



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH**

Estudio de matrices de pectina modificada y bis- glicinato ferroso, para su aplicación en la fortificación de alimentos

Martin Francisco Jiménez Meza

ADVERTIMENT La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del repositori institucional UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) i el repositori cooperatiu TDX (<http://www.tdx.cat/>) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei UPCommons o TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a UPCommons (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del repositorio institucional UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) y el repositorio cooperativo TDR (<http://www.tdx.cat/?localeattribute=es>) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio UPCommons No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a UPCommons (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the institutional repository UPCommons (<http://upcommons.upc.edu/tesis>) and the cooperative repository TDX (<http://www.tdx.cat/?localeattribute=en>) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading nor availability from a site foreign to the UPCommons service. Introducing its content in a window or frame foreign to the UPCommons service is not authorized (framing). These rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA



PROGRAMA DE DOCTORADO EN TECNOLOGÍA

AGROALIMENTARIA Y BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología

**Estudio de matrices de pectina modificada y bis-
glicinato ferroso, para su aplicación en la fortificación
de alimentos.**

Doctorando: Martin Francisco Jiménez Meza

Directores de tesis: Francesc Sepulcre (UPC), José Álvarez

(USFQ) Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.

ENERO, 2024

Este trabajo ha sido financiado por el programa PoliGrant de la Universidad San Francisco de Quito (HUBi 17478). Por el Decanato de Investigación de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbaya, Quito 170901, Ecuador. Es un trabajo realizado tanto en la UPC como en la USFQ.

De esta investigación hemos conseguido una publicación científica aceptada y publicada en la revista, *Colloids and Interfaces*, de acceso abierto sobre coloides y química de interfaces, publicada en línea por MDPI. Con un CiteScore - Q2. Factor de impacto: 2,4 (2022). Manuscript ID: colloids-2289857. Titulada “Matrices of Native and Oxidized Pectin and Ferrous Bisglycinate and their In Vitro Behavior through Gastrointestinal Conditions”. La publicación recoge los resultados principales de SEM, FTIR, TGA, DSC, hinchamiento y liberación de hierro con la pectina nativa comercial, que obtuvimos de la tesis doctoral. Además, nos encontramos escribiendo un segundo artículo con los resultados del uso de la pectina de maracuyá.

Con base en esta tesis, usamos la tecnología de una matriz de pectina aprovechando sus grupos funcionales para realizar también una invención con solicitud de patente nacional e internacional titulada “Compuesto de propionato pectinato de cromo, para administración vía oral y que sea absorbido en el intestino grueso, para el mejoramiento en el rendimiento deportivo y contra el síndrome metabólico”. Presentada a la oficina receptora SENADI y WIPO PCT, con No. de Solicitud SENADI-2020-79793, y Aplicación Internacional No. PCT/EC20121/050004. El cual se encuentra en fase de solicitud de búsqueda internacional y modificación de reivindicaciones.

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que fueron parte de este proceso y que me ayudaron de alguna manera a lograr esta meta.

A mis abuelos que me heredaron el gusto e ingenio por la ciencia y la investigación, gracias por su gran ejemplo.

A mis padres que de una forma incondicional siempre estuvieron apoyándome en mis estudios y los objetivos que me he planteado.

A mis hermanos que siempre han confiado en mí y han sido un respaldo moral para nunca darme por vencido.

A mis tutores Francesc y José, que han sido una guía y apoyo excepcional, siempre estando dispuestos a ayudarme y prepararme de la mejor manera en este camino de la investigación.

A todas las personas que fueron parte de este estudio en la USFQ, sin su aporte esto no hubiera sido posible.

A todos mis familiares y amistades que esperan verme triunfando y logrando mis metas.

¡Muchas gracias a todos!

Resumen

Se desarrollaron matrices coloidales de pectina nativa y oxidada para mejorar la biodisponibilidad del hierro a través del tracto digestivo. El bisglicinato ferroso (Gly-Fe), obtenido por precipitación de la quelación de glicina a Fe²⁺, se mezcló con pectina cítrica nativa y oxidada con peróxido, y posteriormente se liofilizó. Los controles incluyeron matrices con hierro y glicina sin quelación. Las muestras resultantes se caracterizaron mediante FTIR, SEM y TGA/DSC antes y después de la digestión in vitro, que se realizó en fluidos simulados salivales, gástricos e intestinales. Durante estas digestiones se evaluó la capacidad de hinchamiento y la liberación de hierro. Todas las formulaciones de matriz fueron porosas y, si bien la oxidación de la pectina no alteró la estructura, cambió sus propiedades, aumentando la estabilidad térmica, probablemente debido a un mayor número de posibilidades de interacción a través de los grupos carbonilo generados durante la oxidación. Esto también dio como resultado una menor capacidad de hinchamiento, observándose una mayor estabilidad cuando se usaba el complejo quelado. Se encontró mayor hinchamiento en los fluidos gástricos e intestinales. La oxidación de la pectina también incrementó la retención de la forma quelada, al contrario de lo que se observó con el hierro no quelado. Por lo tanto, existe un efecto importante de la oxidación de pectina combinada con hierro en forma de bisglicinato ferroso sobre la estabilidad de la matriz y la liberación de hierro a través del tracto digestivo. Estas matrices podrían potencialmente mejorar la biodisponibilidad del hierro, disminuyendo los cambios organolépticos en los alimentos fortificados con hierro.

Palabras clave: pectina cítrica; pectina modificada; bisglicinato ferroso; transporte de hierro; digestión matricial

Abstract

Colloidal matrices of native and oxidized pectin were developed to improve iron bioavailability through the digestive tract. Ferrous bisglycinate (Gly-Fe²⁺), obtained by precipitation of glycine chelation to Fe²⁺, was mixed with native and peroxide-oxidized citrus pectin, and subsequently lyophilized. Controls included matrices with iron and glycine without chelation. The resulting samples were characterized through FTIR, SEM, and TGA/DSC before and after *in vitro* digestion, which was performed in simulated salivary, gastric, and intestinal fluids. During these digestions, swelling capacity and iron release were assessed. All matrix formulations were porous, and while pectin oxidation did not alter architecture, it changed their properties, increasing thermal stability, likely due to greater number of interaction possibilities through carbonyl groups generated during oxidation. This also resulted in lower swelling capacity, with greater stability observed when using the chelated complex. Higher swelling was found in gastric and intestinal fluids. Pectin oxidation also increased retention of the chelated form, contrary to what was observed with unchelated iron. Thus, there is an important effect of pectin oxidation combined with iron in the form of ferrous bisglycinate on matrix stability and iron release through the digestive tract. These matrices could potentially improve iron bioavailability, diminishing organoleptic changes in fortified iron foods.

Keywords: citrus pectin; modified pectin; ferrous bisglycinate; iron transport; matrix digestion

Resum

Es van desenvolupar matrius col·loïdals de pectina nativa i oxidada per millorar la biodisponibilitat del ferro a través del tracte digestiu. El bisglicinat fèrric (Gly-Fe), obtingut per precipitació de la quelació de la glicina a Fe^{2+} , es va barrejar amb pectina cítrica nativa i oxidada amb peròxid, i posteriorment es va liofilitzar. Els controls incloïen matrius amb ferro i glicina sense quelació. Les mostres resultants es van caracteritzar mitjançant FTIR, SEM i TGA/DSC abans i després de la digestió in vitro, que es va realitzar en fluids salivals, gàstrics i intestinals simulats. Durant aquestes digestions es va avaluar la capacitat d'inflor i l'alliberament de ferro. Totes les formulacions de la matriu eren poroses i, tot i que l'oxidació de la pectina no va alterar l'arquitectura, va canviar les seves propietats, augmentant l'estabilitat tèrmica, probablement a causa del major nombre de possibilitats d'interacció mitjançant grups carbonil generats durant l'oxidació. Això també va provocar una menor capacitat d'inflor, amb una major estabilitat observada quan s'utilitzava el complex quelat. Es va trobar una inflor més gran en els líquids gàstrics i intestinals. L'oxidació de la pectina també va augmentar la retenció de la forma quelada, al contrari del que es va observar amb el ferro no quelat. Així, hi ha un efecte important de l'oxidació de la pectina combinada amb el ferro en forma de biglyscinate fèrric sobre l'estabilitat de la matriu i l'alliberament de ferro a través del tracte digestiu. Aquestes matrius podrien millorar potencialment la biodisponibilitat del ferro, disminuint els canvis organolèptics en els aliments fortificats amb ferro.

Paraules clau: pectina de cítrics; pectina modificada; bisglicinat fèrric; transport de ferro; digestió matricial

Contenido

Agradecimientos	1
Resumen.....	2
Abstract.....	3
Resum	4
CAPÍTULO 1	8
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. El hierro como catión para la fortificación de alimentos.....	9
1.2. La Glicina como transportador de cationes	12
1.3. Bisglicinato ferroso.....	15
1.4. Características estructurales de la pectina y sus aplicaciones.....	22
1.5. Beneficios de la pectina en la salud	25
1.6. Pectina de maracuyá	26
1.7. Modificaciones químicas de la pectina	27
CAPÍTULO 2	30
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. General.....	30
2.2. Específicos	30
CAPÍTULO 3	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. Obtención de bisglicinato ferroso	32
3.2. Extracción de pectina a partir del maracuyá.....	33
3.3. Caracterización de pectina	34

3.4.	Oxidación de pectina	35
3.5.	Preparación de matrices de pectina, glicina, hierro y bisglicinato ferroso	36
3.6.	Preparación de perlas de pectina hierro y glicina	38
3.7.	Digestión in vitro	39
3.8.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	40
3.9.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, FTIR	40
3.10.	Análisis térmicos.....	41
3.11.	Grado de hinchamiento.....	42
3.12.	Cuantificación de liberación de hierro.....	42
3.13.	Análisis estadístico	43
CAPÍTULO 4		44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1.	Quelados de glicina y hierro por precipitación	44
4.2.	Extracción de pectina de maracuyá	47
4.3.	Caracterización de la pectina extraída de maracuyá.....	48
4.4.	Oxidación de pectina nativa.....	49
4.5.	Caracterización de pectina nativa	50
4.6.	Morfología de las matrices de pectina, glicina y hierro.....	51
4.7.	Análisis del espectro de FTIR de la pectina extraída del maracuyá	55
4.8.	Análisis de interacciones de unión entre el hierro, glicina y bisglicinato ferroso, con las matrices de pectina a través de espectros FTIR	58
4.9.	Análisis de las interacciones de perlas de pectina con glicina y hierro a través de los espectros FTIR.	62

4.10. Análisis de estabilidad térmica matricial con TGA y DSC de las muestras de matrices.....	66
4.11. Grado de hinchamiento.....	72
4.12. Liberación de hierro.....	76
CAPÍTULO 5.....	80
5. CONCLUSIONES.....	80
6. REFERENCIAS.....	86

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

En Ecuador los productos secundarios que se generan en los procesos industriales de frutas, se tratan generalmente como desechos, si bien pueden ser potenciales materias primas para nuevos productos en función de sus características, solo una mínima parte es usada para la producción de fertilizante, el resto ha ocasionado conflictos ambientales por la dificultad en la gestión de estos desechos (Ulloa, 2012). La gran disponibilidad de frutas y el crecimiento de la producción industrial de bebidas han permitido que en el país incremente la elaboración de jugos frescos, el cual genera una gran cantidad de residuos compuestos principalmente por cortezas, restos de pulpa y semillas. En el país estos residuos son tratados como desechos sólidos urbanos y pasan por un sistema de recolección, almacenaje y disposición final que en resumen genera gastos tanto para las comercializadoras como para los sistemas públicos de aseo. Los residuos que se obtienen del procesamiento de la fruta están constituidos principalmente por carbohidratos mayoritariamente pectinas, fibra y proteínas, además de aceites esenciales en distintos porcentajes. Estos compuestos pueden ser extraídos o separados para la generación de nuevos productos de valor comercial por medio de distintos procesos, tales como el aislamiento de la pectina. Por ejemplo, el 75% del cultivo de maracuyá se industrializa para la obtención de jugo concentrado, ya que el jugo representa un 30% - 40% de la fruta, mientras que la cáscara se presenta el 50-60%, y las semillas 10-15%. (Macías Camacho, 2014). En la industria de la preservación de alimentos, la pectina es utilizada principalmente como un agente gelificante, en la fabricación de jaleas, mermeladas y gelatinas. La pectina también encuentra aplicación en varias operaciones de procesamiento de alimentos tales como sopesar, estabilización o agente formador de espuma. La pectina es una materia prima cuya demanda ha aumentado de acuerdo a los

datos provistos por el Banco Central del Ecuador, en los que se muestra que, en el 2013, la demanda era cercana a las 53 120 toneladas de pectina, pero, no hay empresas productoras nacionales por lo que la mayoría de la demanda se provee a través de las importaciones de países productores como Colombia, México, Alemania, Brasil, entre otros (Macías Camacho, 2014).

Por otro lado, en el campo de la fortificación de alimentos se conoce la incorporación de metales como el hierro para prevenir y contrarrestar enfermedades, sin embargo, no se garantiza la biodisponibilidad o absorción adecuada por el organismo, gracias a componentes que se encuentran en los alimentos que atrapan el hierro y otros cationes metálicos, asociándolo con problemas de salud como la anemia (Yunarti et al., 2013).

Por esta razón se ha pensado en una forma de aprovechamiento que puede ser de alto valor económico y ambiental, proponiendo la extracción de pectina a partir de los desechos de fruta, puesto que se conocen varias aplicaciones para este compuesto tanto en el campo médico como en la industria, para poder aportar con el cambio en la matriz productiva del Ecuador y contribuir con el aprovechamiento de desechos para el uso industrial y cuidado ambiental, junto con el mejoramiento de productos agroalimentarios para cuidar y mejorar la salud de las personas.

1.1. El hierro como catión para la fortificación de alimentos.

La deficiencia nutricional del hierro es una de las más extendidas. Globalmente más de 2 billones de personas sufren de anemia por deficiencia de hierro, por esta razón la fortificación de alimentos con hierro ha sido recomendada como uno de los enfoques preferidos para prevenir y erradicar la deficiencia de hierro (Mehansho, 2006). El éxito de la fortificación de hierro depende de un nivel significativo de hierro biodisponible en los alimentos sin afectar el sabor y la apariencia del producto final consumido. La

biodisponibilidad del hierro en el cuerpo no está completamente garantizada porque los componentes de los alimentos pueden atrapar el hierro y otros cationes metálicos como zinc y cobre, lo que provoca problemas de salud como la anemia. El contenido de Fe y otros minerales es generalmente alto en las legumbres. Sin embargo, las legumbres también contienen factores antinutricionales, como inhibidores de proteínasa, lectina, oligosacáridos de rafinosa, saponinas, polifenoles y fitatos. Los factores antinutricionales reducen el valor nutricional de un alimento al reducir la digestibilidad o la biodisponibilidad de los nutrientes. El fitato, y algunos de los productos de degradación del fitato, son inhibidores bien conocidos de la absorción de minerales dietéticos esenciales, en particular el hierro no hemo y el Zn. Ciertos polifenoles que se unen al Fe son potentes inhibidores de la absorción del hierro no hemo (Sandberg, 2002). El ácido fítico no es digerible para humanos o animales, y se sabe que es antinutritivo como inhibidor de la adsorción de hierro en alimentos a base de soya como la leche de soya, el tempeh y el tofu (0,4% p/v, 0,2% p/v, 0,1% p/v, respectivamente), así como en granos, legumbres, semillas oleaginosas y frutos secos (Yunarti et al., 2013). El fitato (hexafosfato de inositol) constituye del 1 al 3 % de los granos de cereales, las semillas de legumbres y las nueces, y también se presenta en bajas concentraciones en las raíces, los tubérculos y las verduras. En particular, los cereales integrales y las legumbres tienen un alto contenido de fitato y también de los minerales Zn, Fe y Mg. En las semillas de leguminosas, el fitato se encuentra en los cuerpos proteicos del endospermo. El fitato se presenta como un complejo aminado, que es insoluble al pH fisiológico del intestino. Se considera antinutricional y reduce la absorción en el intestino humano de minerales dietéticos esenciales como Fe, Zn y Ca. Se ha demostrado una inhibición dependiente de la dosis de la absorción de Fe, Zn y Ca por parte del fitato en humanos. Además, recientemente se descubrió que el trifosfato de inositol y el tetrafosfato contribuyen al

efecto negativo sobre la absorción de Fe de los alimentos procesados que contienen una mezcla de fosfatos de inositol, probablemente por interacciones con los fosfatos de inositol más fosforilados (Sandberg, 2002).

Ciertos polifenoles son capaces de unirse al Fe, lo que hace que el Fe unido al complejo no esté disponible para la absorción. Según Sandberg (2022), la cantidad de grupos galóilo fenólicos que se unen al Fe en los alimentos corresponde aproximadamente al grado de inhibición de la absorción de Fe, sin embargo, llegó a la conclusión de que todos los tipos principales de polifenoles alimentarios pueden inhibir fuertemente la absorción dietética de hierro no hemo. Las legumbres contienen cantidades variables de polifenoles y generalmente las cantidades se consideran más altas en las semillas de colores. Se encontró que los frijoles de la especie *Phaseolus vulgaris* contienen altas cantidades de polifenoles, mientras que el contenido de polifenoles en los guisantes es muy bajo (Sandberg, 2002).

Las sales de oxalato también son poco solubles en el pH intestinal. Se sabe que el ácido xálico disminuye la absorción de Ca en animales monogástricos. El efecto del oxalato en la absorción de Ca en humanos es menos claro. Sin embargo, los estudios con oxalato de calcio sugieren que otros factores en las espinacas contribuyen a la baja absorción de Ca. Cierta cantidad de ácido oxálico también existe en los frijoles (Sandberg, 2002).

Las fuentes de hierro altamente biodisponibles (sulfato ferroso y fumarato ferroso) son solubles en ambientes acuosos neutros o ácidos, pero pueden causar cambios organolépticos que dan como resultado una baja aceptabilidad y una vida útil más corta del producto (Hurrell, 2022). La fortificación con hierro puede causar resabio metálico, sabor inaceptable como resultado de la rancidez mediada por la oxidación de las grasas, cambios de color indeseables como resultado de interacciones con antocianinas,

flavonoides y taninos, y degradación de vitaminas, por ejemplo, vitamina C y vitamina A, que son importantes para la absorción y utilización de hierro, y metales como el yodo de la oxidación de yoduro y yodato a yodo libre que escapa como gas (Hurrell, 2022; Mellican et al., 2003). El desarrollo de una tecnología de enriquecimiento que hace que las fuentes de hierro sean más biodisponibles y más compatibles con el vehículo alimentario, sigue siendo un desafío para los científicos de alimentos y la industria alimentaria. Por lo tanto, este problema se ha abordado mediante la quelación de minerales con un aminoácido, más comúnmente glicina ($C_2H_5NO_2$), que tiene una estructura lo suficientemente estable para la protección mineral en el proceso digestivo y lo suficientemente débil para la liberación de minerales en el intestino. Los suplementos de hierro producidos con este método han tenido éxito en la reducción de la anemia por deficiencia de hierro en mujeres embarazadas (Abdel Moety et al., 2017). La capacidad quelante de la glicina también se puede utilizar con varios cationes metálicos como el zinc y el cobre, entre otros (Tepavitchar vitcharova et al., 2012). Lo más importante es que en varios casos se ha demostrado la alta biodisponibilidad de los quelatos en los procesos de absorción digestiva, como el bisglicinato de hierro como alternativa en la prevención y tratamiento de la anemia en recién nacidos (Bagna et al., 2018; O. Pineda & Ashmead, 2001).

1.2. La Glicina como transportador de cationes

La glicina forma parte en la síntesis de colágeno y elastina, constituyen la tercera parte del total de residuos de aminoácidos de estas proteínas. Además, este aminoácido participa en la síntesis de muchos compuestos en el metabolismo, como el glutatión, que actúa principalmente en la lucha contra el estrés oxidativo. La glicina también participa en la desintoxicación de ácido benzoico y como neurotransmisor (Jackson A.A., 1991). Sin embargo, algunas investigaciones han demostrado problemas en cómo se distribuye

la glicina en la síntesis de colágeno y en otras funciones metabólicas cuando existe una deficiencia en la dieta (Meléndez-Hevia et al., 2009). La estequiometría de una reacción catalizada por la enzima glicina hydroxymethyltransferasa (GHMT) que usa el tetrahidrofolato (THF) como coenzima, limita gravemente la capacidad de síntesis de glicina para satisfacer las demandas del metabolismo, que es menor de lo que necesita el ser humano o un animal de gran tamaño. La glicina es catalogada como un aminoácido no esencial, porque puede ser sintetizada por el metabolismo del cuerpo, a pesar de que existen evidencias de que el cuerpo no lo produce en la cantidad suficiente. Incluso varios estudios clínicos y nutricionales han demostrado la relación entre ciertos problemas de salud y la deficiencia de glicina, por lo que la glicina debería considerarse como un aminoácido condicionalmente esencial (Jackson A.A., 1991; Zhong et al., 2003)

Se sugiere que problemas como la artrosis se debe en parte a la deficiencia de glicina, ya que está relacionados con los tejidos conectivos, en los que el colágeno y la elastina son componentes mayoritarios. La evaluación detallada de todas las posibles fuentes de glicina, ya sea de la síntesis, alrededor de 3 g / día, junto con la disponible de la dieta, en el rango de 1.5-3.0 g / día, puede ser significativamente menor que la cantidad necesaria para todos los usos metabólicos, incluida la síntesis de colágeno en alrededor de 10 g por día para un humano de 70 kg de peso. Este resultado apoya sugerencias anteriores en la literatura que la glicina es un aminoácido semi-esencial y que debe tomarse como un suplemento nutricional para garantizar un metabolismo saludable (Meléndez-Hevia et al., 2009)

El pH de la solución de glicina es importante, debido a que dos de sus grupos principales, amino y carboxilo, se pueden encontrar protonados o no. A pH ácido se encuentra como un ácido diprótico, es decir, tanto el grupo carboxilo como el grupo amino, están protonados; el valor debe estar por debajo del pK1 (COOH) (2,34). Al añadir equivalentes

de base el grupo α -carboxilo (-COOH) se disocia cediendo protones al medio y convirtiéndose en un grupo (COO⁻); el grupo carboxilo no estaría protonado, pero el grupo amino sí. En el pI (punto isoeléctrico) prácticamente el aminoácido es Zwitterión, es decir, el aminoácido es eléctricamente neutro; en el caso de la glicina su pI = 5,97. Añadiendo más equivalentes de base, el grupo amino (-NH₃⁺) se disocia también, obteniéndose la forma totalmente desprotonada de la glicina (pK₂ > 9,60) (Clemente J. et al., 2017). En las figuras 1 y 2 se pueden apreciar estas diferencias en el aminoácido respecto a su pH.

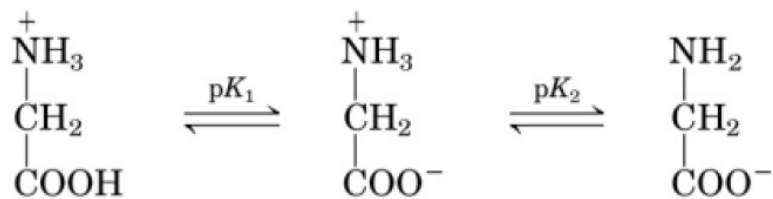


Figura 1: Diferentes estados de protonación según pH. Fuente: (Nelson D., 2019)

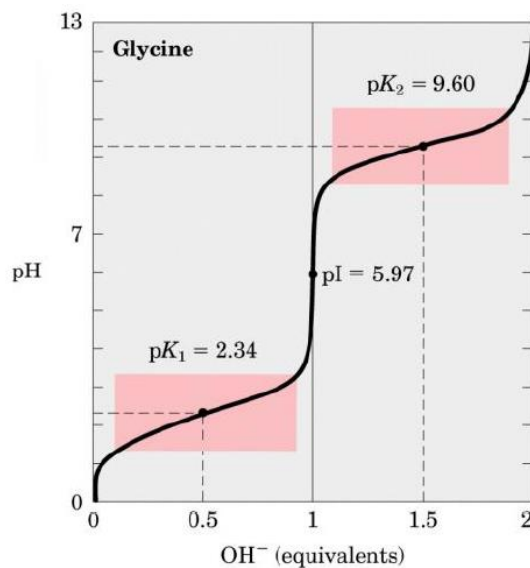


Figura 2: Curva titulación Glicina. Fuente: (Nelson D., 2019)

En la publicación científica de la agencia europea de seguridad alimentaria “EFSA Journal”(EFSA, 2006), se publicó que la solubilidad y la estabilidad del bisglicinato ferroso depende del pH; en el caso de este compuesto también se menciona que es inestable a pH básico debido a la rotura de los enlaces quelatos. Por esta razón no se obtendrán los cristales a pH básico. Por otro lado, según el estudio realizado por Clemente, J. 2017, a pH neutro no se detectó quelación Gly-Fe.

1.3. Bisglicinato ferroso

En una investigación realizada por Yunarti R. 2013, se fortificó tres alimentos a base de soja (leche de soja, tempeh y tofu), con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, bisglicinato ferroso y la mezcla de Na-glicina con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, como fuentes de hierro. Los resultados mostraron que con el bisglicinato ferroso aumenta la biodisponibilidad y absorción del catión metálico, debido a que se pudo prevenir en un mayor porcentaje la formación del fitato de hierro, que es un complejo insoluble y no absorbible en el intestino (Yunarti et al., 2013). El porcentaje máximo de biodisponibilidad para el tofu y tempeh se produjo con la adición de 50 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con el 51% y 74% respectivamente. Sorprendentemente la biodisponibilidad máxima de la leche de soja alcanzará el 48% después de la adición de 100 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El porcentaje máximo de biodisponibilidad para tofu y tempeh con la adición de 36 mg de bisglicinato ferroso fue 55% y 86%, respectivamente, mientras que de la leche de soja alcanzó el 55% después de la adición de 75 mg de bisglicinato ferroso. La fortificación con hierro también se hizo con la adición *in situ* de la mezcla entre Na-glicina y $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a la matriz de muestra. El porcentaje de efectividad de la fortificación disminuyó con una mayor cantidad de adición de hierro. La eficacia máxima en porcentaje de tofu, y tempeh se produjo en la adición de 50 mg de $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con el 46% y 56%, respectivamente, mientras que la eficacia máxima de la leche de soja alcanza el 33% después de la adición de 100 mg de $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La fortificación con bisglicinato

ferroso mostró mejores resultados para cada muestra. La adición de fortificante de bisglicinato ferroso proporcionar mayor eficacia que los otros fortificantes. Los iones en forma de bisglicinato ferroso son más estables porque los iones Fe están en forma de quelatos que se unen a la glicina, esto hace que sea más difícil que el ácido fítico ataque a los iones de Fe. Mientras que el uso de la mezcla in situ de Na-glicina y $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como fortificante podrían hacer posible que no todos los iones Fe en $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se unan con glicina para formar un complejo de bisglicinato estable (Yunarti et al., 2013)

El bisglicinato ferroso es una fuente de hierro quelado con glicina, pero al igual que otros compuestos de hierro solubles en agua, se oxida fácilmente a Fe^{3+} lo que provoca un desarrollo descolorido y oxidación de grasas cuando se agrega a alimentos y bebidas. Un pH por encima de 5, favorece la formación de Fe^{3+} sobre Fe^{2+} . La propiedad electroquímica del hierro se utilizó para desarrollar una tecnología de fortificación con hierro. Se basa en un modelo denominado “Bloquear-Desbloquear”. Durante la "Etapa de bloqueo", la tecnología está diseñada para mantener el hierro no reactivo. Se utilizaron dos estrategias diferentes, 1) quelación-modulación redox (para productos con un $\text{pH} < 5$) y 2) *encapsulación (para productos con un $\text{pH} > 5$)*. (Yunarti et al., 2013). La regulación oxido-reducción del hierro se puede aplicar para prevenir la oxidación de ferroso a férrico. El medio se reduce disminuyendo el pH agregando ácidos orgánicos y agentes reductores. Bajar el pH con ácido cítrico y reducirlo con ácido ascórbico evita la oxidación del hierro ferroso a férrico. Por el contrario, cuando el bis-glicinato ferroso se añadía al agua sin la tecnología de modulación redox, se oxidaba rápidamente a la forma férrica. Sin embargo, como lo indica la absorbancia a 560 nm y el porcentaje de hierro ferroso recuperado, la tecnología de modulación redox es efectiva para prevenir la oxidación de $[\text{Fe}^{2+}]$ a $[\text{Fe}^{3+}]$. Es importante señalar que este fenómeno de oxidación de hierro no es exclusivo del bis-glicinato ferroso. Se sabe que los compuestos ferrosos en

general se oxidan a la forma férrica cuando se agregan a alimentos y bebidas (Yunarti et al., 2013).

La estabilización del hierro ferroso por modulación redox tiene su propia limitación en un ambiente por encima de pH 5. Un pH más alto favorece la formación de $[\text{Fe}^{3+}]$ sobre $[\text{Fe}^{2+}]$. Además, la tasa de reducción del hierro férrico por agentes reductores como el ácido ascórbico disminuye notablemente a medida que aumenta el pH. Por lo tanto, se ha utilizado una tecnología basada en encapsulación para resolver los problemas relacionados con el hierro en productos con un pH superior a 5. El hierro se volvió no reactivo durante la formulación y el almacenamiento aislándolo de los componentes del vehículo (p. ej., taninos, grasas y vitaminas) y agentes oxidantes. (p. ej., oxígeno disuelto y cloro) utilizando emulsionantes formadores de vesículas o liposomas (p. ej., lecitina). La tecnología funciona solo para fumarato ferroso y succinato ferroso. La razón probable es que estos son menos polares que las otras fuentes de hierro solubles en agua, como el citrato ferroso, el tartrato ferroso y el sulfato ferroso. El fumarato ferroso se mezcla con lecitina, que es un emulsionante formador de vesículas. Cuando la mezcla de hierro y lecitina se expone al agua, las moléculas de lecitina forman rápidamente una bicapa. Después de mezclar, se transforman en vesículas. Los resultados obtenidos mediante la adición de estabilizadores de bicapa conocidos (p. ej., colesterol y fitoesteroles) mostraron que la estabilización del fumarato ferroso y el succinato ferroso depende de la formación de bicapa por lecitina (Yunarti et al., 2013).

Se ha demostrado que la tecnología de fortificación con hierro basada en la quelación-modulación redox. 1) resuelve el problema del desarrollo de mal color y mal sabor mediado por el hierro, y 2) entregan hierro biodisponible clínicamente probado. Además, los datos de estabilidad tanto en forma de polvo como de bebida mostraron que no tiene efecto sobre la estabilidad de las múltiples vitaminas y el yodo que se administraron junto

con el hierro. Se ha demostrado que la tecnología es sólida durante la fabricación, el almacenamiento, la distribución y el consumo de una bebida de fruta en polvo fortificada (Mehansho, 2006). Tenga en cuenta que existe una limitación en el uso del hierro redox-estabilizado. Debido a que depende del pH, solo funciona en productos con $\text{pH} < 5$.

Se ha demostrado que la encapsulación de fumarato ferroso a base de lecitina es eficaz para prevenir el desarrollo de mal gusto, mal sabor y regusto metálico sin comprometer la biodisponibilidad. Además, debido a que es compatible con productos con pH superior a 5, tiene potencial para amplias aplicaciones de fortificación de alimentos. Sin embargo, la solidez de la tecnología aún no se ha demostrado durante la ampliación, el almacenamiento, la distribución y el consumo. Actualmente, hay varias fuentes de hierro encapsulado (p. ej., sulfato ferroso, fumarato ferroso y pirofosfato férrico micronizado) disponibles en el mercado. Los aceites hidrogenados se utilizan para encapsular las fuentes de hierro. Sin embargo, la tecnología tiene limitaciones en productos que probablemente estén expuestos a temperaturas más altas durante el procesamiento, almacenamiento o preparación. Se ha demostrado que los productos fortificados con hierro encapsulado provocan un desarrollo de mal color cuando la preparación se lleva por encima del punto de fusión de los aceites hidrogenados ($45\text{--}65^\circ\text{C}$). Además, se observó que las sales fortificadas con fuentes de hierro encapsuladas en aceite hidrogenado (sulfato ferroso, fumarato ferroso) desarrollan una apariencia indeseable cuando se almacenan en un ambiente relativamente húmedo (Zimmermann, 2004).

La generación de formas coloidales obtenidas mediante gelificación iónica de carbohidratos, como la pectina, con Fe^{+2} es uno de los métodos alternativo para la elaboración de suplementos con el objetivo de maximizar la biodisponibilidad de los nutrientes (Olive Li et al., 2014), mediante el cual, el nutriente que deseamos absorber,

es encapsulado con una capa continua de material, como un revestimiento, que permite hacer una separación física con la matriz del alimento.

Se han desarrollado varias tecnologías para la fortificación de hierro evitando la pérdida de yodo en la sal debido a la adición de hierro. Estas tecnologías incluían el uso de estabilizadores y potenciadores de la absorción y la microencapsulación de hierro. Las tecnologías minimizaron la interacción adversa entre el hierro y el yodo en la sal, ayudaron a la biodisponibilidad del hierro y minimizaron el impacto adverso del hierro en las propiedades organolépticas de la sal fortificada (Olive Li et al., 2014). El estudio comparativo realizado sobre estas tecnologías mostró que el hierro (premezcla de hierro) hecho por microencapsulación basada en extrusión es mejor que el resto en términos de propiedades sensoriales, biodisponibilidad del hierro y estabilidad del yodo. El encapsulante forma una barrera física entre el hierro y el yodo y enmascara el color no deseado (marrón) del fumarato ferroso (hierro). Li et al. (2014) optimizaron esta tecnología a escala de laboratorio. Ambos estudios propusieron el uso de sémola de trigo duro como aglutinante y manteca vegetal como lubricante para la extrusión, dióxido de titanio como agente de enmascaramiento del color e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) como material de recubrimiento de la superficie para reemplazar parcial o totalmente el recubrimiento hidrofóbico (estearina de soja) en la formulación original. La optimización involucró consideraciones cuidadosas para seleccionar los materiales y la cantidad utilizada para lograr la bioaccesibilidad deseable del hierro en la premezcla; no es necesario disponer de una premezcla de hierro perfectamente recubierta cuyo hierro no sea biodisponible para realizar sus funciones metabólicas. Por lo tanto, la capa se diseñó para liberar el hierro encapsulado después de la fase de digestión estomacal exponiéndolo a pH 1.

Otro ejemplo tenemos el de los polifenoles de orujo de naranja, que tienen potencial para su uso como ingredientes nutracéuticos en alimentos y bebidas funcionales. Sin embargo, debido a su baja solubilidad en agua y bioaccesibilidad, no se utilizan en todo su potencial. En una investigación se evaluó el impacto de la encapsulación en la solubilidad en agua, la actividad antioxidante y la bioaccesibilidad *in vitro* de la hesperetina (aglicona flavonoide de cáscara de cítricos) utilizando la aglicona flavonoide cítrica (HT) dentro de complejos coloidales dispersables en agua ($d = 350 \pm 8$ nm) formados por atracción electrostática del aislado de proteína de guisante y pectina con alto contenido de metoxilo. La cantidad máxima de HT que se pudo dispersar en agua fue mucho mayor para la forma encapsulada ($99 \pm 7 \mu\text{g ml}^{-1}$) que para la forma no encapsulada ($<10 \mu\text{g ml}^{-1}$). La actividad eliminadora de radicales de la HT encapsulada ($>90\%$, pH 4) fue mucho mayor que la de la forma no encapsulada ($<15\%$ a pH 4 o 7). La bioaccesibilidad *in vitro* de la HT encapsulada ($27 \pm 7\%$) también fue mucho mayor que la de la forma no encapsulada ($<7\%$). (Olive Li et al., 2014). Estos resultados sugieren que un sistema de administración basado en biopolímeros bien diseñado puede mejorar la incorporación efectiva de HT, y potencialmente de otros nutrientes, en productos alimenticios y bebidas.

Aunque los quelatos minerales que utilizan diferentes secuestrantes (EDTA, aminoácidos, etc.) se produjeron ampliamente para su uso en la fortificación de alimentos, su estructura química y características aún no se presentan claramente. Aún falta la prueba sólida de que estas combinaciones sean verdaderamente quelatos y la mayoría de las publicaciones suponen que los productos obtenidos son quelatos debido al hecho bien conocido de quelación de minerales. De hecho, estos productos podrían ser simplemente mezclas físicas de reactivos o mezclas secas sin reaccionar (Mattar et al., 2022). Yunarti et al. (Yunarti et al., 2013) han producido quelatos de hierro utilizando glicina y han utilizado el espectro FTIR del quelato obtenido para probar la quelación asignando

algunos picos para Fe-OC (511/cm) y Fe-N (3000-3200/cm). cm) ya presente en la glicina sola. Por tanto, la evidencia en la que se basa para demostrar la quelación no parece ser lo suficientemente sólida. En el análisis por HPLC pretendían ampliar el tiempo de los análisis de modo que apareciera un tercer pico correspondiente al complejo en un tiempo de retención mayor. De manera similar, en espectrometría de masas, se identificaron picos m/z correspondientes al peso molecular de los complejos de aminoácidos. Pero los autores mencionaron que los aminoácidos libres todavía estaban presentes en los quelatos y también se cuantificaron mediante HPLC.

A partir de estos resultados se puede considerar que estos cristales son cristales impuros de FeSO₄ (Mattar et al., 2022).

Todos estos hallazgos podrían permitirnos comprender que los cristales obtenidos podrían ser simplemente cristales impuros de hierro, glicina o ambos que han precipitado por una cuestión de solubilidad o cambios de pH en lugar de quelatos formados, especialmente porque el sulfato ferroso solo y la glicina sola pueden precipitar. Esta suposición contradice los hallazgos de (Chen et al., 2007; Yunarti et al., 2013) donde el cristal o el precipitado se consideraron el quelato.

Según el análisis de (Mattar et al., 2022) la coloración verde de los cristales es a pH 2 y marrón a PH 6 que coincide con el estado de oxidación que tiene el hierro o las formas impuras de sulfato ferroso que no fue quelado en los cristales. Sin embargo, las mejores condiciones para la quelación de hierro con glicina son una proporción de 1:1 a pH menor al pKa de la glicina que es 2,4 proporcionando una cantidad equivalente de quelatos alrededor del 70%, pero esto sucede solamente en la solución o sobrenadante que queda después de la precipitación de los cristales, es decir separa de los cristales y realiza la cuantificación de quelatos en el sobrenadante de las soluciones precipitadas.

1.4. Características estructurales de la pectina y sus aplicaciones.

La pectina también denominado ácido poligalacturónico, es un polisacárido que constituye principalmente las paredes celulares de células vegetales (Willats et al., 2006), y se lo puede obtener mediante un proceso de extracción ácida; el rendimiento de este método depende de la fruta que se utiliza; sin embargo, generalmente, las frutas cítricas tienen un mayor porcentaje de pectina, hasta un 30% (Adetunji et al., 2017a).

La importancia de este polisacárido en la industria se debe a las varias aplicaciones que tiene. Funcionan como una emulsión estabilizadora para emulsiones de agua y aceite. Películas hechas de productos naturales son de creciente interés porque son biodegradables y potencialmente reciclables e incluso pueden ser utilizados en algunas aplicaciones farmacéuticas. Debido a sus propiedades de formar películas, la pectina es útil como agente de encolado para papel y textiles. Es útil para la preparación de membranas para ultra centrifugación y electrodiálisis. La pectina se utiliza en solución sulfúrica para uso en acumuladores de plomo. Las soluciones libres de burbujas de aire se preparan mezclando pectina a un nivel de aproximadamente 1% en ácido sulfúrico. Las mezclas de pectina y almidón pueden ser utilizadas para hacer películas fuertes y autosuficientes. Las pectinas se han utilizado en la fabricación de pajitas para beber biodegradables en las que se liberan sustancias colorantes y aromatizantes en una capa de pectina cuando los líquidos pasan a través de la paja (Thakur et al., 1997).

La pectina se ha utilizado en la prevención y tratamiento de cáncer de colon, por a su alta digestibilidad en esta parte del intestino grueso y evitando su temprana digestión en el tracto intestinal superior (Liu et al., 2003). El pectinato de calcio, la sal insoluble de la pectina, se puede utilizar potencialmente como un sistema de administración de fármacos específico al colon (Hoffman, 2012; Rubinstein et al., 1993). Los hidrogeles de polímeros

extraídos de residuos orgánicos presentan ventajas de biodigeribilidad y biocompatibilidad, lo que asegura su baja toxicidad y potencial uso como biomaterial (Hoffman, 2012).

El término "pectina" describe una familia de oligosacáridos y polisacáridos que tienen características comunes, pero son extremadamente diversas en su estructura. Sin embargo, todas las pectinas son ricas en ácido galacturónico (GalA), y la FAO y la UE estipula que la 'pectina' debe consistir en al menos un 65% de GalA (Willats et al., 2006). Se reconocen tres polisacáridos pécticos principales, todos contienen GalA (figura 3) en mayor o menor medida. Se ha presentado el desarrollo reciente de pectina especializada para la estabilización de bebidas de leche acidificada. Las pectinas evitan la sedimentación de proteínas de la leche por la unión electrostática homogalacturónica a la caseína (Willats et al., 2006).

La pectina puede ser clasificada según su grado de metoxilación, que determina la capacidad de formar geles. Las pectinas de bajo grado de metoxilación tienen un grado de esterificación menor al 50% y se gelifican por entrecruzamiento iónico comúnmente con calcio. Las pectinas de alto grado de metoxilación tienen un grado de esterificación mayor al 50% y sus geles se forman a pH ácido en presencia de solutos como la fructosa o sacarosa. La máxima estabilidad de la pectina es a pH 4, que es cuando empieza a perder grupos metoxilo y se hidrolizan, perdiendo su capacidad para formar geles (Bochek et al., 2001). Las pectinas con un bajo grado de esterificación (<50%) son útiles para la gelificación ionotrópica (Das, 2021; Liu et al., 2003). La máxima estabilidad de la pectina se da a pH 4, que es cuando comienza a perder grupos metoxilo e hidrolizarse, perdiendo su capacidad de formar geles.

La gelificación ionotrópica se ha explorado principalmente con calcio y zinc, y se ha hecho poco con el uso de hierro. Sin embargo, el estudio de la gelificación de pectina ionotrópica con hierro es relevante, ya que la mayor parte del hierro ingerido se absorbe tanto en el duodeno como en el colon, donde la mucosa también posee proteínas de absorción de hierro que permiten absorber el 30% del hierro que pasa por el tracto gastrointestinal (Ghibaudo et al., 2018). Los carbohidratos no digeribles, como la pectina, resisten la digestión en el intestino delgado, pero se fermentan en el colon para formar ácidos grasos de cadena corta, con algunos beneficios para la salud, incluida una mejor absorción de hierro (Ghibaudo et al., 2018).

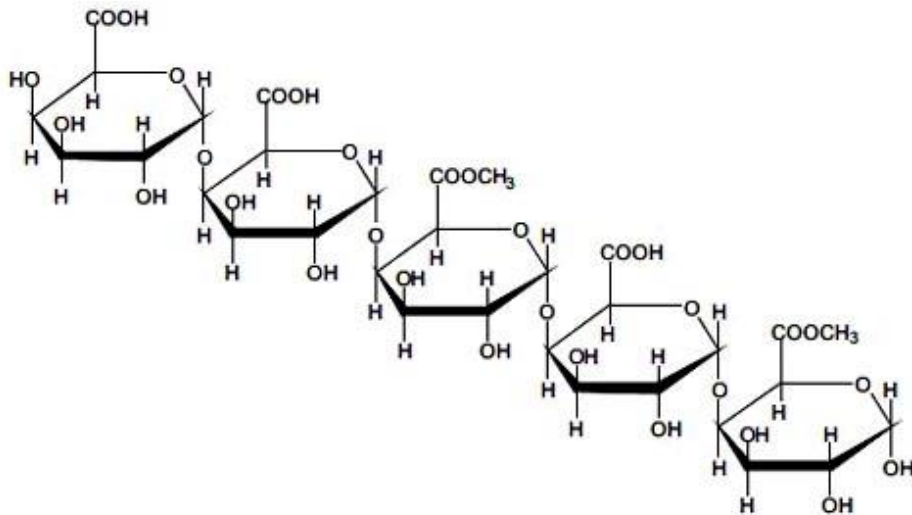


Figura 3. Estructura polimerica conformada por unidades de acido α -D-galacturónico y derivados metoxilados unidas entre sí por enlaces α -1-4. Fuente (García V. et al., 2011)

1.5. Beneficios de la pectina en la salud

Más allá de la importancia de la pectina en la industria, tenemos también los beneficios que tiene en la salud que pueden ser aprovechadas para la utilización en la fortificación de alimentos. Se ha afirmado que las pectinas tienen un efecto prebiótico, que depende del peso molecular; tienen un olor aceptable y son bajas en calorías, esto permite su utilización en dietas contra la obesidad (Chen et al., 2021; Garna et al., 2006). Olano-Martin et al., 2002 fueron los primeros en comparar el efecto de la pectina en el crecimiento de cultivos puros del microbiota del tracto gastrointestinal, informaron que las pectinas de bajo peso molecular tienen un prebiótico potencial mejor que los de alto peso molecular.

Otras investigaciones muestran que pequeños oligómeros de ácido galacturónico fueron los responsables de la inhibición de la adherencia de las bacterias a las células epiteliales, la etapa inicial y crucial de una infección bacteriana (Manderson et al., 2005). Además, con el uso de pectina extraída a partir de cáscara de naranja, se observó un aumento en la población de *eubacterium rectale* y los niveles de butirato, que es un sustrato energético del epitelio del colon, que regulan múltiples procesos celulares y se ha descrito como un posible agente terapéutico frente al cáncer colorrectal (Olano-Martin et al., 2002).

Los oligosacáridos pécticos también pueden ser utilizados como tratamientos, se han demostrado poseer actividad antioxidante (Ho et al., 2006) y tienen un importante efecto que reduce los niveles séricos de colesterol total y triglicéridos, y la inhibición en la acumulación de grasa corporal; además protege contra enfermedades cardiovasculares *in vivo*; el tratamiento con dosis más altas (150-300 mg / kg) redujo significativamente el aumento de peso en ratones (Li et al., 2010). Informes indican que regula el metabolismo de los lípidos y la glucosa con disminución de la respuesta glucémica y los niveles de

colesterol en la sangre (Garna et al., 2006). Los oligosacáridos ácidos derivados han sido evaluados por su potencial genotóxico y la seguridad para el consumo humano fue probado por (Garthoff et al., 2010). Después de ingerir una mezcla de pectinas, se observó el grupo *Clostridium histolyticum* en pacientes con VIH y hubo un aumento en las poblaciones de *Bifidobacteria* y una disminución considerable del *Clostridium lituseburense* (Gori et al., 2011).

1.6. Pectina de maracuyá

La cascara de maracuyá es uno de los desechos agroindustriales en Ecuador, con un gran potencial de obtener un valor agregado para la industria alimentaria. En un estudio realizado por Garrido 2017, se utilizó 10 variedades de frutas producidas en Ecuador (cacao, limón, naranja, granadilla, mandarina, taxo, achotillo, pitahaya, maracuyá, naranjilla) para la obtención de pectina y caracterización a partir de las cáscaras desechadas. El maracuyá tuvo el mayor rendimiento (62%) con respecto al resto de frutas que fue del 6% hasta el 35%. En la industria de pectinas comerciales normalmente se extrae la pectina de fuentes como la manzana y cítricos con un rendimiento del 15% y 20% respectivamente (J. E. D. Pineda, 2012).

La esterificación de la pectina de naranja (74%) y de la pectina de limón (61%) son similares a la de la pectina comercial que proviene de la manzana (72%), esto quiere decir que los grupos carboxilos esterificados en estas pectinas son más abundantes que en las demás, que son catalogadas como de bajo grado de metoxilación (<50%), como el caso del maracuyá con un 41% de metoxilación (Garrido 2017). Los distintos grados de metoxilación se deben a factores como, la variedad de la fruta, grado de maduración y tipo de extracción. Incluso en frutas del mismo género hay variación en la cantidad de pectina y grado de metoxilación (Srivastava & Malviya, 2011)

Los diferentes métodos de extracción (ácido cítrico, ácido nítrico o a alta presión) también generan una variación en el rendimiento de la cantidad, capacidad de gelificación y el grado de metoxilación (Liew et al., 2014).

1.7. Modificaciones químicas de la pectina

Como se muestra en la figura 4, la pectina tiene una estructura de azúcares neutros con grupos hidroxilos y carbonilos, lo que facilita su amplio uso. Las modificaciones químicas que se pueden aplicar a la pectina producen derivados con características diferentes a la pectina nativa; estas características pueden evidenciarse en las interacciones con el agua, con grupos funcionales y el estado cristalino (Einhorn-Stoll et al., 2007). Las pectinas cítricas altamente metoxiladas, modificadas químicamente (desmetoxilación y amidación) y mecánicamente (desagregación), se examinaron con un análisis térmico simultáneo combinado (calorimetría diferencial de barrido (DSC), termogravimetría (TG) y termogravimetría diferencial (DTG)), y se observó que todas las pectinas modificadas químicamente fueron más sensibles a la degradación térmica que sus materiales de referencia no modificados, la entalpía de reacción máxima fue mayor para todas las pectinas modificadas químicamente. Las pectinas degradadas mecánicamente mostraron un comportamiento completamente diferente. Su degradación térmica comenzó antes y terminó más tarde con una disminución del peso molecular (MW). La entalpía y la velocidad máximas de reacción se redujeron después de la modificación (Einhorn-Stoll et al., 2007).

La oxidación de pectina se ha realizado usando hipoclorito de sodio (Chetouani et al., 2014), ácido periódico (Gupta et al., 2013) y permanganato de potasio en medio ácido (Abdel Moety et al., 2017). Con la oxidación con peróxido de hidrógeno se espera obtener resultados similares a la oxidación con los agentes oxidantes antes mencionados,

por lo que en la figura 4 se muestra las posibles reacciones que ocurrirán con esta oxidación. En la oxidación se incrementan los grupos carbonilos, pero ocurre una degradación de las cadenas poliméricas por lo que se reduciría el peso molecular de la pectina (Chetouani et al., 2014).

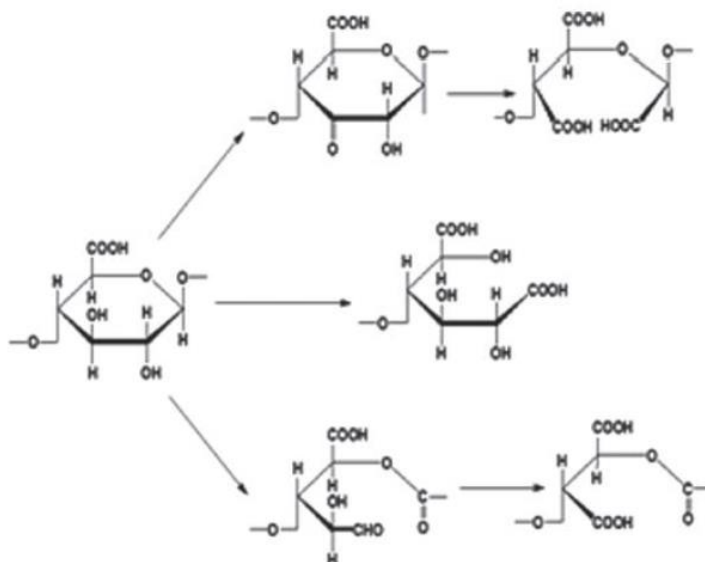


Figura 4: Principales rutas de oxidación de pectina con hipoclorito de sodio. Fuente: (Chetouani et al., 2014)

La pectina se puede utilizar en su forma nativa o modificada, teniendo esta última, propiedades diferentes. Se han creado varios tipos de productos basados en la modificación de pectinas, según el grado de metoxilación (Ralet et al., 2001), la adición de cadenas carbonadas a grupos carboxilo (Willats et al., 2006), oxidación, entre otros. La oxidación de pectina genera grupos carbonilo en el esqueleto del polímero, los cuales podrían formar iminas con grupos amino (Garrido, 2017) a través de bases de Schiff.

Creemos que las estructuras coloidales formadas a través del bisglicinato ferroso y la pectina oxidada podrían fortalecerse mediante la gelificación ionotrópica y las bases de Schiff entre el grupo amino de la glicina y los grupos carbonilo en la pectina oxidada. Por

lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto combinado de estas dos interacciones sobre la estructura de la matriz, la estabilidad y la capacidad de retener hierro a través del tracto digestivo. Mediante el uso de una matriz de pectina previamente oxidada como portador de bisglicinato ferroso, sería posible encontrar un mecanismo para fortalecer la estabilidad del hierro y evitar su oxidación en alimentos fortificados; además, se espera que, mediante el uso de esta matriz, se mejore la biodisponibilidad del hierro a través del tracto digestivo hasta el colon. El desarrollo de estas matrices podría resultar en una tecnología capaz de transportar hierro, en su forma aminoquelada, dentro del cuerpo y lograr una biodisponibilidad prolongada y una liberación controlada en áreas específicas del tracto digestivo, como el duodeno y el colon (Zhang & Feng, 2006).

CAPÍTULO 2

2. OBJETIVOS

2.1. General

Desarrollar una matriz, a base de pectina modificada, capaz de proteger, transportar y aumentar la biodisponibilidad del hierro al unirse a un quelado de glicina y hierro conocido como bisglicinato ferroso.

2.2. Específicos

- Obtener quelados de glicina-hierro (bisglicinato ferroso), a partir del sobrenadante y cristales que se forman mediante el método de precipitación.
- Realizar la extracción de pectina a partir de los desechos de cáscara de maracuyá y evaluar su aplicación comparada con la pectina comercial.
- Modificar pectina nativa mediante la oxidación con peróxido de hidrógeno para obtener más carbonilos libres en la estructura molecular de la pectina.
- Sintetizar complejos de pectina más bisglicinato ferroso y de pectina más glicina y hierro, para comparar la unión del hierro a la matriz de pectina.
- Analizar la estructura e interacción de la matriz de pectina con el bisglicinato ferroso
- Determinar la estabilidad térmica y estructural de las matrices pectina-glicina-hierro, en simulaciones de fluidos gástricos

- Evaluar las diferencias en la biodisponibilidad y retención del hierro que se presentan en las distintas digestiones in vitro con las simulaciones de fluidos gástricos.

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los principales materiales utilizados en el estudio fueron L-glicina (99% de pureza) grado reactivo de la marca Lobachemie; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como fuente de hierro marca Lobachemie; pectina cítrica comercial grado reactivo con bajo grado de metoxilación marca Lobachemie; restos de cáscara de maracuyá, ácido cítrico anhidro riqueza 99,55% de marca Panreac, peróxido de hidrógeno al 30% v/v y etanol al 96% v/v, proporcionado por el laboratorio de Ingeniería Ambiental. Colegio de Ciencias e Ingenierías, Universidad San Francisco de Quito USFQ, Quito, Ecuador.

3.1. Obtención de bisglicinato ferroso

En primer lugar, se obtuvieron muestras de bisglicinato ferroso por precipitación, según el método propuesto por Yunarti et al., 2013, con una relación molar entre glicina y hierro de 1:1. La glicina se disolvió con Fe_2SO_4 al 80 % p/v en agua destilada y el pH se ajustó por debajo de 2,34, que es el pKa del grupo carbonilo de la glicina (Yunarti et al., 2013).

Se inyectó nitrógeno en matraces herméticamente cerrados durante 5 min, bajo agitación continua para favorecer la formación de cristales (Yunarti et al., 2013). Luego, los frascos se mantuvieron en agitación continua a 50 °C durante 24 h, y se refrigeraron a 4 °C hasta la precipitación de cristales, entre 8 a 11 días, dependiendo del nivel de precipitación. Finalmente, todo el producto tanto cristales como sobrenadante se filtró, se lavó con etanol al 96 %, se secó a 40 °C, y se pulverizó mediante liofilización para obtener una muestra en polvo homogénea.

3.2. Extracción de pectina a partir del maracuyá

La pectina extraída que mejor se ajusta para la aplicación en nuestro estudio es la de maracuyá. Debido a que, de todas las frutas utilizadas por Garrido 2017, el rendimiento de la extracción de pectina de maracuyá es el más alto (62%), y con un grado de metoxilación bajo (41%), además, la pectina extraída de maracuyá logró tener mejores condiciones en las cantidades de aldehídos y carbonilos libres, después de la oxidación, que es parte de la metodología de nuestro estudio.

La obtención de pectina a partir de residuos de fruta consiste en una extracción ácida. En este caso, se seleccionó el ácido cítrico porque es el que reporta mayor rendimiento en comparación a los otros ácidos (Ulloa C., 2012).

Inicialmente, se secaron los residuos de fruta a 60°C hasta llegar a un peso constante, luego se trituró hasta obtener la harina, de la que se pesó 100 g y fue emulsionado en 1,5 L de una solución 1 M de ácido cítrico. Las condiciones de tiempo, pH y temperatura fueron llevadas a cabo en el estudio de Liew et al., 2014, en las que se optimiza en base al rendimiento, por lo tanto, se dejó la emulsión en agitación por 75 minutos, a una temperatura de 55 °C y a pH 2 (Liew et al., 2014).

Posteriormente, se filtró el extracto para retirar los sólidos en exceso, y en el filtrado se agregó el doble de volumen de etanol al 96% para precipitar la pectina. Después de 24 horas de añadido el alcohol, se filtró la pectina y se hicieron varios lavados con agua destilada y etanol para purificarla. Finalmente, se dejó secar en un horno a 40°C hasta tener un peso constante (Liew et al., 2014). Las cascaras de maracuyá no deben tener un estado de madurez avanzado, puesto que en ese estado actúan enzimas (pectinasas) que degradan la pectina en azúcares (Iglesias & Lozano, 2004)

El porcentaje de rendimiento de la extracción se determinó utilizando la ecuación (3).

$$\%Rendimiento=(Pf/P0) \times 100 \quad (3)$$

En donde Pf es el peso del producto después de la extracción y $P0$ es el peso de materia prima.

3.3. Caracterización de pectina

El grado de metoxilación se refiere al número de grupos carboxilo esterificados presentes en el ácido poligalacturónico de la pectina. Para establecer grupos carbonilo libres y esterificados, se tituló potenciométricamente con NaOH 0,1 M, una solución de pectina al 1 % p/v disuelta en agua a 40 °C con agitación constante (Boчек et al., 2001; Ciriminna et al., 2017). Para cuantificar el porcentaje de carboxilo libre, se utilizó la ecuación propuesta por Bocheck, et al: (1)

$$Kf = ((N(NaOH) * V(NaOH) \times 0.045) / (a)) \times 100 \quad (1)$$

donde, Kf es el porcentaje de carboxilo libre, a es el peso de la muestra, N (NaOH) es la concentración molar de hidróxido de sodio y V (NaOH) es el volumen utilizado para la titulación (ml).

Después de la primera titulación se añadieron 10 ml de una solución de NaOH 0,1 M y la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente para saponificar los grupos carboxi esterificados de la pectina. Posteriormente, el exceso de base se neutralizó con 10 ml de HCl 0,1 M y se tituló con NaOH 0,1 M. El porcentaje de carboxilo esterificado se calculó a través de la ecuación (2) propuesta por Bocheck, et al:

$$Ke = ((N(NaOH) * V(NaOH) \times 0.045) / (a)) \times 100 \quad (2)$$

donde, K_e es el porcentaje de carboxilo esterificado, a es el peso de la muestra, N ($NaOH$) es la concentración molar de hidróxido de sodio y V ($NaOH$) es el volumen utilizado para la titulación.

Los grupos carboxilo totales se calcularon como la suma de K_f (1) y K_e (2) como % p/v. El grado de metoxilación se calcula con la relación entre los carboxilos esterificados y los carboxilos totales.

3.4. Oxidación de pectina

El ácido poli galacturónico de la pectina se oxidó (figura 5) para obtener carbonilos libres (aldehídos) que pueden reaccionar con los grupos amino del bisglicinato ferroso. Se utilizó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente oxidante, de acuerdo con el método propuesto por Gupta et al., 2013. Brevemente, la pectina se disolvió en (H_2O_2) al 2 % a una concentración final de pectina del 2 % p/v. La reacción se llevó a cabo durante 30 min, a pH 1, bajo agitación constante y protegida de la luz. La pectina oxidada se precipitó con etanol al 96% durante 24 h. El precipitado se filtró, se lavó con agua destilada, y se secó a 40 °C (Garrido, 2017).

La cuantificación de aldehídos se utilizó como parámetro para determinar la eficiencia de oxidación, a través de la metodología reportada por (Siggia & Maxcy, 1947), la cual se basa en una reacción con sulfito de sodio en un medio ácido y una titulación potenciométrica con una base fuerte. Brevemente, se disolvieron 0,2 g de muestra en 5 ml de ácido sulfúrico 1 M y 25 ml de sulfito de sodio 1 M. La mezcla se tituló potenciométricamente para girar con t. La concentración de aldehído se determinó utilizando una curva estándar generada con soluciones conocidas de butirilaldehído.

3.5. Preparación de matrices de pectina, glicina, hierro y bisglicinato ferroso

La pectina que se utilizó a partir de este paso, fue la pectina comercial, descartando la pectina extraída de maracuyá, después de observar los resultados con contaminación de pigmentos y azúcares, pero su grado de metoxilación y carbonilos libres eran suficientes para continuar el estudio (literal 4.2), en donde la pectina comercial tenía buenas condiciones para analizar las interacciones de los grupos funcionales de la pectina con los complejos de glicina y hierro.

Las interacciones entre pectina (nativa y oxidada), glicina y hierro se estudiaron de 3 formas: primero, haciendo soluciones de pectina nativa y hierro. Segundo, obteniendo previamente quelados de glicina y hierro (bisglicinato ferroso) a partir del sobrenadante y cristales que se forman por el método de precipitación (Yunarti et al., 2013), para luego interactuar en solución con pectina. Tercero, realizando soluciones de pectina, glicina y hierro, sin quelación previa (tabla 1). Todos estos procedimientos se realizaron a cabo según las formulaciones descritas en la tabla 1, las soluciones fueron agitadas por 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las soluciones resultantes se congelaron y liofilizaron, obteniendo matrices tipo aerogel.

Adicionalmente, se obtuvieron también perlas individuales de pectina sumergidas en soluciones de glicina y hierro como un método adicional de obtención de este tipo de matrices, descrito en la literal 3.6 (figura 5) (Ghibaud et al., 2018). Con el objetivo de ver si mediante esta metodología según se obtenía algún resultado diferente a las matrices realizadas inicialmente.



Figura 5. Muestras liofilizadas de pectina más bisglicinato ferroso precipitado.

Para unir los grupos carbonilo de la pectina oxidada con los grupos amino de la glicina, fue necesario formar una base de Schiff a pH 5 (Lobaina et al., 2005). La mitad de los grupos carboxilo de la pectina están ionizados a partir de pH 3.5, por lo tanto, pueden unirse al hierro y/o glicina; luego, se comparó mediante FTIR la competencia entre el enlace del hierro con el carboxilo y la formación de la base de Schiff.

Tabla 1. Composiciones de las soluciones. Pectina (Pect), pectina oxidada (Pectox), hierro (Fe), Glicina (Gly), Bisglicinato Ferroso (Gly-Fe) obtenido del sobrenadante y precipitado previo.

	Pect + Fe	Pectox + Fe	Pect + (Gly-Fe)	Pectox + (Gly-Fe)	Pect + Fe + Gly	Pectox + Fe + Gly
Concentración (% w/v) (g/50ml)	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 10	10 + 5 + 5	10 + 5 + 5

Hubo 4 repeticiones por muestra.

3.6. Preparación de perlas de pectina hierro y glicina

En esta investigación también se propuso, como objetivo específico, el sintetizar complejos de pectina más glicina y hierro, en el que el metal actúe como entrecruzante. Específicamente se quiso construir un sistema de perlas de pectina, hierro y glicina a pH 5, para evaluar la competencia entre las cargas positivas del metal y de la glicina al interactuar con los carboxilatos (carga negativa) de la pectina. Esto con el objetivo de poder aplicar en la fortificación de alimentos como fuente de hierro biodisponible.

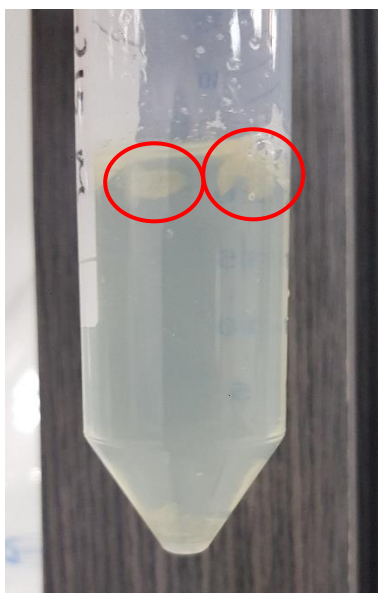


Figura 6. Perlas de pectina al 4% con glicina al 10%, sumergidas en la solución de FeSO_4 a 150mM

Se preparó una solución de pectina al 4% y se mezcló con soluciones de glicina al 10%. De cada una de las mezclas se tomó 200ul y se sumergió en una solución FeSO_4 a 150mM de concentración por 30 minutos, las gotas de pectina que se mantuvieron insolubles, se diferencian visualmente (figura 6), entonces se extrajeron y se colocaron en microtubos para congelar y liofilizar. Las muestras liofilizadas se analizaron por FTIR.

Estos ensayos se realizaron tanto con pectina nativa, como con pectina modificada por oxidación con peróxido de hidrógeno.

Todas las muestras fueron realizadas a pH 5, debido a que es al pH en el que se puede formar una base de schiff entre los carbonilos libres de la pectina y el grupo amino de la glicina (Lobaina et al., 2005), y así poder evaluar la estabilidad de las partículas.

Cada uno de los ensayos y muestras tuvieron 3 repeticiones, para verificar la regularidad de los espectros FTIR y descartar errores.

3.7. Digestión in vitro

Las muestras de las matrices fueron liofilizadas y después digeridas en soluciones gastrointestinales simuladas, como realizó Ghibaud et al., 2018, para caracterizar la estructura, estabilidad y retención de hierro hasta su digestión intestinal en condiciones similares al colon humano. Brevemente, se suspendieron 50 mg de muestra durante 2 min en 1 ml de una solución simulada de saliva preparada previamente (10 mg/ml de *Bacillus subtilis* α -amilasa) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (K₂HPO₄ 0,144 g/L; NaCl 9,00 g/L; Na₂HPO₄ 0,795 g/L, pH 6,8). A continuación, se añadió a las muestras 1 ml de fluido de digestión gástrica simulada (3 mg/ml de pepsina porcina, NaCl 125 mM, KCl 7 mM, NaHCO₃ 45 mM, pH 2,5). Las muestras se incubaron durante 1,5 h a 37 °C con agitación a 50 rpm. Posteriormente, se agregó 1 ml de fluido intestinal simulado (1 mg/ml de pancreatina, 1,5 mg/ml de sales biliares, NaCl 22 mM, KCl 3,2 mM, NaHCO₃ 7,6 mM, pH 8,0) a las muestras y se incubaron durante 3 h a 37 °C, con agitación suave continua (50 rpm) (Ghibaud et al., 2018). Una vez obtenida cada una de las muestras digeridas, estas fueron congeladas y liofilizadas, para luego ser analizadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC), para el grado de hinchamiento y análisis de liberación de hierro.

3.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras previamente congeladas y liofilizadas fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-IT300 para evaluar su morfología a 50 Pa y 20 kV. La morfología de la muestra se evaluó con el software de control externo MP-96040EXCS. La presencia de hierro se examinó usando EDS (Detección de Dispersión de Energía), es una técnica analítica que permite la caracterización química elemental de materiales. Una muestra excitada por una fuente de energía (como el haz de electrones de un microscopio electrónico) disipa parte de la energía absorbida al expulsar un electrón del núcleo. Luego, un electrón de la capa externa de mayor energía procede a ocupar su lugar, liberando la diferencia de energía en forma de rayos X que tiene un espectro característico basado en su átomo de origen. Esto permite el análisis compositivo de un volumen de muestra determinado que ha sido excitado por la fuente de energía. La posición de los picos en el espectro identifica el elemento, mientras que la intensidad de la señal corresponde a la concentración del elemento (Alvarez-Barreto et al., 2021).

3.9. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, FTIR

La espectroscopía infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro infrarrojo se obtiene comúnmente pasando la radiación infrarroja a través de una muestra y determinando qué fracción de la radiación incidente es absorbida en una energía particular. La energía a la que aparece cualquier pico en un espectro de absorción corresponde a la frecuencia de una vibración de una parte de una molécula de muestra (Kyomugasho et al., 2015).

Se realizó FTIR en todas las muestras de la tabla 1, para analizar sus espectros donde los grupos funcionales y las posibles interacciones intermoleculares pueden identificarse potencialmente. Se realizó también FTIR en las muestras de pectina extraída de maracuyá

para comparar el espectro con el de la pectina comercial y evaluar la factibilidad de utilizar esta pectina para los siguientes procedimientos. Se utilizó el espectrofotómetro Spotlight 200i FT-IR Microscopy System, donde se obtuvieron espectros de 650 a 4000 cm^{-1} , utilizando una resolución de 4 cm^{-1} . Se escaneó 4 submuestras de cada muestra, los espectros de cada submuestra no cambiaban significativamente, y finalmente el cristal de cuarzo se limpió con isopropanol entre cada cambio de muestras.

3.10. Análisis térmicos

La estabilidad térmica de las muestras se estudió mediante análisis termogravimétrico, TGA y calorimetría diferencial de barrido, DSC. Estos análisis se llevaron a cabo para evaluar los cambios potenciales en las interacciones entre los diferentes componentes de la matriz.

Los análisis termogravimétricos se realizaron en el equipo PerkinElmer Simultaneous Thermal Analyzer STA 8000 (Analizador DT/TGA), con muestras de 10 mg, calibrado según la norma ASTM E968, de 20 °C a 600 °C, y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La calibración de la temperatura se realizó midiendo el punto de Curie estándar del níquel en crisoles de platino abiertos, bajo un flujo de purga de nitrógeno seco de 20 ml/min, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, un período de modulación de 200 s y una temperatura de amplitud de ± 5 °C.

La calorimetría diferencial de barrido se realizó con muestras de 10 mg, en un DSC Q1000, de TA Instruments, calibrado según la norma ASTM E968, de -90 °C a 250 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Según la norma ASTM D3418, fueron obtenidas las temperaturas de transición vítrea y de fusión, así como la entalpía.

3.11. Grado de hinchamiento.

El grado de hinchamiento determina la estabilidad de la estructura después de cada digestión, y se logra por la capacidad de absorción de agua en el intersticio de estructuras de pectina (Garrido, 2017). Las muestras se pesaron antes de las digestiones, después de cada digestión se secaron por 5 min a 37 °C sobre papel de celulosa y se pesaron nuevamente, según la metodología propuesta por (Begam et al., 2003). El grado de hinchamiento se determinó a través de la ecuación 4.

$$\% \text{ Swelling} = ((W_h - W_d)/W_d) * 100 \quad (4)$$

donde W_h y W_d son los pesos de las muestras hidratadas y deshidratadas antes de la digestión, respectivamente.

3.12. Cuantificación de liberación de hierro

Para evaluar la estabilidad y la capacidad de retención de hierro de las estructuras, se cuantificó la cantidad de hierro en las muestras después de cada digestión in vitro, mediante espectrofotometría. Primero, se diluyeron 250 mg de cada muestra en tubos con 5 ml de cada fluido digestivo simulado (agua, saliva, gástrico e intestinal). Los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min y se realizó una digestión ácida con ácido nítrico (HNO_3), ácido clorhídrico (HCl) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% según métodos estándar (EPA 3050 y 3052) hasta eliminar toda la materia orgánica. La solución digerida se filtró a través de un filtro de 0,45 μm . Las curvas de calibración se construyeron a partir de una solución ICP estándar multielemento 6VIII, grado Trace CERT Certipur (Merck—Millipore Sigma Aldrich, EE. UU.), a una concentración de 100 mg/L, como se describe en la publicación (Capparelli et al., 2020). Luego las muestras se analizaron utilizando un espectrofotómetro a longitudes de onda de 529 y 940 nm (marca

Thermo Scientific, modelo iCAP 7000) para cuantificar la concentración de hierro (ppm) en las soluciones.

3.13. Análisis estadístico

Para los análisis de hinchamiento y liberación de hierro in vitro, los valores se informan como promedio \pm desviación estándar ($n = 4$). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significación estadística y la comparación por pares se realizó con la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Quelados de glicina y hierro por precipitación

Como vemos en la figura 7b y 7c, se obtuvieron cristales por el proceso de precipitación en medio ácido, método propuesto por Yunarti et al., 2013, en donde se puede observar el cristal de glicina como control (7b), con una coloración totalmente blanca, comparado con el color rosa que toma la muestras por la presencia del hierro (7c). Sin embargo, según Mattar et al., 2022, en los cristales o precipitado no se encuentra la formación de aminoquelados, sino que son restos del sulfato ferroso utilizado. La mayor cantidad de aminoquelados se encuentran en el sobrenadante que queda después de la precipitación (6a).

Según (Yunarti et al., 2013) su método logra obtener quelatos en los cristales precipitados, por esta razón iniciamos con este método, pero a medida que avanzábamos, el trabajo (Mattar et al., 2022) se publicó, y a la vista de los resultados en el que mostraban que obtenían más cantidad de quelatos en el sobrenadante de la solución precipitada, decidimos en nuestro trabajo utilizar todo el producto después de la precipitación (figura 7 a), tanto los cristales precipitados, como el sobrenadante. Todo el precipitado más el sobrenadante lo volvimos a reunir y lo liofilizamos para tener una muestra lo más homogénea posible. Con este procedimiento, nos aseguramos de obtener tanto los quelatos del sobrenadante, como los que puedan formarse por cristalización y precipitar. Posteriormente se utilizó estas muestras de Bisglicinato ferroso impuro, para realizar las soluciones con la pectina.

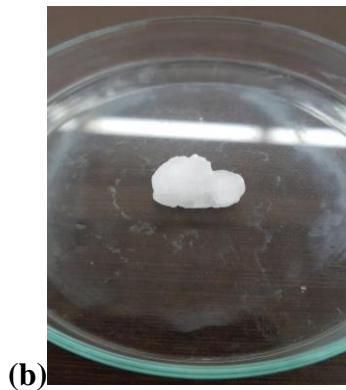


Figura 7. (a) Separación del sobrenadante con el precipitado (b) Cristal de glicina por precipitación. c) Cristal de glicina y hierro

Según el análisis de Mattar et al., 2022, la coloración de sus cristales fue verde a pH 2 y marrón a pH 6 que coincide con el estado de oxidación que tiene el hierro o las formas impuras de sulfato ferroso que no fue quelado en los cristales, pero en nuestro caso los cristales que se prepararon a pH 2 fueron de color rosa-marrón (figura 7 a, c), que quiere decir que el hierro llegó a oxidarse a férrico, y puede deberse a una propiedad del bisglicinato ferroso que según Yunarti et al., 2013, en el agua el hierro del bisglicinato ferroso se oxida fácilmente. La coloración verde se presentó solamente cuando no se realizó un precipitado, es decir cuando se prepararon las muestras en solución a pH 2 de

glicina hierro y se liofilizó directamente, pero nosotros decidimos utilizar las muestras de Glicina-hierro obtenidas después de la precipitación previa, en donde vemos que toma una coloración rosa-marrón (figura 7a).

Mattar et al., 2022, mediante HPLC consiguió cuantificar en los sobrenadantes de la solución Gly-Fe, una cantidad de formación de quelatos de alrededor del 70%, dividiendo el promedio del área del pico de quelación por el promedio de la suma de las áreas de todos los demás picos. Cuantitativamente, la cantidad de glicina libre se calculó a partir del área del pico después de interpolarla con la de glicina estándar.

En el trabajo de Mattar et al., 2022, la muestra de Gly-Fe con ratio 1:1 a pH 0 tiene el porcentaje de quelato más alto (72,01 %), seguida del ratio 1:3 a pH 1 (70,47 %), que es estadísticamente similar a 1:1 a pH 0 y 1:4 a pH 1 (66,86 %). De todos estos hallazgos se concluye que la relación molar 1:1 en el pH inicial tiene la mayor proporción de quelato y las impurezas más bajas; sin embargo, la muestra 1:4 en el pH isoelectrico 5,97, contiene la mayor cantidad de hierro en forma de quelato por volumen. Pero teniendo en cuenta que esta muestra contiene NaOH en su preparación, lo que da como resultado glicinato de sodio, además de tener más glicina libre y sus oligómeros, hace que se prefiera la muestra 1:1 al pH inicial debido a varios aspectos como la pureza del quelato y la ausencia de NaOH. En el presente trabajo se realizó a una ratio de 1:1 bajo el pK1 de la glicina 2,34. Por lo que a pesar de obtener un quelado impuro, se logró obtener una muestra con un buen porcentaje de bisglicinato ferroso (alrededor del 70%).

4.2. Extracción de pectina de maracuyá

La extracción de pectina a partir de la cáscara de maracuyá, tiene algunas características diferentes al de la pectina comercial. El color de la pectina extraída de maracuyá tiene una coloración más oscura (figura 8), esto se debe a pigmentos que se han extraído durante el proceso y estos pigmentos en algunas frutas también son solubles en medio acuoso y se pueden extraer en medio ácido (Adetunji et al., 2017b).



Figura 8. Pectina extraída de cáscara de maracuyá, después de los procesos de extracción, filtrado, precipitación y secado.

En el protocolo reportado por Ulloa 2012 y (Liew et al., 2014), no se propone alguna forma de eliminar dichos pigmentos; sin embargo, se intentó emplear varios lavados de etanol con la finalidad de retirar la mayor cantidad de pigmentos, pero no se logró un cambio significativo. Por otro lado, el grado de maduración de la fruta es otra variable que afecta en la extracción de la pectina; esto se debe a que existe un proceso enzimático que degrada las cadenas de azúcares en azúcares simples lo que afecta en la distribución, peso molecular y grado de metilación de las pectinas (Ding et al., 2017). Un factor determinante en las propiedades físicas de la pectina extraída, también es el proceso de

secado de las cascaras de fruta, que debe ser por convección, caso contrario se produce la caramelización de los azúcares y la generación de coloración adicional.

4.3. Caracterización de la pectina extraída de maracuyá

La extracción de pectina utilizando ácido cítrico nos dio un rendimiento de $59,09 \pm 1,10\%$, similar al obtenido en el trabajo de Garrido 2017 ($63,31 \pm 1,08$) %. Que resulta un buen porcentaje de rendimiento considerando la cantidad de desechos de cáscara de maracuyá que no son aprovechados y se desperdicia.

Sin embargo, el grado de metoxilación es una de las características importantes de la pectina para definir su potencial como fuente de grupos carboxilos o carbonilos libres que puedan reaccionar con el hierro o la glicina. El grado de metoxilación está determinado por la relación entre la cantidad de grupos esterificados y la suma de los grupos carboxilos y esterificados totales, en las unidades del ácido poligalacturónico de la pectina. Por esta razón, mientras más metoxilada esté, menos oportunidad tenemos de encontrar carboxilos o carbonilos que reaccionen con el complejo de glicina y hierro. Los porcentajes de grupos carboxilo libres (K_f) en la pectina extraída fueron $17,50 \pm 1,90$ %, y los porcentajes de grupos carboxilo esterificados (K_e) fueron $18,20 \pm 0,95$ %. Esto representa el 49,02% de grado de metoxilación, que es incluso más que lo que logra Garrido 2017 y Liew et al., 2014 (41,66 y 36,21 %, respectivamente). Pero, debido a la contaminación de pigmentos y azúcares que puede tener estas pectinas, es más conveniente utilizar la pectina comercial, que un mayor grado de metoxilación, pero que a través de la modificación por oxidación se logra obtener grupos carboxilos y carbonilos que reaccionen mejor con los complejos de hierro y glicina.

4.4. Oxidación de pectina nativa

La oxidación de pectina se realizó sobre muestra de pectina nativa comercial debido a que son muestras más homogéneas y puras, a diferencia de la contaminación e impurezas que podrían tener las pectinas extraídas de frutas cítricas. El producto oxidado muestra dos fases, la fase superior en suspensión corresponde a pectina con un alto grado de oxidación y la fase inferior precipitante tiene pectina con un menor grado de oxidación. A medida que incrementa el grado de oxidación de la pectina, disminuye el grado de metoxilación y el rendimiento de oxidación, que se obtiene comparando el peso inicial de pectina contra el peso final de pectina oxidada seca (Garrido, 2017), esto se debe a la degradación de la pectina al romperse los anillos de la D-galactosa del ácido poligalacturónico de la pectina debido a la oxidación (Chetouani et al., 2014); en la figura 4 se muestran las principales rutas de oxidación de la pectina y en todas se observa la fragmentación del anillo de la D-galactosa, lo que desestabiliza la estructura de la pectina. Sin embargo, el grado de oxidación al 2% de peróxido resultó ideal con un contenido de aldehídos de $(0,400 \pm 0,035)$ mol/g.

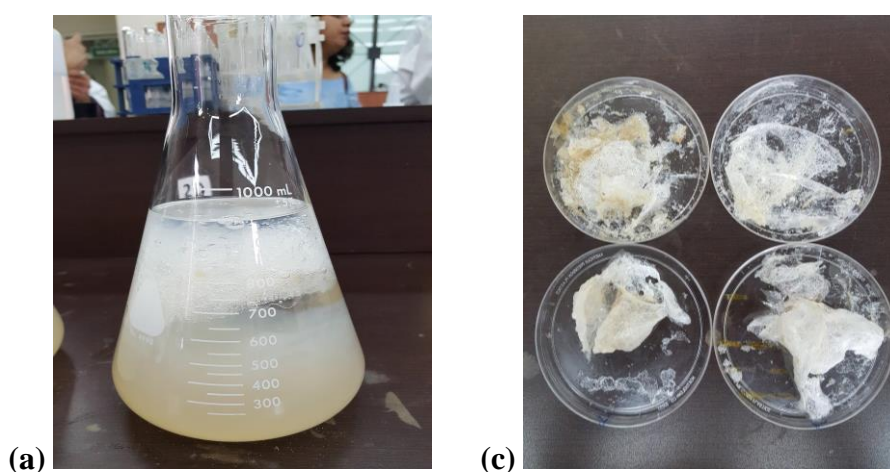


Figura 9. (a) Muestra de oxidación de pectina al 2% de peróxido de hidrogeno. (b) Muestra de pectina oxidada después del filtrado, lavado y secado.

La pectina que posteriormente se utilizó para obtener las matrices con glicina, hierro y el complejo Gly-Fe, fue en forma nativa y oxidada. Se pudo comprobar que la pectina oxidada proporcionó una mayor cantidad de interacciones tanto con la glicina y el hierro separados, como con la muestra que contenía el complejo Gly-Fe. La caracterización de estas matrices se detalla y analiza a continuación.

4.5. Caracterización de pectina nativa

El grado de metoxilación está determinado por la relación entre la cantidad de grupos esterificados y el total de grupos carboxilo libres y esterificados en las unidades de ácido poligalacturónico de pectina, antes y después de la oxidación con peróxido. Los porcentajes de grupos carboxilo libres (Kf) en pectina nativa y oxidada fueron $(22,50 \pm 2,10) \%$ y $(61 \pm 1,90) \%$, respectivamente. Por otro lado, los porcentajes de grupos carboxilo esterificados (Ke) en pectina nativa y oxidada fueron $(11,30 \pm 1,58) \%$ y $(9,50 \pm 1,40) \%$, respectivamente. De esta forma tenemos un grado de esterificación de la pectina nativa de 33,43% y de la pectina oxidada el 13,47%.

Como el contenido de carboxilo esterificado es inferior al 50%, se consideró que la pectina tiene un bajo grado de metoxilación, la pectina oxidada tuvo un menor grado de esterificación y un mayor porcentaje de carboxilos libres, posiblemente debido a la oxidación adicional de los grupos carbonilo en nuevos carboxilos, de acuerdo con las diferentes rutas de oxidación que puede sufrir la pectina (Chetouani et al., 2014). No se observaron cambios significativos en cuanto a los carboxilos esterificados porque la oxidación no afecta a los grupos metoxilo (Bochek et al., 2001). El contenido de carbonilo, por otro lado, se encontró en $0,400 \pm 0,001$ mol/g, lo que corresponde a un alto grado de oxidación (Chetouani et al., 2014).

4.6. Morfología de las matrices de pectina, glicina y hierro.

En la figura 10, podemos ver el resultado de la liofilización de las soluciones con las distintas formulaciones de pectina, glicina y hierro. Mediante SEM se analizaron microscópicamente la estructura de las matrices.

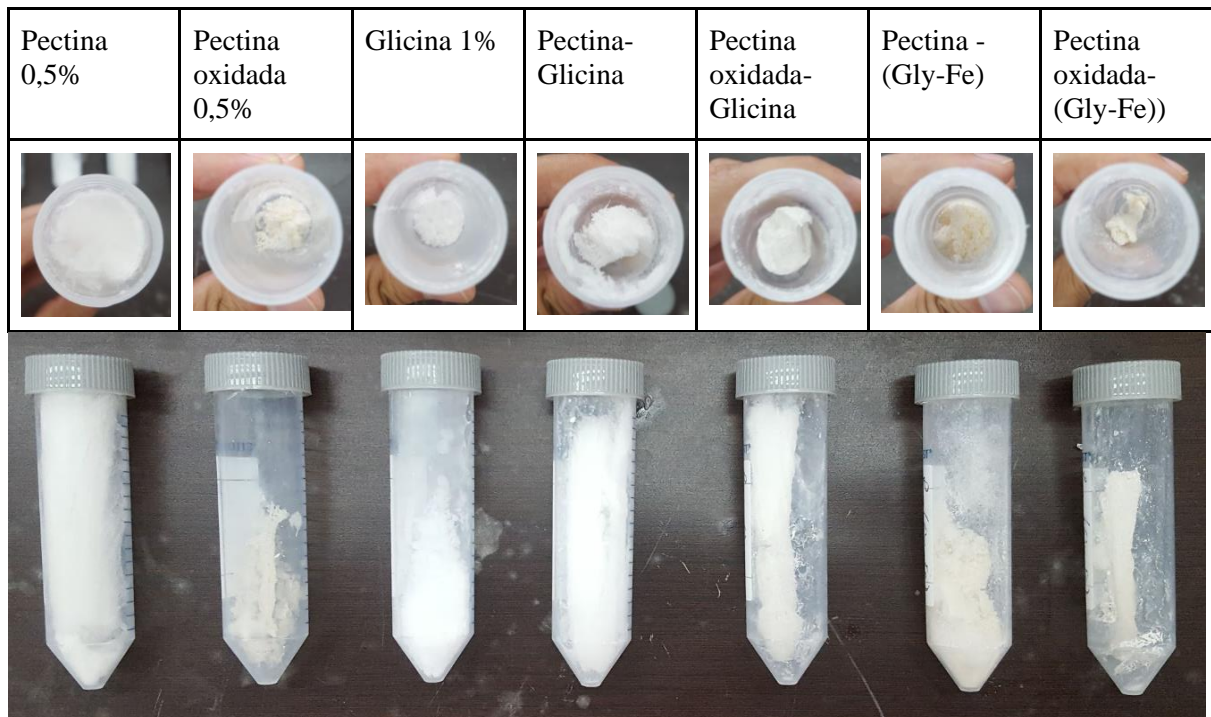
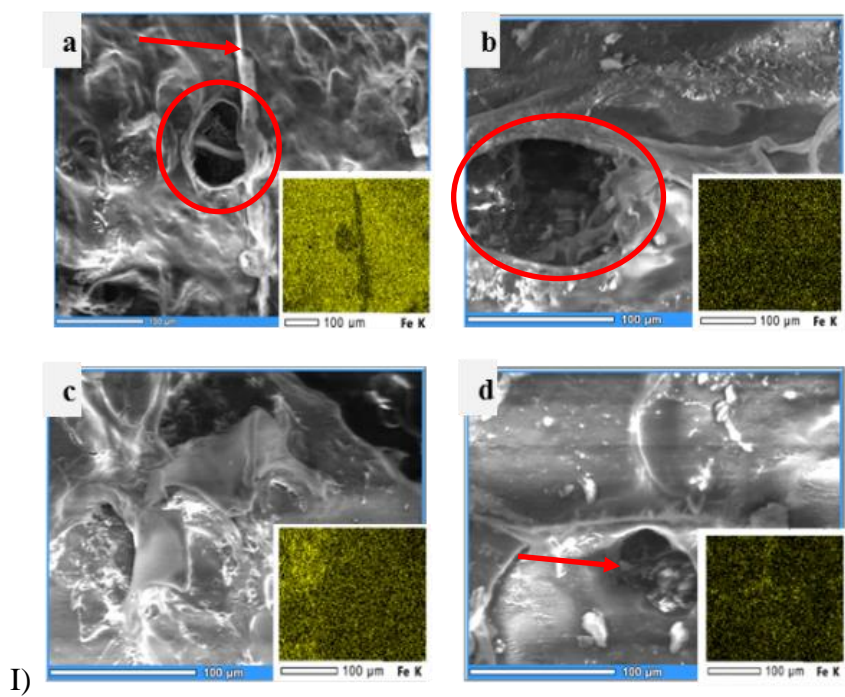


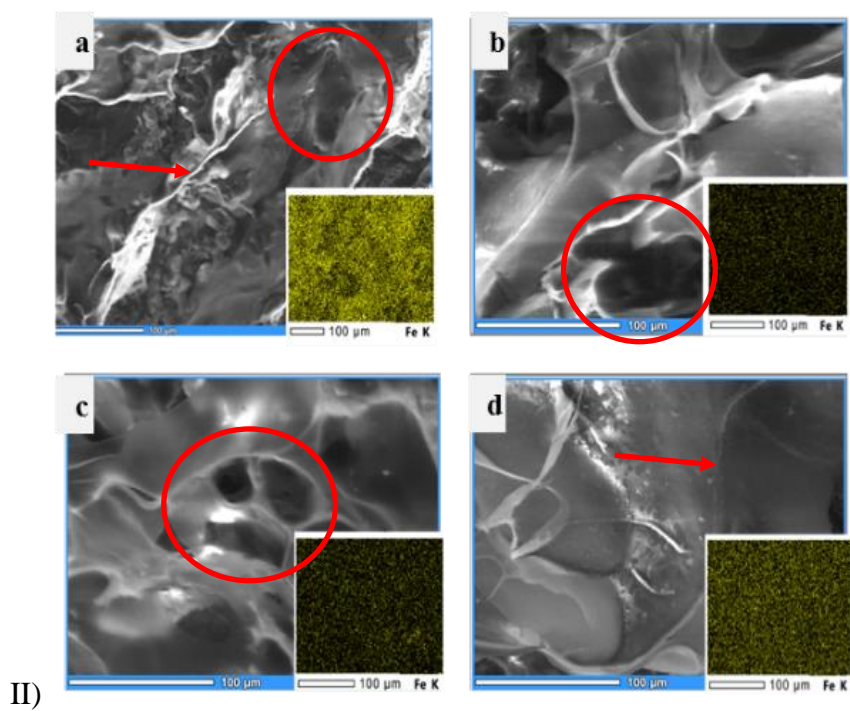
Figura 10. Muestras a pH 5 después de la liofilización

Las diferencias en la morfología de la matriz y los posibles cambios debido a la digestión se analizaron mediante micrografías electrónicas de barrido, complementadas con una evaluación de la distribución de hierro a través de EDS, como se muestra en la figura 11.

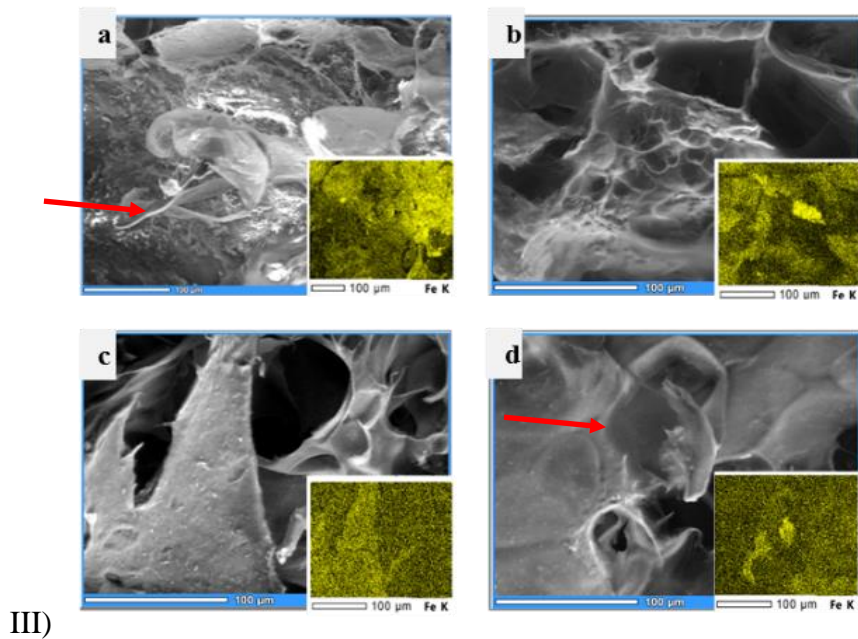
Pect-(Fe-Gly)



Pectox-(Fe-Gly)



Pect-Fe



III)

Los círculos rojos indican los poros o huecos irregulares
Las flechas rojas señalan los contornos que se han ido erosionando y desvaneciendo

Figura 11. Micrográficas electrónicas de barrido de diferentes muestras (I-III) en diferentes medios de digestión simulados: (a) sin digerir, (b) saliva, (c) gástrica y (d) intestinal. Las imágenes EDS que muestran la distribución del hierro se muestran en amarillo en el inserto inferior derecho. Barra de calibración: 100 μm .

La morfología inicial de las muestras no digeridas fue porosa tipo aerogel, similar a las reportadas previamente en la literatura (Günter et al., 2019). Su estructura es visualmente micro porosa, con poros de 100 μm aproximadamente (figura 11), heterogénea, donde los poros no tienen un diámetro uniforme sino una forma de huecos irregulares, ramificados e interconectados. Mientras va avanzando toda la digestión *in vitro*, no se observaron diferencias importantes entre la pectina nativa y la oxidada (figura 11 I, II), ambas muestran un cambio similar en su estructura. Sin embargo, individualmente se ve un cambio según avanza la digestión. La figura 11 Ia y 11 IIa muestran huecos y poros con perfiles y contornos bien definidos dando una apariencia más sólida, pero que, a medida

que la digestión *in vitro* avanza, la estructura va cambiando, se observa una porosidad o huecos menos definidos, los contornos se desvanecen, toma una forma más homogénea, lo que da una apariencia más blanda (figura 11 I b, c, d; II b, c, d); la digestión parece haber provocado cierto nivel de erosión de la matriz, es decir hay un desgaste o destrucción de las matrices. De hecho, macroscópicamente, después de la digestión, se hizo más difícil manipular las muestras, y se necesitó un mayor cuidado ya que tenían tendencia a desvanecerse más fácilmente al manipular, el efecto de la digestión cambió la estructura de la matriz, tanto en las matrices con pectina nativa como con la oxidada, de igual manera; es decir la modificación de la pectina por oxidación, no representó un cambio significativo en la estabilidad de la estructura microscópica de las matrices.

Con respecto a la presencia de hierro a través de EDS (figura 11, insertos rectangulares colores amarillos), al comparar el complejo quelado con el hierro solo, se ve claramente que hubo una presencia de hierro (intensidad del color amarillo) más fuerte en el último (figura 11, III), a lo largo de todas las etapas de digestión, mientras que para el primero (figura 11, I), hubo una disminución importante en la presencia después de la digestión con saliva. Se observó un efecto similar con la pectina oxidada (figura 11, II).

Según Ghibaud et al., 2018, la porosidad de la pectina tiene una estructura estable no homogénea, probablemente como resultado del proceso de preparación de la muestra y la digestión *in vitro* en medios ácidos, considerando que la estabilidad de los geles de pectina es a pH 4 máxima. En el presente trabajo se muestra que la oxidación de la pectina, en las condiciones utilizadas, no fue lo suficientemente significativa como para generar cambios estructurales. Además, la retención de hierro muestra ser mayor cuando se usa hierro sin haber realizado ningún proceso de posible quelación previo, posiblemente porque el hierro interactúa más fácilmente con la pectina a través de enlaces iónicos cuando está solo, que cuando está mezclado con glicina o como complejo Gly-Fe, en donde el hierro

compite con la glicina para unirse a la pectina, ya que la glicina, a través de bases de Schiff, puede unirse a los grupos carboxilos de la pectina, y disminuye la probabilidad de que el amino quelado se una a través del hierro. (Ghibaud et al., 2018; Günter et al., 2019).

4.7. Análisis del espectro de FTIR de la pectina extraída del maracuyá

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una tecnología que se utiliza para comprender la estructura de las moléculas individuales y la composición de las mezclas moleculares de una muestra. La espectroscopia FTIR usa energía del infrarrojo medio modulada para analizar una muestra. La luz infrarroja se absorbe a frecuencias específicas directamente relacionadas con las energías de enlace vibratorio interatómico de la molécula. Cuando la energía de enlace vibratorio y la luz infrarroja media son equivalentes, el enlace puede absorber dicha energía. Los diversos enlaces de una molécula vibran con energías diferentes y, por lo tanto, absorben longitudes de onda distintas de la radiación por infrarrojos (IR). La frecuencia e intensidad de cada una de estas bandas de absorción contribuye al espectro total, lo que crea una identificación característica de la molécula.

Los picos que se utilizan para determinar el contenido de ácido poligalacturónico se encuentran en la región de 1100-1200 cm^{-1} . Además del grupo C=O del grupo esterificado, está el grupo C-H del grupo éster en el rango de 2800-3000 cm^{-1} que se encuentra presente en todas las pectinas, aunque en algunas pueden estar ligeramente desplazados (Kyomugasho et al., 2015).

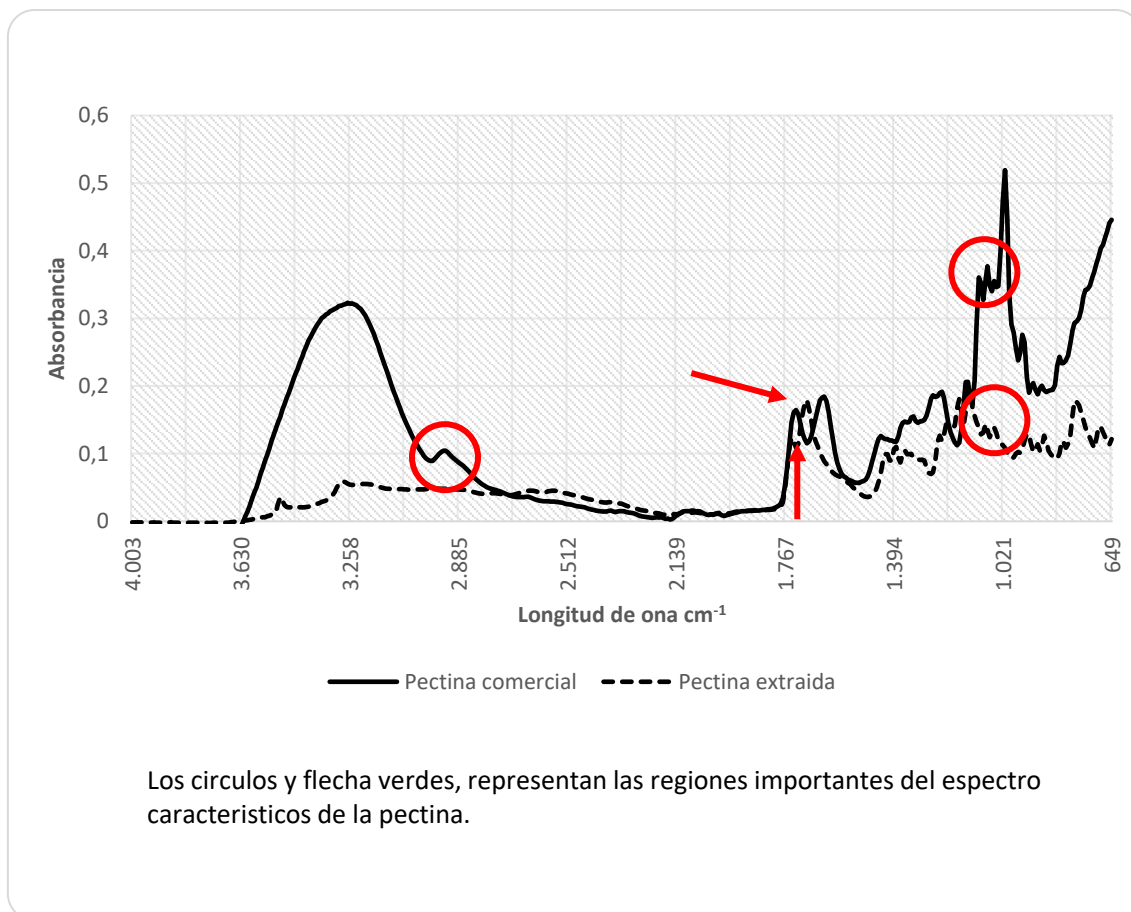


Figura 12. Espectro de FTIR de la pectina comercial comparada con la pectina extraída de maracuyá.

La pectina extraída de maracuyá tiene un espectro un poco diferente a la pectina comercial, a pesar de mantener un patrón similar que coincide en los rangos importantes que corresponden al grupo C=O y C-O (figura 12). Es probable que pigmentos y azúcares que se mantienen en la pectina extraída, alteren el espectro FTIR. Esta hipótesis se corrobora con el estudio realizado por Garrido 2017, en donde extrae pectinas de otras frutas y que tienen un espectro similar al de la pectina de maracuyá y sus características físicas son parecidas, como la pitahaya y la granadilla.

La pectina comercial tiene un grado de metoxilación mayor a la pectina de maracuyá (70% y 40% respectivamente), este dato se comprueba a través de este espectro, ya que

la pectina de maracuyá no presenta un pico en el rango de 1700 a 1750 cm^{-1} (figura 12), que es donde tienen absorbanza los carbonilos esterificados (Kyomugasho et al., 2015), pero la pectina comercial (1700 cm^{-1}) si absorben en este rango ya que su grado de metoxilación es significativamente mayor al de la pectina de maracuyá. Esto implica que con un procedimiento más efectivo para extraer pectina de maracuyá sin residuos de pigmentos ni azúcares, sería una opción ideal, con más grupos carboxilos y carbonilos libres para el propósito del estudio, de aumentar la interacción con los complejos de Glicina y hierro, y formar una matriz que aumente la biodisponibilidad del hierro en el organismo humano.

Fue importante la extracción de pectina a partir del maracuyá para poder corroborar la utilidad de reciclar los residuos de maracuyá, principalmente la cascara, como una buena fuente para obtener pectina y aprovecharlo a nivel industrial. Sin embargo, para objeto de nuestro estudio de analizar la estructura e interacciones con el hierro y la glicina, fue necesario utilizar en los siguientes ensayos solamente pectina comercial y así no tener interferencias en los espectros FTIR ni en el resto de métodos donde los residuos de pigmentos y azúcares de la pectina extraída puedan alterar los resultados.

4.8. Análisis de interacciones de unión entre el hierro, glicina y bisglicinato ferroso, con las matrices de pectina a través de espectros FTIR

Los espectros y picos más relevantes que se analizaron en espectros FTIR, están interpretados según el pH de 4,5 que se usó por ejemplo en el trabajo de Kyomugasho 2015, ya que en nuestro trabajo usamos pH 5. Según la literatura (Chetouani et al., 2014; Kyomugasho et al., 2015) los espectros relevantes fueron los siguientes:

- 1000–1150 cm^{-1} : C-O de los grupos C-O-Fe.
- 1620–1690 cm^{-1} : se espera que se forme la base de Schiff C=N entre el grupo amino de glicina y carbonilo libre de pectina oxidada.
- 1600–1650 cm^{-1} : C=O de carboxilos de pectina.
- 1690–1750 cm^{-1} : C=O de carbonilos libres de pectina oxidada.

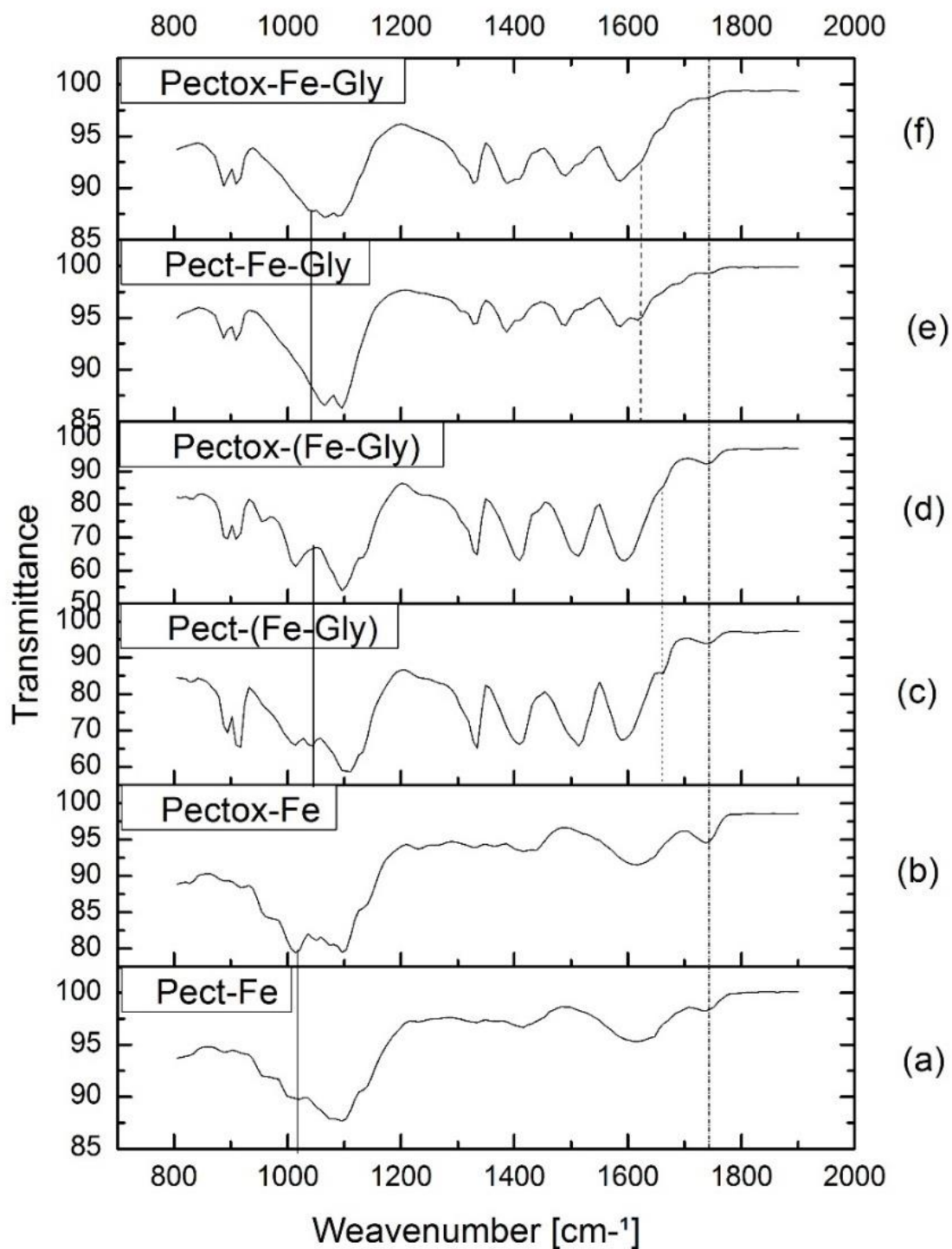


Figura 13. Espectros infrarrojos transformados de Fourier (FTIR). (a) pectina nativa con hierro, (b) pectina oxidada con hierro, (c) pectina nativa con bisglicinato ferroso, (d) pectina oxidada con bisglicinato ferroso, (e) pectina, con hierro y glicina no quelada, (f) pectina oxidada, con hierro y glicina no-quelada.

En la figura 13, la señal observada entre 1000 y 1150 cm^{-1} se puede atribuir al estiramiento C-O de los grupos carboxilo y metoxilo de la pectina. Como se mencionó en la cuantificación de carboxilo (apartado 4.3.) la pectina nativa y oxidada mantienen cantidades similares de grupos metoxilo, pero pueden tener diferentes cantidades de carbonilos y carboxilos libres porque, después de la oxidación, los carbonilos libres pueden oxidarse aún más a carboxilos (Chetouani et al., 2014; Kyomugasho et al., 2015). Por lo tanto, al usar las versiones no queladas, el pico alrededor de 1650 cm^{-1} en la pectina oxidada (figura 13 b, f) tiene mayor intensidad que en la pectina nativa (figura 13 a, e), debido a los carboxilos formados después de la oxidación, corroborado por el aumento significativo en la cuantificación de carboxilo mostrada anteriormente en la literal 4.4. En las muestras aminoqueladas (figura 13 c, d), por otro lado, la pectina oxidada (figura 13 d) presenta una señal atenuada en este rango, posiblemente indicando interacciones iónicas combinadas con el hierro e interacciones de carga con los grupos amino de la glicina, y los grupos carboxilo del aminoácido interactuando significativamente en el complejo quelado.

Desafortunadamente, los picos de imina de las bases de Schiff C=N (1620–1690 cm^{-1}) se superponen con el estiramiento C=O de los grupos carboxilo (1600–1640 cm^{-1}), por lo que puede haber presencia de ambos grupos (C=N, C=O); sin embargo, la señal que aparece entre 1620 y 1650 cm^{-1} en la pectina nativa (figura 13 c, e) puede deberse a carboxilos que no reaccionaron con el hierro, por lo que se supone que la oxidación aumenta la afinidad por la interacción C-O-Fe.

En el caso de las muestras sin glicina (figura 13 a, b), se observa una intensidad ligeramente superior en el pico de 1740 cm^{-1} , correspondiente a carbonilos libres, producto de la oxidación, y al no existir grupos amino de glicina, están disponibles libremente. Además, estos carbonilos pueden oxidarse a carboxilos (Chetouani et al.,

2014; Kyomugasho et al., 2015), como se observa en un pico de pectina oxidada a 1015 cm^{-1} (figura 13 b). Por lo tanto, suponemos que se forman tanto enlaces de bases de Schiff $\text{C}=\text{N}$ como iónico $\text{C}-\text{O}-\text{Fe}$, potencialmente con una afinidad ligeramente mayor por la formación de $\text{C}-\text{O}-\text{Fe}$, después de que se oxida la pectina.

Por otro lado, existe una diferencia entre, las muestras que se usó hierro sin ser sometido a un proceso de quelación con glicina, con aquellas muestras de Glicina-Hierro que tuvieron un tratamiento de quelación previa. Las muestras con aminoquelados (figura 13 c, d) muestran mayor intensidad que los no aminoquelados (figura 13 e, f) entre 1690 y 1750 cm^{-1} de carbonilos libres; por lo tanto, es posible que, en los quelatos (figura 13 c, d), la formación de la base de Schiff fuera menos favorecida y se forman cantidades iguales o quizás mayores de $\text{C}-\text{O}-\text{Fe}$ que en las formas no queladas (figura 13 e, f). Sin embargo, en las matrices de hierro no quelado (figura 13 e, f), aparentemente se forman tanto $\text{C}=\text{N}$ ($1620\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$) como $\text{C}-\text{O}-\text{Fe}$ ($1000\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$), ya que no existe una quelación previa entre el hierro y la glicina, por lo que forman sus respectivos enlaces de forma independiente. Por el contrario, en matrices con el complejo quelado (figura 13 c, d), el amino Gly-Fe aparentemente quelado se mantiene e influye en la afinidad por el carboxilo o carbonilo libre, donde parece tener una mayor afinidad por el enlace $\text{C}-\text{O}-\text{Fe}$ formador de carboxilo ($1000\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$).

Se observó también una diferencia en los grupos carboxilo ($1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) y carbonilos libres ($1690\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$) entre las muestras de pectina nativa y las de pectina oxidada, pero el complejo Gly-Fe quelado reacciona menos con la pectina que cuando se agregan Gly y Fe por separado sin quelar de antemano. Por lo tanto, Fe^{2+} , cuando se coordina con Gly, puede evitar parcialmente que reaccione con la pectina.

4.9. Análisis de las interacciones de perlas de pectina con glicina y hierro a través de los espectros FTIR.

En primer lugar, se compararon los espectros de FTIR entre pectina nativa y pectina oxidada al 10% con Gly, a pH 2 y pH 5

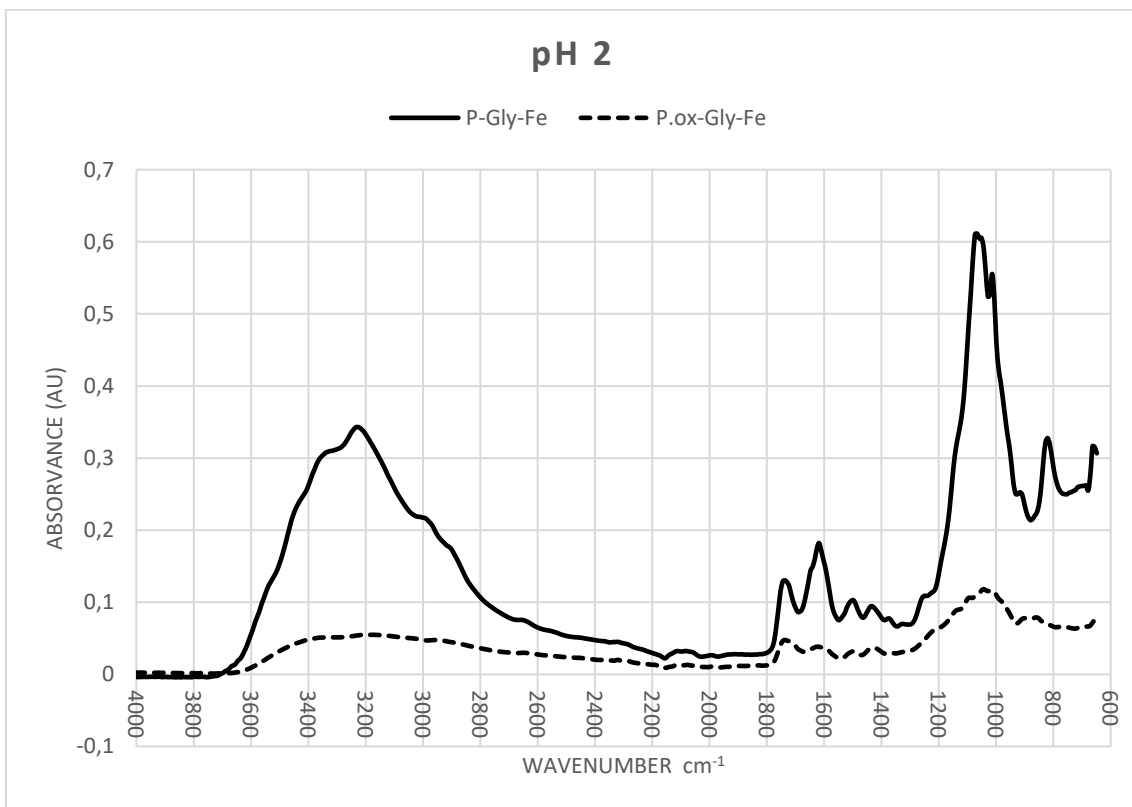


Figura 14. Espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) del sistema de partículas con pectina nativa y pectina oxidada al 10% de Gly, a pH 2.

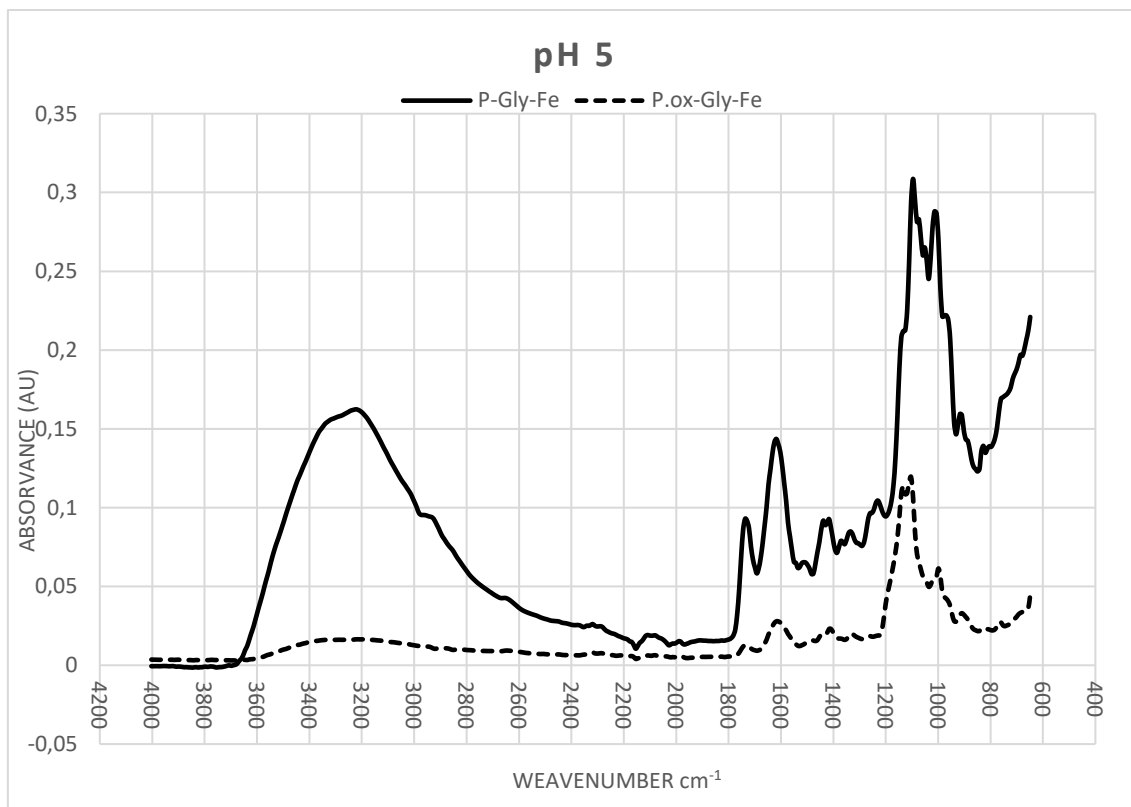


Figura 15. Espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) del sistema de partículas con pectina nativa y pectina oxidada al 10% de Gly, a pH 5.

Tanto en los espectros a pH 2 como a pH 5 (figura 14 y 15), vemos que las muestras con pectina oxidada presentan menor intensidad en los picos del rango de 1760-1620 cm^{-1} comparado con los espectros de pectina nativa.

Ahora comparamos los espectros de pectina nativa y pectina oxidada al 10% de Gly, entre pH 2 y pH 5,

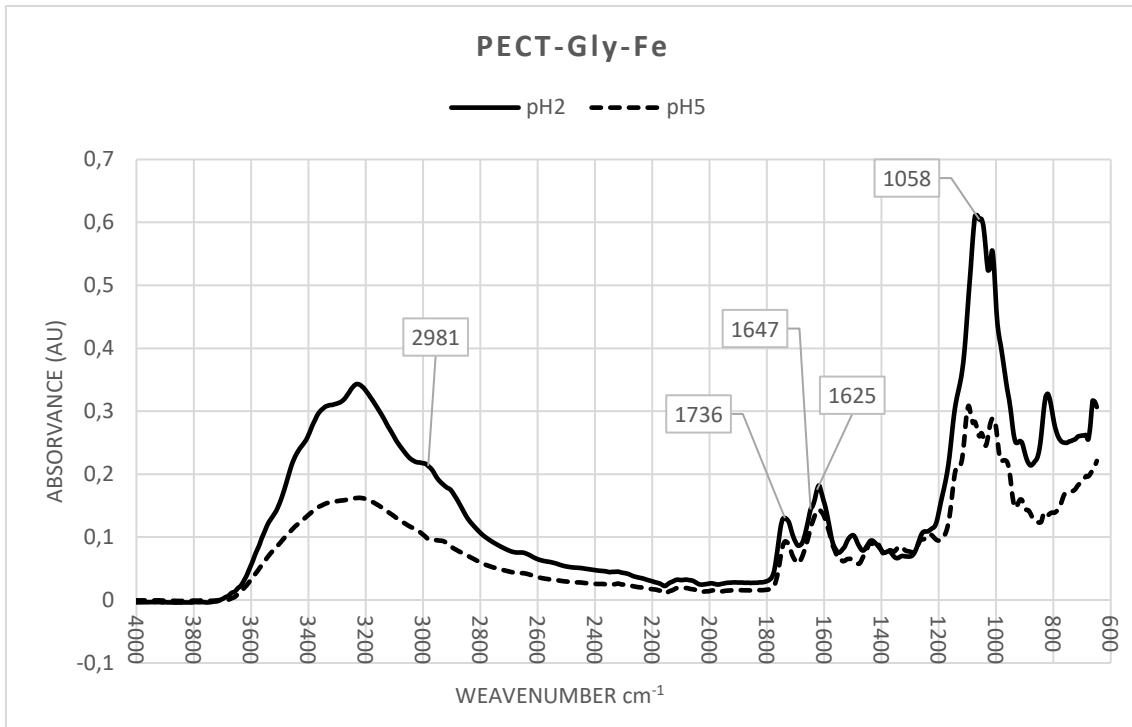


Figura 16. Espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) del sistema de partículas con pectina nativa al 10% de Gly, a pH 2 y pH 5

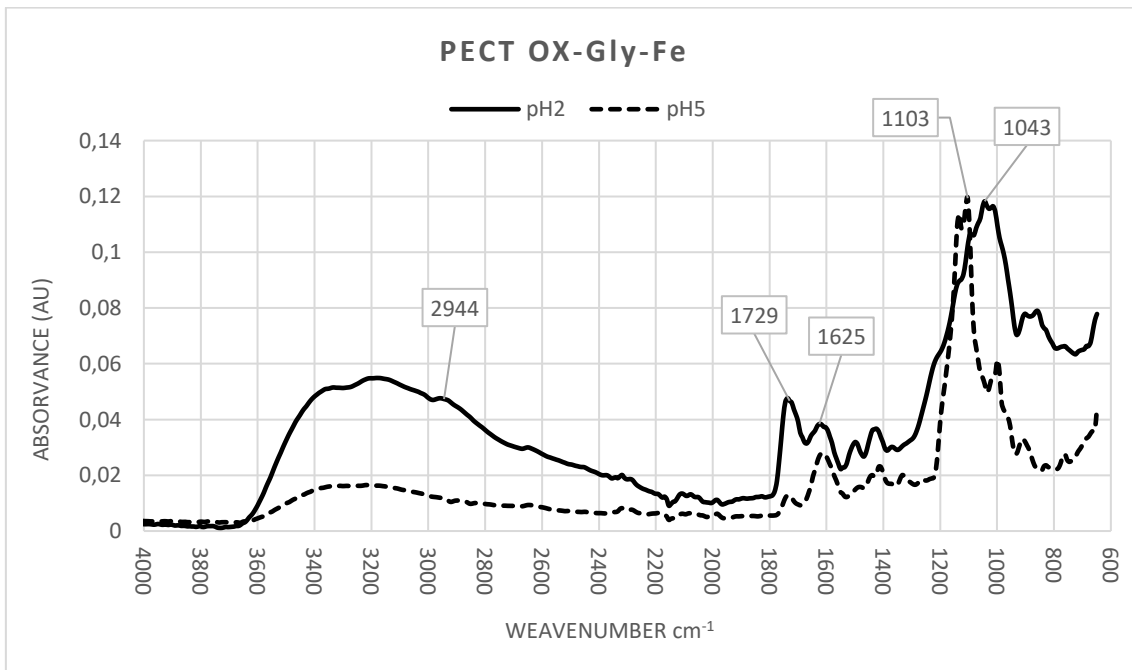


Figura 17. Espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) del sistema de partículas con pectina oxidada al 10% de Gly, a pH 2 y pH 5

Analizando las figuras 16 y 17, los espectros a pH 5 se muestran con menor intensidad que los espectros a pH 2, principalmente en los picos de interés en el rango de 1760-1620 cm^{-1} . Aparentemente esto indica que disminuye la cantidad de carbonilos libres y carboxilos al enlazarse a la glicina, mediante la base de schiff, debido a que es el pH ideal para su formación, o empieza a perder grupos metoxilo y se hidrolizan, perdiendo su capacidad para formar geles debido a que la estabilidad máxima de la pectina es a pH 4 (Bochek et al., 2001).

Y por último se comparó los espectros de las partículas con pectina nativa y pectina oxidada directamente con hierro sin glicina, a pH 2 y 5.

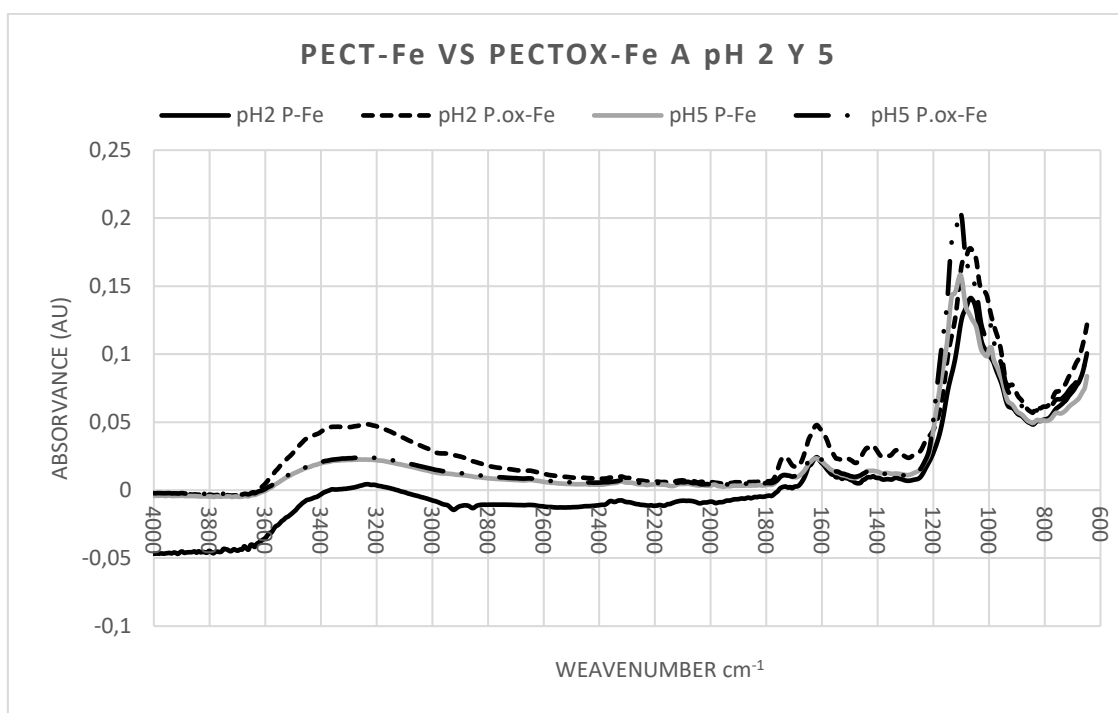


Figura 18. Espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) del sistema de partículas con pectina nativa y oxidada a pH 2 y pH 5.

En el caso del uso de pectina con hierro, no existe diferencia significativa entre los espectros (figura 18), sin embargo, igualmente existe menor intensidad en los picos conforme se utilice pectina nativa, por lo que aparentemente sí se van enlazando a los grupos carbonilos y carboxilos de la pectina oxidada.

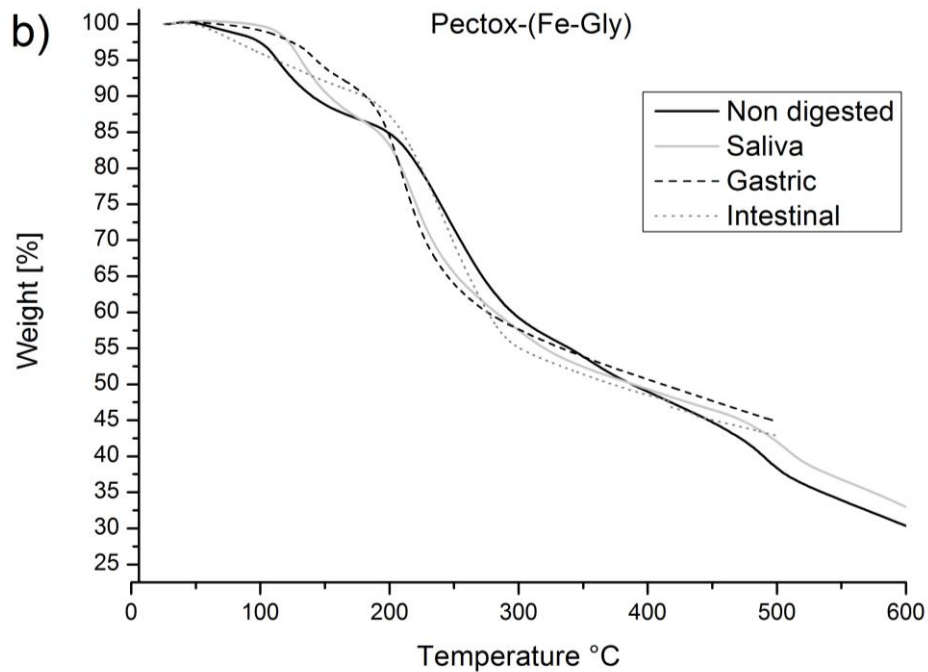
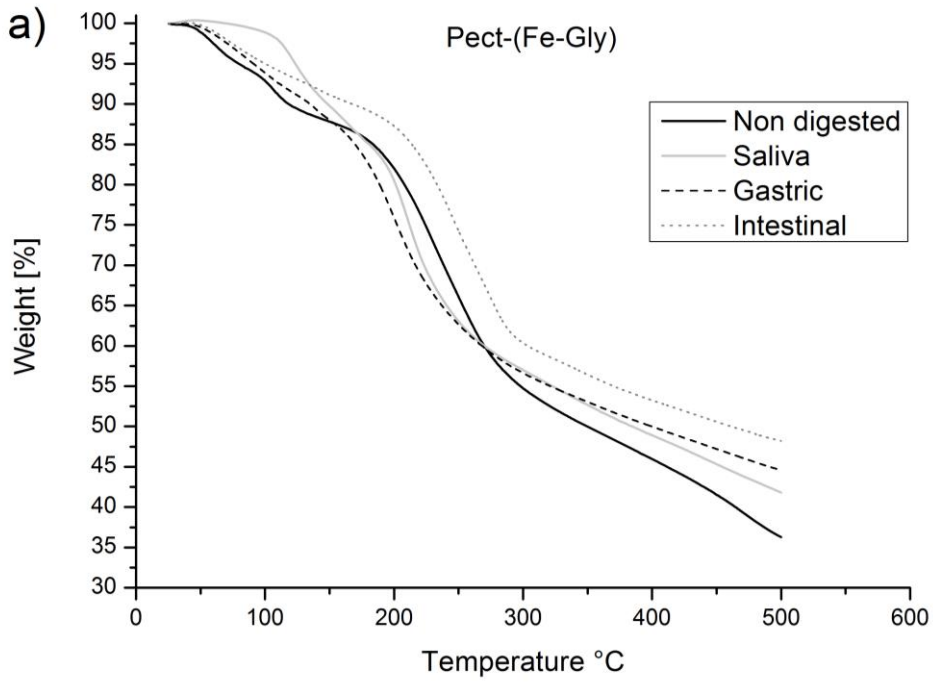
No se observaron diferencias relevantes entre las muestras de matrices de pectina (literal 3.5) y las perlas de pectina (literal 3.), por lo que se continuó el estudio de estabilidad térmica con las matrices de pectina (literal 3.5).

4.10. Análisis de estabilidad térmica matricial con TGA y DSC de las muestras de matrices.

Se realizó análisis termogravimétrico, TGA, para observar los cambios producidos en la estabilidad térmica de muestras digeridas y no digeridas de las matrices, lo que podría corroborar cambios en su estructura y composición (Almeida et al., 2015). El análisis termogravimétrico (TGA) es un método de análisis térmico en el cual se mide la pérdida o ganancia de masa de una muestra cuando ésta se somete a un programa controlado de temperatura. Esta medición proporciona información sobre fenómenos físicos, tales como transiciones de fase, absorción, adsorción y desorción; así como fenómenos químicos que incluyen reacciones químicas, descomposición térmica y reacciones de oxidación-reducción (Almeida et al., 2015)

Las figuras 16 a, b muestran cuatro etapas de degradación: una primera etapa de 0 a 100 °C corresponde a la evaporación del agua; una segunda, de 100 a 200 °C donde el peso disminuye levemente, se relaciona con el inicio de la despolimerización de la pectina (Kumar et al., 2011). Una tercera etapa, de 200 a 300 °C, se encuentra la temperatura

máxima de degradación, donde se produce una descomposición rápida por deshidratación de los grupos hidroxilo de la pectina; y la cuarta etapa, de 300 a 600 °C, representa una degradación lenta debido a la formación de residuos de carbono a partir de la descomposición térmica de la pectina (Almeida et al., 2015).



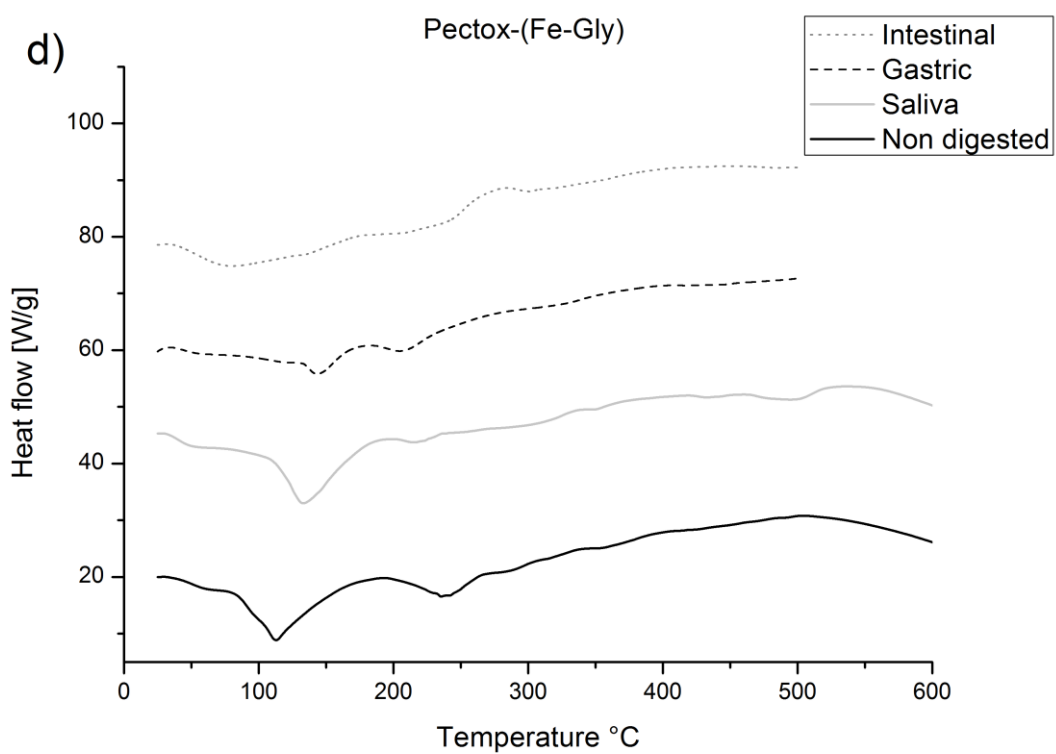
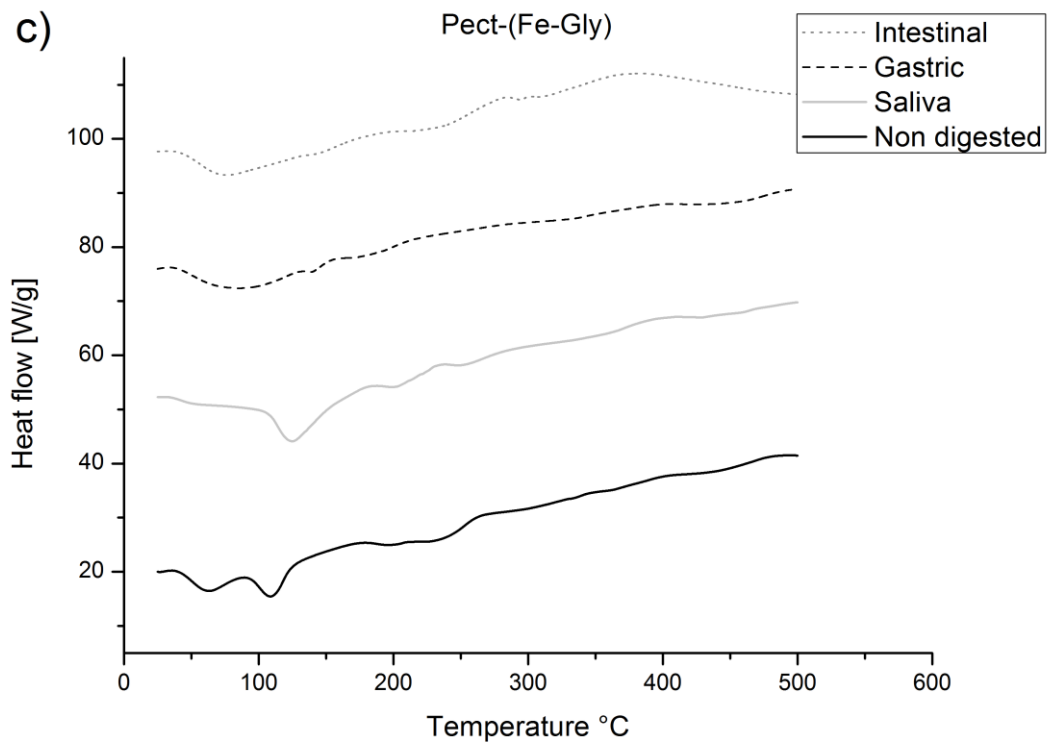


Figura 19. Análisis termogravimétrico, TGA (a, b) y calorimetría diferencial de barrido, DSC (c, d) de matrices antes y después de la digestión in vitro.

Los resultados de degradación son similares con cada tipo de fluido de digestión *in vitro*, excepto para las muestras que no fueron sometidas a ningún fluido de digestión, y cuando se usó saliva simulada, que se degradan por completo a 600 °C. Las muestras con pectina oxidada (figura 19b) parecen tener menor contenido de agua ya que mantienen un peso constante entre 0 y 100 °C (primera etapa). A partir de esta temperatura, comenzaron a degradarse y disminuir drásticamente su peso alrededor de los 200 °C, a diferencia de la pectina nativa (figura 19a), que inicia la disminución de peso a los 150 °C. Por lo tanto, se da a entender que las muestras con pectina oxidada poseen una mayor estabilidad térmica que sus contrapartes nativas. Además, se ha informado previamente que la temperatura máxima de degradación de la pectina es alrededor de 250 °C (Almeida et al., 2015), menor temperatura a lo encontrado en este trabajo, donde a esa temperatura mantiene todavía el 50% del peso. El cambio de peso a la misma temperatura no varió comparando entre las muestras de Pect (figura 19a) y Pectox (figura 19b).

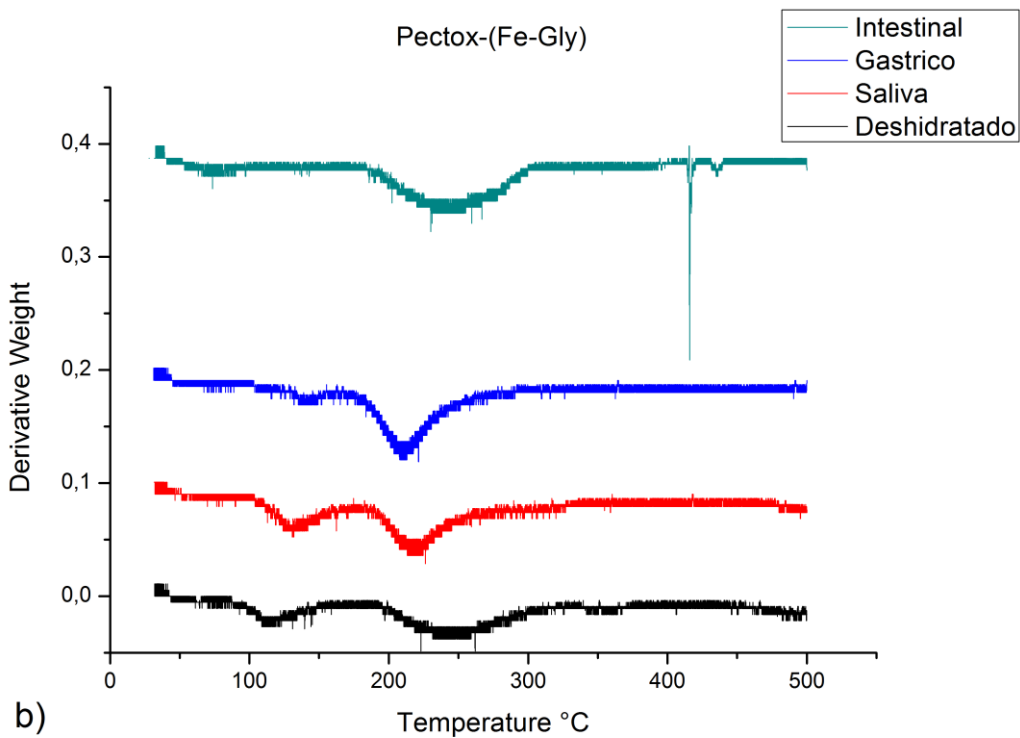
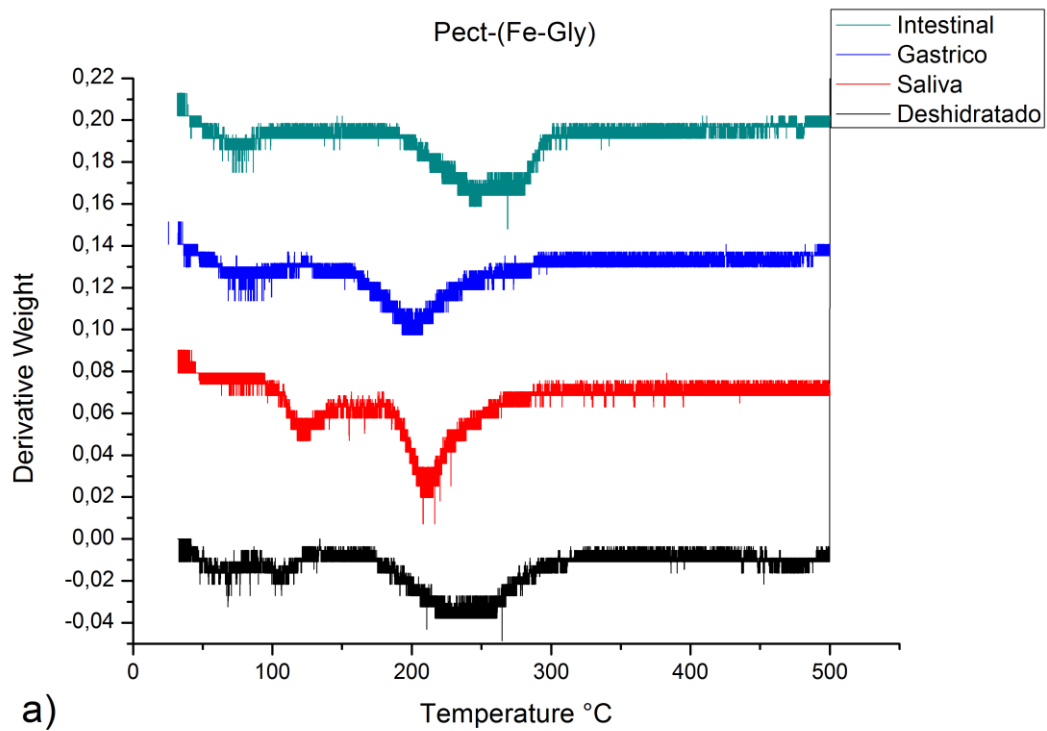


Figura 20. Primera derivada de degradación de peso. a) Pectina con complejo Gly-Fe b) Pectina oxidada con complejo Gly-Fe. Digeridas in vitro con tres simulados de fluidos (saliva, gástrico e intestinal).

La primera derivada de la curva TGA con respecto al tiempo se conoce como curva DTG (figura 20); es proporcional a la velocidad de descomposición de la muestra. Las áreas bajo los picos de DTG son proporcionales a los cambios de masa de la muestra. Así, comparando las curvas de DTG, se pueden observar pequeños cambios que ayudan a diferenciar los distintos tipos de digestión *in vitro*. Un parámetro importante en las curvas DTG es la T de máxima velocidad de reacción, o de máxima velocidad del proceso de degradación en general que en todos los casos de digestión alcanza a temperatura entre 200 y 250 °C.

La figura 20 muestra que los picos de velocidad máxima de degradación disminuyen significativamente en las muestras digeridas. En las matrices de Pect (figura 20a), los picos ya no se observan tras la digestión gástrica, mientras que en las matrices de Pectox (figura 20b) esto ocurre tras la digestión intestinal. Por lo tanto, se puede suponer que estos últimos son más estables térmicamente, probablemente debido a las mayores interacciones entre la pectina y el complejo quelado, como se desprende también del TGA. La aparente degradación más avanzada después de las digestiones, particularmente gástrica e intestinal, puede explicar el hecho de que estas tuvieran el mayor porcentaje de masa residual a 500 °C; es posible que, tras la digestión, exista una mayor composición de hierro libre o aminoquelato, que es más estable térmicamente que la pectina. Ghibaudo et al., 2018, analizaron perlas de pectina-hierro y encontraron que la mayor pérdida de peso debido a la descomposición térmica comenzó por encima de los 200 °C, e informaron que la pérdida de masa por encima de los 250 °C puede explicarse por las interacciones entre un compuesto orgánico (pectina) y porciones inorgánicas (hierro) dentro de la matriz, lo que requeriría temperaturas de calcinación más altas para eliminar toda la materia orgánica (Einhorn-Stoll et al., 2007).

De forma complementaria para obtener información más precisa sobre las características térmicas de las muestras, se realizó DSC para evaluar la temperatura de fusión (T_m). La T_m más alta indica una estructura con una característica energéticamente favorable, es decir, más estable térmica y químicamente (Amin et al., 2019; Chen et al., 2021; Jiang et al., 2006). El análisis DSC muestra dos picos principales durante el análisis térmico de la pectina; el primer pico endotérmico, 100–150 °C, se atribuye a la evaporación del agua, y un segundo pico térmico, 210–270 °C, representa la degradación térmica (Einhorn-Stoll et al., 2007).

4.11. Grado de hinchamiento

Se evaluó el grado de hinchamiento para evaluar la capacidad de absorción de agua de las diferentes matrices, y cómo cambia después de la digestión. Este análisis da una idea de la estabilidad estructural de la matriz a lo largo de las diferentes etapas del trayecto gastrointestinal (Ghibaud et al., 2018). Los porcentajes de hinchamiento de pectina nativa y oxidada en cada uno de los fluidos digestivos simulados (saliva, gástrico e intestinal) se muestran en la figura 21.

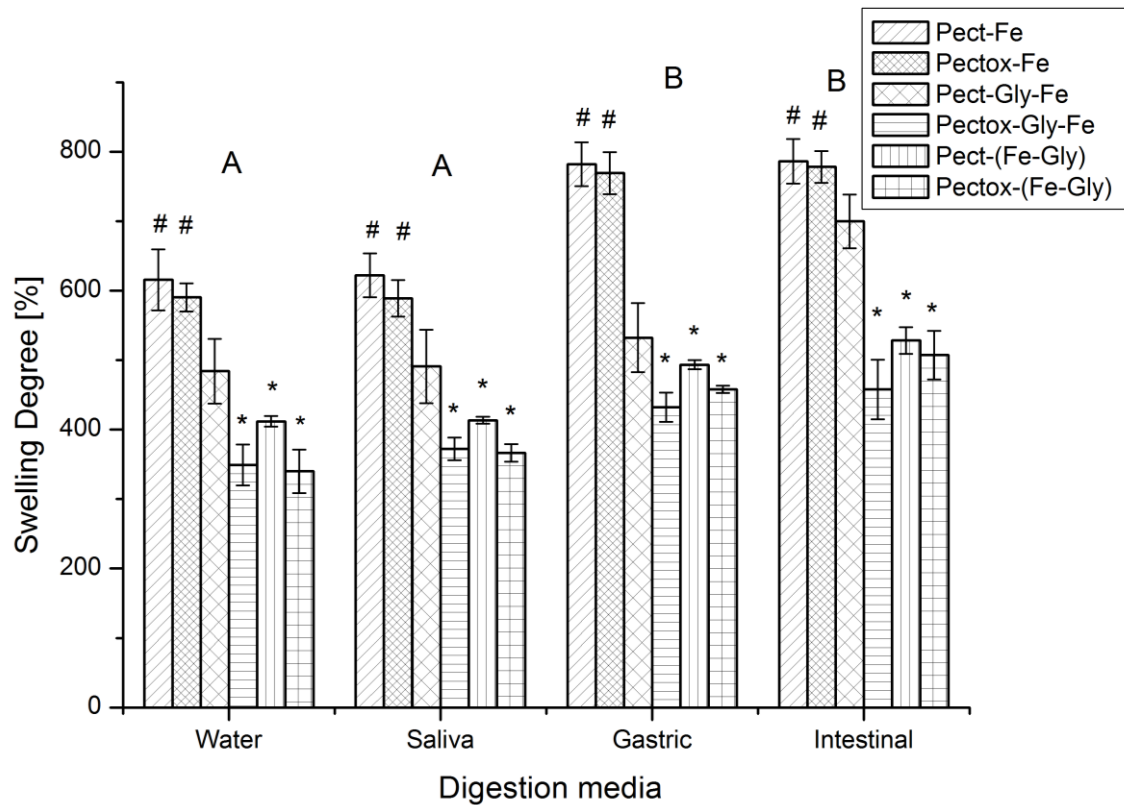


Figura 21. Hinchamiento de matrices de pectina nativa y oxidada con hierro, glicina y bisglicinato ferroso, en cuatro fluidos digestivos diferentes: agua, saliva, gástrico e intestinal. (*) y (#) representan composiciones que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas bajo un medio de digestión dado. Los tratamientos digestivos con las mismas letras (A o B) no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Según ANOVA, la oxidación disminuyó significativamente el grado de hinchamiento de las matrices (figura 21), con respecto a las que contenían pectina nativa ($p < 0,05$). Esto indica que la oxidación proporciona una mayor estabilidad a la estructura de la pectina como se ve en los análisis de TGA y DSC. Sin embargo, estas diferencias fueron menos preponderantes en las matrices con el complejo aminoquelado y se igualaron estadísticamente después de la digestión intestinal. En el caso del hierro solo (Pect-Fe y Pectox-Fe), no hubo diferencias de hinchamiento significativas entre pectina nativa y oxidada. Las mayores diferencias se encontraron entre las muestras con glicina y hierro no quelados (Pect-Gly-Fe y Pectox-Gly-Fe).

Diferentes estudios han explorado previamente geles coloidales de pectina reticulados con hierro, y han demostrado que este catión produce una de las formas más estables, en comparación con otros geles más utilizados como el cobre y el calcio (Günter et al., 2019; Popov et al., 2022). En este caso, se cree, a partir del análisis FTIR, que la oxidación produjo una mayor cantidad de grupos carboxilo que podrían participar potencialmente en la gelificación ionotrópica, pero es posible que la cantidad de estos grupos adicionales no fuera suficiente para causar una diferencia significativa en el grado de entrecruzamiento y, por lo tanto, afecta el hinchamiento. A medida que se introduce la glicina, puede competir con el hierro por los grupos carboxilo para las interacciones de carga, pero, cuando se oxida la pectina, la glicina puede formar bases de Schiff con grupos carbonilo y además proporcionar una mayor cantidad de grupos carboxilo disponibles para la reticulación ionotrópica (red de canales con enlaces iónicos). Esto aumentaría la rigidez de la matriz y, a su vez, se traduciría en una menor capacidad de absorción de agua.

Cuando se usa los complejos de Gly-Fe estos pueden contener gran cantidad de bisglicinato ferroso; esta forma quelada tiene una estructura compleja que podría tener cargas residuales de hierro y grupos amino en la superficie de la estructura que podrían interactuar con la pectina de diferentes maneras: a) entrecruzamiento ionotrópico, b) interacciones de carga entre aminoácidos y ácidos carboxílicos, y c) bases de Schiff entre los grupos amino y carbonilo. Las dos primeras interacciones pueden ocurrir con ambos tipos de pectina, mientras que la última se produciría en pectina oxidada. Las diferencias en el hinchamiento entre Pect-Gly-Fe y Pectox-Gly-Fe (entre 100% y 200% de hinchamiento de diferencia) son un indicador de que las formaciones de iminas a través de las bases de Schiff son importantes, aunque quizás menos favorables debido a los efectos estéricos (Nowok et al., 2022).

En cuanto a los efectos de los medios de digestión, por otro lado, no hubo diferencias entre las muestras con agua y las digeridas en saliva simulada, para todas las

formulaciones, posiblemente porque la pectina no es propensa al ataque enzimático de la amilasa. Después de la digestión gástrica en todas las muestras no hubo aumentos estadísticamente significativos, excepto en Pect-Gly-Fe, que presentó un aumento significativo después de la digestión intestinal (de 500% a 700% de incremento de hinchamiento). Este aumento del 200% en el hinchamiento se correlaciona con una mayor degradación a través del debilitamiento de las interacciones moleculares en la matriz, que se visualizan como cierta erosión en las imágenes SEM (figura 11). Es claro entonces que las formulaciones que presentaron mayor estabilidad a través de la vía gastrointestinal fueron aquellas que pueden tener la presencia del complejo aminoquelado, lo que se correlaciona con su mayor estabilidad térmica.

4.12. Liberación de hierro

La liberación de hierro en diferentes medios de digestión se muestra en la figura 22. En esta fase se han omitido muestras de hierro no quelado y glicina, ya que el objetivo principal es la estabilización y caracterización del bisglicinato ferroso con pectina, o pectina con hierro directamente.

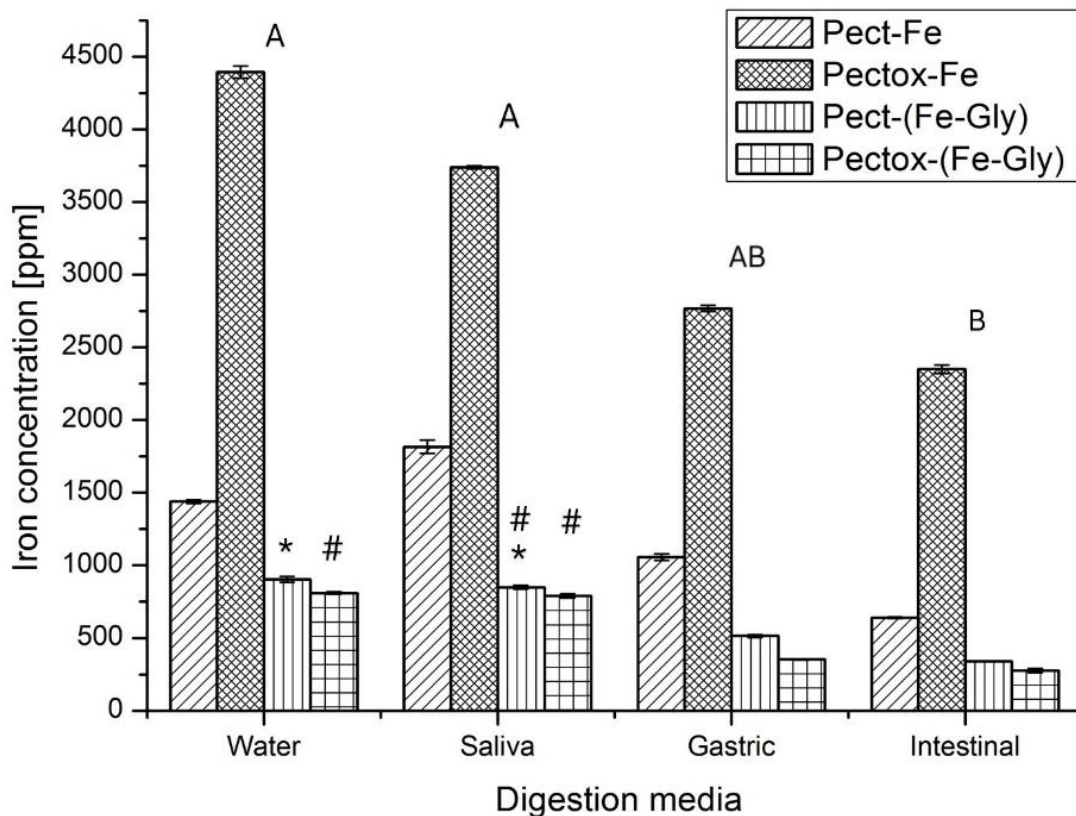


Figura 22. Liberación de hierro de muestras de pectina nativa y oxidada, con hierro (Pect-Fe, Pectox-Fe) y bisglicinato ferroso Pect-(Gly-Fe), Pectox-(Gly-Fe). (*) y (#) representan composiciones que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas, los tratamientos digestivos con la misma letra (A o B) no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Las matrices con hierro no quelado mostraron una liberación rápida de hierro, en particular aquellas con pectina oxidada (Pectox-Fe), que presentaron una liberación significativa superior (de 4300 ppm a 2300 ppm), con una diferencia de 2000 ppm de

principio a fin de todo el recorrido de digestiones. Por su parte, Pect-Fe tuvo una menor liberación de hierro y más gradual, que pasó de 1400 ppm en saliva, a 500 ppm en fluido intestinal; esto indica que hubo apenas una diferencia de 900ppm de principio a fin de las digestiones. A pesar de tener similar capacidad de hinchamiento y morfología, Pect-Fe y Pectox-Fe tuvieron comportamientos diferentes en la liberación del hierro (figura 22), donde vemos que la oxidación debilita las interacciones del hierro con la matriz y se produce mayor liberación de hierro.

Al utilizar la muestra que pueden contener complejos quelados (Gly-Fe), la liberación de hierro (entre 600ppm y 300ppm) disminuye hasta cuatro veces en comparación con las matrices sin glicina Pectox-Fe (entre 4300 ppm y 2300ppm). Sin embargo, las muestras con glicina, en cambio, la oxidación no hace que se libere más hierro sino que, con pectina nativa Pect-(Gly-Fe), tuvieron una liberación de hierro ligeramente mayor (entre 800 ppm en agua a 500ppm en intestinal), que las matrices con pectina oxidada Pectox-(Gly-Fe) (entre 600 ppm en agua a 300 ppm en intestinal). De hecho, estos últimos hidrogeles presentaron la mayor retención en todas las condiciones de digestión, probablemente debido a su menor capacidad de hinchamiento como resultado de interacciones más fuertes entre el hierro y la matriz. Este hecho puede explicar las señales de EDS de hierro más bajas que se observan después de la digestión cuando se utiliza los complejos Gly-Fe, ya que es posible que solo se libere hierro sin reaccionar, mientras que el resto queda atrapado en la estructura interna. Es importante destacar que Pect-Gly-Fe tiene una presencia (intensidad de color) EDS ligeramente más fuerte cuando se digiere en condiciones gástricas, lo que corresponde al máximo observado en la figura 11. Cuando el hierro no está sometido previamente a un tratamiento de quelado, la matriz se degrada en mayor medida, en comparación con las formas posiblemente queladas, evidenciado

por su gran capacidad de hinchamiento; en consecuencia, se libera hierro interno y se observa una señal EDS consistentemente fuerte en todas las condiciones de digestión.

Ghibaudo et al., 2018 evaluaron la liberación de hierro de las perlas de pectina-hierro y encontraron que la digestión gástrica aumentaba el tamaño de los poros de las perlas, lo que se atribuye a un mayor hinchamiento, pero, por el contrario, en condiciones alcalinas, la eliminación de residuos de ácido β galacturónico de la pectina, da como resultado la escisión de la cadena y una rápida pérdida de viscosidad y propiedades gelificantes, además de sufrir un proceso de desmetilación. Por lo tanto, en ese caso, la digestión intestinal alcalina de pH 8 fue el principal proceso que alteró el tamaño y la estructura de la pectina, y es donde una mayor cantidad de hierro comenzaría a liberarse de las perlas, y luego se oxidaría para formar un agua. complejo Fe (III)-oligopectina soluble (Ganji et al., 2010). Sin embargo, en nuestro trabajo observamos que la liberación de hierro sucede desde el tratamiento con agua y se detiene ligeramente después de la digestión gástrica, lo que sugiere que simplemente las muestras se quedan con poco hierro por ende se presencia menor liberación, pero en cambio vemos que el uso de los complejos de Gly-Fe unidos a la pectina, sí hace que se libere menos hierro que Pect-Fe.

Para resumir el comportamiento de las diferentes matrices en función del hinchamiento y la liberación de hierro, se puede afirmar lo siguiente:

- El complejo Gly-Fe con pectina oxidada aumenta la estabilidad química de la matriz y la retención de hierro dentro de la matriz, en comparación con la Pect-Fe.
- El complejo Gly-Fe con pectina oxidada aumenta la probabilidad de unión con el bisglicinato ferroso debido a la presencia del grupo carbonilo libre. Muestra mayor estabilidad y retención de hierro, en comparación con las otras

formulaciones, por ejemplo: Pectox-Fe libera 2300ppm de Fe, y Pectox-(Gly-Fe) libera 300 ppm en fluido intestinal.

- El hierro no quelado y la glicina con pectina nativa presentaron menor estabilidad de matriz y capacidad de retención de hierro que las matrices con hierro quelado y pectina oxidada.
- El hierro quelado y la glicina con pectina oxidada presentaron mayor estabilidad y capacidad de retención de hierro, comparado con el hierro no quelado y la pectina nativa.

Al hacer un análisis global de hinchamiento y liberación de hierro, junto con análisis SEM, FTIR, TGA y DSC, los resultados pueden explicar lo siguiente: primero, la oxidación aumenta la probabilidad de entrecruzamiento ya que hay una mayor cantidad de grupos carbonilo y carboxilo libres que pueden reaccionar, lo que da a las moléculas una mayor estabilidad. En segundo lugar, la pectina probablemente interactúa con el bisglicinato ferroso, solo por una de las opciones, ya sea con hierro y pectina carboxilo, o con glicina amino y pectina carbonilo, pero no por ambas. Se mantiene el remanente, pero quedan grupos funcionales libres, contrario al uso de glicina y hierro no quelado, donde cada uno interactúa y se entrecruza con la pectina por ambas opciones. Por lo tanto, dado que no hay suficiente entrecruzamiento con bisglicinato ferroso, los grupos funcionales que no forman parte del entrecruzamiento atraen agua y permiten un mayor hinchamiento, ya que son sitios potenciales de interacción electrostática con moléculas de agua (Ganji et al., 2010). Finalmente, el uso de pectina con hierro directamente, sin glicina, disminuye su estabilidad en comparación con otras muestras, debido a que la glicina aumenta el entrecruzamiento que se produce con la pectina, dándole mayor estabilidad, al contrario de las muestras que no contienen glicina.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

La administración de hierro, en su estado Fe^{2+} , sigue siendo un reto importante en el campo de los alimentos fortificados. Para hacer frente a este problema, la presente tesis propone construir un sistema de matrices de hidrogel coloidal de pectina (nativa y oxidada) y hierro, en el que el efecto combinado de las interacciones hierro-glicina dentro de un complejo quelado y las interacciones entre este complejo y la pectina podría ayudar a retener el hierro en su camino a través del tracto gastrointestinal. Como el metal actúa como reticulante, la estabilidad de la matriz se ve afectada por la forma de presentación del hierro, ya sea libre o aminoquelado (biglicinato ferroso), y si la pectina es nativa u oxidada. Se da a entender que, al utilizar el complejo aminoquelado Gly-Fe, la oxidación aumenta la probabilidad de entrecruzamiento ya que hay un mayor número de grupos carbonilo y carboxilo libres que pueden reaccionar, lo que le da mayor estabilidad a la matriz. La pectina puede interactuar con el biglicinato ferroso a través de diferentes rutas: hierro-pectina carboxilo o glicina amino-pectina carbonilo. Así, potencialmente, el uso de pectina para crear una matriz protectora del hierro, en su forma de biglicinato ferroso, ayudaría a evitar la formación de fitatos insolubles y cambios organolépticos en los alimentos que han sido fortificados con este compuesto, y podría aumentar la biodisponibilidad del hierro.

En el presente trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones que se destacan en **negrita**.

En primer lugar, podemos decir que los resultados obtenidos de **la pectina extraída de la cáscara de maracuyá indican que es una buena alternativa para su uso como matriz protectora de complejos de glicina y hierro, debido a su buen rendimiento de extracción y bajo grado de metoxilación**, que al tener más cantidad de grupos carboxilos libres que la pectina nativa comercial, **le da mayores probabilidades de conseguir la unión al complejo Gly-Fe. Más aún si se le da un tratamiento de modificación como por oxidación**, donde obtiene más carbonilos libres que puedan unirse al amino de la Gly-Fe.

Después de analizar los diferentes métodos de obtención de quelados de glicina-hierro (bisglicinato ferroso), concluimos que **los quelados se pueden encontrar en mayor cantidad en el sobrenadante (alrededor del 70%) que en el precipitado que se forma mediante el método de precipitación.**

Con respecto a la modificación de la pectina para la optimización de la matriz receptora del amino quelado, concluimos que **mediante la oxidación con peróxido de hidrogeno se puede modificar la pectina nativa para obtener más carbonilos y carboxilos libres en la estructura molecular de la pectina y así aumentar los sitios de unión al hierro o glicina del bisglicinato ferroso.** Los porcentajes de grupos carboxilo libres, en pectina nativa fueron $22,50 \pm 2,10$ % y después de la modificación por oxidación subieron a $61 \pm 1,90$ %.

En el análisis mediante FTIR de los grupos funcionales de interés en la pectina, **en los espectros FTIR la señal que aparece entre 1620 y 1650 cm⁻¹ solo en la pectina nativa, puede deberse a carboxilos que no reaccionaron con el hierro, por lo tanto, al no tener esta señal en la pectina oxidada, vemos que la oxidación aumenta la afinidad por la interacción C-O-Fe (1000–1150 cm⁻¹).**

Con respecto a la estabilidad térmica y estructural de las matrices pectina-glicina-hierro, **las muestras con pectina modificada por oxidación comenzaron a degradarse y disminuir drásticamente su peso alrededor de los 200 °C, a diferencia de las muestras con pectina nativa, que inicia la disminución de peso a los 150 °C. Por lo tanto, la modificación por oxidación aumenta la estabilidad térmica y estructural de la matriz de pectina.**

Adicionalmente, para el análisis de la estabilidad de la estructura de la matriz, en los ensayos donde medimos el grado de hinchamiento, vemos que **solo en las muestras con Gly y Fe sin quelación previa, la oxidación de la pectina disminuyó significativamente el grado de hinchamiento de las matrices, con respecto a las que contenían pectina nativa (entre el 100% al 200% de diferencia). Esto indica que la oxidación proporciona una mayor estabilidad a la estructura de la pectina.**

Continuando con el grado de hinchamiento, **las formaciones de iminas a través de las bases de Schiff que deberían suceder solo en la pectina oxidada, también son importantes para aumentar la estabilidad de la estructura de la matriz, ya que hay**

una diferencia en el hinchamiento entre Pect-Gly-Fe y Pectox-Gly-Fe (entre 100% y 200% de hinchamiento de diferencia), más que todo en las muestras sin quelación previa donde la Gly no compite con el Fe, sino que forman sus enlaces con la pectina de forma independiente.

A medida que se introduce la glicina, puede competir con el hierro por los grupos carboxilo para las interacciones de carga, pero, cuando se oxida la pectina, la glicina puede formar bases de Schiff con grupos carbonilo y además proporcionar una mayor cantidad de grupos carboxilo disponibles para la reticulación ionotrópica (red de canales con enlaces iónicos). Esto aumentaría la rigidez de la matriz y, a su vez, se traduciría en una menor capacidad de absorción de agua.

Para la medir la biodisponibilidad del hierro unido a la matriz de pectina, se realizaron los ensayos de liberación de hierro y podemos concluir que, **los complejos de Gly-Fe que se unen tanto a pectina nativa como modificada, aumentan la retención del hierro (alrededor del 13% más, que el uso de hierro solo sin glicina) y por ende aumentaría la biodisponibilidad del hierro.**

De forma general analizando todo el conjunto de resultados concluimos que, **entre la pectina y la glicina, se forman tanto enlaces de bases de Schiff C=N como iónico C-O-Fe entre la pectina y el Fe²⁺, potencialmente con una afinidad ligeramente mayor por la formación de C-O-Fe, en las muestras que se oxida la pectina.**

Además, el complejo Gly-Fe quelado previamente, reacciona menos con la pectina, que cuando se agregan Gly y Fe independiente sin un proceso de quelación previa. **Por lo tanto, Fe^{2+} , cuando se coordina con Gly, puede evitar parcialmente que el amino quelado reaccione con la pectina.**

Por lo tanto, se resume que, **cuando se utiliza complejos de Gly-Fe sometidos a un proceso de quelación previa, la unión a la matriz de pectina puede darse por el extremo amino de la glicina a través de una base de Schiff o por el grupo carboxilo de la pectina al hierro**, lo que asegura la formación de una sola matriz enlazada protegiendo al hierro.

Evidentemente **la matriz, a base de pectina nativa o modificada, es capaz de proteger y transportar dentro del tracto digestivo al hierro formando un complejo con glicina, para aumentar su biodisponibilidad.**

Finalmente, **la modificación de pectina por oxidación puede aumentar la estabilidad estructural y química de la matriz estudiada**, siendo una potencial alternativa para una posible aplicación industrial en la fortificación de alimentos.

No obstante, **serían necesarios más estudios de viabilidad celular in vitro, así como evaluar la estabilidad de la matriz a largo plazo y el comportamiento de los hidrogeles coloidales en una matriz alimentaria.**

6. BIBLIOGRAFIA

- Abdel Moety, G. A. F., Ali, A. M., Fouad, R., Ramadan, W., Belal, D. S., & Haggag, H. M. (2017). Amino acid chelated iron versus an iron salt in the treatment of iron deficiency anemia with pregnancy: A randomized controlled study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *210*, 242–246. <https://doi.org/10.1016/J.EJOGRB.2017.01.003>
- Adetunji, L. R., Adekunle, A., Orsat, V., & Raghavan, V. (2017a). Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review. *Food Hydrocolloids*, *62*, 239–250. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2016.08.015>
- Almeida, E. A. M. S., Facchi, S. P., Martins, A. F., Nocchi, S., Schuquel, I. T. A., Nakamura, C. V., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2015). Synthesis and characterization of pectin derivative with antitumor property against Caco-2 colon cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, *115*, 139–145. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2014.08.085>
- Alvarez-Barreto, J. F. , Larrea, F. , Pinos, M. C. , Benalcázar, J. , Oña, D. , Andino, C. , & Almeida-Streitwieser, D. (2021). Chemical Pretreatments on Residual Cocoa Pod Shell Biomass for Bioethanol Production. *Rev. Bionatura*, *6*, 1490–1500. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2020.06.01.9>
- Amin, M. R., Chowdhury, M. A., & Kowser, M. A. (2019). Characterization and performance analysis of composite bioplastics synthesized using titanium dioxide nanoparticles with corn starch. *Heliyon*, *5*(8), e02009. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02009>
- Bagna, R., Spada, E., Mazzone, R., Saracco, P., Boetti, T., Cester, E. A., Bertino, E., & Coscia, A. (2018). Efficacy of Supplementation with Iron Sulfate Compared to Iron Bisglycinate Chelate in Preterm Infants. *Current Pediatric Reviews*, *14*(2), 123–129. <https://doi.org/10.2174/1573396314666180124101059>
- Begam, T., Nagpal, A. K., & Singhal, R. (2003). A comparative study of swelling properties of hydrogels based on poly(acrylamide-co-methyl methacrylate)

- containing physical and chemical crosslinks. *Journal of Applied Polymer Science*, 89(3), 779–786. <https://doi.org/10.1002/APP.12270>
- Bochek, A. M., Zabivalova, N. M., & Petropavlovskii, G. A. (2001). Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 74(5), 796–799. <https://doi.org/10.1023/A:1012701219447/METRICS>
- Capparelli, M. V., Moulatlet, G. M., Abessa, D. M. de S., Lucas-Solis, O., Rosero, B., Galarza, E., Tuba, D., Carpintero, N., Ochoa-Herrera, V., & Cipriani-Avila, I. (2020). An integrative approach to identify the impacts of multiple metal contamination sources on the Eastern Andean foothills of the Ecuadorian Amazonia. *Science of the Total Environment*, 709. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136088>
- Chen, W., Yuan, S., Shen, J., Chen, Y., & Xiao, Y. (2021). A Composite Hydrogel Based on Pectin/Cellulose via Chemical Cross-Linking for Hemorrhage. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1582. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.627351/BIBTEX>
- Chetouani, A., Elkolli, M., Bounekhel, M., & Benachour, D. (2014). Characterization and bioevaluation of new class of hydrogels based on oxidized pectin crosslinked to gelatin. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 4(6), 465–470. <https://doi.org/10.1166/JBT.2014.1197>
- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Delisi, R., Tamburino, A., Carnaroglio, D., Cravotto, G., Ilharco, L. M., & Pagliaro, M. (2017). Controlling the Degree of Esterification of Citrus Pectin for Demanding Applications by Selection of the Source. *ACS Omega*, 2(11), 7991–7995. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.7B01109>
- Clemente J., Sepulcre Francisco, & Artigas David. (2017). *Estudio de quelados de glicina mediante espectroscopía FTIR.* 2017–2018. <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/108359>
- Das, S. (2021). Pectin based multi-particulate carriers for colon-specific delivery of therapeutic agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 605. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120814>

- Ding, S., Wang, R., Shan, Y., Li, G., & Ou, S. (2017). Changes in pectin characteristics during the ripening of jujube fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 4151–4159. <https://doi.org/10.1002/JSFA.8285>
- EFSA. (2006). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Ferrous bisglycinate as a source of iron for use in the manufacturing of foods and in food supplements. *EFSA Journal*, 4(1). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2006.299>
- Einhorn-Stoll, U., Kunzek, H., & Dongowski, G. (2007). Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1101–1112. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2006.08.004>
- Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., & Vasheghani-Farahani, E. (2010). Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. In *Polymer Journal* (Vol. 19, Issue 5119, pp. 375–398). IRANIAN POLYMER JOURNAL (ENGLISH). <https://sid.ir/paper/561994/en>
- García Víctor, Yipmantin Andrea, Guzmán Enrique, Huertas Rodolfo, & Maldonado Holger. (2011). Estudio de la cinética de biosorción de iones plomo en pectina reticulada proveniente de cáscaras de cítricos. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 77(3), 173–181. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Garna, H., Mabon, N., Nott, K., Wathélet, B., & Paquot, M. (2006). Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chemistry*, 96(3), 477–484. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.03.002>
- Garrido, C. (2017). *Extracción y modificación de pectina para la formación de hidrogeles con potencial para la administración controlada de fármacos*. <http://dx.doi.org/10.1024/0300-9831.77.4.243>
- Garthoff, J. A., Heemskerk, S., Hempenius, R. A., Lina, B. A. R., Krul, C. A. M., Koeman, J. H., & Speijers, G. J. A. (2010). Safety evaluation of pectin-derived acidic oligosaccharides (pAOS): genotoxicity and sub-chronic studies. *Regulatory*

Toxicology and Pharmacology: RTP, 57(1), 31–42.
<https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2009.12.004>

Ghibaud, F., Gerbino, E., Hugo, A. A., Simões, M. G., Alves, P., Costa, B. F. O., Campo Dall'Orto, V., Gómez-Zavaglia, A., & Simões, P. N. (2018). Development and characterization of iron-pectin beads as a novel system for iron delivery to intestinal cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170, 538–543.
<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.06.052>

Gori, A., Rizzardini, G., Van'T Land, B., Amor, K. B., Van Schaik, J., Torti, C., Quirino, T., Tincati, C., Bandera, A., Knol, J., Benlhassan-Chahour, K., Trabattoni, D., Bray, D., Vriesema, A., Welling, G., Garssen, J., & Clerici, M. (2011). Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naive HIV-infected adults: results of the “COPA” pilot randomized trial. *Mucosal Immunology*, 4(5), 554–563. <https://doi.org/10.1038/MI.2011.15>

Günter, E. A., Popeyko, O. V., Melekhin, A. K., Belozarov, V. S., Martinson, E. A., & Litvinets, S. G. (2019). Preparation and properties of the pectic gel microparticles based on the Zn²⁺, Fe³⁺ and Al³⁺ cross-linking cations. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 629–635.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.07.122>

Gupta, B., Tummalapalli, M., Deopura, B. L., & Alam, M. S. (2013). Functionalization of pectin by periodate oxidation. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1160–1165.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.06.069>

Ho, J. K., Jo, C., Joong, H. K., Jun, H. S., Bong, J. A., & Myung, W. B. (2006). Antioxidant and cancer cell proliferation inhibition effect of citrus pectin-oligosaccharide prepared by irradiation. *Journal of Medicinal Food*, 9(3), 313–320.
<https://doi.org/10.1089/JMF.2006.9.313>

Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 18–23. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2012.09.010>

Hurrell, R. F. (2022). Ensuring the Efficacious Iron Fortification of Foods: A Tale of Two Barriers. *Nutrients*, 14(8), 1609. <https://doi.org/10.3390/NU14081609>

- Iglesias, M. T., & Lozano, J. E. (2004). Extraction and characterization of sunflower pectin. *Journal of Food Engineering*, 62(3), 215–223. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00234-6](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00234-6)
- Jackson A.A. (1991). The glycine story. *European Journal of Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.3/JQUERY-UIJS>
- Jiang, W., Qiao, X., & Sun, K. (2006). Mechanical and thermal properties of thermoplastic acetylated starch/poly(ethylene-co-vinyl alcohol) blends. *Carbohydrate Polymers*, 65(2), 139–143. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2005.12.038>
- Kumar, M., Mishra, R. K., & Banthia, A. K. (2011). Development of pectin based hydrogel membranes for biomedical applications. *International Journal of Plastics Technology 2011 14:2, 14(2)*, 213–223. <https://doi.org/10.1007/S12588-011-0019-5>
- Kyomugasho, C., Christiaens, S., Shpigelman, A., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2015). FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. *Food Chemistry*, 176, 82–90. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.12.033>
- Li, T., Li, S., Du, L., Wang, N., Guo, M., Zhang, J., Yan, F., & Zhang, H. (2010). Effects of haw pectic oligosaccharide on lipid metabolism and oxidative stress in experimental hyperlipidemia mice induced by high-fat diet. *Food Chemistry*, 121(4), 1010–1013. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.01.039>
- Liew, S. Q., Chin, N. L., & Yusof, Y. A. (2014). Extraction and Characterization of Pectin from Passion Fruit Peels. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 231–236. <https://doi.org/10.1016/J.AASPRO.2014.11.033>
- Liu, L. S., Fishman, M. L., Kost, J., & Hicks, K. B. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, 24(19), 3333–3343. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00213-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00213-8)
- Lobaina, C., Ricardo, C. A., Orue, T., & Castel, Z. (2005). Obtencion de bases de schiff por condensacion del O-hidroxibenzaldehido con anilina y P-derivados. *Revista*

- Macías Camacho, E. J. (2014). *Estudio técnico-económico para la instalación de una planta extractora de pectina a partir de la cáscara de maracuyá*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/4764>
- Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T., Widmer, W., Yadhav, M. P., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2005). In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8383–8389. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8383-8389.2005>
- Mattar, G., Haddarah, A., Haddad, J., Pujola, M., & Sepulcre, F. (2022). New approaches, bioavailability and the use of chelates as a promising method for food fortification. *Food Chemistry*, 373(Pt A). <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131394>
- Mehansho, H. (2006). Iron Fortification Technology Development: New Approaches. *The Journal of Nutrition*, 136(4), 1059–1063. <https://doi.org/10.1093/JN/136.4.1059>
- Meléndez-Hevia, E., De Paz-Lugo, P., Cornish-Bowden, A., & Cárdenas, M. L. (2009). A weak link in metabolism: the metabolic capacity for glycine biosynthesis does not satisfy the need for collagen synthesis. *Journal of Biosciences*, 34(6), 853–872. <https://doi.org/10.1007/S12038-009-0100-9>
- Mellican, R. I., Li, J., Mehansho, H., & Nielsen, S. S. (2003). The Role of Iron and the Factors Affecting Off-Color Development of Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2304–2316. <https://doi.org/10.1021/JF020681C>
- Nelson David. (2019). *Lehninger. Principios de Bioquímica Ed.7º*, Journal. <https://www.edicionesjournal.com/Papel/9788428216678/Lehninger++Principios+De+Bioqu%C3%ADmica+Ed+7%C2%BA>
- Nowok, A., Cieřlik, W., Grelska, J., Jurkiewicz, K., Makieieva, N., Kupka, T., Alemán, J., Musioł, R., & Pawlus, S. (2022). Simple Rules for Complex Near-Glass-Transition Phenomena in Medium-Sized Schiff Bases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS23095185>

- Ollano-Martin, E., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 505–511. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2002.01719.X>
- Olive Li, Y., Dueik González, V. P., & Diosady, L. L. (2014). Microencapsulation of Vitamins, Minerals, and Nutraceuticals for Food Applications. *Microencapsulation in the Food Industry: A Practical Implementation Guide*, 501–522. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404568-2.00038-8>
- Pineda, J. E. D. (2012). Proceso para producir Pectinas Cítricas. *Revista Universidad EAFIT*, 39(129), 21–29. <https://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/918>
- Pineda, O., & Ashmead, H. D. W. (2001). Effectiveness of treatment of iron-deficiency anemia in infants and young children with ferrous bis-glycinate chelate. *Nutrition*, 17(5), 381–384. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(01\)00519-6](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(01)00519-6)
- Popov, S., Paderin, N., Chistiakova, E., Ptashkin, D., & Markov, P. A. (2022). Effect of Cross-Linking Cations on In Vitro Biocompatibility of Apple Pectin Gel Beads. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14789. <https://doi.org/10.3390/IJMS232314789/S1>
- Ralet, M. C., Bonnin, E., & Thibault, J. F. (2001). Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 753(1), 157–166. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00500-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00500-4)
- Rubinstein, A., Radai, R., Ezra, M., Pathak, S., & Rokem, J. S. (1993). In vitro evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier. *Pharmaceutical Research*, 10(2), 258–263. <https://doi.org/10.1023/A:1018995029167>
- Sandberg, A.-S. (2002). Bioavailability of minerals in legumes. *The British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 3(S3), 281–285. <https://doi.org/10.1079/BJN/2002718>
- Siggia, S. , & Maxcy, W. (1947). *Analytical Chemistry*. (12th ed., Vol. 19).

- Srivastava, P., & Malviya, R. (2011). Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry – An overview. *IJNPR Vol.2(1) [March 2011]*, 2(1), 10–18. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/11534>
- Tepavitcharova, S., Rabadjieva, D., Havlíček, D., Němec, I., Vojtíšek, P., Plocek, J., & Koleva, Z. (2012). Crystallization and characterization of the compounds Gly·MSO₄·mH₂O (M = Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺; m = 0, 3, 5, 6). *Journal of Molecular Structure*, 1018, 113–121. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2012.02.068>
- Ulloa, C. (2012). *Estudio de las opciones de reutilización energética o material de cáscaras de naranja*. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/6983>
- Willats, W. G. T., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science and Technology*, 17(3), 97–104. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2005.10.008>
- Yunarti, R. T., Zulys, A., Harahap, L. Y., Saroh, M., & Pramukti, A. (2013). Effectiveness of Iron Fortification on Soy-Based Foods Using Ferrous Bisglycinate in the Presence of Phytic Acid. In *Makara Journal of Science* (Vol. 17).
- Zhang, Z., & Feng, S. S. (2006). The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)–tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials*, 27(21), 4025–4033. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.03.006>
- Zhong, Z., Wheeler, M. D., Li, X., Froh, M., Schemmer, P., Yin, M., Bunzendaul, H., Bradford, B., & Lemasters, J. J. (2003). L-glycine: A novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 6(2), 229–240. <https://doi.org/10.1097/00075197-200303000-00013>
- Zimmermann, M. B. (2004). The potential of encapsulated iron compounds in food fortification: a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International de Vitaminologie et de Nutrition*, 74(6), 453–461. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.74.6.453>

