

Fe, Zn and Se availability of a functional chicken meat product enriched with olive oil and hydroxytyrosol in an *in vitro* gastrointestinal digestion system and Caco-2 cells.

L. Martínez¹, G. Nieto², G. Ros³

Dpto. de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. . Universidad de Murcia. 30071 Espinardo (Murcia)

¹lorena.martinez23@um.es, ²gnieto@um.es, ³gros@um.es

1. INTRODUCCIÓN

En España la carne y los productos cárnicos se encuentran entre los grupos de alimentos más consumidos, y entre ellos destacan los productos, que representan el 23% de la carne que consumimos (AESAN/MARM, 2011). Para su formulación, se añaden aditivos sintéticos, como por ejemplo: sulfitos, BHA y BHT. El uso de éstos conlleva la preocupación por parte del consumidor, ya que diversos estudios correlacionan su consumo con el desarrollo de enfermedades (asma, cáncer, etc.). Por ello, el uso de conservantes naturales para incrementar la vida útil de la carne es una prometedora herramienta, ya que numerosas plantas y especias muestran propiedades antioxidantes.

En este sentido, el hidroxitirosol (HXT), un feniletanoide con demostradas propiedades antioxidantes *in vitro*. Este compuesto fenólico es encontrado comúnmente en la hoja del olivo y el aceite proveniente de este fruto, responsable de su intenso sabor y aroma (Yadav & Singh, 2004; Wang *et al.* 2013). Al tratarse de un compuesto antioxidante ligado a ciertos minerales, como el gluconato Fe(II) en las olivas negras, que cataliza la oxidación de este compuesto, es posible que el HXT actúe en la biodisponibilidad biológica de algunos minerales y elementos traza (Wang *et al.* 2013).

El objetivo general de este experimento fue comprobar la funcionalidad nutricional y tecnológica de un producto cárnico (mortadela) a base de carne de pollo alimentado con Zn y Se (en sus formas orgánicas) y, posteriormente enriquecido durante su elaboración con aceite de oliva virgen extra (AOVE) e hidroxitirosol (HXT). Esta funcionalidad se evaluó mediante la medida de la descomposición del HXT y la biodisponibilidad de oligoelementos - Fe, Zn y Se - (absorción, transporte y metabolismo) tras una digestión *in vitro* utilizando el modelo de cultivo celular con células gastrointestinales Caco-2.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Extractos y piensos utilizados.

El extracto HXT utilizado fue suministrado por Nutrafur-Frutarom (Murcia, España), procedente de aguas de vegetación del olivo con un 23% de pureza.

Los pollos de los que provenía la carne con la que se elaboraron las muestras fueron alimentados con dos variedades de pienso: un control (0.3 ppm selenito de sodio y 80 ppm óxido de Zn) y un pienso enriquecido (0.2 ppm Se y 50 ppm Zn).

2.2. Muestras

Las muestras se elaboraron siguiendo las siguientes fórmulas:

1. Control (Cc): 71.3% carne control; 1.5% sal; 27.2% agua.
2. 23% HXT (Hc): 71.3% carne control; 1.5% sal; 50 ppm extracto HXT al 23%; 27.2% agua.
3. AOVE+HXT (HAc): 61.6% carne control; 1.5% sal; 10% AOVE; 50 ppm HXT 23%; 27.2% agua.
4. Control tto (Ct): 71.3% carne tratamiento; 1.5% sal; 27.2% agua.
5. 23% HXT tto (Ht): 71.3% carne tratamiento; 1.5% sal; 50 ppm HXT 23%; 27.2% agua.

6. AOVE+HXT tto(HAT):61.6% carne tratamiento;1.5% sal;10% AOVE;50 ppm HXT 23%;27.2% agua.

Una vez se mezclaron todos los ingredientes de cada una de las fórmulas, se procedió a su picado, se embutió a vacío y se llevó a cabo su cocción hasta llegar a una temperatura interna de 75°C. Seguidamente se enfriaron las muestras hasta los 4°C.

2.3. Digestión *in vitro*

Para la digestión *in vitro* de las emulsiones cárnicas se siguió el modelo descrito por Kanner & Lapidot (2001) en cuatro fases: digestión gástrica, digestión intestinal, ultracentrifugación (223,487 g a 4°C, durante 95 minutos) y filtración (0.2 µm). Finalmente las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su adición a la monocapa celular.

2.4. Cultivo celular

Para este experimento se utilizó la línea celular Caco-2 (ECACC, nº 86010202, Salisbury, UK), entre sus pases 26 y 31. Se utilizó el medio de cultivo EMEM con rojo fenol para el mantenimiento de la línea, al que se le añadió suero bovino fetal (10%), glutamina (1%), aminoácidos no esenciales (1%) y penicilina y estreptomicina (1%) como antibiótico. El mantenimiento de la línea se llevó a cabo en frascos de 75 cm², cambiando el medio en días alternos e incubándola a 37°C, con 5% CO₂ y 95% humedad. Cuando se llegó al 80% de confluencia se realizó un subcultivo.

2.5. Patrones

Como blanco se utilizó un buffer compuesto por: 0.75% NaCl, 0.074% KCl, 0.09% Glc, 1.3% HEPES y 0.012% MgSO₄ en agua milliQ y ajustado a pH 7.2.

Las soluciones patrón fueron: 200 mM FeCl₃*6H₂O (400 mM ácido nitrotriácético y 20 mM HCl) para el Fe, 50 mM ZnSO₄*7H₂O para el Zn, y 5 mM Na₂SeO₃ para el Se.

2.6. Absorción, transporte y metabolismo en células Caco-2

Las células se sembraron a una densidad de 30000 células/cm² sobre soportes permeables tipo "Transwell" de policarbonato con 0.4 µm de diámetro de poro y superficie 3.8 cm² en placas de seis pocillos. Cambiando el medio en días alternos, a día 13 del subcultivo se añadieron los digeridos y los patrones durante una hora, previamente acondicionados, para determinar la biodisponibilidad mineral.

2.7. Determinación de HXT mediante HPLC

La concentración de compuestos fenólicos procedentes del extracto HXT de los digeridos que se añadieron a la monocapa celular, fue determinada mediante HPLC, siguiendo el método de Benavente *et al.* (2000). El equipo utilizado fue el Hemlett-Packard HP 1100, equipado con un detector de diodo array. La fase estacionaria fue una C18 LiChrospher® 100 (250 x 4 mm) tamaño de partícula de 5 µm (Merck, Darmstadt, Germany) y calentado a 30°C. El ratio de flujo 1 ml/min y la absorción fue a 280 nm.

2.8. Determinación mineral mediante ICP-OES

La concentración de minerales traza (Fe, Zn y Se) en las muestras fue determinada mediante espectroscopía de plasma (ICP-OES), con el equipo ICAP THERMO DUO 6500.

2.9. Determinación de la biodisponibilidad mineral

La retención mineral se calculó como la diferencia entre la concentración mineral en la monocapa celular incubada y la solución patrón. El transporte, fue la diferencia entre la cantidad mineral obtenida en la cámara basal y el buffer usado como blanco. La captación, fue la suma de la cantidad mineral retenido y transportado. Mientras que el porcentaje retenido y transportado se calculó como diferencia mineral entre el captado el transportado (Frontela *et al.* 2009).

2.10. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis descriptivo de los resultados. El efecto del tratamiento usado y la biodisponibilidad de nutrientes fue determinado mediante una ANOVA usando pares de factores. El test de homogeneidad utilizado fue el de Scheefe mediante el programa estadístico Statistix8. Se consideraron aquellas diferencias significativas $p < 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Presencia de HXT en las muestras tras su digestión

Tabla 1. Concentración HXT en las muestras (fracción soluble añadida a las células Caco-2)

MUESTRAS	CONTROL			TRATAMIENTO		
	CONTROL	HXT 23%	AOVE + HXT 23%	CONTROL	HXT 23%	AOVE + HXT 23%
HXT añadido (ppm)	0.0±0.0 ^b	50±0.0 ^a	50±0.0 ^a	0.0±0.0 ^b	50±0.0 ^a	50±0.0 ^a
Concentración HXT (ppm)	0.0±0.0 ^e	45.43±0.01 ^c	48.5±0.01 ^b	0.0±0.0 ^e	42.57±0.02 ^d	49.48±0.01 ^a
% Descomposición	0.0±0.0 ^e	9.14±0.01 ^b	3±0.01 ^c	0.0±0.0 ^e	14.86±0.02 ^a	1.04±0.01 ^d

a, b, c, d, e: Diferentes letras en la misma fila indicant diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$)

HXT: hidroxitirosol

AOVE: Aceite de Oliva Virgen Extra

El porcentaje de descomposición del HXT tras la digestión es muy bajo, aunque existen grandes diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$). Esto demuestra que la capacidad antioxidante del HXT no se mermaría si se incorporase en un producto cárnico, como también han demostrado publicaciones previas (Ramírez *et al.* 2015).

También se puede observar que el HXT es más biodisponible cuando se combina con el AOVE, lo que resulta comprensible al contener compuestos de origen común, como ya comprobaron otros autores (Ramírez *et al.* 2015; Rubió *et al.* 2014).

3.2. Estudio de la absorción, transporte y metabolismo en células Caco-2

3.2.1. Biodisponibilidad del Fe

Tabla 2. Fe: Retención, transporte y captación celular en las seis muestras.

Muestra	CONTROL			TRATAMIENTO		
	CONTROL	HXT 23%	AOVE + HXT 23%	CONTROL	HXT 23%	AOVE + HXT 23%
Concentración Fe (mg/ml)	0.27±0.01 ^d	0.33±0.01 ^c	0.25±0.01 ^d	0.44±0.01 ^b	0.43±0.01 ^b	0.49±0.01 ^a
Mineral añadido (µg)	4.32±0.01 ^d	4.51±0.02 ^c	4.64±0.07 ^b	4.3±0.001 ^d	4.88±0.0009 ^b	4.95±0.07 ^a
Mineral retenido (µg)	1.13±0.08	1.15±0.03	1.18±0.08	1.12±0.0001	1.21±0.0008	1.15±0.08
% Retención	26.16±0.4 ^a	25.5±0.3 ^b	25.43±0.35 ^b	26.05±0.55 ^a	24.8±0.37 ^c	23.23±0.58 ^c
Mineral transportado(µg)	1.06±0.003 ^c	1.32±0.0 ^b	1.37±0.0 ^b	1.17±0.0001 ^c	1.52±0.09 ^a	1.54±0.03 ^a
% Transporte	24.54±0.42 ^f	29.27±0.18 ^d	29.52±0.08 ^c	27.21±0.04 ^e	31.15±0.4 ^a	31.11±0.2 ^b
Mineral captado (µg)	2.13±0.001	2.03±0.0004	2.09±0.1	2.01±0.08	2.15±0.11	2.26±0.1
% Captación	49.31±1.98	45.01±3.08	45.04±4.39	46.74±4.03	44.05±4.26	45.65±2.13
Eficiencia de transporte (ET)	6.42 ±1.91 ^d	7.46±0.11 ^{bc}	7.5±0.37 ^b	7.08±0.16 ^c	7.72±0.33 ^a	7.22±0.18 ^{cd}
Eficiencia de captación (EC)	12.89 ±1.17 ^a	11.48±2.95 ^b	11.45±2.34 ^b	12.17±0.21 ^{ab}	10.92±2.05 ^c	10.6±1.13 ^c

a, b, c, d, e, f: Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$)

HXT: hidroxitirosol

AOVE: Aceite de Oliva Virgen Extra

No hubo diferencias significativas entre los valores de absorción de las muestras, pero sí entre las concentraciones basales, la cantidad de Fe retenido y transportado. Así, las muestras control de ambos lotes tuvieron un mayor porcentaje de captación mineral ($p < 0.05$), y las muestras a las que se le añadió HXT, un alto porcentaje de mineral transportado ($p < 0.05$). La eficiencia de transporte y captación se incrementó un 7.5% y un

12%, respectivamente. Esto puede ser debido a que la cantidad de Fe fue mayor en los controles debido a la mayor cantidad de carne utilizada.

Resultados similares fueron obtenidos por Soresen & Bukhave (2010) o por Pachón *et al.* (2008) al determinar la biodisponibilidad de Fe en carne sobre células Caco-2.

3.2.2. Biodisponibilidad del Zn

Tabla 3. Zn: Retención, transporte y captación celular en las seis muestras.

Muestra	CONTROL			TRATAMIENTO		
	CONTROL	HXT 23%	AOVE + HXT 23%	CONTROL	HXT 23%	AOVE + HXT 23%
Concentración Zn (mg/ml)	0.14±0.01 ^e	0.16±0.01 ^{de}	0.18±0.01 ^{cd}	0.21±0.01 ^{bc}	0.22±0.006 ^b	0.27±0.01 ^a
Mineral añadido (µg)	3.79±0.02 ^e	4.49±0.11 ^c	6.04±0.27 ^b	4.07±0.1 ^d	4.63±0.06 ^c	6.9±0.55 ^a
Mineral retenido (µg)	1.7±0.02 ^c	2.23±0.1 ^{bc}	2.73±0.26 ^{ab}	1.8±0.11 ^c	2.4±0.06 ^{cd}	3.52±0.56 ^a
% Retención	44.85±0.18 ^d	49.66±0.01 ^b	45.19±0.16 ^c	44.23±0.2 ^d	51.83±0.61 ^a	51.01±0.32 ^{ab}
Mineral transportado (µg)	0.94±0.001 ^c	1.29±0.12 ^{bc}	2.23±0.18 ^a	1.23±0.13 ^{bc}	1.4±0.12 ^b	2.15±0.06 ^a
% Transporte	24.8±0.07 ^e	28.73±0.01 ^d	36.92±0.01 ^a	30.22±0.01 ^c	30.23±0.01 ^c	31.16±0.26 ^b
Mineral captado (µg)	1.15±0.1 ^{ab}	0.97±0.06 ^{bc}	1.08±0.06 ^{ab}	1.04±0.01 ^{abc}	0.83±0.0 ^c	1.23±0.11 ^a
% Captación	30.34±4.17 ^a	21.6±1.32 ^c	17.88±3.9 ^d	25.55±1.26 ^b	17.92±0.94 ^d	17.82±1.93 ^d
Eficiencia de transporte(ET)	11.12±0.03 ^e	14.26±0.02 ^c	16.68±0.21 ^a	13.36±0.3 ^d	15.66±0.12 ^b	15.89±0.01 ^b
Eficiencia de captación (EC)	13.6±1.87 ^a	10.72±3.27 ^c	8.07±6.51 ^e	11.3±2.35 ^b	9.28±1.01 ^d	9.08±4.5 ^d

a, b, c: Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre las muestras (p <0.05)

HXT: hidroxitirosol

AOVE: Aceite de Oliva Virgen Extra

Las muestras enriquecidas con Zn orgánico, obtuvieron un mayor concentración basal de este mineral (p<0.05). Dentro de cada lote, las muestras con HXT, o combinado con AOVE, obtuvieron una mayor concentración de Zn, con respecto a los controles (p<0.05). Así, el porcentaje de retención mineral aumentó hasta un 51% en el lote de las tratadas. El porcentaje de mineral captado por las Caco-2 fue más bajo (p<0.05) en muestras con HXT, alcanzando hasta un 17%, en comparación al 25 y 30%, respectivamente, en control y control tratamiento. Mientras que, el porcentaje de mineral transportado fue más uniforme en las tratadas (30%) y más variable en el lote de los controles (entre 24 y 37%).

Estos resultados son algo contradictorios, por ejemplo, a los obtenidos por Frontela *et al.* (2009) o Frontela *et al.* (2011) en fórmulas de leche infantiles en las que sí se incrementó la absorción de Zn. Sin embargo, no se ha encontrado literatura en carne.

3.2.3. Biodisponibilidad del Se

Tabla 4. Se: Retención, transporte y captación celular en las seis muestras.

Muestra	CONTROL			TRATAMIENTO		
	CONTROL	HXT 23%	AOVE + HXT 23%	CONTROL	HXT 23%	AOVE + HXT 23%
Concentración Se (mg/ml)	0.01±0.0 ^b	0.01±0.0 ^b	0.01±0.0 ^b	0.02±0.0001 ^a	0.01±0.0 ^b	0.01±0.0 ^b
Mineral añadido (µg)	4.5±0.0	4.5±0.0	4.5±0.0	4.5±0.0	4.5±0.0	4.5±0.0
Mineral retenido (µg)	1.5±0.0 ^a	1.5±0.0 ^a	1.5±0.0 ^a	1.31±0.0 ^b	1.5±0.0 ^a	1.5±0.0 ^a
% Retención	33.33±0.0 ^a	33.33±0.0 ^a	33.33±0.0 ^a	29.18±0.98 ^b	33.33±0.0 ^a	33.33±0.0 ^a
Mineral transportado (µg)	1.5±0.0 ^a	1.5±0.0 ^a	1.5±0.0 ^a	1.31±0.0 ^b	1.5±0.0 ^a	1.5±0.0 ^a
% Transporte	33.33±0.0 ^a	33.33±0.0 ^a	33.33±0.0 ^a	29.18±0.01 ^b	33.33±0.0 ^a	33.33±0.0 ^a
Mineral captado (µg)	1.5±0.0 ^b	1.5±0.0 ^b	1.5±0.0 ^b	1.87±0.0 ^a	1.5±0.0 ^b	1.5±0.0 ^b
% Captación	33.33±0.0 ^b	33.33±0.0 ^b	33.33±0.0 ^b	41.64±0.69 ^a	33.33±0.0 ^b	33.33±0.0 ^b
Eficiencia de transporte (ET)	11.10±0.0 ^a	11.10±0.0 ^a	11.10±0.0 ^a	8.51±0.1 ^b	11.10±0.0 ^a	11.10±0.0 ^a
Eficiencia de captación (EC)	11.10±0.0 ^b	11.10±0.0 ^b	11.10±0.0 ^b	12.15±0.19 ^a	11.10±0.0 ^b	11.10±0.0 ^b

a, b, c: Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$)
HXT: hidroxitirosol
AOVE: Aceite de Oliva Virgen Extra

No existen diferencias significativas con respecto a los controles en muestras con HXT y/o AOVE. Sin embargo, se apreció un ligero incremento ($p < 0.05$) en la concentración inicial (0.01 mg/ml) y en la captación del mismo (8.31%) en las enriquecidas con Se orgánico. Aunque no se ha encontrado literatura similar en carne, Catalayud *et al.* (2012) y Moreda-Piñero *et al.* (2013) obtuvieron resultados comparables en pescado y derivados, debido a que el Se es un elemento de muy baja biodisponibilidad en el intestino, por lo que la eficiencia de absorción no supera un 10%.

4. CONCLUSIONES

En conclusión, el HXT es un antioxidante natural apropiado para su uso como ingrediente en alimentos cárnicos funcionales debido a su resistencia a la descomposición durante la digestión. En general, la biodisponibilidad de oligoelementos se incrementó en el lote de las mortadelas procedentes de pollos alimentados con Zn y Se orgánicos, comparado con la carne control, excepto en el caso del Fe. Además, el HXT actuó como un potenciador de la absorción, sobre todo, en el caso del Zn. Debido a la limitada literatura sobre este tema, éste es un campo muy interesante de explotar para futuras aplicaciones en la industria alimentaria moderna.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESAN/MARM. (2011). **Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (ENIDE)**. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Río JA. **Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves**. *Food Chemistry*, 68; 2000: 457-462.
- Calatayud M, Devesa V, Virseda JR, Barberá R, Montoro R, Vélez D. **Mercury and selenium in fish and shellfish: Occurrence bioaccessibility and uptake by Caco-2 cells**. *Food and Chemical Toxicology*, 50(8); 2012: 2696-2702.
- Frontela C, Peso-Echarri P, González CA, López R, Martínez C, Ros G. **A critical perspective on cells lines studies in nutrition: the case of intestinal absorption**. In: **Caco-2 and their uses**. Nova Science Publishers, Inc; 2011: ISBN: 978-61209-917-0.
- Frontela C, Ros G, Martínez C. **Iron and calcium availability from digestion of infant cereals by Caco-2 cells**. *Europe Food Researcher and Technology*; 2009.
- Kanner J, Lapidot T. **The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants**. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11); 2001: 1388-1395.
- Moreda-Piñero J, Moreda-Piñero A, Romarís-Hortas V *et al.* **In vitro bioavailability of total selenium and selenium species from seafood**. *Food Chemistry*, 139(1-4); 2013: 872-877.
- Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays**. *Journal Immunology Methods*, 65;1983: 55-63.
- Pachón H, Stoltzfus RJ, Glahn RP. **Chicken thigh, chicken liver and iron fortified wheat flour increase iron uptake in an in vitro digestion/Caco-2 cell model**. *Nutrition Research*, 28(12); 2008:851-858.
- Ramírez JP, Samaniego C, Castañeda MC, Villalón M, López H. **Phenols and the antioxidant capacity of Mediterranean vegetables prepared with extra virgin olive oil using different domestic cooking techniques**. *Food Chemistry*, 188; 2015: 430-438.
- Rubió L, Macià A, Castell A, Pinent M, Blay T, Ardévol A, Romero MP, Motilva MJ. **Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models**. *Food Chemistry*, 149; 2014: 277-284.
- Soresen AD, Bukhave K. **Iron uptake by Caco-2 cells following in vitro digestion: Effects of heat treatments of pork meat and pH of the digests**. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(4); 2010: 230-235.
- Viadel, MB. **Biodisponibilidad de calcio, hierro y cinc en leguminosas mediante ensayos in vitro con cultivos celulares**. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
- Wang D, Williams BA, Ferruzzi MG, D'Arcy BR. **Microbial metabolites, but not other phenolics derived from grape seed phenolic extract, are transported through differentiated Caco-2 cell monolayers**. *Food Chemistry*, 138(2-3); 2013: 1564-1573.
- Yadav AS, Singh, RP. **Natural preservatives in poultry meat products**. *Natural Product Radiance*, 3(4); 2004.