacionado con el contenido de Fe total y el FePB ($R^2=0.0132$ y $R^2=0.0319$, respectivamente), Salunke *et al.* (2011) reportaron estos mismos resultados. En este estudio se esperaba encontrar cierta relación entre el FePB y la concentración de ácido fítico, debido a que se creía que a mayor concentración de ácido fítico habría una menor cantidad o menor biodisponibilidad de Fe; donde los resultados demuestran que el tema de la biodisponibilidad de hierro es muy complejo, al igual que pueden llegar a serlo las metodologías para estimarlo.

También es sabido que la biodisponibilidad de minerales puede ser estimada mediante relaciones molares fitato/mineral donde los valores obtenidos para nuestras 20 muestras se encontró en un rango de 12-17.7 mol/100 g. Según se ha reportado por varios autores (Saha *et al.* 1994 y López *et al.* 1998), las relaciones molares críticas por encima del cual la absorción de ciertos minerales se ve comprometida son: Ca > 1.56, Fe > 14 y Zn > 10, lo que relaciones molares por encima de estos valores indican una reducción en la biodisponibilidad de minerales.

En términos de repetibilidad y reproducibilidad para las técnicas elaboradas (determinación del potencial de biodisponibilidad de hierro y ácido fítico), la precisión se encontró dentro de los límites aceptables debido a que los coeficientes de variación obtenidos para ambas técnicas no superaron el 10 % entre réplicas, lo cual nos indica que son técnicas confiables además de que permiten analizar un gran número de muestras en tiempo corto y a un menor costo, lo cual es necesario para un programa de fitomejoramiento.

El desarrollo de estas técnicas podrían complementar el criterio de selección de germoplasma en el programa de mejoramiento del proyecto *Harvest Plus*, por lo tanto se busca hacer cruzamientos de líneas que de manera natural contribuyan a una mejor biodisponibilidad de hierro con líneas que cuenten con parámetros de calidad adecuados.

Determinación de ácido fítico en pan con diferentes tiempos de fermentación

Calidad física del pan

Se observó que el tiempo de fermentación influye en el volumen final de pan, en la calidad de la estructura interna (miga) y en el color de la corteza, donde un tiempo corto de fermentación (90 min) dió como resultado un volumen promedio de 950 cm³ y una calidad de miga muy buena, mientras que un tiempo largo de fermentación (240 min) dió como resultado un volumen promedio de 690 cm³ y una calidad de miga regular. Estos resultados se deben a que en tiempos de fermentación cortos hay mayor disponibilidad de azúcares fermentables (glucosa) para la levadura lo cual se ve reflejado en una mayor producción de CO₂ y, por tanto, en un mayor volumen de pan. Por otra parte la calidad de la miga depende de la calidad del gluten, el cual durante la fermentación sufre diversas modificaciones estructurales, por lo tanto variedades de trigo de gluten medio-fuerte o fuerte resisten mejor un tiempo largo de fermentación que un trigo de gluten débil. Por último el color de la corteza del pan fue más oscuro en tiempos cortos de fermentación (90

min) respecto a tiempos largos (240 min) lo cual se debe a que en un tiempo largo la mayoría de los azúcares disponibles se consumieron por la acción de las levaduras y lo cual produjo que durante el horneado del pan no haya habido azúcares suficientes para producir la reacción de Maillard.

Ácido fítico en harina integral y harina refinada para las muestras utilizadas en la elaboración de pan de caja.

En cuanto a la determinación de ácido fítico en harina integral se encontraron valores de concentración de 0.659, 0.694 y 0.751 g/100 g para la variedad Kronstad, Roelfs y Torocahui respectivamente. Estos resultados coinciden con los reportados anteriormente para las 20 muestras analizadas en la validación del micro-método para ácido fítico, donde el rango de valores se encontró 0.522-0.705 g/100 g. En cuanto a la concentración de ácido fítico en harina refinada las concentraciones fueron menores a los de harina integral con 0.152, 0.123, y 0.092 g/100 g para la variedad Kronstad, Roelfs y Torocahui, respectivamente. Esto se debe a que como ya se ha mencionado anteriormente el ácido fítico se encuentra mayoritariamente en la parte externa del grano (aleurona) y durante el proceso de molienda la mayor parte es eliminada en el salvado, por lo que el grado de refinamiento de la harina influye de manera directa en el contenido de ácido fítico. Por otra parte se cree que durante el acondicionamiento del grano (antes de la molienda) se activa la enzima fitasa endógena del trigo debido a que este se deja reposar aproximadamente 24 horas con una determinada humedad. Investigaciones realizadas para la determinación de

la actividad de fitasa (Okot-Kotber *et al.* 2003) muestran que la parte externa del grano (salvado) tiene una mayor actividad de fitasa que la harina refinada (0.9-3.9 FTU/g salvado), lo cual podría estar hidrolizando parte del ácido fítico presente en el salvado durante esta etapa de acondicionamiento del grano.

Cabe mencionar que como ya se demostró anteriormente (Fig. 17) el ácido fítico tiene una relación directa con el contenido de cenizas en la harina refinada ($R^2=0.998$), y que está a su vez se relaciona con la dureza de grano ($R^2=0.932$), esto se debe a que al ser la variedad Kronstad y Roelfs de endospermo duro y semi-duro respectivamente, tienden a sufrir más daños durante la molienda ocasionando una mayor contaminación de cenizas que los trigos de endospermo suave como lo es la variedad Torocahui.

Ácido fítico en pan

La fermentación del pan tiene un efecto positivo en la degradación del contenido de ácido fítico de la harina refinada puesto que en promedio después de la fermentación queda presente solo un 44 % del ácido fítico, lo que indica que durante el proceso de fermentación se hidroliza aproximadamente un 56% del ácido fítico presente en la harina refinada, lo cual según Giovanelli *et al.* (1994) se debe a la acción de fitasas procedentes de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* utilizada en la elaboración de pan y a la activación de las enzimas fitasas endógenas del trigo, donde Okot *et al.* (2003) reportan valores de actividad de fitasa en harina refinada de

0.3 a 0.9 FTU/g harina, que durante la fermentación se encuentran en condiciones óptimas de temperatura, humedad y pH para su actividad.

Estudios realizados por Požrl *et al.* (2009) reportan que el tipo de harina para la elaboración de pan influye en el contenido de ácido fítico, donde panes elaborados con harinas integrales tuvieron mayor contenido de ácido fítico que los elaborados con harina refinada. Požrl también estudió el efecto en la hidrólisis de ácido fítico mediante el uso de 3 procedimientos diferentes en la elaboración de pan (panificación directa, indirecta y adición de masa fermentada), donde el pH tuvo una influencia significativa en la hidrólisis de ácido fítico, pues muestras con un pH más bajo tenían un contenido de ácido fítico inferior, que fue especialmente notable en las muestras preparadas con la adición de masa fermentada, además reporta que una temperatura de fermentación mayor a 30°C disminuye el contenido de ácido fítico.

La panificación es un procedimiento de múltiples fases, y las fases más importantes son la fermentación y la cocción. Un alto contenido de agua en la masa aumenta la hidrólisis de ácido fítico (Türk *et al.* 1992). El factor más importante es la acidez de la masa. El pH óptimo para la actividad de fitasa en masa de trigo es 4.5, y la temperatura óptima es 55 °C (Fretzdorff *et al.* 1992). La velocidad de hidrólisis y la consiguiente disminución del contenido de ácido fítico dependen de la actividad fitasa, temperatura, pH, contenido de agua, tiempo de fermentación, enzimas añadidas, y otros parámetros (Türk *et al.* 1992 y Penella *et al.* 2008). La cantidad de

ácido fítico hidrolizada en diferentes tipos de pan varía entre 13-100 % (López *et al.* 2001). La adición de la levadura puede aumentar la cantidad de ácido fítico hidrolizado (Türk *et al.* 1996). La hidrólisis de ácido fítico es una consecuencia de la actividad de fitasa que está presente en el trigo y levaduras, y probablemente debido a la presencia de los microorganismos que están implicados en la fermentación de la masa (Giovanelli *et al.* 1994).

En general, un pH bajo, un tiempo de fermentación largo, y una mayor adición de levadura resultan en una degradación más intensiva del ácido fítico (Hesseltine 1979 y Lasztity *et al.* 1990). Durante el horneado de pan la degradación del ácido fítico se produce debido a la activación de la fitasa (endógena y exógena) y a las altas temperaturas. Según Oberleas (1985) la presencia de fitasa activa durante los primeros minutos de la cocción tiene una importancia mayoritaria. Esta enzima presenta normalmente una actividad máxima a pH 5.5 y a una temperatura de 60 °C, por lo que bajo las condiciones de cocción lo más probable que se encuentre inactivada, por otra parte es sabido que los cereales y leguminosas que son sometidos a tratamiento térmico experimentan una reducción en el contenido de fitatos que, a su vez, está en función de una serie de factores como el tipo de tratamiento térmico, la temperatura, el pH, el producto y la presencia de proteínas y cationes asociados a la molécula de ácido fítico.

CONCLUSIONES

Las técnicas elaboradas para potencial de biodisponibilidad de hierro y de ácido fítico, resultan ser técnicas útiles, de fácil uso, rápidas y de bajo costo, para medir la concentración de FePB y ácido fítico, ideales para un programa de mejoramiento.

La concentración de FePB calculado con nuestra metodología no tuvo correlación significativa con la concentración de hierro total ni con la presencia de ácido fítico, por lo tanto ninguno de estos parámetros está en función del otro, pudiendo deberse a otro tipo de factores como por ejemplo el genético. Es necesario en próximos estudios validar la metodología utilizada para estimar el FePB en este estudio con otras más complejas como puede ser el modelo con células Caco-2

El grado de refinamiento en el proceso de molienda y la fermentación son técnicas fáciles y eficaces para obtener una alta degradación de ácido fítico, además de que un tiempo corto de fermentación es suficiente para producir una disminución significativa en la concentración de ácido fítico y para obtener una buena calidad en productos de panificación, donde el objetivo final no es sólo el incremento en la concentración de hierro en el trigo, sino también la conservación de la calidad del grano y de sus subproductos.

Por lo tanto, es importante generar líneas de trigo harinero que tengan alto contenido de hierro y mayor contenido de Fe biodisponible así como también hacer

más biodisponible a este micronutriente mediante técnicas genéticas y de procesamiento.

Este trabajo aporta información y herramientas valiosas para los mejoradores de trigo, los cuales se encargan de generar las nuevas variedades de trigo contribuyendo a mejorar la biodisponibilidad de micronutrientes a la dieta, y dirigiéndose específicamente a poblaciones de países en vías de desarrollo en los cuales se consume el trigo en su forma natural como harina integral, sin pasar por procesos de fortificación o fermentación.

BIBLIOGRAFIA

Akhter, S., Saeed, A., Irfan, M., Malik, A. K., 2012. *In vitro* dephytinization and bioavailability of essential minerals in several wheat varieties. *Journal of Cereal Science*. 56:741-746.

Beckhoff, B., Kanngießner, B., Langhoff, N., Wedell, R., Wolff, H., 2006. *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. Springer-Verlag. Heidelberg, Berlin. 4-13.

Boss, C. B., and Fredeen, K. J. 1997. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*. Perkin Elmer. Second Edition. USA. 2-11.

Choi, E. Y., Graham, R., Stangoulis, J., 2007. Semi-quantitative analysis for selecting Fe and Zn dense genotypes of staple food crops. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20:496-505.

Febles, C. I. 1998. *Estudio del contenido de fitatos en derivados de cereales de consumo en Canarias*. Tesis Doctoral. 22-23.

Febles, C. I., Arias A., Hardisson, A., Rodriguez, A. C., Sierra, A., 2002. Phytic Acid level in wheat flours. *Journal of Cereal Science*. 36:19-23.

Fretzdorff, B., Brummer, J. M., 1992. Reduction of phytic acid during breadmaking of whole-meal breads. *Cereal Chemistry*. 69:266-270.

Frontela, C., Ros, G., Martínez C., 2008. Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Murcia, España. 58:215-219.

Frontela, C., García, F. J., Ros, G., Martínez, C., 2008. Phytic acid and inositol phosphates in raw flours and infant cereals: the effect of processing. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21:343-350.

Gargari, B. P., Mahboob, S., Razavieh, S. V., 2007. Content of phytic acid and its mole ratio to zinc in flour and breads consumed in Tabriz, Iran. *Food Chemistry*. 100:1115-1119.

Giovanelli G., Polo R., 1994. Formation of fermentation products and reduction in phytic acid in wheat and rye flour breadmaking. *Italian Journal of Food Science*. 1:71-83, 89.

Grases, F., Simonet, B. M., March, J. G., Prieto, R. M., 2000. Inositol hexakisphosphate in urine: the relationship between oral intake and urinary excretion. *BJU Int.* 85:138-142.

Han, O., Failla, M. L., Hill, A. D., Morris, E. R., Smith, J. C. Jr. 1994. Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. *The Journal of Nutrition.* 124:580-587.

Hesseltine C. W., 1979. Some important fermented foods of Mid-Asia, the Crumb East and Africa. *Journal of American Oil Chemists' Society.* 56:367-374.

Hix, D. K., Klopfenstein, C. F., Walker, C. E. 1997. Physical and Chemical Attributes and Consumer Acceptance of Sugar-Snap Cookies Containing Naturally Occurring Antioxidants. *Cereal Chemistry.* 74:281-283.

Hurrell, R. F., 2001. Modifying the composition of plant foods for better human health. In: Nösberguer, J., Geiger, H. H., Struik, P. C. *Crop Science: Progress and Prospects.* CABI publishing, Bristol. 53-64.

Itkonen, S. T., Ekholm, P. J., Kemi, V. E., Lamberg-Allardt, C. J. E. 2012. Analysis of in vitro digestible phosphorous content in selected processed rye, wheat and barley products. *Journal of Food Composition and Analysis.* 25:185-189.

Konietzny, U., Greiner, R. 2003. Phytic Acid: Nutritional Impact. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, B. Caballero, L. Trugo, P. Finglas. El Sevier, London, UK. 4555–4563.

Konietzny, U., Greiner, R. 2004. Bacterial phytase: potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology.* 35:11-18.

Lasztity R., Lasztity L. 1990. Phytic acid in cereal technology. In: *Advances in Cereal Science and Technology.* American Association of Cereal Chemists Publishers, St. Paul. 309-371.

Loewus, F. A., 2001. Biosynthesis of Phytate in Food Grains and Seeds. In: *Food Phytates.* CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 53-61.

Lopez, H. W., C. Coudray, J. Bellanger, H. Younes, C. Demigné and Rémésy, C. 1998. Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. *Journal of Nutrition.* 128: 1192-1198.

Lopez H. W., Krespine V., Guy C., Messenger A., Demigne C., Remesy C. 2001. Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and

increases soluble magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:2657-2662.

Miller, D. D., Schrickler, R. B., Rasmussen, R. R., and Campen, V. D. 1981. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 34:2248-2256.

NAP (National Academy Press), 2001. Washington, D.C. <http://www.nap.edu>.
http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=10026&page=296

Oberleas D. 1985. Factors influencing availability of minerals. in: *Proceedings of the western Hemisphere Nutrition Congress IV*. 1975 Acton MA: Publishing Sciences Group. 1985: 156-61

Okot-Kotber, M., Kwon, J. Y., Katherine B., Allan L. 2003. Phytase activity in extracts of flour and bran from wheat cultivars: enhanced extractability with b-glucanase and endo-xylanase. *Journal of Cereal Science*. 38:307-315

Ortiz-Monasterio, J.I., Palacios-Rojas, N., Meng, E., Pixley, K., Trethowan, R., Peña, R.J. 2007. Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *Journal of Cereal Science*. 46: 293-307.

Owen, R. W., Weisgerberg U. M., Spiegelhalder, B., Bartsch H. 1996. Faecal phytic acid and its relation to other putative markers of risk for colorectal cancer. *Gut* 38:591-597.

Penella J. M., Collar C. 2008. Effect of wheat bran and enzyme addition on dough functional performance and phytic acid levels in bread. *Journal of Cereal Science*. 48:715-721.

Peña, J. R., Pérez H. P., Villaseñor, M. E., Gómez, V. M., Mendoza, L. M., Monterde, G. R., 2007. Calidad de la cosecha del trigo en México. Ciclo otoño-invierno 2005-2006. Publicación especial del CONASIST. México, D.F. 1.

Peña, J. R., Velu, G., Singh, P. R., Huerta-Espino, J., 2012. Flour fortification and wheat biofortification as strategies to fight iron and zinc undernourishment. *Cereal Food Nutrition and Health Session*. 159-160.

Požrl T., Kopjar M., Kurent I., Hribar J., Janeš A., Simčič M. 2009. Phytate degradation during breadmaking: The influence of flour type and breadmaking procedures. *Czech Journal of Food Sciences*. 27:29-38.

Preedy, R. V., Watson, R. R., Patel, B.V. 2011 *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*. Academic Press. 4-5.

Türk M., Carlsson N. G., Sandberg A. S. 1996. Reduction in the levels of phytate during whole meal bread making; effect of yeast and wheat phytases. *Journal of Cereal Science*. 23:257- 264.

Türk M., Sandberg A. S., 1992. Phytate degradation during breadmaking: Effect of phytase addition. *Journal of Cereal Science*. 15:281–294.

Saha, P. R., C. M. Weaver and Mason, A. C. 1994. Mineral bioavailability in rats from intrinsically labeled whole wheat flour of various phytate levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 2531-2535.

Salunke, R., Neelam, K., Rawat, N., Tiwari, V. K., Dhaliwal, H. S., Roy, P. 2011. Bioavailability of iron from wheat *Aegilops* derivatives selected for high grain iron and protein contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59:7465-7473.

Schröterová, L., Hasková, P., Rudolf, E., Cervinka, M. 2010. Effect of phytic acid and inositol on the proliferation and apoptosis of cells derived from colorectal carcinoma. *Oncology Reports* 23:787-793.

Urbano, G., López J. M., Aranda, P., Vidal V. C., Tenorio, E., Porres, J. 2000. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *Journal Physiology Biochemistry*. 56:283-294.

Velu, G., Ortiz-Monasterio, I., Cakmak, I., Hao, Y., Singh, R. P. 2014. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *Journal of Cereal Science*. 59:365-372.

Welch, R. M., Graham, R. D. 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*. 55:353-364.