



USO DE NANO Y MICRO FORMULACIONES
ORALES DE PECTINA, FUNCIONALIZADAS
CON HIERRO, EN LA CONSERVACIÓN DE
BACTERIAS LÁCTICAS. DISEÑO,
CARACTERIZACIÓN Y COMPORTAMIENTO
BIOLÓGICO.

TESIS DOCTORAL
Lic. Florencia Ghibaudo

Directoras: Dras. Andrea Gómez-
Zavaglia y Viviana Campo Dall'Orto

Codirector: Esteban Gerbino

Universidad Nacional de La Plata

2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

USO DE MICRO Y NANO FORMULACIONES ORALES DE PECTINA,
FUNCIONALIZADAS CON HIERRO, EN LA CONSERVACIÓN DE BACTERIAS
LÁCTICAS. DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y COMPORTAMIENTO
BIOLÓGICO.

Tesista: Lic. María Florencia Ghibaudó

Directora: Dra. Andrea Gómez-Zavaglia

Directora: Dra. Viviana Campo Dall'Orto

Codirector: Esteban Gerbino

Año: 2021

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET-UNLP-CICPBA



Los resultados del presente trabajo de tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

Ghibaudo, F., Gerbino, E., Campo Dall' Orto, V. and Gómez-Zavaglia, A. (2017). Pectin-iron capsules: Novel system to stabilise and deliver lactic acid bacteria. *Journal of Functional Foods*, 39, 299-305.

Ghibaudo, F., Gerbino, E., Hugo, A. A., Simões, M. G., Alves, P., Costa, B. F. O., Campo Dall' Orto, V., Gómez-Zavaglia, A. and Simoes, 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.

Ghibaudo, F., Gerbino, E., Copello, G. J., Campo Dall' Orto, V. and Gómez-Zavaglia, A. (2019). Pectin-decorated magnetite nanoparticles as both iron delivery systems and protective matrices for probiotic bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 180, 193-201.

Además se participó en ensayos experimentales de los siguientes trabajos:

Gerbino, E., **Ghibaudo, F.**, Tymczyszyn, E. E., Gómez-Zavaglia, A., & Hugo, A. A. (2020). Probiotics, Galacto-oligosaccharides, and zinc antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* on cultured cells and brine shrimp model. *LWT*, 109435.

Villanueva, M.E.; **Ghibaudo, F.**; Tovar, G.; Copello, G.J.; Campo Dall' Orto V. (2020). Oligomer-stabilized silver nanoparticles for antimicrobial coatings for plastics. *Nano-Structures and Nano-Objects* Volume 24, Article number 100610.

Agradecimientos

A mi directora Andrea, por creer en mí al otorgarme la beca que dio inicio a esta tesis. Por enseñarme a pensar al diseño experimental como una herramienta para llegar a la divulgación del conocimiento. Por darme la libertad de expresar mis propuestas aunque implicaran tomar diferentes caminos para abordar este proyecto según las inquietudes que me fueron surgiendo. Por enseñarme a escribir mis propios artículos con el objetivo de darme una valiosa herramienta para toda la vida. Por su tiempo y por siempre estar disponible para responderme cualquier duda.

A mi directora Vivi, por su calidez humana, por escuchar mis dudas con los ensayos y sentarse conmigo a sacar cálculos y a brindarme su gran conocimiento, pero sobre todo, su gran comprensión y corazón. Gracias por alegrarte todos los días al verme, por los mates compartidos y las charlas. Por estar presente en las situaciones difíciles y siempre empatizar y querer mi bienestar, por valorarme y remarcarme constantemente las cosas buenas. Gracias por enseñarme que hay personas que velan y laburan por la ciencia sin otro interés que la ciencia en sí misma y que quieren hacer las cosas bien aunque muchos pongan palos en las ruedas. Solo muere quien es olvidado, y nosotros te recordaremos por siempre querida Vivi.

A mi codirector Esteban, por ayudarme desde el inicio con este plan de tesis, por guiarme con los experimentos y enseñarme cada cosa que necesité día a día. Por preocuparse porque el trabajo fuera bien y por confiar en mi perseverancia cuando los resultados no eran los que esperábamos. Por reírse conmigo y acompañarme a buscar equipos fuera del CIDCA, aunque me llevara a su paso apresurado.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de La Plata, por haberme permitido realizar mis estudios de postgrado y darme la posibilidad de acceder al grado de Doctor.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) que, a través del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), fue proveedora de la Beca con la que pude dar inicio y realizar los 3 primeros años de este doctorado.

Al CONICET por haberme otorgado la Beca con la que pude finalizar mis estudios.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por brindarme mi segundo espacio de trabajo en la cátedra de Química Analítica e Instrumental.

Al proyecto de colaboración bilateral Argentina-Portugal PO-14-05. (2015-2016) (MinCyT-MEC) por financiar mi primera estadía en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidade de Coimbra, que me permitió realizar experimentos cuyos resultados fueron un gran aporte para esta tesis.

Al proyecto “Programa Horizonte 2020” (Unión Europea): H2020-MSCA-RISE-2017 (2018-2021) “Preservation of microorganisms by understanding the protective mechanisms of oligosaccharides” (PREMIUM) Code: 777657. Por financiar mi segunda estadía en la Universidad de Coimbra.

Al grupo dirigido por el Prof. Pedro N. Lopes Simões del Departamento de Ingeniería Química de la Universidade de Coimbra, por albergarme en dos oportunidades en mis estancias en Portugal para poder avanzar con mis experimentos con las herramientas que me ofrecieron sus laboratorios. Y a todas las personas que allí conocí y me brindaron ayuda y hasta su amistad.

A todos los integrantes del CIDCA, por hacer del instituto un lugar acogedor, con buena energía y agradable para trabajar. Por la predisposición para ayudarme siempre que lo necesité en estos 5 años. Gracias por los juegos de fin de año y los buenos momentos compartidos. Me llevo lindos recuerdos.

A mis compañeros del box: Feli, Santi, Susan, Sabri, Lu, Lina, Pau, Manu, Meli y Martin. Por tantas jornadas compartidas, por las charlas, risas, mates y almuerzos al sol. Especialmente gracias Gabi por contenerme siempre y estar para todo lo que necesité, gracias amigo por bancarme y por endulzarnos los días con tantas delicias.

A mis amigos del grupo del IQUIMEFA de FFyB: Emi, Jonás, Aye, Gabi, Juanma, Dimas, Gonza y Luz. Por divertir mis tardes y brindarnos apoyo emocional mutuo, por sus aportes científicos y por las gratas juntadas fuera del labo. Hacen que trabajar sea una aventura emocionante todos los días.

A Aye Hugo, por su ayuda con mis experimentos y su aporte a mi proyecto de tesis. Por ser una gran persona y siempre tirar para adelante.

A Guille, por su asesoramiento con la tesis y su valioso aporte científico, por enseñarme numerosas técnicas y siempre estar disponible para transmitirme su conocimiento desinteresadamente. Por ser una excelente persona y profesional.

A mis queridas amigas de la vida: Popis y Carlita, que a pesar de las distancias, siempre estuvieron presente brindando apoyo incondicional y sin el cual todo me hubiese sido más difícil. También a todo mi grupo de amigas de Luque y a mi grupo facultativo que, a través de los años, siguen estando para compartir una juntada cada vez que regreso.

A Li, por acompañarme al labo cuando tenía que largar ensayos pasada la medianoche, por escuchar mis hipótesis y ayudarme a pensar mis experimentos. Por apoyarme con los viajes y alentarme a ir tras mis sueños.

A mis padres, Marisa y Jorge y a mi hermano Damián, que me impulsaron en cada paso que quise emprender en mi vida, creyendo en mí más que yo misma, alentándome a seguir cueste lo que cueste. Que no me dejaron desistir de mi pasión tan grande por la ciencia en aquellos momentos donde se había puesto difícil continuar. Por ser mí sostén y no permitir que me sienta sola porque con sólo escucharlos o mirarlos a los ojos hacen que todo valga la pena, me recuerdan que todo se puede lograr y que lo realmente importante está en el interior de cada uno.

¡¡¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. El Hierro: un mineral esencial para el ser humano.	1
1.1. Anemia por deficiencia de hierro.	1
1.2. Consecuencias de la insuficiencia de hierro.	2
1.3. Causas etiológicas de la insuficiencia de hierro.	3
1.4. Absorción de hierro y fortificación de alimentos.	4
1.4.1 Mecanismos de absorción de hierro en células intestinales y ensayos <i>in vitro</i> para su determinación	5
2. Bacterias lácticas probióticas.	7
2.1. Supervivencia de los probióticos durante el procesamiento y almacenamiento	8
3. Encapsulación.	9
3.1. Proceso de encapsulación	11
3.2. Proceso de preservación	12
3.2.1. Congelación	12
3.2.2. Liofilización	13
4. Fibra dietaria: La pectina	13
OBJETIVOS GENERALES	16

CAPÍTULO I - PARTE A. Desarrollo y caracterización de cápsulas de hierro-pectina como sistema de transporte de hierro a las células intestinales.

IA.1. INTRODUCCIÓN	17
IA.1. Encapsulación por gelificación iónica	17
IA.1.1. Polímeros empleados en la encapsulación por gelificación iónica	18
IA.1.1.1. Pectina	18
IA.1.2. Cationes más utilizados	18
IA.1.3. Caracterización fisico-química de las cápsulas obtenidas	19
IA.1.3.1. <i>Swelling</i> (hinchamiento)	19
IA.1.3.2. Termogravimetría (TGA)	20
IA.1.3.3. Porosimetría de intrusión de mercurio	22
IA.1.3.4. Análisis de fluorescencia de rayos X (XRF)	23
IA.1.3.5. Análisis del tamaño de partícula por dispersión dinámica de la luz (DLS)	25
IA.1.3.6. Potencial zeta (ζ)	30
IA.1.3.7. Espectroscopía Mössbauer	32
Objetivos específicos	39

IA.2. MATERIALES Y MÉTODOS	40
IA.2.1. Preparación de cápsulas de hierro-pectina	40
IA.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	41
IA.2.3. Digestión <i>in vitro</i>	41
IA.2.4. Caracterización del <i>swelling</i> (hinchamiento) de las cápsulas.	41
IA.2.5. Análisis termogravimétrico (TGA)	42
IA.2.6. Porosimetría de intrusión de mercurio	42
IA.2.7. Análisis de fluorescencia de rayos X (XRF)	42
IA.2.8. Medición del tamaño de partícula y potencial zeta (ζ)	43
IA.2.9. Espectroscopía de Mössbauer	43
IA.2.10. Cultivo de células Caco-2/TC7	43
IA.2.11. Absorción de hierro por células Caco-2/TC7	44
IA.2.12 Transporte transepitelial de las cápsulas en células Caco-2/TC7	44
IA.2.13. Mediciones de absorción de hierro y transferencia basal en células Caco-2/TC7	45
IA.2.14. Reproducibilidad de resultados	46
IA.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
IA.3.1. Caracterización física y química de las cápsulas	46
IA.3.2. Absorción de hierro y transporte transepitelial	53
IA.4. CONCLUSIONES	56

CAPÍTULO I - PARTE B. Encapsulación de *Lactopantibacillus plantarum* CIDCA 83114, mediante gelificación iónica con hierro y pectina.

IB.1. INTRODUCCIÓN	58
IB.1.1. Probióticos	58
IB.1.1.2. Prebióticos	59
IB.1.1.3. Simbióticos	59
IB.1.1.4. <i>Lactopantibacillus plantarum</i> CIDCA 83114	60
Objetivos específicos	62
IB.1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	63
IB.2.1. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento	63
IB.2.2. Encapsulación	63
IB.2.3. Viabilidad bacteriana	63
IB.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	64
IB.2.5. Digestión <i>in vitro</i>	64

IB.2.6. Cuantificación de pectina y hierro.	64
IB.2.6.1 Cuantificación de hierro.	64
I.2.5.2 Cuantificación de pectina.	65
IB.2.7. Análisis estadístico	66
IB.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
IB.3.1. Observación microscópica	67
IB.3.2. Viabilidad bacteriana	69
IB.3.3. Cuantificación de hierro y pectina de las cápsulas	71
IB.4. CONCLUSIONES	74

CAPÍTULO II - PARTE A. Síntesis y caracterización de nanopartículas (NP) de óxido de hierro Fe₃O₄ decoradas con pectina.

IIA.1. INTRODUCTION	76
IIA.1.1. Fortificación de alimentos con hierro.	76
IIA.1.2. Nanopartículas de hierro	77
IIA.1.3. Caracterización fisicoquímica de nanopartículas	79
IIA.1.3.1. Difracción de rayos X (XRD) de nanopartículas de hierro.	79
IIA.1.3.2. Espectroscopía Infrarroja (IR)	80
Objetivos específicos	84
IIA.2. MATERIALES Y MÉTODOS	85
IIA.2.1. Síntesis de nanopartículas (NP) de Fe ₃ O ₄	85
IIA.2.2. Caracterización fisicoquímica de las partículas magnéticas	85
IIA.2.2.1. Difracción de rayos X en polvo	85
IIA.2.2.2. Espectroscopía FTIR	85
IIA.2.2.3. Mediciones de tamaño de partícula y de potencial zeta (ζ)	86
IIA.2.3. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento	86
IIA.2.4. Preparación de compósitos y determinación del efecto inhibidor del hierro	86
IIA.2.5. Liofilización	88
IIA.2.6. Microscopía	88
IIA.2.6.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	88
IIA.2.6.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	88
IIA.2.7. Digestión <i>in vitro</i>	88
IIA.2.8. Liberación de hierro	88
IIA.2.9. Viabilidad bacteriana	89
IIA.2.10. Reproducibilidad de los resultados	89

IIA.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
IIA.3.1. Análisis fisicoquímico de las nanopartículas de hierro	89
IIA.3.1.1. Difracción de rayos X	89
IIA.3.1.2. Análisis por FTIR	91
IIA.3.1.3. Parámetros hidrodinámicos, topología y morfología de M y cM	92
IIA.3.2. Estabilidad de <i>L. plantarum</i> CIDCA 83114 en los compósitos	96
IIA.3.2.1. Efecto inhibitorio de hierro sobre bacterias	96
IIA.3.2.2. Imágenes microscópicas de los compósitos	96
IIA.3.2.3. Liberación de hierro durante la digestión gastrointestinal simulada	99
IIA.3.2.4. Viabilidad bacteriana durante la digestión <i>in vitro</i> y el almacenamiento	101
IIA.4. CONCLUSIONES	104

CAPÍTULO II - PARTE B. Incorporación de las nanopartículas sintetizadas de Fe₃O₄ en kefir de agua.

IIB.1. INTRODUCCIÓN	106
IIB.1.1. Bebidas funcionales naturalmente probióticas	106
IIB.1.1.1. Kefir de agua	107
IIB.1.2. Ensayos <i>in vitro</i>	108
IIB.1.2.1. <i>Artemia salina</i> como sistema vivo para medir toxicidad	109
IIB.1.3. Mecanismos de absorción de hierro en células intestinales y ensayos <i>in vitro</i> para su determinación	111
Objetivos específicos	113
IIB.2. MATERIALES Y MÉTODOS	114
IIB.2.1. Síntesis de Fe ₃ O ₄	114
IIB.2.2. Test de toxicidad con <i>Artemia salina</i>	114
IIB.2.3. Preparación de kefir de agua	115
IIB.2.4. Fortificación de kefir con hierro	115
IIB.2.5. Medición de pH	115
IIB.2.6. Digestión <i>in vitro</i>	115
IIB.2.7. Cultivo de células Caco-2/TC7	116
IIB.2.8. Absorción de hierro por células Caco-2/TC7	116
IIB.2.9. Cuantificación de ferritina	117
IIB.2.10. Toxicidad sobre células Caco-2/TC7 de citotoxicidad	117
IIB.2.11. Bacterias ácido lácticas y levaduras totales	118
IIB.2.12. Perfiles HPLC de las bebidas de kefir	118
IIB.2.13. Reproducibilidad de resultados	118
IIB.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119

IIB.3.1. Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas sobre <i>Artemia salina</i>	119
IIB.3.2. Variaciones producidas en las bebidas durante el tiempo de conservación	120
IIB.3.2.a. Variación de pH	120
IIB.3.2.b. Modificación de los perfiles cromatográficos de las bebidas fermentadas y fortificadas durante la conservación	121
II.3.3. Determinación de la viabilidad bacteriana de las bebidas fortificada	132
IIB.3.4. Cuantificación de ferritina	134
IIB.4. CONCLUSIONES	138

DISCUSIÓN GENERAL	140
Apéndice	143
Bibliografía	145

Abreviaturas

ADA	Asociación dietética americana
ATR	Reflexión total atenuada
° C	Grados centígrados
cM	Magnetita cubierta con pectina
DCYTB	Citocromo b duodenal
DDTG	Segunda derivada del termograma termogravimétrico
DL50	Dosis letal del 50%
DLS	Dispersión dinámica de la Luz
DMAB	2,3-dimetil-4-aminobifenilo
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's minimum Essentials medium
DMT1	Transportador de metales divalentes
DO	Densidad óptica
DTG	Primera derivada del termograma termogravimétrico
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	La Administración de Medicamentos y Alimentos de EE. UU
Fe	Hierro
FePP	Pirofosfato férrico
FPN1	Proteína de exportación de hierro ferroportina 1
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier
g	Gramo
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
h	Hora
HCP1	Proteína transportadora de hemo 1
HEPH	Hefestina
HO	Hemo oxigenasa
HPLC	del ingles <i>high performance liquid chromatography</i>
IR	infrarrojo

Js	Joules por segundo
KeV	Kilo electronvolts
Log	Logaritmo
M	Molar
M	Magnetita
MeV	Mega electronvolts
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitros
MNNG	Metil-N-nitrosoguanidina
MRS	Caldo de Man, Rogosa y Sharpe
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
mV	miliVolts
N	Normal
NHE	Na ⁺ /H ⁺ exchanger
nm	Nanómetros
NP	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	Peso en volumen
PBS	<i>Buffer</i> salino fosfato
PDI	Índice de polidispersión
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
SEM	Microscopía electrónica de barrido
T	Temperatura
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TG	Termograma
TGA	Termogravimetría
tr	Tiempo de retención
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
µL	Microlitro
µM	Micromolar
U/mL	Unidades por mililitro

UV	Ultravioleta
v/v	Volumen en volumen
XRD	Difracción de rayos X
XRF	Fluorescencia de rayos X

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. El Hierro: un mineral esencial para el ser humano

El hierro es un metal traza esencial para todos los organismos y su deficiencia nutricional es la más común a nivel mundial, constituyendo un problema de salud pública tanto en los países industrializados como en los países en vías de desarrollo. El hierro desempeña importantes funciones bioquímicas en el hombre, entre las que destacan la unión de oxígeno a hemoglobina, su función como cofactor de diferentes enzimas, o la unión al grupo hemo del complejo citocromo P450, entre las más importantes.

La hemoglobina es una hemo-proteína que se encuentra en los glóbulos rojos, también llamados eritrocitos o hematíes. Cada una de sus cuatro unidades estructurales está compuesta por un grupo hemo que contiene un átomo de hierro, encargado de captar el oxígeno molecular (O₂) de los alvéolos pulmonares y transportarlo a través del torrente sanguíneo hacia todos los tejidos del organismo. La disminución del número de glóbulos rojos deriva en anemia, debido a la reducción del flujo de oxígeno hacia los tejidos.

La anemia está definida como un síndrome que se caracteriza por la disminución anormal del número o tamaño de los glóbulos rojos que contiene la sangre o de su nivel de hemoglobina. Aunque son diversas las causas que pueden provocar esta afección, la anemia por deficiencia de hierro, o anemia ferropénica, es la más común (Schechter, 2008).

1.1. Anemia por deficiencia de hierro

En la anemia por deficiencia de hierro, el suministro de hierro a la médula ósea es insuficiente para la eritropoyesis (producción de glóbulos rojos) (Handelman & Levin, 2008). De acuerdo a los datos proporcionados por el estudio GBD del 2016 (del inglés, *Global Burden of Disease*), un tercio de la población mundial sufre anemia, y en aproximadamente la mitad de los casos se debe a deficiencia de hierro. Por lo tanto, la anemia ferropénica afecta a más de 1200 millones de personas en todo el mundo, y la deficiencia de hierro sin llegar a desarrollar anemia es aún más frecuente (Camaschella, 2019).

1.2. Consecuencias de la insuficiencia de hierro

El hierro en la dieta se presenta en dos formas: como hierro hemínico, presente en productos de origen animal, y como hierro no hemínico (inorgánico) que es el que se encuentra en vegetales y derivados. Sin embargo, la biodisponibilidad del hierro hemínico es del 20 – 30 % y la del no-hemínico es de solo del 1 – 10 % (Skolmowska & Głabska, 2019). La presencia de fitatos en los alimentos vegetales, compleja el hierro y reduce su absorción (Zhang *et al.*, 2020). Es por este motivo que para las personas veganas es complicado alcanzar la dosis recomendada de hierro, ya que el hierro que suelen consumir se absorbe menos. Por eso se buscan constantemente fuentes alternativas para su administración.

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO/OMS), la dosis diaria recomendada de hierro varía entre 5 y 30 mg en función del estado fisiológico, la etapa de crecimiento, el género y la demanda. Dichos requerimientos son difíciles de cubrir en determinados estados (por ejemplo, en mujeres embarazadas), por lo que el riesgo de desarrollar anemia ferropénica se incrementa. En función de lo expuesto, las recomendaciones diarias de hierro de la FAO/OMS (2002a) son las siguientes (fuente <http://www.fao.org/3/a-y2809e.pdf>):

- En niños, 6 - 9 mg/día
- En adolescentes, 17 mg/día
- En mujeres adultas de entre 19 - 65 años se recomienda 29 mg/día
- En embarazadas la recomendación es de 60 mg/día por lo que se sugiere el uso de suplementos)
- En mujeres postmenopáusicas, 11 mg/día
- En hombres adultos, 14 mg/día

Las consecuencias de la deficiencia de hierro están asociadas no solamente a las propias de la anemia, sino también a alteraciones hematológicas relacionadas con el mal funcionamiento de las enzimas dependientes de hierro (Serpa Guerra *et al.*, 2016). En este sentido, se han informado alteraciones en la capacidad de trabajo físico y de la actividad motora espontánea, mayor susceptibilidad a las infecciones (especialmente respiratorias), alteraciones cardíacas, anomalías funcionales e histológicas del tubo digestivo, aumento del riesgo de partos prematuros, de la morbilidad perinatal, menor transferencia de hierro al feto, disminución en la velocidad de crecimiento. Por ello, en poblaciones con una alta prevalencia de anemia ferropénica, la administración de hierro a embarazadas (especialmente al comienzo de la

gravidez) mejora la ingesta de hierro, evita partos prematuros y aumenta el peso al nacer (Percy *et al.*, 2017).

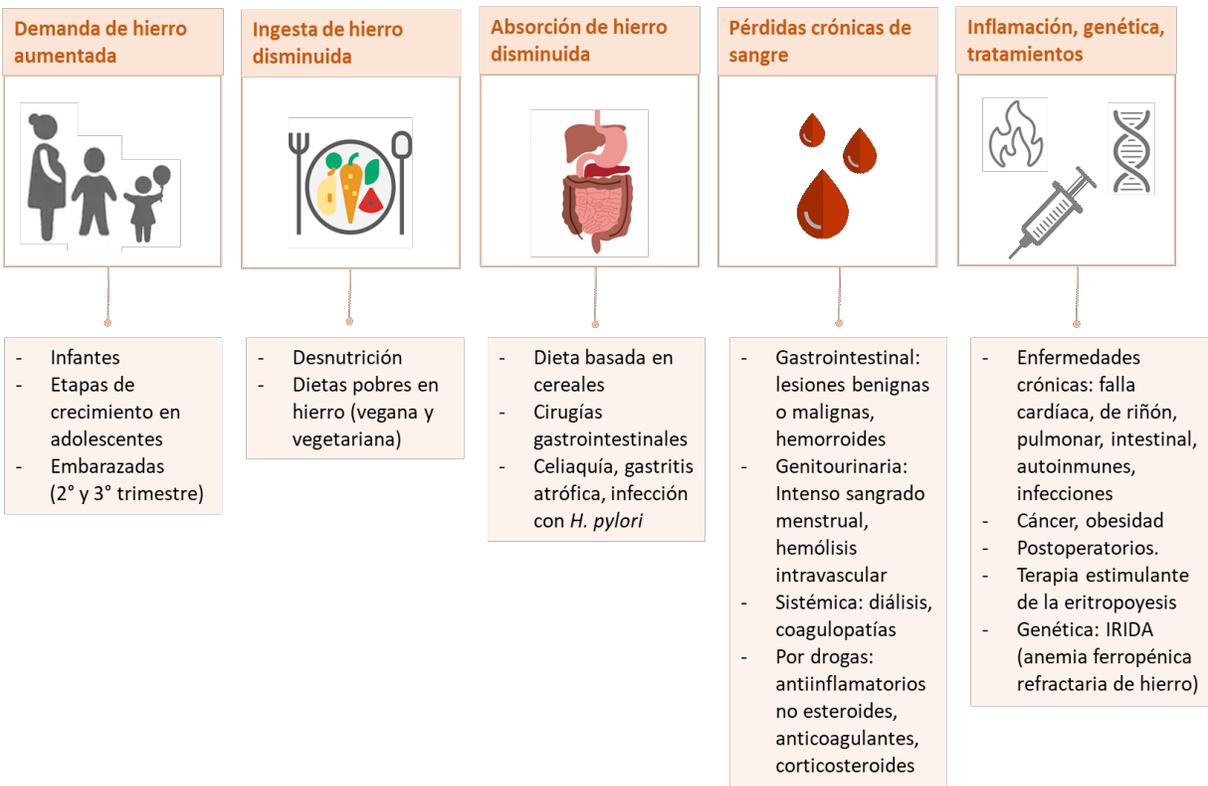
Existe una relación entre los niveles de hierro sérico de la madre y los del recién nacido. Los hijos de madres con anemia ferropénica al momento del parto tienen mayor prevalencia de anemia ferropénica durante el primer año de vida. Diversos estudios llevados a cabo en lactantes durante períodos prolongados demostraron que la anemia ferropénica en la infancia produce un retraso del desarrollo psicomotor, y que estos efectos persisten hasta los 5 y 10 años. Las alteraciones en la maduración del sistema nervioso central también persisten más allá de la infancia. Además, lo más inquietante de estos hallazgos es que dichos efectos parecieran no ser reversibles, aun a largo plazo, a pesar del tratamiento oportuno y satisfactorio de la anemia de acuerdo con las normas pediátricas vigentes (Ramsay & Charles, 2015).

1.3. Causas etiológicas de la insuficiencia de hierro

Las causas de la deficiencia de hierro pueden deberse a diversos factores, tales como:

- Demanda aumentada
- Ingesta disminuida
- Absorción disminuida
- Otras causas (pérdidas aumentadas, drogas, algunas enfermedades crónicas, entre otras).

En el esquema siguiente se presentan algunas de las causas etiológicas que contribuyen a la insuficiencia de hierro y a la anemia ferropénica:



1.4. Absorción de hierro y fortificación de alimentos

La concentración de hierro en el organismo es regulada a nivel de la absorción en el intestino delgado proximal (Zimmermann & Hurrell, 2007). La mayor parte del hierro dietario se absorbe en el duodeno, aunque la mucosa del colon también expresa las proteínas de absorción de hierro, lo que permite la absorción de hasta el 30% del hierro presente en el tracto gastrointestinal, dependiendo de su origen.

El hierro no hemínico se absorbe mediante diferentes mecanismos: a) por solubilización y reducción en el medio gástrico, b) por absorción en el duodeno proximal y c) por reducción del hierro férrico a ferroso en el borde cepillo del enterocito y co-transporte de hierro ferroso a través del transportador de metales divalentes (DMT1) (Serpa Guerra *et al.*, 2016). De acuerdo a las necesidades del organismo, el hierro se almacena en la proteína citoplasmática ferritina y se utiliza en los procesos metabólicos celulares o se transporta hacia la sangre. Por su parte, el hierro hemínico es solubilizado en el tracto gastrointestinal sin ser modificado, se transporta unido al del anillo de protoporfirina, mediante la proteína carrier de hierro hemo (HCP1) hacia el duodeno donde es absorbido. Como la estructura hemo es la que permite la entrada directa de

hierro a las células de la mucosa del intestino en forma de complejo hierro-porfirina, la absorción de hierro hemínico es mayor que la de hierro no hemínico (Serpa Guerra *et al.*, 2016).

Debido a la baja absorción del hierro, en muchas ocasiones resulta difícil alcanzar los requerimientos diarios. Para afrontar esta problemática a nivel de la salud pública, la **suplementación** y/o la **fortificación** son dos estrategias generalmente usadas.

La **suplementación** está dirigida a la población de alto riesgo. El hierro es administrado tres a cuatro veces al día en dosis altas (usualmente 60 mg Fe/día), y no está incluido en productos alimenticios. Esta estrategia a menudo conlleva efectos no deseados, como dolor abdominal, estreñimiento, diarrea y vómitos (Camaschella, 2019).

En la **fortificación**, el hierro se incluye en los alimentos en dosis más bajas, simulando su entorno natural y evitando efectos secundarios indeseados, razón por la cual sería una intervención más segura (Abbaspour *et al.*, 2014). El sulfato ferroso y el fumarato ferroso son los compuestos en los cuales el hierro se encuentra más biodisponible. Si bien estas sales son solubles en agua o en ácido diluido, a menudo reaccionan con otros componentes de los alimentos, causando sabores desagradables, cambios de color u oxidación de lípidos (Durán *et al.*, 2017). Por esta razón, para la fortificación de alimentos, se encuentran disponibles en el mercado el sulfato y fumarato ferroso encapsulados. De esta manera se impide que el catión ferroso altere las propiedades sensoriales de los alimentos, permitiendo que el hierro se libere y se absorba de manera segura en el intestino delgado. En el caso de las formas menos solubles de hierro (pirofosfato férrico), si bien se absorben menos muchas veces son las escogidas para fortificar alimentos, dado que se evitan alteraciones sensoriales no deseadas (Bries *et al.*, 2020). Por eso, es necesario diseñar sistemas que permitan una mejor absorción del hierro, evitando alteraciones organolépticas de los alimentos.

1.4.1 Mecanismos de absorción de hierro en células intestinales y ensayos *in vitro* para su determinación

Los niveles de hierro corporal se controlan principalmente mediante la modulación de la absorción de hierro en el duodeno y el yeyuno proximal. La absorción del hierro de la dieta por el intestino proximal está regulada con precisión por factores celulares y sistémicos para asegurar que la concentración de hierro se mantenga en niveles adecuados (Gulec *et al.*, 2014).

La absorción de hierro hemínico es eficiente y no se ve influenciada en gran medida por otros componentes de la dieta. La misma está mediada por la proteína transportadora de hemo 1

(HCP1). Por el contrario, el hierro no hemínico de la dieta (predominantemente en forma de Fe(III)) debe reducirse antes del transporte y la encargada de hacerlo es una ferrireductasa de la membrana de borde en cepillo de los enterocitos, citocromo b duodenal (DCYTB) (Gulec *et al.*, 2014).

Luego de la reducción, el hierro ferroso [Fe(II)] se transporta a través de la membrana del borde en cepillo de los enterocitos a través de una proteína transmembrana, el transportador de iones metálicos divalente 1 (DMT1) (Gulec *et al.*, 2014). Una vez que llega a los enterocitos, el Fe(II) es probablemente quelado por ácidos orgánicos de peso molecular pequeño (e.g., citrato), aminoácidos o proteínas intracelulares (chaperonas) (Gulec *et al.*, 2014) (Figura 1).

Cuando la demanda de hierro es alta, el hierro intracelular se transfiere rápidamente a través de la membrana basolateral por la proteína de exportación de hierro ferroportina 1 (FPN1). La salida del hierro ferroso está funcionalmente acoplada a la oxidación del hierro a través de la hefestina (HEPH). Por último, el hierro férrico se une a la transferrina en los fluidos intersticiales o en los vasos sanguíneos y se distribuye por todo el organismo.

Cuando la demanda es baja, el hierro se puede almacenar como ferritina, un complejo proteico de almacenamiento de hierro intracelular (Gulec *et al.*, 2014).

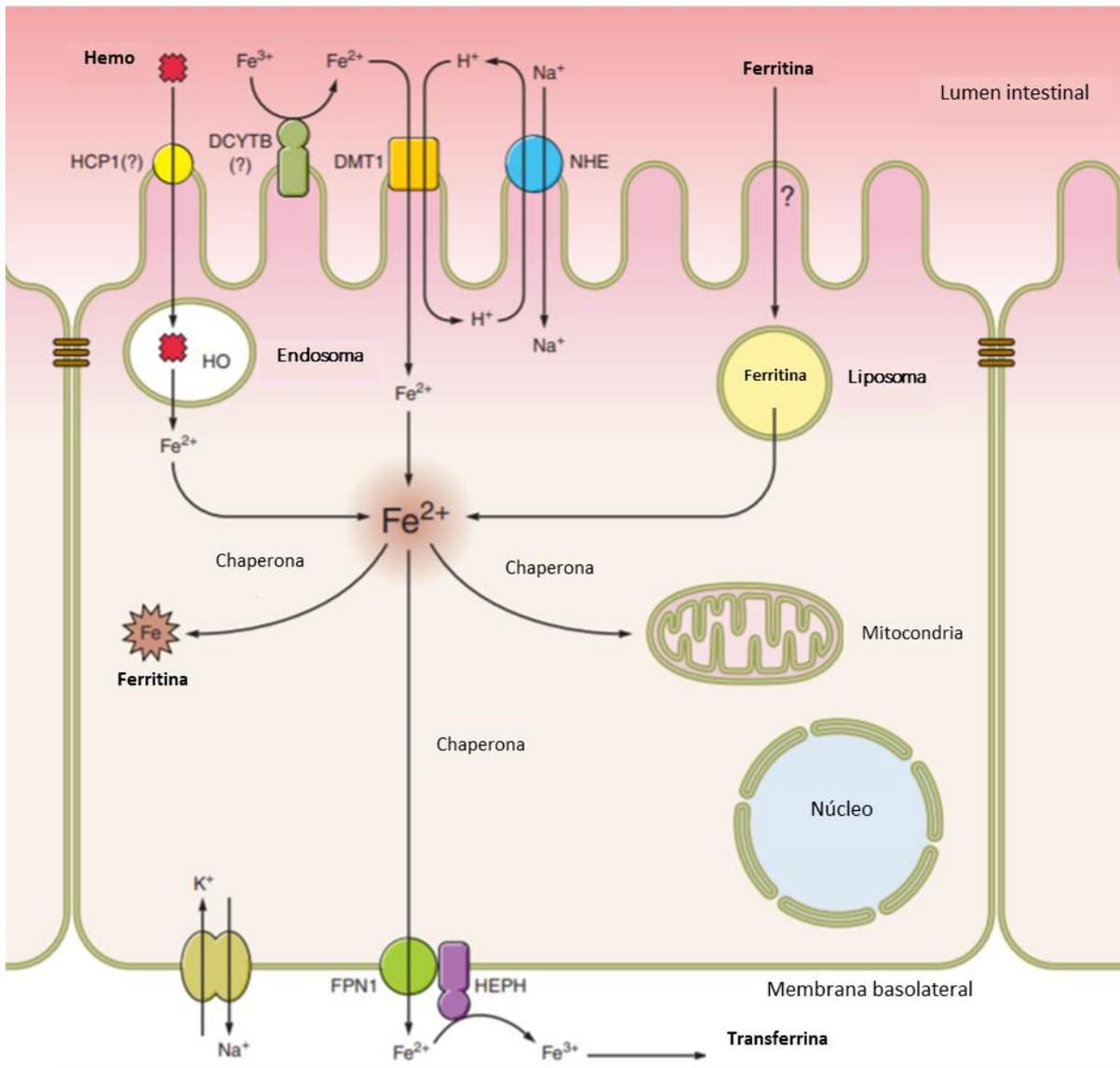


Figura 1. Mecanismos de absorción de hierro en el duodeno de los mamíferos. Se representa un solo enterocito con la maquinaria de transporte responsable de la asimilación del hierro de la dieta. El transporte de hierro hemínico es mediado por la endocitosis del hemo seguida de la liberación de hierro dentro de los endosomas por la acción de la hemo oxigenasa (HO). El gradiente de protones que alimenta la actividad de DMT1 se mantiene mediante la acción combinada de un intercambiador de sodio / hidrógeno apical (NHE) y la Na-K-ATPasa basolateral. (Imagen extraída de Gulec *et al.*, 2014).

2. Bacterias lácticas probióticas

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos que producen ácido láctico como único o principal producto de la fermentación de carbohidratos. Son cocos o bacilos Gram

positivos no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilicos o aerotolerantes, oxidasa y catalasa negativas, y que carecen de citocromos (Soto *et al.*, 2017). Entre los principales géneros de bacterias lácticas se encuentran: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (König *et al.*, 2009).

Algunas bacterias lácticas tienen propiedades probióticas. Desde el punto de vista etimológico, el término probiótico significa "para la vida". La FAO/OMS define a los probióticos como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped" (FAO/OMS, 2002; Frias *et al.*, 2016).

Las bacterias lácticas, en general, y los lactobacilos en particular, juegan un papel importante en la salud y bienestar humano y animal. Fueron consideradas por la FDA (*Food and Drug Administration* de EE. UU) como GRAS (generalmente reconocidas como seguras, del inglés *Generally Recognized as Safe*) y constituyen los microorganismos más ampliamente utilizados como *starters* en la industria, en la fabricación de diferentes alimentos (e.g., queso, yogurt, carnes fermentadas, pescado y vegetales) y también como inoculantes para ensilados (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2017; Albano *et al.*, 2009; Gerez *et al.*, 2009; Giraffa *et al.*, 2010).

Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los que más se utilizan como probióticos (Fijan, 2014; Vlasova *et al.*, 2016; Fenster *et al.*, 2019). Entre los beneficios que confieren los probióticos a la salud del huésped se encuentran una mayor resistencia a infecciones, reducción del colesterol sérico, reducción de la concentración de sustancias tóxicas a nivel intestinal, inhibición del crecimiento de bacterias potencialmente perjudiciales para el organismo, inmunomodulación, entre los más importantes (Patel & Goyal, 2013).

La eficacia de los productos alimenticios probióticos para ejercer su acción benéfica depende del número de bacterias viables y activas por gramo o mililitro de producto en el momento de su consumo (Tripathi & Giri, 2014). Por lo tanto, es esencial asegurar una alta tasa de supervivencia de los probióticos durante la producción, almacenamiento y pasaje a través del tracto gastrointestinal.

2.1 Supervivencia de los probióticos durante el procesamiento y almacenamiento

Existen diversos factores que influyen en la viabilidad de los microorganismos probióticos en los productos alimenticios durante la producción, el procesamiento y el almacenamiento. Estos factores incluyen **parámetros alimentarios** (pH, acidez, oxígeno disuelto, actividad de agua, presencia de sal, azúcar y productos químicos como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas,

saborizantes, aromatizantes y colorantes artificiales); **parámetros de procesamiento** (referidos a las condiciones de fermentación como, temperatura de incubación, presencia de oxígeno, velocidad de enfriamiento de los materiales de embalaje del producto, métodos de almacenamiento, y escala de producción); y **parámetros microbiológicos** (cepas de probióticos utilizadas y concentración del inóculo) (Tripathi & Giri, 2014). La cepa bacteriana a utilizar debería ser capaz de soportar las condiciones de procesamiento y mantener su funcionalidad luego del mismo y durante el almacenamiento. Además, los probióticos incorporados en alimentos no deben alterar la calidad del producto ni las propiedades organolépticas (del Piano *et al.*, 2006).

La creciente demanda de alimentos funcionales en el mercado obliga a las industrias alimentarias a implementar nuevas tecnologías que garanticen una elevada viabilidad luego de la producción a gran escala. La sensibilidad al oxígeno y a la acidez son los inconvenientes más importantes para el procesamiento y escalado de cepas probióticas de origen intestinal. Para evitar que perjudiquen la estabilidad de las bacterias, generalmente se utilizan tecnologías de microencapsulación (Gbassi *et al.*, 2009; Heidebach *et al.*, 2010; Sandoval-Castilla *et al.*, 2010), que permiten mantener la viabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y pasaje a través del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, la selección de cepas y el uso de tecnologías adecuadas resultan cruciales en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales que contengan probióticos.

3. Encapsulación

En la industria alimentaria se utiliza la encapsulación de componentes bioactivos en diversas aplicaciones, tales como el control de reacciones de oxidación, enmascaramiento de sabores, colores y olores, extensión de la vida útil, entre otras (Chávarri *et al.*, 2012). Estas técnicas también son utilizadas para proteger a los microorganismos probióticos tanto de los factores tecnológicos asociados al procesamiento de alimentos que puedan alterar su viabilidad en el producto final, como de las condiciones adversas del tracto gastrointestinal al momento de ser consumidos.

La microencapsulación provee una barrera física entre el microorganismo y los otros componentes del producto alimentario, protegiéndolo frente a diferentes ambientes adversos. (Champagne & Kailasapathy, 2008; Zuidam & Shimodi, 2010). En términos generales, una microcápsula es una pequeña esfera de material encapsulante (matriz), que permite recubrir el material de interés (núcleo).

El proceso de encapsulación se realiza en dos etapas. La primera etapa consiste en la incorporación del compuesto bioactivo o bacterias (núcleo) mediante disolución o dispersión (si la matriz es líquida), o aglomeración o adsorción (si la matriz es sólida). La segunda etapa es la estabilización mediante procesos físicos (evaporación, solidificación), químicos (polimerización), o fisicoquímicos (gelificación) (Burgain *et al.*, 2011).

La microencapsulación ayuda a separar el núcleo de su entorno hasta su liberación. De esta manera, el núcleo (donde se encuentra el compuesto bioactivo) queda protegido frente a diversos factores adversos (e.g., acidez, concentración de oxígeno y condiciones gastrointestinales), mejorando su estabilidad y vida media, y permitiendo una liberación controlada en función del material de encapsulación empleado. (Champagne & Kailasapathy, 2008; Burgain *et al.*, 2011).

Los agentes encapsulantes son generalmente matrices de grado alimentario. Su selección representa un desafío, ya que los materiales utilizados deben cumplir requisitos tecnológicos (resistentes a las condiciones de procesamiento), regulatorios (reglamentaciones de organismos nacionales -Código Alimentario Argentino- o internacionales -EFSA, FDA-) y de estabilidad durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal (Chávarri *et al.*, 2012; Serna-Cook & Vallejo-Castillo, 2013). Por todas estas razones, los materiales seleccionados deben ser generalmente reconocidos como seguros (GRAS) y estables en el tracto gastrointestinal superior, pero inestables en el intestino, donde deben liberarse los microorganismos (Würth *et al.*, 2015). Entre los materiales más ampliamente utilizados se encuentran polisacáridos, proteínas y lípidos, que actúan ya sea de manera individual como conjunta (de Souza Simões *et al.*, 2017). Cuando se requiere transportar un bioactivo cuyo *target* es el colon, pueden usarse materiales encapsulantes pertenecientes a la familia de la fibra dietaria, ya que no se hidrolizan en la parte superior del tracto gastrointestinal (Assifaoui *et al.*, 2011; Das & Ng, 2010; Das *et al.*, 2010; Dhalleine *et al.*, 2011). El uso de los materiales de grado alimentario garantiza la ausencia de citotoxicidad (Cook *et al.*, 2012).

Al momento de desarrollar un producto probiótico encapsulado seguro y eficaz, es crítico mantener un número adecuado de células viables durante la vida útil del producto hasta el momento de consumirlo (Chávarri *et al.*, 2012). Diversos organismos nacionales e internacionales, entre ellos la Federación Internacional de Lechería (FIL), el Código Alimentario Argentino, la EFSA y la FDA, requieren un mínimo de 10^6 - 10^7 unidades formadoras de colonias de probióticos por gramo de alimento (UFC/g) al momento del consumo, para garantizar sus efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor (FAO/OMS, 2002b; Mortazavian *et al.*, 2007).

Diferentes factores determinan la viabilidad bacteriana luego de la encapsulación. Entre ellos pueden mencionarse el tipo y la concentración del material de la matriz, el tamaño de la cápsula, el número de bacterias iniciales y la cepa utilizada (Chen *et al.*, 2007). Por eso, los agentes encapsulantes y los métodos de elaboración y conservación de alimentos adquieren un papel determinante para lograr este objetivo.

La efectividad del proceso de encapsulación depende de diferentes parámetros, tales como la viabilidad de los microorganismos luego de exponerlos a condiciones ambientales adversas, el tiempo necesario para la formación de la cápsula, la capacidad de liberación de las bacterias y la recuperación bacteriana (Mortazabian *et al.*, 2007; Borgogna *et al.*, 2010).

Diversas técnicas de deshidratación (*e.g.*, secado en *spray*, liofilización) suelen usarse como complemento a la encapsulación. Esto disminuye el tamaño de partícula, facilita el manejo del polvo obtenido y mejora la estabilidad del producto durante la conservación.

Estos procesos de deshidratación también pueden emplearse directamente sobre los cultivos bacterianos o en matrices de alimentos, sin encapsulación previa. Sin embargo, esta estrategia puede funcionar en ciertos casos, pero no en otros, ya que algunas bacterias son más susceptibles al daño o la muerte durante el proceso de deshidratación (Cook *et al.*, 2012).

Es por este motivo que las técnicas de deshidratación pueden considerarse como pasos complementarios a la encapsulación. Es por ello que el proceso de microencapsulación será dividido en dos fases:

- i. Proceso de encapsulación
- ii. Proceso de preservación.

3.1. Proceso de encapsulación

Los métodos de encapsulación se pueden dividir en: métodos de extrusión o de gotas y métodos de emulsión o sistemas de dos fases (Solanki *et al.*, 2013).

Dentro de los métodos de extrusión, la gelificación iónica es uno de los más utilizados para encapsular probióticos (Etchepare *et al.*, 2015) y consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulado, haciendo pasar una solución polimérica a través de una aguja de jeringa por goteo (de Vos, *et al.*, 2010). Para ello, los microorganismos son adicionados a un hidrocoloide (*e.g.*,

pectina, alginato) y la suspensión se hace gotear sobre una sal (e.g., CaCl_2) que permite la gelificación (Vemmer & Patel, 2013).

La emulsificación se define como un proceso de dispersión de un líquido en un segundo líquido inmiscible (Goodarzi & Zendejboudi, 2019). El material a encapsular (bacterias o compuestos bioactivos) se incluye en el primer líquido (solución polimérica) (de Vos, *et al.*, 2010). Un pequeño volumen de la solución polimérica con bacterias en suspensión (fase dispersa) es adicionado a un volumen mayor de aceite vegetal (fase continua). Luego, la mezcla es homogeneizada hasta formar una emulsión de agua en aceite (Vemmer & Patel, 2013).

3.2. Proceso de preservación

Para mejorar la estabilidad de los probióticos durante el almacenamiento prolongado se recurre a la deshidratación de los mismo (Perdana *et al.*, 2013). Sin embargo, el proceso de secado puede causar deterioro de las cápsulas, liberación de algunas bacterias y pérdida de viabilidad.

Los procesos de conservación permiten reducir la actividad de agua del material a preservar, inhibiendo las reacciones químicas y biológicas responsables de su degradación (Lodato *et al.*, 1999; Jagannath *et al.*, 2010). La liofilización y congelación son los métodos de preservación de microorganismos más utilizados.

3.2.1. Congelación

Para garantizar la viabilidad y actividad celular luego de la congelación y descongelación, se requiere que las velocidades de estos procesos sean rápidas (Li *et al.*, 2018). Las temperaturas más utilizadas son $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Cuanto menor sea la temperatura de almacenamiento, mayor será la supervivencia de las bacterias (Călinoiu *et al.*, 2016). Es por este motivo que la congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido ($-110\text{ }^\circ\text{C}$ a $-196\text{ }^\circ\text{C}$) permite obtener una mejor actividad y viabilidad celular (Zheng & Sun, 2006). Sin embargo, es una técnica muy cara para su implementación a escala de laboratorio ni a escala industrial.

3.2.2. Liofilización

Desde hace mucho tiempo la liofilización es un método ampliamente utilizado para almacenar y preservar bacterias lácticas y probióticos (Carvalho *et al.*, 2004; Gautier *et al.*, 2013; Saarela *et al.*, 2005; Jagannath *et al.*, 2010). El proceso consiste en la remoción del agua por sublimación del hielo de la muestra congelada. El proceso consta de tres etapas: congelación, sublimación y desorción, obteniéndose un material concentrado en polvo (Perry, 1998).

La resistencia bacteriana a la liofilización es cepa dependiente, y por ello, el comportamiento bacteriano puede ser diferente, aun cuando se utilicen condiciones comparables (Fonseca *et al.*, 2015). La supervivencia bacteriana durante la liofilización también se puede ver afectada por otros factores, tales como fase de crecimiento celular (Carvalho *et al.*, 2004), pH de crecimiento (Li *et al.*, 2009) y temperatura de incubación (Li *et al.*, 2009). La temperatura de almacenamiento es otro parámetro crítico para la conservación de bacterias liofilizadas (Zhao & Zhang, 2005). Los polvos liofilizados pueden ser almacenados bajo vacío, mantenidos en actividad de agua controlada y en la oscuridad.

Entre las ventajas que presenta la liofilización se encuentran la baja temperatura de trabajo que impide que se alteren las estructuras termolábiles, la ausencia de oxígeno durante el proceso que impide que se oxiden biomoléculas bacterianas, la ausencia de agua libre que evita el crecimiento microbiano, la baja humedad residual, la alta estabilidad de los productos durante tiempos prolongados, el volumen reducido de los productos obtenidos que facilita el transporte y el almacenamiento de los mismos, entre otros.

Para garantizar la máxima viabilidad y actividad de los cultivos liofilizados deben optimizarse las condiciones de humedad y temperatura de almacenamiento y transporte (Coulibaly *et al.*, 2010).

4. Fibra dietaria: La pectina

Los carbohidratos no digeribles, como la pectina, resisten la digestión en el intestino delgado pero son degradados en el colon a ácidos grasos de cadena corta, con diversos beneficios para la salud del consumidor, entre ellos, el aumento de la absorción de hierro (Yeung *et al.*, 2005).

La ingesta de fibra dietaria proporciona muchos beneficios para la salud. Una ingesta elevada de fibra dietaria reduce el riesgo de desarrollar enfermedades coronarias, accidentes

cerebrovasculares, hipertensión, diabetes, obesidad y ciertos trastornos gastrointestinales. Además, un mayor consumo de fibra dietaria mejora las concentraciones de lípidos séricos, reduce la presión arterial, mejora el control de la glucosa en sangre en la diabetes, promueve la regularidad, ayuda a perder peso y mejora la función inmunológica. Sin embargo, la mayoría de las personas en Estados Unidos consumen menos de la mitad de los niveles recomendados de fibra dietaria al día (Anderson *et al.*, 2009).

En el año 2016 el Ministerio de Salud de la Nación elaboró las nuevas Guías Alimentarias para la población argentina (García *et al.*, 2018). El valor recomendado para fibra dietaria es de 25 g/día y coincide con la recomendación de la *American Dietetic Association* (ADA) (Marlett & Slavin, 1997).

Según datos del Ministerio de Salud de la Nación, el consumo de fibra dietaria en la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud presentó una media de ingesta de 9.39 g, y el 97.2% de las mujeres mostró una ingesta inferior a la recomendada (Durán *et al.*, 2007)

Las pectinas pertenecen a la fibra dietaria y son polisacáridos que constituyen aproximadamente un tercio de la pared celular de las plantas superiores. En los últimos años han adquirido gran interés porque sus propiedades físico-químicas y su biodegradabilidad han permitido el desarrollo de diversas aplicaciones en Ciencia y Tecnología de Alimentos (Crispín *et al.*, 2012). Las pectinas pueden extraerse a partir de cáscaras de cítricos y de pulpa de manzana en condiciones ligeramente ácidas. Los residuos provenientes de la industria azucarera (remolacha), aceitera (semillas de girasol), son fuentes alternativas de pectinas (Srivastava & Malviya, 2011).

Desde el punto de vista químico la pectina está compuesta por una cadena lineal de residuos de ácido α -(1,4)-D-galacturónico cuyos grupos carboxílicos se encuentran parcialmente metoxilados (Figura 2) (Burgeois *et al.*, 2006). Debido a la complejidad de su estructura, el peso molecular de la pectina está comprendido entre 50000 y 180000 daltons (Sinha & Kumria, 2001). A pH neutro las cadenas de este polisacárido se encuentran cargadas negativamente, ya que su pKa es aproximadamente 3.5 (Vandamme *et al.*, 2002).

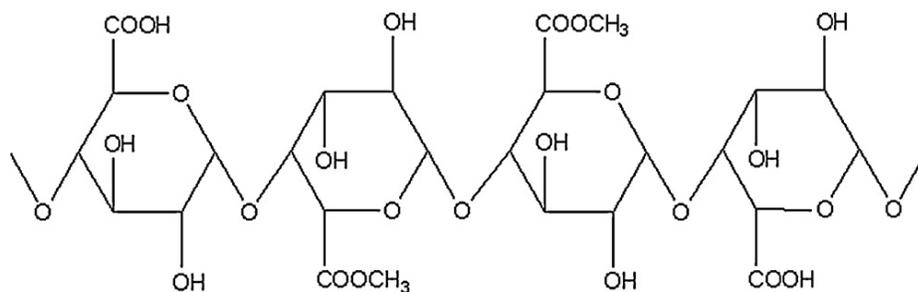


Figura 2. Estructura química de la pectina (Sharma & Ahuja, 2011).

Las pectinas se dividen en dos grupos principales, en función de su grado de esterificación con grupos metoxilo: pectinas de alto grado de metoxilación, pectinas de bajo grado de metoxilación y en otras sustancias pécticas (e.g., pectinas desmetiladas o moléculas amidadas) (Vandamme *et al.*, 2002). Las pectinas alto grado de metoxilación presentan valores de metoxilación comprendidos entre el 60 y 75 %, mientras que este valor disminuye hasta un 20–40 % en las pectinas de bajo grado de metoxilación. Esta diferencia influye directamente en la capacidad gelificante de cada pectina. Así, las pectinas de alto grado de metoxilación requieren un intervalo de pH próximo a 3 para formar geles, son en general solubles en agua caliente y deben contener un agente dispersante, como la dextrosa, para evitar la formación de grumos durante el proceso de gelificación. Por el contrario, las pectinas de bajo grado de metoxilación producen geles independientemente del pH del medio, pero requieren la presencia de una cantidad controlada de iones calcio u otros cationes divalentes. Es por ello que estas últimas revisten un mayor interés por sus aplicaciones en tecnología farmacéutica (Sriamornsak, 2003). Asimismo, pueden utilizarse en tratamientos de reducción de peso, ya que su ingesta provoca una sensación de saciedad, por su gran capacidad para absorber líquidos (Anderson *et al.*, 2009).

Objetivos Generales

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos en esta sección, los objetivos generales de este trabajo de tesis son:

- Desarrollar y caracterizar cápsulas de hierro-pectina como un método de transporte de hierro hacia el intestino (Capítulo I, Parte A);
- Desarrollar sistemas de encapsulación de bacterias lácticas a partir de los sistemas hierro-pectina, que aseguren la viabilidad bacteriana luego de la digestión gastrointestinal (Capítulo I, Parte B).
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de Fe_3O_4 como alternativa a la fortificación con sulfato ferroso (Capítulo II, Parte A).
- Incorporar las nanopartículas obtenidas en aplicaciones alimentarias (Capítulo II, Parte B).

CAPÍTULO I

PARTE A. Desarrollo y caracterización de cápsulas de hierro-pectina como sistema de transporte de hierro a las células intestinales.

IA.1. INTRODUCCIÓN

IA.1. Encapsulación por gelificación iónica

Uno de los enfoques más extendidos para la obtención de cápsulas es el método de gelificación iónica o ionotrópica. Esta técnica consiste en la utilización de biopolímeros aniónicos que, en combinación con ciertos cationes como el calcio, inducen la formación de un gel estructurado (Figura IA1). Este efecto conduce a la formación de una cápsula cuya matriz es el biopolímero utilizado y dentro de la misma quedará encapsulado el material bioactivo (núcleo), que puede consistir en bacterias lácticas (Bourgeois *et al.*, 2006).

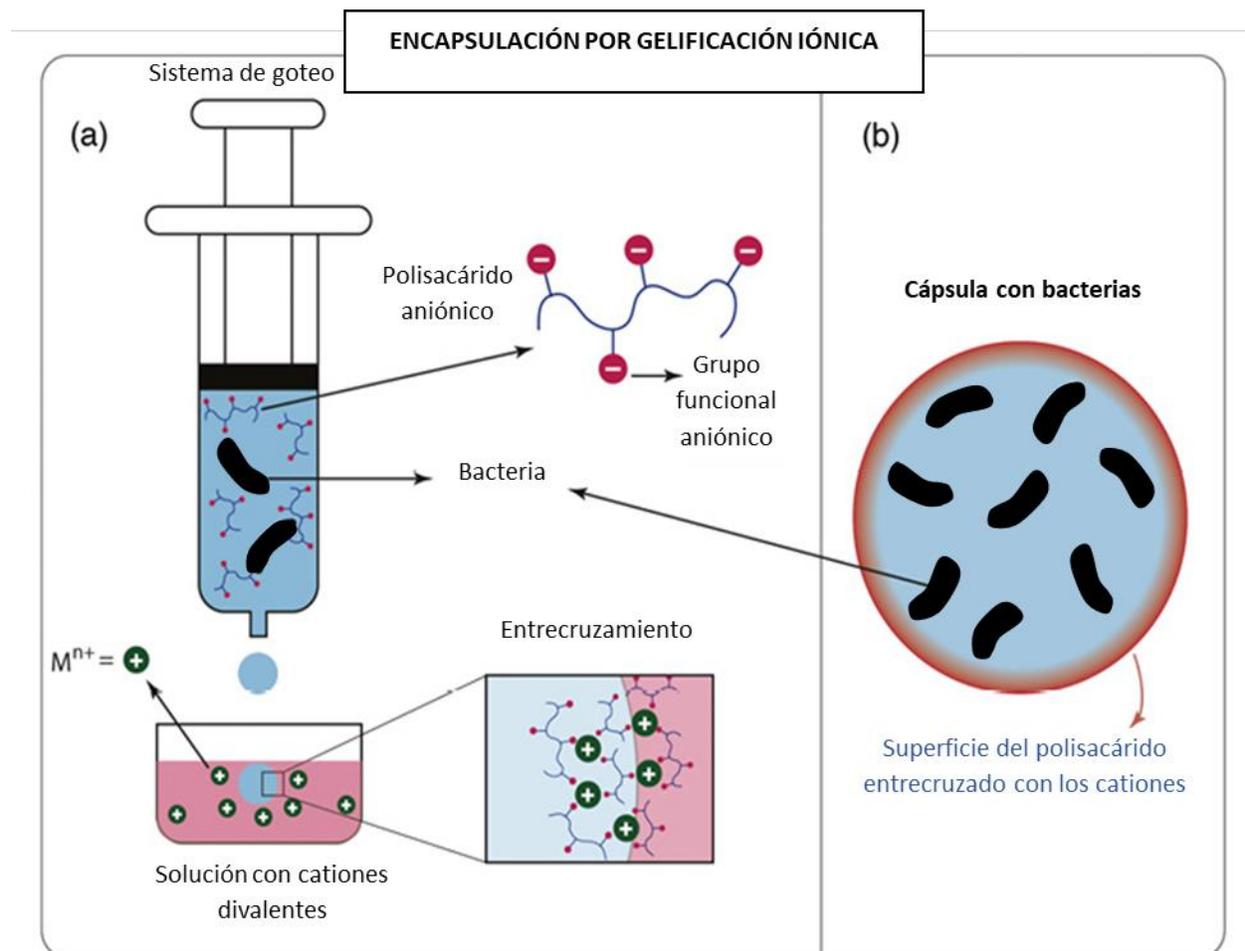


Figura IA1. Representación esquemática de la encapsulación por gelificación iónica (adaptada de Bogantes, Delia, *et al.* 2018)

IA.1.1. Polímeros empleados en la encapsulación por gelificación iónica

Si bien el alginato, asociado principalmente a los cationes de calcio, se ha utilizado ampliamente para encapsular lactobacilos y bifidobacterias (Chaluvadi *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2007; Hotchkiss *et al.*, 2008; Kent & Doherty, 2014; Klemmer, Korber, Low & Nickerson, 2011; Nazzaro, Fratianni, Coppola, Sada & Orlando, 2009; Zheng *et al.*, 2017), existen otros biopolímeros naturales, tales como los oligo y polisacáridos de la dieta, que son particularmente interesantes para este propósito debido a su buena biocompatibilidad, no toxicidad y propiedades de liberación controlada (Coviello *et al.*, 2007).

IA.1.1.1. Pectina

Tal como se mencionó en la introducción general, las pectinas pertenecen a la fibra dietaria y no se hidrolizan en la parte superior del tracto gastrointestinal, siendo degradadas por la microflora colónica. Por eso, las matrices de pectina se han utilizado ampliamente para administrar fármacos cuyo sitio de acción (o *target*) es el colon (Islan *et al.*, 2012; Assifaoui *et al.*, 2011; Das & Ng, 2010; Das *et al.*, 2010; Dhalleine *et al.*, 2011; El- Gibaly, 2002; Liu *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2004). A pesar de las ventajas derivadas de su capacidad para transportar compuestos al intestino, las pectinas se han utilizado escasamente para la encapsulación de probióticos. Al respecto, Gerez y col. (2012) combinaron técnicas de gelificación ionotrópica y coacervación compleja para obtener microcápsulas de pectina recubiertas con proteínas de suero, que mejoran la supervivencia de *Lactobacillus rhamnosus* a pH bajo y bilis. Oliveira *et al.* (2007) utilizaron pectinas y caseína seguidas de secado en *spray* para encapsular *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*. Sandoval-Castilla *et al.*, (2010) utilizaron pectinas y alginato para encapsular *Lactobacillus casei* incorporado en yogures y posteriormente expuesto a condiciones gastrointestinales simuladas. A su vez, Nualkaekul *et al.* (2013) compararon la eficiencia de cápsulas de alginato y pectina para mejorar la supervivencia de *Lactoplantibacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* en jugos de granada y arándano durante el almacenamiento.

IA.1.2. Cationes más utilizados

La fisicoquímica del complejo formado entre el catión y el agente encapsulante está determinada por el polímero y el catión utilizado. En la gelificación iónica los cationes forman

asociados insolubles con las cadenas de carbohidratos del agente encapsulante y dan como resultado los llamados complejos de "caja de huevos" (Bourgeois *et al.*, 2006).

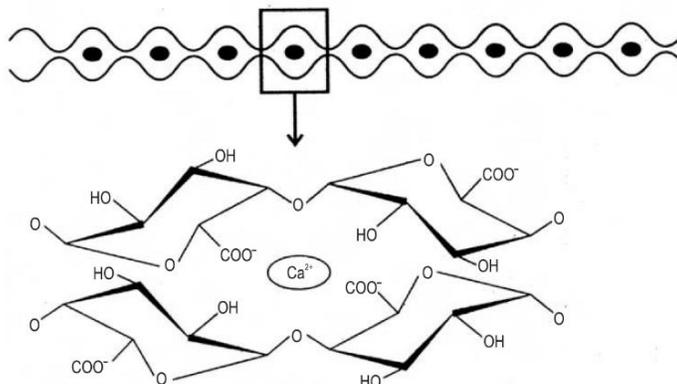


Figura IA2. Representación esquemática de la unión del calcio a la secuencia poligalacturonato de la pectina (Srivastava & Malviya, 2011).

Los cationes calcio y el zinc han sido los más empleados en la gelificación iónica, siendo el uso del hierro mucho menos habitual (Ghibaudo *et al.*, 2017).

IA.1.3. Caracterización físico-química de las cápsulas obtenidas

IA.1.3.1. *Swelling* (hinchamiento)

El porcentaje de hinchamiento (*swelling*) es una de las propiedades de un material que puede cambiar al ser inmerso en medios con diferentes pH. El *swelling* se determina pesando el material y/o midiendo el tamaño del mismo antes y después de sumergirlo en el medio a estudiar. El análisis de estas variaciones es importante para predecir el comportamiento del material en las condiciones a las que será expuesto en su potencial aplicación tecnológica. Así, por ejemplo, en el diseño de cápsulas que contienen un producto bioactivo cuyo *target* de liberación es el intestino, será necesario escoger un material encapsulante que pueda retener el material encapsulado durante su paso a través del tracto gastrointestinal y ser capaz de liberarlo una vez llegado al intestino.

IA.1.3.2. Termogravimetría (TGA)

El fundamento del análisis termogravimétrico es la variación del peso de la muestra como consecuencia del tratamiento térmico. Debido al proceso, se perderá masa en términos de volatilización o descomposición y esta pérdida de peso se mide normalmente por medio de una microbalanza (De Blasio, 2019).

El análisis termogravimétrico (TGA) se utiliza a menudo en estudios de descomposición térmica de biomasa. A partir de la medida instrumental se obtiene el termograma termogravimétrico diferencial (DTG), a partir del cual se hacen suposiciones sobre las velocidades de reacción del tratamiento térmico. El método permite una medición simultánea de la temperatura, el tiempo y la masa de una muestra en una atmósfera dinámica controlada.

El analizador consta de una microbalanza precisa conectada a una bandeja o plato de muestra dentro de un horno con un programador de temperatura y una termobalanza controladora. La balanza pesa la muestra en el horno cerrado y la temperatura de la muestra es monitoreada por una termocupla cerca de la bandeja. Un tubo protector aísla tanto los elementos calefactores como los serpentines de refrigeración del plato de muestra. Un gas de purga dinámico pasa sobre la muestra, con un flujo de entre 20 y 200 mL/min (Figura IA3) (Saadatkah, *et. al*, 2020).

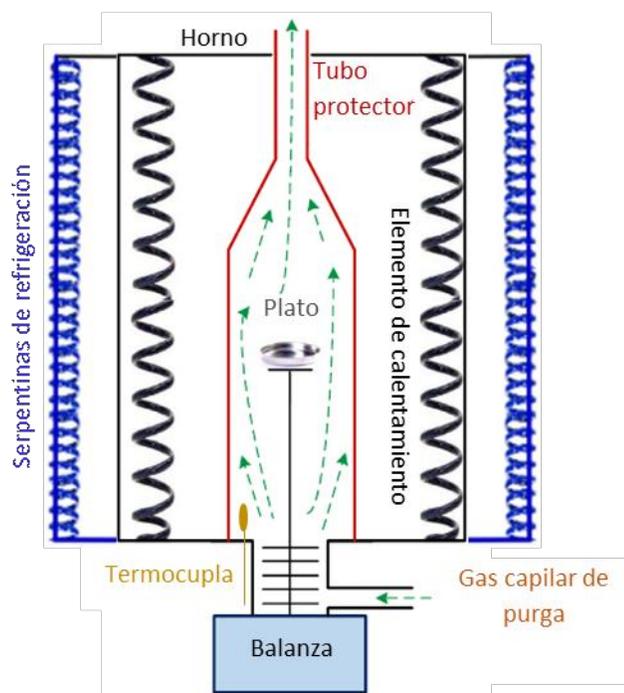


Figura IA3. Representación esquemática de un analizador termogravimétrico (Saadatkah *et. al*, 2020).

La variación de la temperatura se establece de acuerdo con un programa de temperaturas específico que puede incluir pasos isotérmicos y rampas con diferentes velocidades de calentamiento. El sistema se calienta mediante un horno eléctrico, que en algunos casos puede alcanzar hasta 2000 °C, dependiendo de los materiales y el diseño del horno (de Blasio, 2019). En la curva termogravimétrica (TG o termograma) se grafica el cambio de masa de la muestra en función de la temperatura o el tiempo. Los termogramas son únicos para cada compuesto y brindan información sobre la estabilidad térmica del material, la estabilidad oxidativa, la composición de múltiples componentes, la vida útil del producto, la cinética de descomposición y el contenido de humedad y volátiles.

De manera general, los termogramas se pueden analizar de la siguiente manera (Saadatkhan *et. al*, 2020):

1. Por debajo de 150 °C se desprenden agua adsorbida físicamente, compuestos volátiles de bajo peso molecular, solventes y gases atrapados.

2. Entre 150-250 °C la pérdida de masa se debe al agua adsorbida químicamente y compuestos de bajo peso molecular, tales como aditivos y productos volátiles de descomposición.

3. Por encima de 250 °C los compuestos comienzan a descomponerse entre la temperatura de inicio y finalización.

4. Por encima de la temperatura final, el material remanente incluye cenizas y metales no volátiles.

5. En un ambiente oxidante, los compuestos metálicos aumentan el estado de oxidación y ganan masa.

La primera y la segunda derivadas del perfil de pérdida de peso (DTG y DDTG, respectivamente) identifican puntos de inflexión y discriminan fenómenos de mezclas en sistemas multicomponente que reaccionan a temperaturas superpuestas (Figura IA4). Los picos del DTG corresponden a puntos de inflexión, mientras que en el caso de picos superpuestos, los DDTG (temperaturas de inicio) separan las reacciones con mayor precisión.

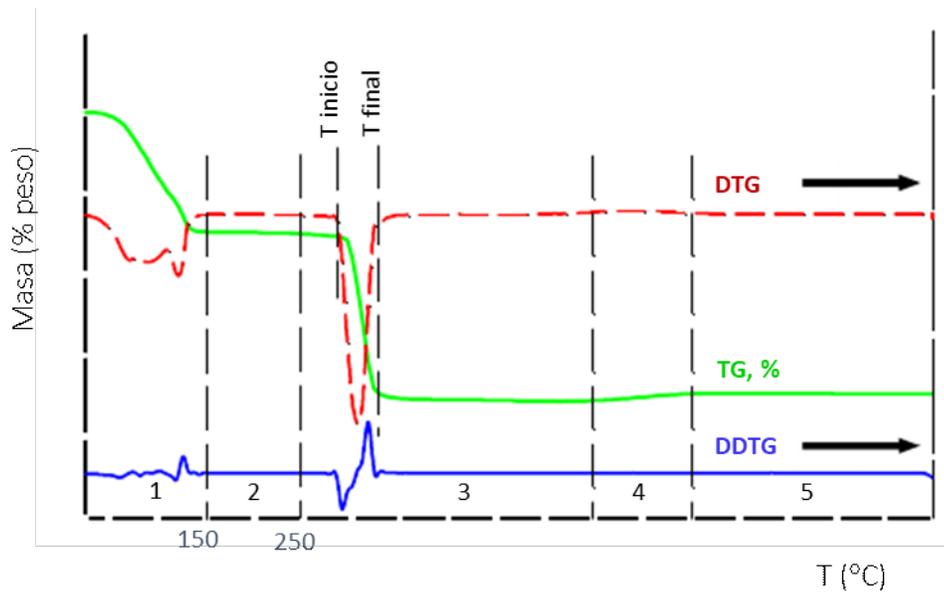


Figura IA4. Cinco posibles secciones de un termograma (curva TGA (verde), curva DTG, primera derivada (rojo), curva DDTG, segunda derivada (azul) de $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ calentado hasta 900 °C en aire) (Saadatkah *et. al*, 2020).

IA.1.3.3. Porosimetría de intrusión de mercurio

La porosimetría de intrusión de mercurio es un método comúnmente usado para caracterizar un material poroso en cuanto a su distribución de tamaño de poro. Generalmente se utiliza un porosímetro de mercurio, que es un dispositivo capaz de generar presiones lo suficientemente elevadas como para medir el volumen de mercurio captado por los poros.

El método se basa en la **ecuación de Young-Laplace**, también conocida como **ecuación Washburn**:

$$D = \frac{4\gamma \cos \theta}{P}$$

Ec. IA1

donde D es el diámetro de poro, γ es la tensión superficial del mercurio ($\gamma = 0.485 \text{ N/m}$), θ es el ángulo de contacto entre el mercurio y la pared del poro, y P es la presión aplicada (Sidiq, *et. al*, 2020).

El mercurio es el único metal líquido a temperatura ambiente. Debido a que es un líquido no humectante, presenta ángulos de contacto superiores a 90° . Por este motivo, el $\cos \theta$ arrojará un valor negativo, que refleja el hecho de que el mercurio debe recibir una fuerza para introducirse en los poros (Tanis-Kanbur, *et. al*, 2020).

Una porosimetría típica implica colocar la muestra en una cámara y usar vacío para evacuar los gases y el vapor de las muestras. Luego, mediante un aumento escalonado de la presión aplicada, el mercurio se ve obligado a entrar en todos los poros presentes en la muestra. La información sobre los poros se obtiene a través de la ecuación de Washburn (Ec. IA1). La presión aplicada para llenar completamente los poros es compatible con el tamaño de los poros (con una presión más baja se obtendrá información para macroporos y con una presión alta, para microporos) (Sidiq, *et. al*, 2020).

IA.1.3.4. Análisis de fluorescencia de rayos X (XRF)

La espectrometría XRF es una técnica de caracterización particularmente valiosa, que permite un análisis de alta resolución de la composición elemental de un material (Löwemark *et al.*, 2011).

Los rayos X son una radiación electromagnética de longitud de onda corta (10^{-5} – 100 \AA), producida la detención de electrones de elevada energía o por transiciones electrónicas de electrones que se encuentran en los orbitales internos de los átomos (Dolenco *et. al*, 2017). El intervalo de longitudes de onda utilizadas en la espectroscopía de rayos X se limita a 0.1 – 25 \AA .

Para utilizarlos con fines analíticos, los rayos X pueden ser obtenidos de 4 maneras (Dolenco *et. al*, 2017):

- 1) Por bombardeo de un blanco metálico con un haz de electrones de elevada energía.
- 2) Por exposición de una sustancia a un haz primario de rayos X con el objetivo de generar un haz secundario de fluorescencia de rayos X.
- 3) Mediante la utilización de una fuente radiactiva cuyo proceso de desintegración da lugar a una emisión de rayos X (radiación gamma).
- 4) A partir de una fuente de radiación sincrotrón.

Los componentes de un instrumento de fluorescencia de rayos X incluyen una fuente (la fuente más habitual es el tubo de rayos X, ver Figura IA5), un dispositivo encargado de seleccionar la longitud de onda de la radiación incidente, un soporte para la muestra, un detector de radiación o un transductor, un procesador de la señal y un dispositivo de lectura (Skoog *et. al*, 2017).

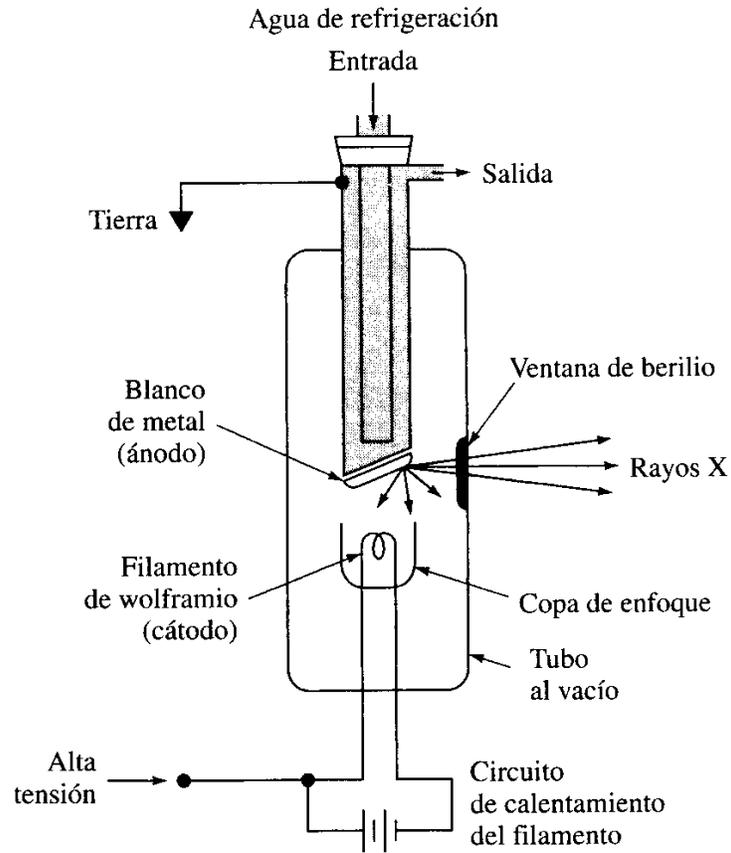


Figura IA5. Esquema básico de un tubo de rayos X (Skoog *et. al*, 2017).

Cuando un átomo absorbe radiación de rayos X, se produce un ion excitado electrónicamente que después de un breve período vuelve a su estado fundamental mediante transiciones que involucran a los electrones de los niveles de mayor energía. Estas transiciones que se producen para volver al estado fundamental se caracterizan por la emisión de radiación X (fluorescencia) (Dolenco *et. al*, 2017).

El análisis de los elementos principales y traza en un material por fluorescencia de rayos X es posible gracias al comportamiento de los átomos cuando interactúan con la radiación. Cuando los materiales se excitan con radiación de alta energía y longitud de onda corta (por ejemplo, rayos X), pueden ionizarse. Si la energía de la radiación es suficiente para desalojar un electrón de un nivel interno, el átomo se vuelve inestable y un electrón externo reemplaza al electrón interno faltante. Cuando esto sucede, se libera energía debido a la disminución de la energía de enlace del orbital interno del electrón en comparación con el externo. La radiación emitida es de menor energía que los rayos X incidentes primarios y se denomina radiación fluorescente. Debido a que la energía del fotón emitido es característica de una transición entre orbitales de electrones específicos en un elemento particular, los rayos X fluorescentes resultantes se pueden usar para detectar los elementos que están presentes en la muestra y la abundancia de cada uno (Oyedotun, 2018).

IA.1.3.5. Análisis del tamaño de partícula por dispersión dinámica de la luz (DLS)

El análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés, *Dynamic Light Scattering*) es un método utilizado para determinar el tamaño y la distribución de tamaño de partículas en suspensión debido al movimiento browniano de las mismas y las fluctuaciones que este genera en la intensidad de un haz de luz láser incidente (Thomas *et. al*, 2017).

El principio del movimiento browniano es que las partículas chocan constantemente con las moléculas de solvente (Thomas *et. al*, 2017). Estas colisiones hacen que se transfiera una cierta cantidad de energía, lo que induce el movimiento de partículas. La transferencia de energía es más o menos constante y, por lo tanto, tiene un mayor efecto sobre las partículas más pequeñas (Figura IA6). Como resultado, las partículas más pequeñas se mueven a velocidades más altas que las partículas más grandes (Morilla, 2018).

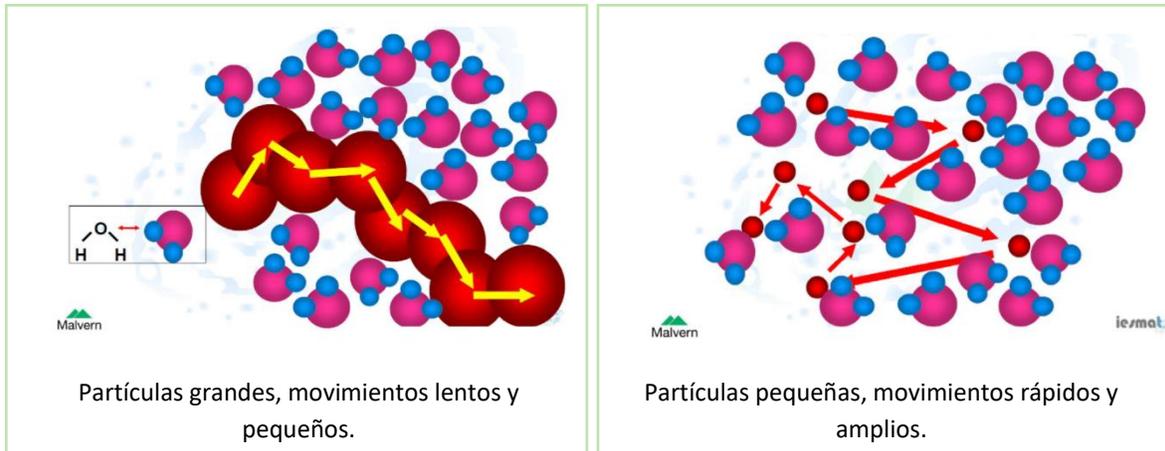


Figura IA6. Representación del movimiento browniano de partículas grandes y pequeñas (extraída de Morilla, 2018).

Cuando un haz de luz láser polarizada incide sobre una partícula, se creará un patrón de dispersión o *scattering* de la luz. La forma de este patrón depende del tamaño de partícula y de la relación entre el tamaño de la partícula y la longitud de onda (λ) del haz de luz incidente. Según esta relación, se pueden distinguir tres formas de patrones de dispersión o *scattering* (Morilla, 2018) (Figura IA7).

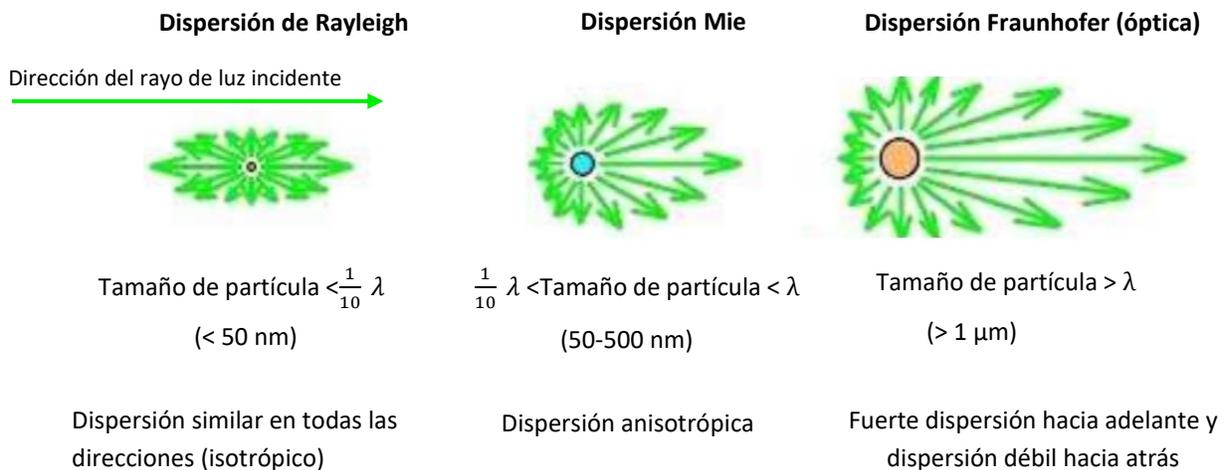


Figura IA7. Diferencias entre los patrones de dispersión de Rayleigh, Mie y Fraunhofer.

En una determinación por DLS, una muestra diluida en medio líquido es irradiada con haz de luz láser de longitud de onda λ_0 . El movimiento browniano de las partículas en suspensión origina fluctuaciones temporales en la intensidad (I) de la luz dispersada a un ángulo de medición θ , como se indica en la Figura IA8.

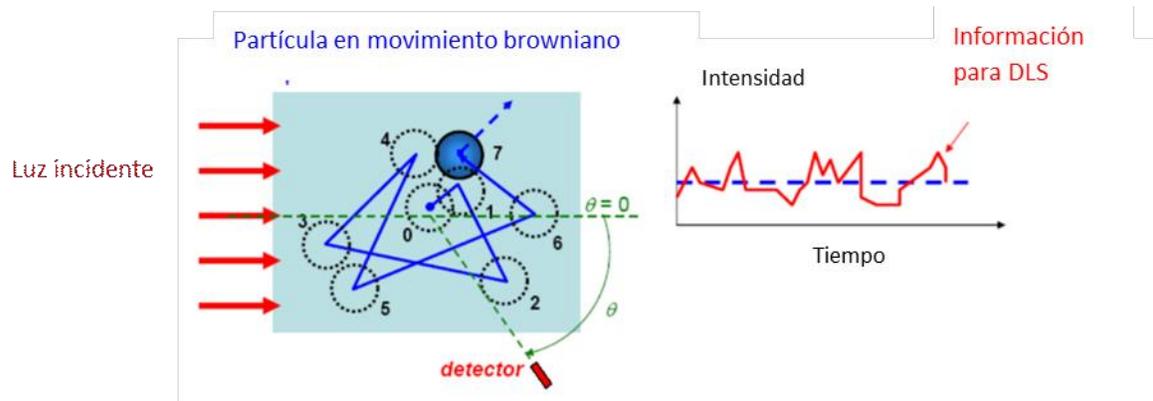


Figura IA8. Diagrama explicativo sobre cómo el tamaño de las partículas se determina correlacionando las variaciones en la intensidad de la luz con el movimiento browniano de las partículas (figura extraída de <http://www.gp.santafe-conicet.gov.ar/cursos/a/a.25.pdf>).

La luz dispersa se detecta durante un cierto período para monitorear el movimiento de las partículas. La intensidad de la luz dispersa no es constante, sino que fluctuará con el tiempo.

La velocidad de estas fluctuaciones en la intensidad en cada punto depende del tamaño de partícula. Las partículas pequeñas hacen fluctuar la intensidad dispersada más rápidamente que las partículas grandes. Por otro lado, las partículas más grandes dan como resultado amplitudes más altas entre las intensidades de dispersión máxima y mínima, como se muestra en la Figura IA9.

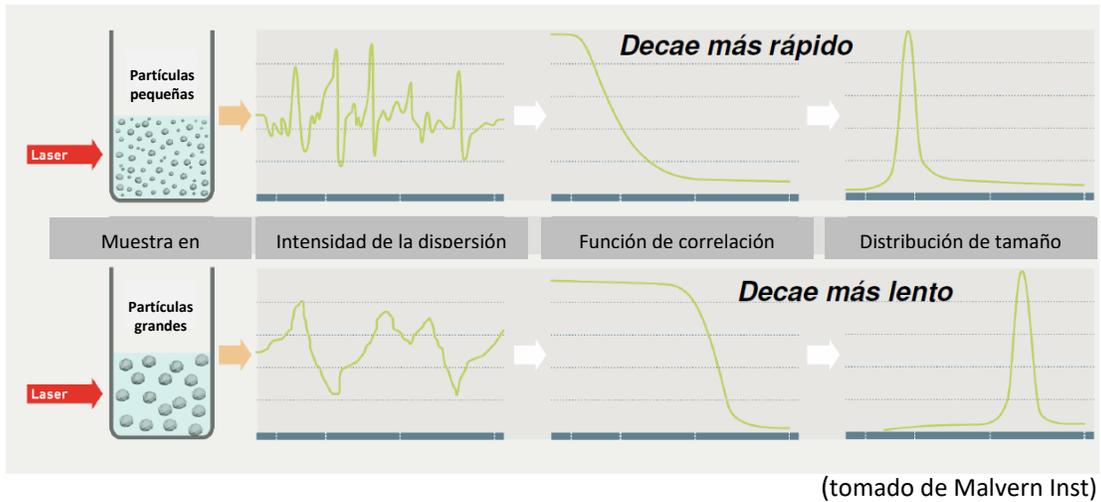


Figura IA9. Representación de las fluctuaciones de la intensidad de la dispersión en el tiempo, la función de correlación y la distribución de tamaño, dependiendo del tamaño de partícula.

La intensidad de la señal a un tiempo t es comparada con la intensidad intervalos de decaimiento cortos (τ) (orden de los microsegundos), entonces se calcula la correlación entre las intensidades de estas dos señales. El equipo construye una función de correlación de la intensidad de la luz dispersada (que es una función de decaimiento exponencial) se obtiene mediante la Ecuación IA2 para muestras con partículas monodispersas puras (Bhattacharjee, 2016).

$$G(\tau) = 1 + b \times e^{-2Dq^2\tau} \quad \text{Ec. IA2}$$

donde, b es una constante dependiente del instrumento y las configuraciones ópticas, D es el coeficiente de difusión traslacional y q es el vector de dispersión calculado con la Ecuación IA3.

$$|q| = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0 \sin \frac{\theta}{2}} \quad \text{Ec. IA3}$$

donde, n_0 es el índice de refracción del solvente, λ_0 es la longitud de onda en vacío, y θ es el ángulo de dispersión.

La velocidad del movimiento browniano de una partícula se define por una propiedad conocida como coeficiente de difusión traslacional (\mathfrak{D}). Por DLS se miden las fluctuaciones temporales de la luz dispersada, a partir de la determinación del coeficiente de difusión traslacional \mathfrak{D} y éste se relaciona con el tamaño de la partícula mediante la ecuación de Stokes-Einstein (Thomas *et. al*, 2017) (Ecuación IA4):

$$d(h) = \frac{Kb T}{3 \pi \eta \mathfrak{D}} \quad \text{Ec. IA4}$$

donde:

$d(h)$ = diámetro hidrodinámico

Kb = constante de Boltzmann (1.38×10^{-23} J/K)

T = temperatura absoluta

η = viscosidad del medio dispersante

\mathfrak{D} = coeficiente de difusión traslacional

El diámetro hidrodinámico es el diámetro de una hipotética esfera sólida (esfera equivalente) que difunde con la misma velocidad que la partícula en estudio suponiendo una capa de hidratación que rodea la molécula (Thomas *et. al*, 2017) (Figura IA10).

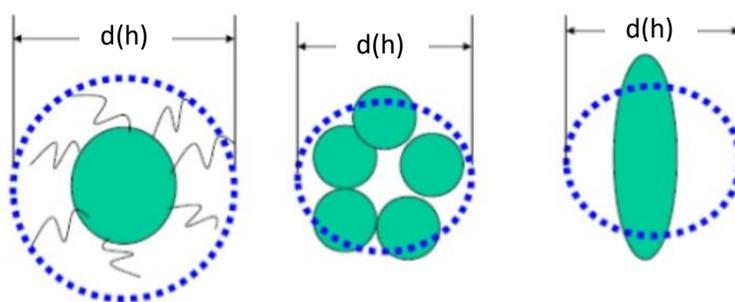


Figura IA10. Representación del diámetro hidrodinámico $d(h)$, de diferentes tipos de muestras.

IA.1.3.6. Potencial zeta (ζ)

En una solución iónica, las partículas con carga neta tendrán una capa de iones (de carga opuesta) fuertemente unida a su superficie; esto se conoce como la **capa Stern**. Una segunda **capa exterior difusa** se compone de iones asociados de forma débil. Estas dos capas se denominan colectivamente la **doble capa eléctrica** (Figura IA11).

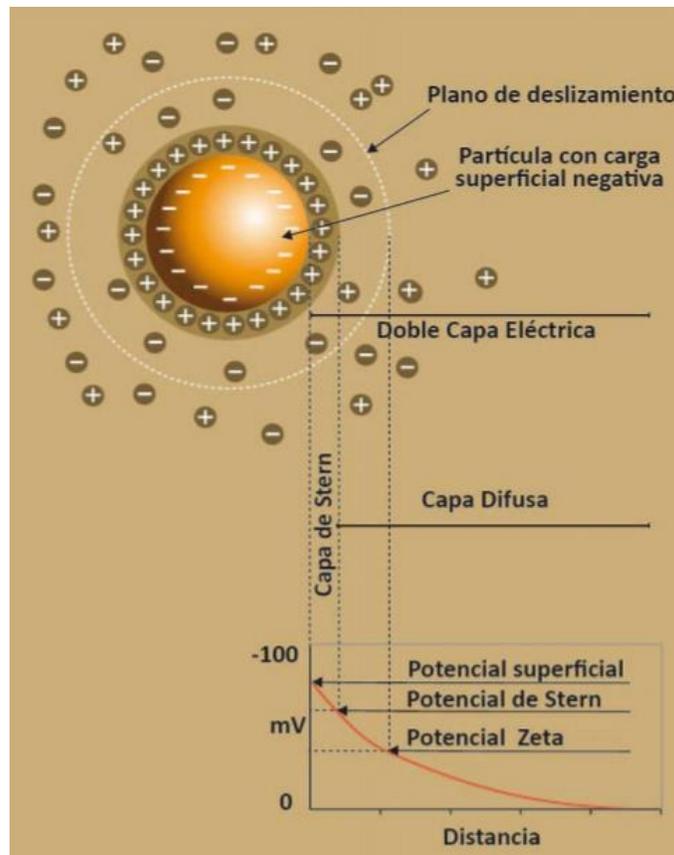


Figura IA11. Esquema que muestra la doble capa eléctrica en una partícula cargada negativamente. Inmediatamente unida está la capa Stern fuertemente adherida que comprende iones de carga opuesta.

Luego se desarrolla una capa difusa que consta de cargas negativas y positivas. Durante la electroforesis, la partícula con la doble capa eléctrica adsorbida se mueve hacia el electrodo de carga opuesta, y el potencial zeta es el potencial electrocinético en el plano de deslizamiento.

En presencia de un campo eléctrico aplicado, las partículas cargadas se desplazan hacia el electrodo de carga opuesta. A medida que las partículas se mueven se crea una distinción entre los iones en la capa difusa que se mueven con la partícula y los iones que permanecen con el dispersante (Clogston & Patri, 2011).

El potencial electrostático en este límite del "plano de deslizamiento" se denomina potencial zeta y está relacionado con la carga superficial de la partícula.

En las mediciones de potencial zeta, se aplica un campo eléctrico a través de la muestra y se mide el movimiento de las partículas (movilidad electroforética) mediante velocimetría láser Doppler. Las partículas con un potencial zeta entre -10 y $+10$ mV se consideran aproximadamente neutras, mientras que aquellas con potenciales zeta de más de $+30$ mV o menos de -30 mV se consideran fuertemente catiónicas y aniónicas, respectivamente.

Como el potencial zeta no se puede medir directamente, se deduce de la movilidad electroforética de partículas cargadas bajo un campo eléctrico aplicado. La movilidad electroforética (U_e) de las partículas se calcula primero de acuerdo a la Ecuación IA5.

$$U_e = \frac{V}{E} \quad \text{Ec. IA5}$$

donde V es la velocidad de las partículas ($\mu\text{m/s}$) y E , la intensidad del campo eléctrico aplicado (V/cm) (ambas variables conocidas).

Luego, la **ecuación de Henry** se usa para calcular el potencial zeta, ζ (Clogston & Patri, 2011) (Ecuación IA6).

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad \text{Ec. IA6}$$

donde U_e es la movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica, η es la viscosidad del medio, ζ es el potencial zeta, $f(Ka)$ es la función de Henry y Ka es una medida de la relación del radio de la partícula y del grosor de la doble capa eléctrica.

Cuando el grosor de la doble capa eléctrica de la partícula es mucho menor que el radio de las partículas, lo que puede darse con partículas más grandes (hasta $1 \mu\text{m}$) dispersas en soluciones acuosas de alta concentración de sales (10^{-2} M), el valor de $f(Ka)$ es tomado como 1.5 y la ecuación de Henry se modifica en la **ecuación de Helmholtz-Smoluchowski** (Bhattacharjee, 2016) (Ecuación IA7).

$$U_e = \frac{\varepsilon z}{\eta} \quad \text{Ec. IA7}$$

Por el contrario, cuando el grosor de la doble capa eléctrica de la partícula es mucho mayor que el radio de las partículas, lo que puede darse con partículas más pequeñas (≤ 100 nm) dispersas en soluciones de baja concentración de sales (10^{-5} M), el valor de $f(Ka)$ es tomado como 1 y la ecuación de Henry se modifica en la **ecuación de Hückel**, (la cual es raramente aplicada) (Ecuación IA8):

$$U_e = \frac{2\varepsilon z}{3\eta} \quad \text{Ec. IA8}$$

IA.1.3.7. Espectroscopía Mössbauer

La espectrometría Mössbauer es un método para determinar el estado de oxidación química y el entorno de los elementos químicos.

La espectrometría Mössbauer se trata de una técnica de resonancia nuclear que utiliza la emisión de rayos gamma desde un núcleo radiactivo, seguido por la absorción selectiva de dichos fotones en otro núcleo cercano. El fenómeno es extremadamente sensible a pequeñas diferencias entre la estructura del núcleo emisor y el núcleo absorbente. La absorción depende fuertemente del estado electrónico, químico y magnético de los átomos que componen el material en estudio (Veiga, 2008).

Para entender el mecanismo del efecto Mössbauer es necesario comprender previamente algunos principios fundamentales como la absorción resonante, la emisión libre de retroceso y el efecto Doppler.

Absorción resonante

Una fuente radiactiva emite un fotón durante la transición desde un nivel determinado de energía a uno de energía inferior. Estos fotones de alta energía (desde keV hasta unos pocos MeV) se denominan rayos gamma. Para que un fotón pueda ser absorbido por un núcleo, su energía debe ser exactamente igual a la diferencia entre dos de sus estados de energía. Este fenómeno se denomina absorción resonante (Veiga, 2008).

El factor más importante en la distribución de energía de los fotones emitidos es la vida media del estado excitado τ . El nivel de referencia tiene vida infinita y por lo tanto no tiene

incertidumbre en su energía (Veiga, 2008). En cambio, un estado excitado tiene una vida media de un microsegundo o menos, por lo tanto existirá una distribución en la energía de los rayos gamma con un ancho Γ a mitad del máximo, de acuerdo a la Ecuación IA9:

$$\Gamma\tau = \frac{h}{2\pi} \quad \text{Ec. IA9}$$

donde h la constante de Planck (6.626×10^{-34} Js)

La distribución de energía de los fotones emitidos y absorbidos $N(E)$ está dada por la Ecuación IA10:

$$N(E) = \frac{1}{4} \frac{\Gamma^2}{(E-E_0)^2 + \left(\frac{\Gamma}{4}\right)^2} \quad \text{Ec. IA10}$$

donde E es la energía del estado excitado y E_0 la energía del estado fundamental.

Emisión libre de retroceso

Un rayo gamma que es emitido por un núcleo perteneciente a un átomo libre no puede ser absorbido por un núcleo similar de otro átomo, ya que su energía es menor que la de resonancia. Esto se debe al retroceso que le imprime la emisión al núcleo que está libre. Si en cambio el núcleo emisor se encuentra formando parte de la red de un sólido, la masa del sistema se incrementa drásticamente y la energía consumida en el retroceso es despreciable (Veiga, 2008). Es por este motivo que, para poder aprovechar el efecto Mössbauer, es necesario que el material de estudio esté en estado sólido; si su estado natural fuese líquido, será necesario congelarlo.

Efecto Doppler

Cuando el núcleo emisor está en movimiento respecto del núcleo absorbente, los fotones emitidos experimentan un corrimiento de energía. La energía de un fotón emitido por una fuente que se mueve a velocidad mucho menor que la de la luz puede expresarse de acuerdo a la Ecuación IA11:

$$E_{\gamma} = E_0 \left(1 + \frac{v}{c} \right)$$

Ec. IA11

donde E_0 es la energía del fotón emitido por un núcleo en reposo, v es la velocidad de la fuente respecto del núcleo absorbente y c es la velocidad de la luz.

El aumento de la energía del fotón es proporcional a la velocidad relativa de la fuente (núcleo emisor). Variando dicha velocidad es posible variar la energía de los fotones con gran resolución dentro de un rango muy pequeño (del orden del ancho de los niveles atómicos) (Veiga, 2008).

Rudolph Mössbauer descubrió que, para ciertos niveles de energía, un fotón puede ser emitido desde un núcleo perteneciente a una red sólida, la cual retrocede como una única masa rígida. En estas condiciones la energía perdida en el retroceso es despreciable y el fotón emitido puede excitar a un núcleo absorbente idéntico que se encuentra en una red próxima. En estas circunstancias, demostró que una fracción f_{LM} de los rayos gamma es emitida libre de retroceso, pudiendo ser absorbida por otro núcleo idéntico (Veiga, 2008). La fracción f_{LM} llamada fracción Lamb-Mössbauer, está dada por la Ecuación IA12:

$$f_{LM} = e^{-K^2[x^2]}$$

Ec. IA12

donde $K = 2\pi/\lambda$ (λ es la longitud de onda del rayo gamma) y $[x^2]$ es el valor cuadrático medio del desplazamiento térmico del átomo.

La técnica Mössbauer consiste en utilizar el mismo tipo de núcleo en dos sólidos. En uno de ellos se utiliza el núcleo en estado de radiación o excitado y en el otro en estado absorbente o fundamental. Así es posible absorber en el segundo la radiación gamma del primero (Veiga, 2008). El método es tan sensible que si un sólido se mueve con relación al otro con una velocidad tan baja como un milímetro por segundo la resonancia es destruida por el efecto Doppler. La absorción resonante también desaparecerá si los estados de energía, tanto de la fuente como del absorbente, son afectados por algún parámetro externo, como por ejemplo ante la aplicación de campo magnético o la variación de la temperatura. En este caso puede variarse la velocidad relativa entre la fuente y el absorbente hasta restablecer la absorción resonante, pudiéndose así cuantificar los efectos de dicho parámetro (Veiga, 2008).

En la implementación de la técnica, la fuente radiactiva se monta sobre un transductor electromecánico (usualmente un motor lineal) que le imprime un movimiento longitudinal oscilatorio de valor medio nulo. Los fotones emitidos por dicha fuente sufren una modulación de su energía debido al efecto Doppler, desde un mínimo a la máxima velocidad negativa, pasando por velocidad nula hasta un máximo a la máxima velocidad positiva.

Con el eje de dicho transductor se alinean el absorbente que se desea estudiar y un detector de rayos gamma, como muestra esquemáticamente a continuación (Veiga, 2008) (Figura IA12):

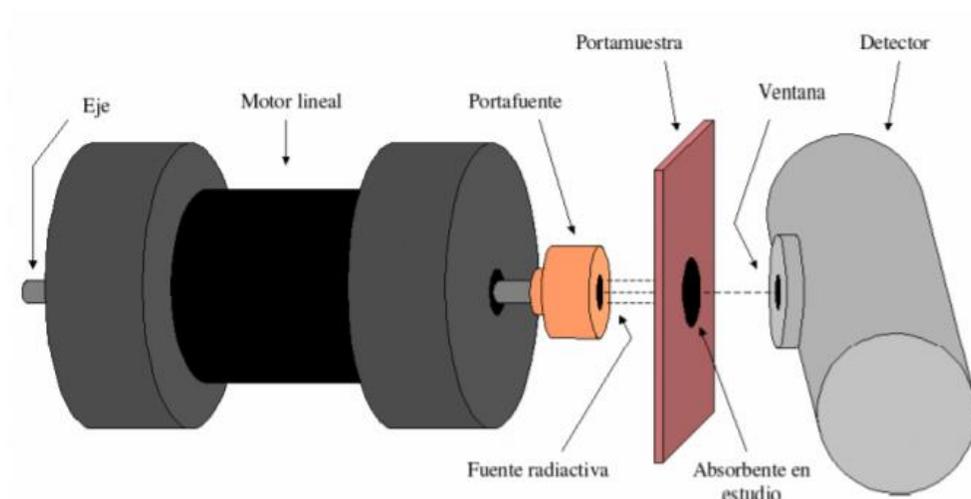


Figura IA12. Disposición del transductor electromecánico, la fuente, el absorbente en estudio y el detector en un espectrómetro Mössbauer típico.

Cada fotón que llega al absorbente tiene una cierta probabilidad de resonar en un núcleo idéntico. El resto de los fotones atraviesan el material sin ser absorbidos. Los núcleos que atrapan fotones adquieren un nivel excitado de energía. Luego de un tiempo en ese estado (vida media del estado excitado) un nuevo fotón será emitido isotrópicamente (en cualquier dirección), con lo cual la probabilidad de que llegue al detector puede ser considerada despreciable (Veiga, 2008). Por lo tanto, los fotones que tienen la cantidad de energía exacta como para quedar atrapados en un núcleo del absorbente nunca alcanzan al detector.

Al representar la transmisión del material (tasa de conteo del detector) en función de la velocidad de la fuente se obtiene un espectro de absorción como el siguiente (Veiga, 2008) (Figura IA13):

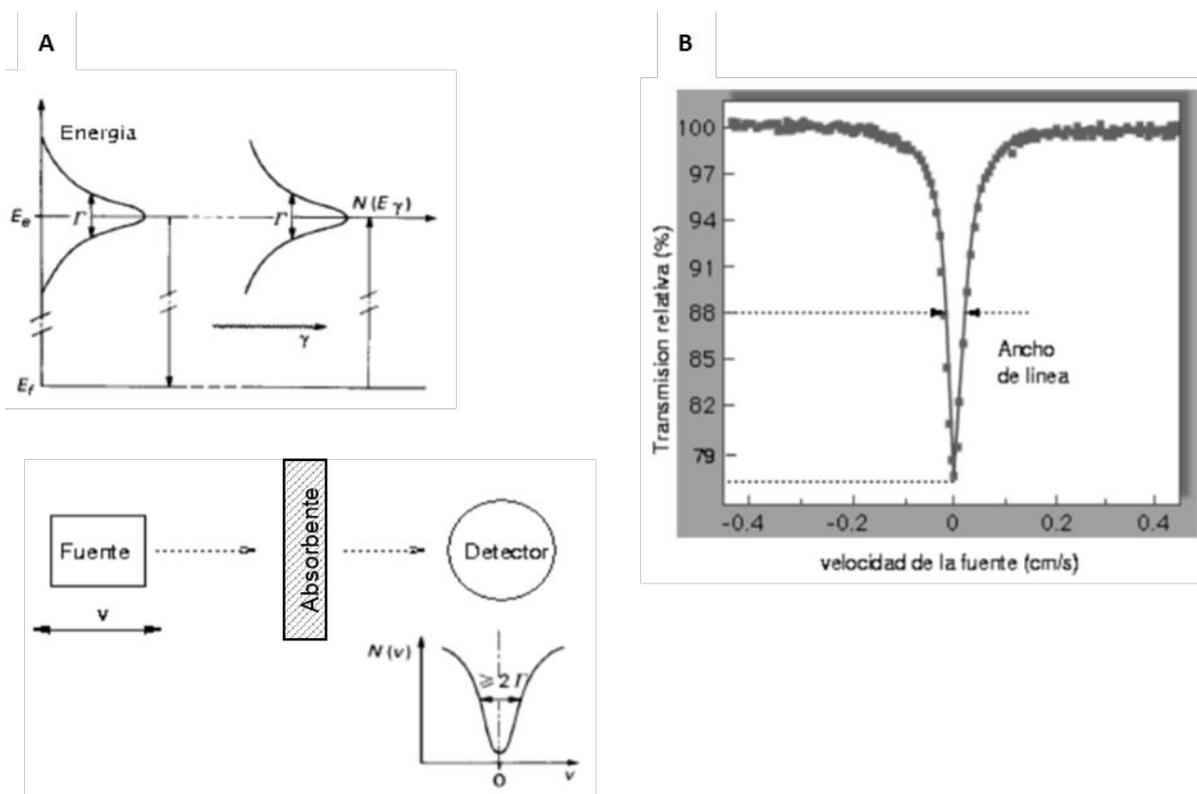


Figura IA13. A) Diagrama esquemático de los niveles energéticos de la fuente y el absorbente, mostrando el efecto resultante en el detector. B) Espectro Mössbauer experimental dado por la transmisión relativa de rayos gamma del absorbente en función de la velocidad de la fuente. (Imagen extraída de Veiga, 2008)

La disminución de la tasa de conteo es causada por la absorción resonante. En el caso de la Figura IA13, la máxima absorción se encuentra en el centro del espectro (velocidad nula), lo cual implica que los estados de energía del absorbente son idénticos a los de la fuente. La forma de la línea de absorción se debe a la convolución de la distribución de la energía del nivel emisor con la del absorbente (ambas de ancho Γ resultando en un ancho teórico de 2Γ (Veiga, 2008).

La principal característica del efecto Mössbauer es que se evidencia muy notoriamente en el hierro y sus compuestos. Por este motivo se ha transformado en una herramienta de estudio muy importante para este tipo de materiales.

Isótopos utilizados

El efecto Mössbauer ha sido observado en más de 100 isótopos, de los cuales el primero fue Ir^{191} , utilizado por Rudolf Mössbauer en 1957. El isótopo más utilizado, dadas sus buenas características y costo, es el Co^{57} que decae en Fe^{57} con estados del núcleo excitados. Otro isótopo bastante utilizado, aunque en menor medida, es el Sn^{119} , en el cual también puede observarse claramente el efecto Mössbauer aunque en algunos materiales el efecto se hace visible solo a muy bajas temperaturas (Veiga, 2008).

Estados de oxidación del hierro

Para el hierro, los estados de oxidación más comunes son: Fe^{2+} y Fe^{3+} , con configuraciones electrónicas de $[\text{Ar}]3d^6$ y $[\text{Ar}]3d^5$, respectivamente. Teniendo en cuenta que la configuración electrónica de Fe es $[\text{Ar}]3d^64s^2$, la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} involucra la pérdida de un electrón 3d y causa una reducción en la coraza de los electrones s externos, provocando una variación de la densidad electrónica (Rojas Ayala, 1999). La oxidación del Fe^{2+} al Fe^{3+} se manifiesta en la disminución del corrimiento isomérico. Así, el estado de oxidación Fe^{3+} proporciona un corrimiento isomérico a velocidad menor que Fe^{2+} . No obstante, cada estado de oxidación tiene diferente corrimiento, dentro de un estado de oxidación el corrimiento puede variar de compuesto a compuesto, debido a efectos de carácter covalente (Rojas Ayala, 1999).

Los rangos aproximados de los corrimientos isoméricos para los iones más comunes de hierro se presentan en la Tabla IA1. Allí, también se muestra una segunda consideración importante llamada efecto de correlación del electrón diferente. Por ejemplo, la configuración $3d^6$ de Fe^{2+} puede existir en las formas de alto espín ($S=2$) o bajo espín ($S=0$), los cuales difieren en sus efectos de apantallamiento sobre los electrones s, y por lo tanto, muestran distintos corrimientos isoméricos (Rojas Ayala, 1999).

Tabla IA1. Rangos aproximados de los corrimientos isoméricos de los iones de Fe más comunes. Estos valores son referidos al hierro metálico (Fe- α) a temperatura ambiente.

		Bajo espín (mm/s)	Alto espín (mm/s)
Fe(0)	Fe	-0.2 a -0.1	---
Fe(II)	Fe ²⁺	-0.2 a +0.5	+0.6 a +1.7
Fe(III)	Fe ³⁺	-0.1 a +0.5	+0.1 a +0.5

Normalmente, el catión ferroso está asociado a un gradiente de campo eléctrico más intenso y un desdoblamiento cuadrupolar más grande, que puede sobrepasar 2 mm/s (Bravo *et al.*, 2007).

Se puede hacer la siguiente comparación entre los dos estados de ionización del catión Fe:

- a) El corrimiento isomérico es mayor en el caso del catión ferroso,
- b) El desdoblamiento cuadrupolar es mayor en el caso del catión ferroso y
- c) Los cationes férricos están asociados a la presencia de magnetización en ciertos materiales.

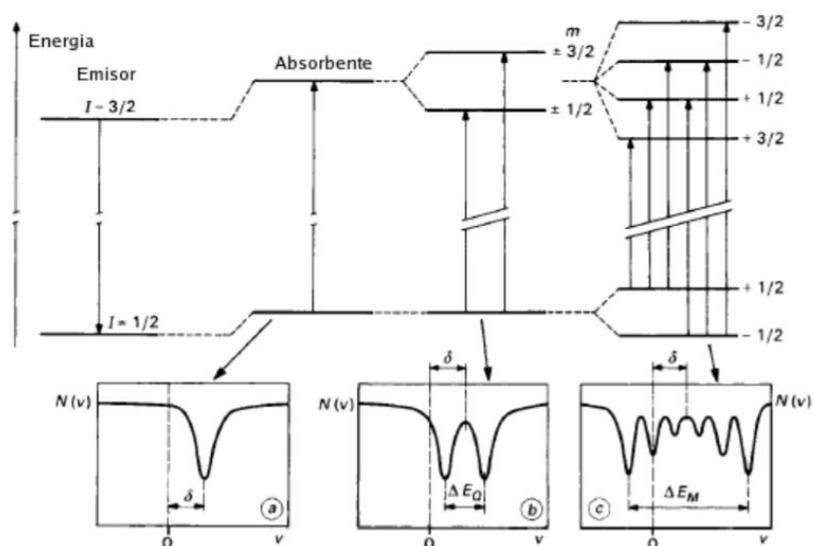


Figura IA14. Interacciones observables en un espectro Mössbauer: a) Corrimiento isomérico, b) desdoblamiento cuadrupolar y c) desdoblamiento magnético (Eymery *et al.*, 2000)

Objetivos específicos

Considerando el importante papel de las sales de sulfato ferroso para mejorar el consumo de hierro, los objetivos de este capítulo son:

- Desarrollar cápsulas de pectina con cationes divalentes de hierro mediante gelificación iónica.
- Realizar una caracterización fisicoquímica y termogravimétrica de las cápsulas liofilizadas.
- Evaluar la liberación de hierro de las cápsulas en los distintos fluidos corporales (digestión gastrointestinal simulada).
- Evaluar la absorción de hierro *in vitro* a nivel intestinal.

(Gran parte de los resultados obtenidos en este capítulo fueron obtenidos en el marco de la estadía en el Departamento de Engenharia Química de la Universidad de Coimbra).

IA.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IA.2.1. Preparación de cápsulas de hierro-pectina

Se utilizó pectina de cáscara de cítricos (ácido galacturónico ≥ 74.0 %, Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina), que fue disuelta en acetato de sodio - ácido acético 0.060 M (Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina) a pH 5.0, para obtener una solución al 4% p/v. La solución de pectina se goteó en una solución de FeSO_4 150 mM usando una aguja de 0.3 mm (~ 10 μL /gota) bajo agitación continua durante 30 minutos. Las cápsulas se filtraron a través de una malla de acero inoxidable de 0.10 mm y se lavaron tres veces con agua destilada. Luego se congelaron a -80 $^\circ\text{C}$ y se deshidrataron por liofilización durante 48 h en un equipo Heto FD4 (Heto Lab Equipment, Dinamarca) (temperatura del condensador: -45 $^\circ\text{C}$; presión de la cámara: 0.04 mbar).

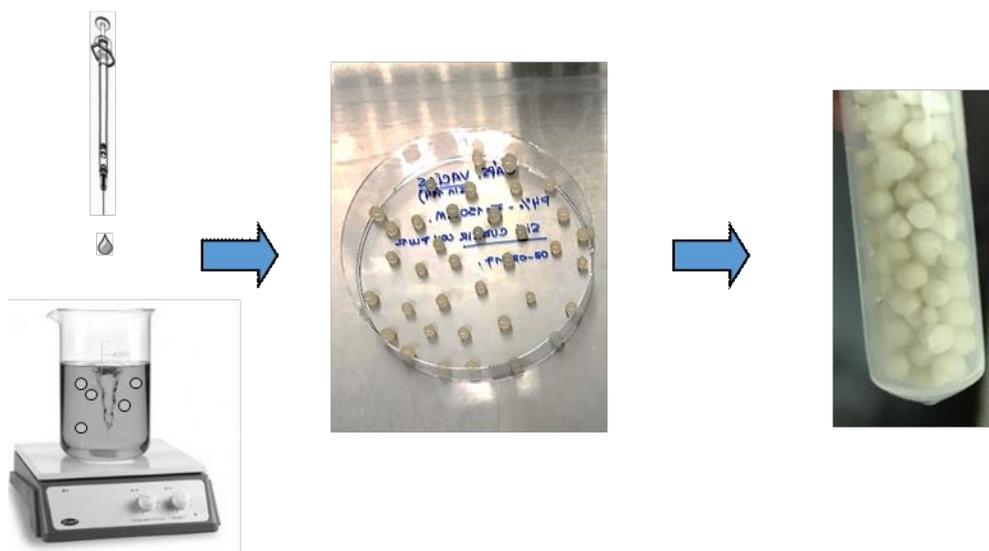


Figura IA15. Esquema de la síntesis de cápsulas de pectina con FeSO_4 mediante gelificación iónica y su aspecto luego de la liofilización.

IA.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las cápsulas obtenidas se montaron en trozos de metal con cinta adhesiva doble faz de carbono, recubierta con volatilización de oro (Polaron Thermo VGScientific, East Grinstead, Sussex, Reino Unido) al vacío y 18 mA a 25 °C (Martin-Dejardin *et al.*, 2013). Las muestras se examinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (FEI La B6, Eindhoven, Países Bajos) a un voltaje de aceleración de 14 kV con un detector de electrones de bajo vacío. Se observaron las características superficiales y para examinar la estructura interna, las cápsulas se cortaron por la mitad con un bisturí de acero.

IA.2.3. Digestión gastrointestinal *in vitro*

Las cápsulas liofilizadas se digirieron en soluciones gastrointestinales simuladas, de acuerdo a Grimoud *et al.* 2010. Para ello, se suspendieron 10 cápsulas (que pesaban alrededor de 3.5 mg y representaban aproximadamente 100 µL de la solución de pectina original) durante 2 minutos en 1.00 mL de saliva simulada [10 mg/mL de α -amilasa de *Bacillus subtilis* en buffer fosfato salino (PBS) (K_2HPO_4 0.144 g/L; NaCl 9.00 g/L; Na_2HPO_4 0.795 g/L, pH 6.8 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). La saliva se eliminó por completo y luego se adicionó 1.00 mL de digestión gástrica simulada (3 mg/mL de pepsina porcina, NaCl 125 mM, KCl 7 mM, $NaHCO_3$ 45 mM, pH 2.5) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a las cápsulas sedimentadas. Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 37 °C en condiciones de agitación continua (50 rpm, MaxQ 4000, Thermo Scientific, EE.UU.). Posteriormente, la solución gástrica se removió completamente y se adicionó 1.00 mL de solución intestinal (1 mg/mL de pancreatina, 1.5 mg/mL de sales biliares, NaCl 22 mM, KCl 3.2 mM, $NaHCO_3$ 7.6 mM, pH 8.0) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) Finalmente, las cápsulas fueron incubadas durante 3 horas a 37 °C, bajo agitación suave continua (50 rpm, MaxQ 4000, Thermo Scientific, EE.UU.).

IA.2.4. Caracterización del *swelling* (hinchamiento) de las cápsulas.

Las cápsulas liofilizadas se pesaron en una balanza analítica (Adventurer Ohaus, Parsippany, NJ, EE.UU., sensibilidad: 0.1 mg), y luego se hidrataron durante 15 minutos en agua y durante 60 minutos en las soluciones gástricas e intestinales simuladas. Posteriormente, las cápsulas se secaron durante 5 minutos a 20 °C en papel de filtro (Whatman n° 1) y se volvieron

a pesar. Se determinó el porcentaje de *swelling* (dado por la capacidad de absorber agua en los intersticios de las microcápsulas) (Ecuación IA13):

$$S = \frac{(Ph-Pd)}{Pd} \times 100 \quad \text{Ec. IA13}$$

donde *S* es el hinchamiento (*swelling*), *Ph* es el peso de las cápsulas hidratadas y *Pd*, el peso de las cápsulas deshidratadas.

IA.2.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de las muestras de pectina comercial en polvo y de las cápsulas de hierro-pectina se estudió mediante termogravimetría de alta resolución modulada Hi-Res-MTGA (TA Instruments Q500, EE.UU.; sensibilidad de equilibrio: 0.1 µg). La calibración de temperatura se realizó midiendo el punto Curie del estándar de níquel en crisoles de platino abiertos, bajo un flujo de purga de nitrógeno seco de 100 mL/min, a una velocidad de calentamiento de 2 °C/min, un período de modulación de 200 s, y una temperatura de amplitud de ± 5 °C. Los experimentos se llevaron a cabo en el rango de temperatura de 20–600 °C.

IA.2.6. Porosimetría de intrusión de mercurio

La porosidad y la distribución del tamaño de poro de las cápsulas liofilizadas se cuantificaron por porosimetría de intrusión de mercurio utilizando el AutoPore IV 9500, de Micromeritics (Atlanta, EE.UU.), a una presión de 0.5 y 30 psi.

IA.2.7. Análisis de fluorescencia de rayos X (XRF)

Las cápsulas de hierro-pectina fueron analizadas por fluorescencia de rayos X y se usó pectina comercial en polvo (ácido galacturónico ≥ 74.0 %, Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina) como control. Las mediciones se realizaron en aire a presión atmosférica en un analizador XRF de alta sensibilidad Hitachi SEA6000VX, con un tubo de rayos X con un objetivo de tungsteno, operando a potenciales de 15 y 50 kV y una corriente de 1000 mA, con un colimador de haz primario de 3 mm de ancho. Se fijó la geometría de medición con el detector semiconductor Vortex Si de dispersión de energía colocado en un ángulo de dispersión de 135°

y a una distancia de 19 mm de la muestra, sin ranuras adicionales que restringieran su ángulo de aceptación. Los resultados se expresaron como porcentaje de los elementos detectados normalizados (no se detectaron elementos livianos).

IA.2.8. Medición del tamaño de partícula y potencial zeta (ζ)

El tamaño de partícula se midió en un analizador Horiba Nano-SZ 100 (Horiba, Japón) a 37 °C. El tamaño hidrodinámico medio de partícula (Z-promedio) se determinó utilizando dispersión dinámica de luz en dispersión hacia atrás (173 °) con el *software* Horiba (Horiba NextGen Projezt SZ100 para Windows).

El potencial ζ se determinó usando una combinación de técnicas de medición: electroforesis y velocimetría láser Doppler (electroforesis láser Doppler). Los valores de potencial ζ fueron proporcionados directamente por el instrumento.

Los valores de media y desviación estándar del Z-promedio y el potencial ζ se obtuvieron de al menos 10 determinaciones para cada muestra.

IA.2.9. Espectroscopía de Mössbauer

Las mediciones Mössbauer ^{57}Fe se realizaron en geometría de transmisión (a 20 °C) sobre cápsulas de hierro-pectina previamente trituradas. Se usó una fuente $^{57}\text{Co/Rh}$ con aproximadamente 10 mCi, en un espectrómetro Mössbauer en modo de aceleración constante convencional (WissEL). El espectro se ajustó mediante el ajuste de cuadrados mínimos de varias líneas usando el programa NORMOS (Brant, 1994).

IA.2.10. Cultivo de células Caco-2/TC7

Se trabajó sobre la línea celular de enterocitos humanos Caco-2/TC7, crecida en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, EE. UU.), suplementado con 15 % v/v suero fetal bovino inactivado por calor (30 min a 60 °C), 1 % p/v de aminoácidos no esenciales y 1 % v/v de solución de penicilina-estreptomina (100 U/mL de penicilina G, 100 g/mL de estreptomina). Las células cultivadas se incubaron a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% de aire. Durante los experimentos, el medio DMEM suplementado se reemplazó por medio DMEM sin antibióticos ni suero fetal bovino.

IA.2.11. Absorción de hierro por células Caco-2/TC7

Las células Caco-2/TC7 se sembraron en confluencia aproximada de 2.0×10^5 células/mL en matraces de cultivo de 25 cm². Las células se mantuvieron en las condiciones de cultivo descritas anteriormente y, para los experimentos de absorción de Fe, se utilizaron a los 7–8 días posteriores a la siembra. Antes del experimento, las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS. Luego, se añadió DMEM fresco con una concentración final de Fe 200 µM (tanto como solución de FeSO₄ digerido, o como el Fe calculado proveniente de una desintegración completa de las cápsulas digeridas). Las células se incubaron con las diferentes soluciones de Fe o con medio DMEM (control) a 37 °C durante 2, 4 y 6 h. Después de cada período de incubación, el medio se removió y las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS-EDTA 2 mM para eliminar cualquier resto de Fe adherido aleatoriamente a las membranas celulares. Luego, se añadió agua milli Q y las monocapas se removieron mecánicamente con raspadores de células. Las suspensiones celulares se sonicaron en un homogeneizador ultrasónico Sonic Ruptor 400 (Omni-International, Georgia, EE.UU.) Al 40% de amplitud con 3 ciclos de 15 s manteniendo la muestra a 4 °C. Los lisados celulares se congelaron a -80 °C, se liofilizaron y se resuspendieron en agua ultrapura para lograr una concentración 15 veces mayor del volumen original. Los lisados concentrados se usaron luego para determinar la concentración de hierro. El proceso de liofilización se realizó a -50 °C y 0.04 mbar en un liofilizador Rificor L-A-B4-C (Buenos Aires, Argentina).

IA.2.12 Transporte transepitelial de las cápsulas en células Caco-2/TC7

Las monocapas de células Caco-2/TC7 se obtuvieron sembrando 0.2 mL de células Caco-2/TC7 en filtros de membrana de policarbonato (tamaño de poro de 8.0 µm, área de crecimiento de 1.12 cm²) dentro de cámaras de cultivo de células Transwell (Corning Costar Cambridge, MA, EE. UU.) a una confluencia de 4×10^5 células/cm², y cultivadas de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección IA.2.10. Luego de 7 días, la integridad de las monocapas Caco-2/TC7 se confirmó determinando la resistencia eléctrica transepitelial utilizando un sistema Millicell-ERS (MilliCell Corporation, Billerica, MA, EE.UU.). Las células con valores de resistividad eléctrica transepitelial de alrededor de 300-400 Ωcm² se utilizaron para estudios de transporte transepitelial. Antes del experimento, las monocapas se lavaron dos veces con PBS, y luego los compartimientos basolaterales se llenaron con 0.8 mL de DMEM fresco sin suero fetal bovino. Al compartimento apical se le agregaron 0.2 mL de DMEM con concentración final de Fe 200 µM,

proveniente de la solución de FeSO_4 digerido (control) y de cápsulas de hierro-pectina digeridas (Figura IA15). Luego, la placa Transwell se incubó a 37°C durante 2, 4, 6, 8 y 12 h. Después de cada período de incubación, el volumen total de la cámara basolateral se retiró y se congeló a -80°C . Las muestras congeladas se liofilizaron, y se resuspendieron en $80\ \mu\text{L}$ de agua millQ, alcanzando así una concentración 10 veces mayor que la original.

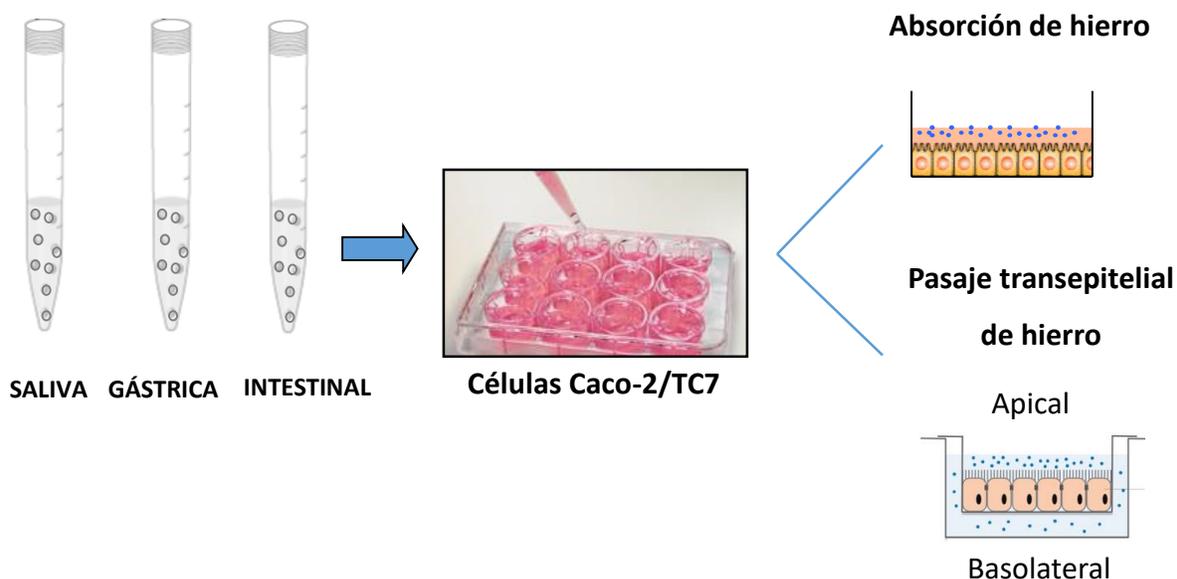


Figura IA16. Esquema del ensayo de absorción y pasaje de hierro en células Caco-2/TC7 expuestas a las cápsulas o a FeSO_4 digeridos previamente.

IA.2.13. Mediciones de absorción de hierro y transferencia basal en células Caco-2/TC7

La absorción de hierro y la transferencia basal en las células Caco-2/TC7 se midieron utilizando el ensayo colorimétrico de Fer-Color (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina). Para ello, se redujo el hierro con ácido mercaptoacético y luego, se usó piridil-bis-fenil-triazin sulfonato para formar complejos con el hierro reducido. La absorbancia del complejo coloreado se midió a

560 nm en un lector de microplacas de fluorescencia Synergy HT (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, EE.UU.).

IA.2.14. Reproducibilidad de resultados

Todos los experimentos se realizaron en duplicado utilizando tres preparaciones independientes. Las diferencias relativas fueron reproducibles independientemente de la preparación empleada. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con el software estadístico Infostat v2009 (Córdoba, Argentina). La comparación de las medias se probó utilizando los métodos de Tukey, y si $p < 0.05$, la diferencia se consideró estadísticamente significativa.

IA.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IA.3.1. Caracterización física y química de las cápsulas

Las cápsulas de hierro-pectina resultaron ser esféricas, con un diámetro de 1 a 2 mm, una superficie externa bastante lisa, cuya estructura interna mostró una textura compacta con orificios regulares (Figura IA17).

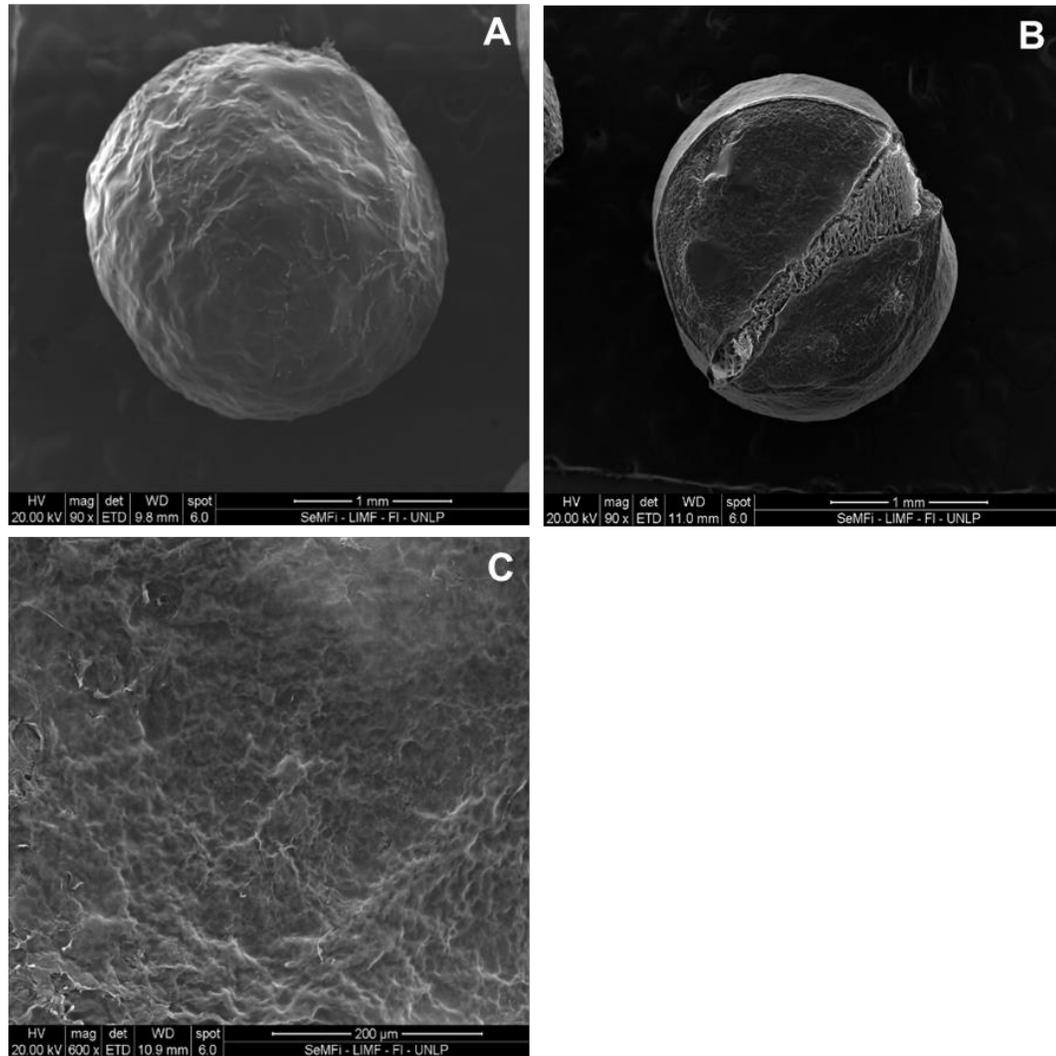


Figura IA17. Microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes corresponden a la superficie externa (A), a un corte parcial (B) y a la superficie interna (C) de las cápsulas de hierro-pectina.

El grado de hinchamiento (*swelling*) es una propiedad determinante en los sistemas de liberación de bioactivos. Para las cápsulas de hierro-pectina, el comportamiento del *swelling* demostró ser dependiente del pH del medio (Figura IA18). Las cápsulas se hincharon menos cuando se expusieron al medio gástrico ácido (pH 1.25). Günter y Popeyko, 2016; Oliveira *et al.*, 2010 informaron que el *swelling* es mayor en medio intestinal (pH 8) que en medio gástrico. Este comportamiento puede explicarse sobre la base de la solvatación de los grupos carboxilato existentes a dicho pH, la repulsión electrostática de los sitios aniónicos fijos, y la expansión de las cadenas poliméricas que facilitan el acceso de moléculas de agua (Rathee *et al.*, 2019). Como

las pectinas son polielectrolitos aniónicos, los cambios de pH del entorno afectan su conformación (Narkar *et al.*, 2010).

El pKa de las pectinas es de aproximadamente 3.5 (Einhorn-Stoll, 2018). En medio ácido ($\text{pH} < \text{pKa}$) existe una alta concentración de iones H^+ que mantiene los grupos carboxilo en su estado protonado, reduciendo así la repulsión electrostática. Por lo tanto, las cadenas de polímeros se vuelven más compactas, dificultando la penetración de líquido en el sistema y reduciendo la solubilidad de las cadenas de polímeros (Oliveira *et al.*, 2010; Prezotti *et al.*, 2014). A $\text{pH} > \text{pKa}$ ionizada se disocia el proton del grupo carboxilo, dando lugar a carboxilato, lo que aumenta la hidrofiliidad y promueve la expansión de la red como resultado de la repulsión electrostática. Ambos factores favorecen la penetración de líquido en el sistema (Prezotti *et al.*, 2014). Por lo tanto, los polímeros muestran una mayor capacidad de retención de agua (*swelling*) a pH 8 (el medio intestinal). Este comportamiento también puede atribuirse a la presencia de aniones hidróxido (OH^-) en el medio, que pueden favorecer la liberación de iones Fe (II) que actúan como puntos de reticulación de las cadenas de pectina, lo que resulta en un aumento de la captación de agua por estos sistemas (Remuñán-López y Bodmeier, 1997).

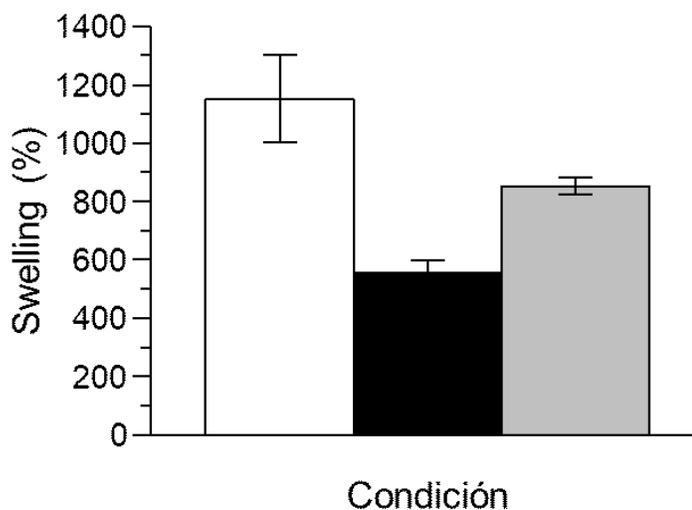


Figura IA18. Capacidad de retención de agua (*swelling*) de las cápsulas de hierro-pectina luego de ser expuestas durante 60 minutos a agua (barra blanca), a solución gástrica simulada (barra negra) o a solución intestinal simulada (barra gris).

La porosidad de las cápsulas de hierro-pectina se determinó por porosimetría de intrusión de mercurio utilizando dos rangos de presión (Tabla IA2). En el rango de presiones bajas (0.5–33000 psi), los intersticios (espacios entre partículas) fueron los principales contribuyentes a la porosidad. A su vez, en el rango de altas presiones, la porosidad fue determinada principalmente por los poros (espacio intrapartículas). Esto explica la disparidad entre los resultados presentados en la Tabla IA2, que se atribuyen a los intersticios. De hecho, las cápsulas mostraron baja densidad (0.09 g/mL) y ninguna porosidad significativa (4.56 %) a altas presiones. Por el contrario, se observó una mayor densidad (1.29 g/mL) y una alta porosidad (93.28 %) a bajas presiones, lo que indica que las cápsulas son altamente permeables, incluso cuando se exponen a baja presión.

Tabla IA2. Porosimetría de intrusión de mercurio de las cápsulas de hierro-pectina.

Rango de presión (psi):	0.5 - 33000	30 - 33000
Área total de poros (m ² /g)	3.51	2.08
Diámetro medio de poro (en función del volumen) (μm)	30.19	1.51
Diámetro medio de poro (en función del área) (μm)	1.83	0.72
Diámetro promedio de poro (4V/A) (μm)	12.27	1.01
Densidad aparente a presión inicial (g/mL)	0.087	0.087
Densidad aparente (g/mL)	1.29	0.09
Porosidad (%)	93.28	4.56

La composición química de las cápsulas y de la pectina cítrica comercial se midió por XRF (Tabla IA3). Los resultados indican claramente el aumento en la concentración de hierro luego de la encapsulación. La disminución en la cantidad de cationes intrínsecos de la pectina comercial en polvo [Cu (II), K⁺] puede atribuirse a su intercambio con Fe (II) en la gelificación iónica. El Fe (II) resultó atrapado en las cápsulas, y los iones sulfato de la sal de hierro también fueron retenidos.

Tabla IA3. Análisis XRF de las cápsulas de hierro-pectina y de polvo de pectina cítrica comercial. Se informan los valores relativos porcentuales. Se calcularon considerando elementos detectables (n.d.: no detectado).

Elemento	Cápsulas de hierro-pectina (%)	Pectina comercial en polvo (%)
S	20.28 ± 0.53	n.d.
Cl	0.61 ± 0.18	n.d.
Ca	0.66 ± 0.09	64.27 ± 1.43
Cr	0.24 ± 0.02	n.d.
Mn	0.30 ± 0.03	n.d.
Fe	77.77 ± 0.23	3.00 ± 0.30
Cu	0.03 ± 0.02	0.42 ± 0.09
Zn	0.06 ± 0.02	0.30 ± 0.06
Br	0.06 ± 0.01	n.d.
K	n.d.	32.01 ± 0.67

En la Figura IA19 se presenta el espectro de Mössbauer de las cápsulas a 20 °C. El espectro se puede descomponer en tres dobletes, D1, D2 y D3 (Tabla IA4), correspondientes a los iones Fe (II) (D1 y D2) y Fe (III) (D3). Los iones Fe (II) fueron el componente principal (71.5 %) del espectro, y se observaron en dos microambientes ferrosos.

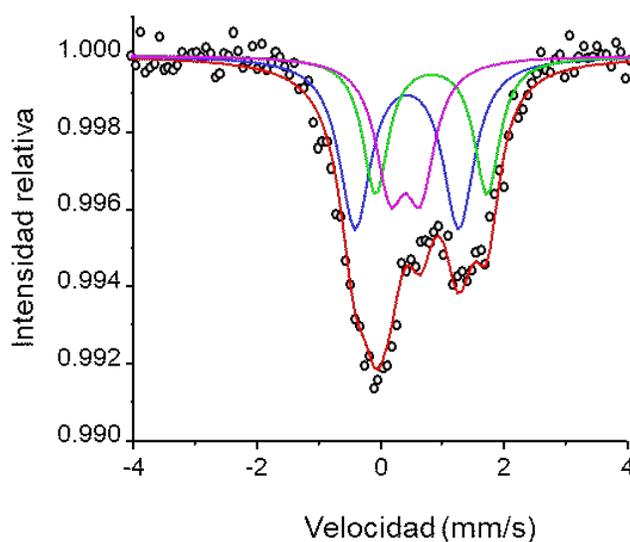


Figura IA19. Espectro de Mössbauer de las cápsulas de hierro-pectina registrado a 20 °C. Línea roja: hierro total; línea azul: doblete D1; línea verde: doblete D2; línea fucsia: doblete D3. Los puntos blancos son los datos experimentales.

Tabla IA4. Parámetros de Mössbauer obtenidos del ajuste del espectro que se muestra en la Figura IA19.

Doblete	Corrimiento isomérico (mm/s)	Desdoblamiento cuadrupolar (mm/s)	Área (%)	Atribución
D1	0.60 ± 0.02	1.68 ± 0.01	43.1	Fe(II)
D2	0.92 ± 0.02	1.81 ± 0.01	28.4	Fe(II)
D3	0.45 ± 0.01	0.49 ± 0.01	28.5	Fe(III)

En la Figura IA20 se muestran las curvas TGA de las cápsulas de hierro-pectina y de la pectina comercial (control), y los parámetros principales característicos se presentan en la Tabla IA5. Tanto las cápsulas como los controles tuvieron perfiles de pérdida de masa similares. En el rango de temperatura entre 25 – 200 °C (Figura IA20 A) la pérdida de peso puede atribuirse a la pérdida de humedad de la estructura de polisacárido (Zohuriaan y Shokrolahi, 2004). La mayor pérdida en el caso de las cápsulas (12.5 %) puede explicarse considerando que se obtuvieron en un medio acuoso, lo que significa que podría quedar retenida más agua residual en su estructura. La descomposición térmica de la pectina comenzó por encima de 200 °C (Figura IA20 A), lo cual es consistente con la información publicada sobre la descomposición de los polisacáridos (Zohuriaan & Shokrolahi, 2004; Souto-Maior *et al.*, 2010; Aburto *et al.*, 2015). A partir de los 364 °C (T_{on}) se observa una pérdida de masa (Figura IA20 B), que puede explicarse considerando que la mezcla obtenida a partir de los componentes orgánicos (pectina) e inorgánicos (hierro) al momento de obtener las cápsulas requiere una temperatura más elevada para calcinar toda la materia orgánica.

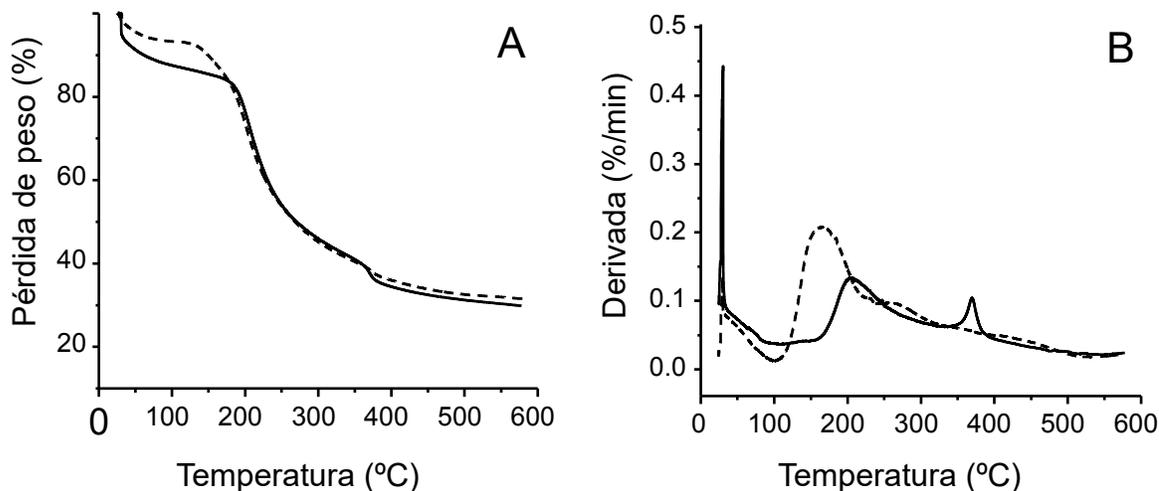


Figura IA20. Análisis termogravimétrico modulado de alta resolución de las cápsulas de hierro-pectina (líneas llenas) y de pectina comercial en polvo (líneas de puntos). A. Pérdida de peso vs. Temperatura. B. Derivada de la pérdida de peso vs. Temperatura.

Tabla IA5. Valores característicos (promedio de al menos dos corridas \pm desvío estándar) obtenidos de las curvas termogravimétricas. Δm - pérdida de masa en cada paso relevante; T_{on} - temperatura de inicio extrapolada; m_{res} - masa residual.

	25 < T/°C < 150	150 < T/°C < 300	T/°C > 300	
	Δm (%)	T_{on} (°C)	T_{on} (°C)	m_{res} (%)
Pectina comercial en polvo	7.1 \pm 0.1	174.6 \pm 0.5	–	30.8 \pm 0.1
Cápsulas de hierro-pectina	13.6 \pm 0.1	188.7 \pm 1.3	363.6 \pm 0.4	28.0 \pm 0.1

El tamaño y el potencial ζ de las cápsulas se analizaron por dispersión dinámica de luz (DLS). La carga de las mismas fue de alrededor de 0. El potencial ζ fue de -1.1 ± 0.7 mV para las cápsulas suspendidas en agua y de -1.2 ± 0.9 mV al final de la digestión simulada. Este resultado permite suponer que se formarían complejos pectina-hierro neutros en la superficie de las cápsulas y que no hay tendencia a adsorber iones de las soluciones en contacto.

Con respecto al tamaño de partícula, como el destino final de las partículas es el intestino, solo se discutirá su tamaño al final del proceso digestivo simulado. Luego de la digestión, la población más pequeña tuvo un tamaño de partícula promedio de $4.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$ con un índice de polidispersión de 5.3 ± 1.4 . Esto lleva a la conclusión de que el proceso de digestión disgregó las cápsulas, reduciendo el tamaño promedio de partícula en comparación con el inicial (1 – 2 mm), que se muestra en la Figura IA17. El índice de polidispersión elevado (y la distribución de tamaños) indica una población de partículas no homogénea, muy probablemente como resultado del proceso de digestión. Considerando que los geles iónicos se prepararon en medios ácidos, la estabilidad de los geles de pectina es máxima a pH cercano a 4 (Sriamornsak, 2003). Por lo tanto, el elevado tamaño de los poros de las cápsulas luego de la exposición al medio gástrico simulado puede atribuirse al *swelling*.

Por el contrario, en condiciones alcalinas, la β -eliminación de los residuos de ácido galacturónico de las pectinas da como resultado la escisión de la cadena y una pérdida muy rápida de viscosidad y de las propiedades gelificantes (Sriamornsak, 2003; Diaz *et al.*, 2007). También se ha informado que el proceso de desmetilación ocurre en condiciones alcalinas (Renard y Thibault, 1996). En base a esta información puede concluirse que la digestión intestinal simulada fue el principal proceso que dio lugar a la alteración del tamaño de las cápsulas en este trabajo de tesis. Estos resultados indicarían que en solución el hierro se libera de las cápsulas, se oxida y se puede encontrar como complejo de oligopectina Fe (III) soluble en agua.

IA.3.2. Absorción de hierro y transporte transepitelial

El contenido total de hierro de las cápsulas sería de $2.06 \pm 0.01 \text{ mM}$, si se liberara completamente a los medios gástrico-intestinal. La concentración de hierro liberado en la saliva fue baja (0.12 mM), aumentando a 0.79 y 0.77 mM luego de la exposición a las condiciones gástricas e intestinales, respectivamente (Ghibaudo *et al.*, 2017). La Figura IA21 A representa la absorción del hierro que llega al intestino, por las células Caco-2/TC7. La fuente de hierro [FeSO_4 (control) o cápsulas de hierro-pectina] no tuvo efecto significativo sobre la captación del mineral (Figura IA21 A). La absorción promedio del metal fue de $13.98 \pm 2.53 \mu\text{M}$, que representa el 6.98 % del hierro total agregado a las células, lo cual es consistente con estudios similares realizados por otros autores (Scheers *et al.*, 2014). Los valores de absorción de hierro alcanzados después de las 2 h de incubación se mantuvieron, durante el experimento, sin diferencias significativas a lo largo del tiempo. Se sabe que la acumulación de hierro es un proceso rápido en condiciones de saturación, con un rápido aumento de la absorción del metal durante los primeros 40-60

minutos. Esto conduce a una meseta en la concentración de hierro dentro de las células (Halleux & Schneider, 1994).

La absorción de hierro inorgánico libre soluble a nivel intestinal se produce en el borde en cepillo de los enterocitos. Mientras que el Fe (II) se absorbe directamente, la absorción del Fe (III) está mediada por un transportador de metal divalente 1 (DMT1) que introduce el hierro previamente reducido a Fe (II), a través de la membrana del borde en cepillo por DMT1 (Steele *et al.*, 2005). Por otro lado, se demostró que los polioxo-hidróxidos de Fe (III) nanoparticulados (insolubles a pH duodenal) y otras partículas de hierro de tamaño nanométrico que varían de 9 μm a 50 nm pueden ser absorbidos por los enterocitos utilizando diferentes vías endocíticas (Pereira *et al.*, 2014; Perfecto *et al.*, 2017).

En este trabajo de tesis se observó que, luego de la digestión, parte del hierro fue liberado de las cápsulas como Fe(II) / Fe(III), y parte quedó retenido en la red polimérica de las cápsulas digeridas, que exhibieron un tamaño Z promedio de $4.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$ (ver sección IA.3.1). Por lo tanto, ambos mecanismos de absorción de hierro son factibles para explicar la incorporación del hierro de las cápsulas por parte de las células Caco-2/TC7.

El hierro agregado al compartimiento apical de las monocapas de células Caco-2/TC7 se recuperó en el compartimiento basal y fue proporcional al tiempo de exposición (Figura IA21 B). Durante las primeras 4 h de incubación, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) independientemente de que el hierro proviniese de FeSO_4 (control) o de las cápsulas. Después de ese tiempo, el transporte del hierro proporcionado por las cápsulas fue significativamente mayor que el del hierro del control (Figura IA21 B).

El pasaje de hierro a través de las células intestinales es un proceso más lento que la absorción de hierro. Dependiendo de la fuente de hierro, la concentración máxima del metal en la cámara o compartimiento basal de los modelos *in vitro* ocurre después de las 4 - 24 h de incubación (Sánchez *et al.*, 1996). Como el pasaje de hierro a través de las monocapas de células Caco-2/TC7 es un proceso de muy baja eficiencia, solo una pequeña proporción (menos del 2 %) del hierro total que proviene de las fuentes generalmente utilizadas (FeSO_4 o citrato de Fe), es transportado (Sánchez *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2013). Esto refleja la eficiencia limitada del transporte de hierro *in vivo*. En este trabajo, la incubación de las células Caco-2/TC7 con las cápsulas digeridas mostró un aumento significativo del pasaje de hierro en comparación con los controles (FeSO_4), lo que constituye una estrategia interesante para resolver el problema de la baja eficiencia del pasaje de hierro a través de las células.

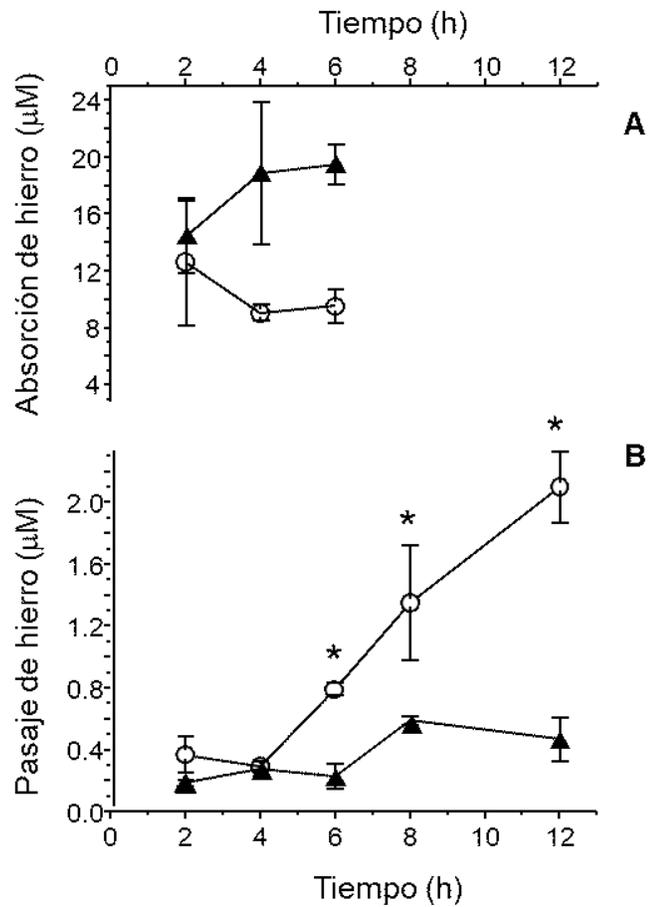


Figura IA21. A. Captación de hierro en células Caco-2/TC7. Las células se incubaron durante diferentes tiempos en DMEM con dos fuentes de hierro: FeSO₄ (control, triángulos) y cápsulas de hierro-pectina digeridas (círculos). La concentración final de Fe en ambas condiciones fue de 200 µM. B. Pasaje transepitelial del hierro en monocapas de células Caco-2/TC7. Las fuentes de hierro fueron FeSO₄ (triángulos) o cápsulas de hierro-pectina digeridas (círculos) y se agregaron al compartimento superior en contenido inicial de Fe equivalente a 200 µM. En diferentes momentos, se determinó el contenido de Fe del compartimento basal. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

IA.4. CONCLUSIONES

Las cápsulas de pectina-hierro demostraron ser un buen sistema para el *delivery* de hierro ya que presentaron un *swelling* dependiente del pH del medio, manteniendo un bajo hinchamiento en medio gástrico y en medio intestinal el *swelling* fue mayor producto de la repulsión electrostática de las cadenas poliméricas con los grupos carboxilos ionizados. Esta característica es una ventaja de la pectina por ser parte de la fibra dietaria, la cual no se hidroliza hasta llegar al intestino.

Por XRF se pudo ver que el mayor contenido de hierro en las cápsulas comparado al contenido en la pectina comercial, claramente indica la incorporación efectiva del hierro luego de la encapsulación. El estado de oxidación del hierro en las cápsulas determinado por espectroscopía Mössbauer resultó ser un 71.5 % Fe(II) y el resto Fe(III), lo que permite predecir que la mayoría de hierro se encuentra en su estado de mayor biodisponibilidad para ser absorbido por las células intestinales.

El contenido total de hierro en 10 cápsulas digeridas fue de 2.06 mM y la concentración de hierro cuantificada en medio intestinal fue de 0.77 mM. El promedio de absorción de hierro en células intestinales representó aproximadamente el 7 % del hierro agregado a las células.

La absorción de hierro inorgánico libre soluble a nivel intestinal ocurre en el borde en cepillo de los enterocitos. Mientras que el Fe (II) se absorbe directamente, el Fe (III) en primer lugar se reduce a Fe(II) y luego está disponible para el transporte a través de la membrana del borde en cepillo mediado por DMT1.

El hierro agregado al compartimiento apical de las monocapas de Caco-2/TC7 se recuperó en el compartimiento basal y fue proporcional al tiempo de exposición. Luego de las primeras 4 h de incubación, el transporte del hierro proveniente de las cápsulas fue significativamente mayor que el del hierro proveniente del FeSO₄. El transporte de hierro es un proceso más lento que la absorción, es dependiente de la fuente de hierro y la concentración máxima del metal en el compartimiento basal de los modelos *in vitro* ocurrió entre las 8-12 h de incubación.

La gelificación iónica frecuentemente es abordada con cationes como calcio y zinc y polímeros como el alginato. Es importante resaltar la gran eficacia que mostró en este trabajo la gelificación con hierro y pectina, obteniéndose cápsulas con la rigidez y forma deseada para ser implementadas en futuras aplicaciones alimenticias. Además de ser una estrategia novedosa el empleo de este metal y polímero en esta técnica de encapsulación, es necesario recalcar el gran

aporte al valor nutricional del producto alimenticio al que se incorporen, debido a que se trata de un polímero que forma parte de la fibra dietaria y de un metal cuyo déficit en la dieta es causa de uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial.

CAPÍTULO I

PARTE B. Encapsulación de *Lactoplantibacillus plantarum* CIDCA 83114, mediante gelificación iónica con hierro y pectina.

IB.1. INTRODUCCIÓN

IB.1.1. Probióticos

Tal como se indica en la introducción general, el término "probióticos" se refiere a microorganismos vivos que, consumidos en concentraciones adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped. Un probiótico para consumo humano debe ser preferiblemente de origen humano, seguro e incapaz de transferir genes de resistencia a los antibióticos, patogenicidad o toxicidad (Plaza-Díaz *et al.*, 2019).

Normalmente, en el tracto gastrointestinal humano del adulto existen entre 100-1000 especies microbianas, que integran la llamada microflora intestinal (Kerry *et al.*, 2018). La microflora intestinal actúa ofreciendo resistencia a la colonización de patógenos, función conocida como "efecto barrera". Se trata de un mecanismo por medio del cual, las bacterias intestinales autóctonas mantienen su presencia y estabilidad y confieren protección específica contra los microorganismos patógenos (Lewis *et al.*, 2015; Pérez-Cobas *et al.*, 2015). Cualquier alteración en la composición y diversidad de la microflora intestinal puede resultar en trastornos y enfermedades. Los medicamentos convencionales para tratarlos proporcionan una eficacia muy limitada, debido a que los microbios patógenos desarrollan tolerancia y resistencia a los mismos (Pamer, 2016). La microflora intestinal, mediante la incorporación de probióticos a la dieta, aumenta el número relativo de "bacterias beneficiosas", que tienen impacto positivo en la función inmunológica, la digestión, el metabolismo, entre otros (Scott *et al.*, 2015).

En este contexto, los probióticos sirven como complemento de la microflora del huésped y proporcionan protección contra diversos patógenos entéricos, reforzando la función de barrera intestinal y aumentando la capacidad de competir con los patógenos por la adhesión al intestino impidiendo su colonización (Rao *et al.*, 2016). Los probióticos también estimulan y regulan la respuesta inmune del huésped, incluso modulan la liberación de hormonas gastrointestinales y regulan el comportamiento cerebral a través de la señalización neuronal (Kristensen *et al.*, 2016). Estos microorganismos beneficiosos también juegan un papel importante en la inducción de la angiogénesis intestinal, regulan la inflamación aguda y crónica en el tejido de la mucosa intestinal causada por la progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal (Bakirtzi *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2013) y son útiles para combatir el sobrepeso y la obesidad (Kobyliak *et al.*, 2016), mejorar la salud humana, la optimización de la nutrición y la regulación de trastornos o anomalías metabólicas comunes.

Se consumen comúnmente como preparaciones que contienen bacterias probióticas, las cuales pueden ser lactobacilos, lactococos o bifidobacterias que se han aislado de entornos naturales (Bongaerts & Severijnen, 2016).

IB.1.1.2. Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles (oligosacáridos) que llegan al colon y sirven de sustrato a los microorganismos, originando energía, metabolitos y micronutrientes utilizados por el hospedador y estimulando el crecimiento selectivo de determinadas especies beneficiosas (principalmente, bifidobacterias y lactobacilos) de la microbiota intestinal (Corzo *et al.*, 2015; Rastall & Gibson, 2015; Thomas, 2016). La fermentación de carbohidratos representa una fuente importante de energía para las células epiteliales en el colon y los prebióticos cumplen fácilmente este requisito como resultado de su fermentación por la microflora intestinal (Kerry *et al.*, 2018).

Entre los prebióticos más conocidos se encuentran la inulina, oligofruktosa y fructooligosacáridos (FOS). Existen numerosos estudios que demuestran el efecto prebiótico de la pectina sobre diversos microorganismos probióticos, entre ellos, *Lactoplantibacillus plantarum* (Nazzaro *et al.*, 2012; Khorasani & Shojaosadati, 2017; Zhang *et al.*, 2018)

Los prebióticos se pueden obtener de forma natural a partir de fuentes como verduras, frutas y cereales que se consumen en nuestra vida diaria. Los prebióticos no solo sirven como fuente de energía, sino que también tienen diversos beneficios para la salud, como reducir la prevalencia y la duración de la diarrea, ejercer efectos protectores para prevenir el cáncer de colon, aliviar la inflamación y otros síntomas asociados con trastornos intestinales (Kerry *et al.*, 2018; Peña, 2007). También están involucrados en la mejora de la biodisponibilidad y la absorción de minerales, la reducción de algunos factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares y la promoción de la saciedad y la pérdida de peso (Pokusaeva *et al.*, 2011).

IB.1.1.3. Simbióticos

Un simbiótico es combinación de productos probióticos y prebióticos y ayuda a mejorar la supervivencia y la implantación de los microorganismos vivos provenientes de suplementos dietéticos en el intestino (Kerry *et al.*, 2018). Los beneficios sinérgicos se promueven de manera más eficiente cuando tanto el probiótico como el prebiótico actúan juntos en el sistema vivo.

El interés comercial en los alimentos funcionales que contienen simbióticos ha aumentado constantemente debido a la conciencia de los beneficios para la salud intestinal y la prevención de enfermedades. Los ensayos e investigaciones convencionales han demostrado que los diversos efectos beneficiosos de los probióticos, prebióticos y simbióticos son mucho más efectivos que su uso por separado (Kerry *et al.*, 2018). Por lo tanto, las investigaciones destinadas a desarrollar nuevos productos alimenticios que contengan probióticos y prebióticos son importantes para aprovechar los beneficios aportados por un simbiótico.

IB.1.1.4. *Lactoplanibacillus plantarum* CIDCA 83114

Dentro de las bacterias ácido lácticas, *Lactoplanibacillus plantarum* CIDCA 83114 es una cepa potencialmente probiótica aislada de gránulos de kefir. Se ha demostrado que esta cepa presenta actividad antimicrobiana contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *S. sonnei* (Golowczyc *et al.*, 2008), disminuye la adhesión de *E. coli* enterohemorrágica a las células Hep-2 (Hugo *et al.*, 2008), protege las células Hep-2 en cultivo contra la invasión de *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* (Kakisu *et al.*, 2013) y tiene un papel antagónico al efecto citotóxico de la toxina Shiga producida por *E. coli* enterohemorrágica sobre células Vero (Kakisu, 2013).

L. plantarum CIDCA 83114 ha demostrado ser muy resistente a procesos de deshidratación (Golowczyc *et al.*, 2010) y se ha visto que algunas de sus propiedades probióticas no cambian significativamente después del proceso de deshidratación (Golowczyc *et al.*, 2011). Además de sus propiedades probióticas, *L. plantarum* CIDCA 83114 ha demostrado ciertas propiedades compatibles con la incorporación a alimentos funcionales. En este sentido, se ha informado que la cepa puede ser inmovilizada en películas de carboximetilcelulosa (Romano *et al.*, 2014), y posteriormente usarse para funcionalizar *snacks* de manzana (Tavera-Quiroz *et al.*, 2015). Además, se pudo encapsular y estabilizar esta cepa por secado en *spray* en leche o permeado de suero (Golowczyc *et al.*, 2011; Golowczyc *et al.*, 2013).

Como ya se mencionó, para que las bacterias probióticas puedan ejercer su acción benéfica deben llegar viables al colon en cantidades adecuadas. Para ello, no sólo deben resistir las condiciones gastrointestinales, sino también los procesos tecnológicos a los que se exponen durante su producción o incorporación en alimentos funcionales.

En este contexto, en esta parte del capítulo se utilizará el sistema pectina-hierro descrito como agente encapsulante de *L. plantarum* 83114. En la Figura IB1 se presenta una estructura posible para la incorporación del microorganismo en las cápsulas.

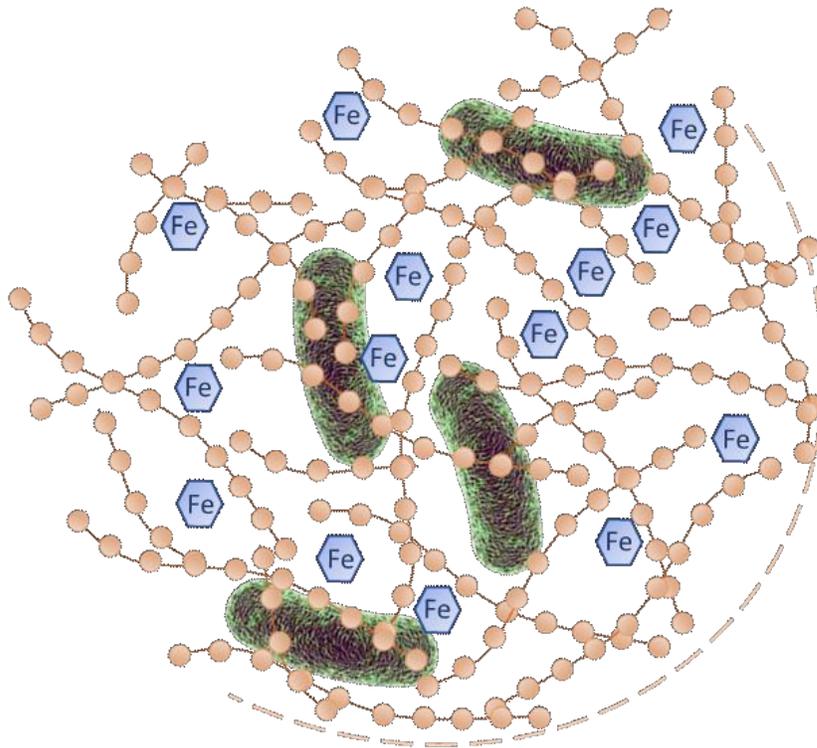


Figura IB1. Esquema teórico de la estructura y composición de la cápsula

Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este capítulo fueron:

- Encapsular *Lactiplantibacillus plantarum* CIDCA 83114 utilizando cápsulas de hierro-pectina obtenidas por gelificación iónica.
- Evaluar la viabilidad bacteriana luego de la encapsulación, almacenamiento y digestión gastro-intestinal simulada.
- Analizar la liberación de hierro y pectina en condiciones salivales, gástricas e intestinales simuladas.

IB.I.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IB.2.1. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento

Se utilizó *L. plantarum* CIDCA 83114 aislada de gránulos de kefir (Garrote *et al.*, 2001), congelada a -80 °C en 120 g/L de leche descremada (Difco, MA, EE.UU.). Los microorganismos se cultivaron en caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, 1960) a 37 °C en condiciones aeróbicas. Los cultivos en fase estacionaria ($\sim 2 \times 10^8$ UFC/mL) se cosecharon por centrifugación a 6000 \times g durante 5 minutos y los *pellets* se usaron para encapsulación.

IB.2.2. Encapsulación

Se siguió el procedimiento de la sección IA.2.1. del capítulo IA. Los *pellets* bacterianos obtenidos en la sección IB.2.1. se suspendieron en la solución 4 % p/v de pectina y la misma se goteó en una solución de FeSO₄ 150 mM usando una aguja de 0.3 mm (~ 10 μ L/gota) bajo agitación continua durante 30 min. Las cápsulas se filtraron a través de una malla de acero inoxidable de 0.10 mm, y se enjuagaron tres veces con agua destilada. Luego, las cápsulas se congelaron a -80 °C y se liofilizaron durante 48 h en un equipo Heto FD4 (Heto Lab Equipment, Dinamarca) que funciona con condensador a -45 °C a una presión de la cámara de 0.04 mbar. Las muestras obtenidas se almacenaron durante 60 días a 4 °C.

IB.2.3. Viabilidad bacteriana

Se realizaron recuentos en placa de los microorganismos antes y después de encapsular, y también durante el almacenamiento. Para ello, se solubilizaron 10 cápsulas (que representan aproximadamente 100 μ L de cultivo fresco) en 1 mL de PBS con agitación continua. Se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones bacterianas provenientes de microorganismos encapsulados y no encapsulados, se sembraron en agar MRS y se incubaron a 37 °C durante 48 h en condiciones aeróbicas. Además, se realizaron recuentos en placa de cultivos frescos sin encapsular (controles).

IB.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se siguió el protocolo de la sección IA.2.2. (Capítulo IA).

IB.2.5. Digestión *in vitro*

Se siguió el protocolo de la sección IA.2.3 (Capítulo IA). Para los microorganismos no encapsulados, se centrifugaron 100 µL de cultivos frescos y se suspendieron los *pellets* en los diferentes fluidos gastrointestinales simulados, siguiendo un protocolo similar al utilizado para las bacterias encapsuladas.

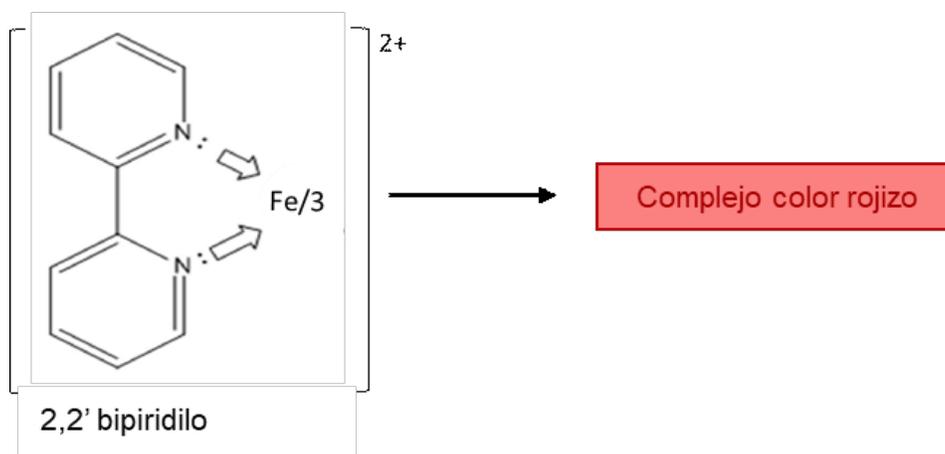
Para determinar la viabilidad de las bacterias liberadas luego de cada etapa de digestión, se diluyeron alícuotas de 1 mL de saliva, fluidos gástricos e intestinales en PBS y se sembraron en placas en agar MRS para el recuento bacteriano, como se describe en la sección IB.2.3 de este capítulo.

IB.2.6. Cuantificación de pectina y hierro

Se evaluó el contenido total de cationes de hierro [Fe(II) y Fe(III)] y de pectinas en las cápsulas (como controles se usaron cápsulas que no contenían bacterias) cuantificando los analitos libres después de la desintegración completa de 10 cápsulas en 1 mL de PBS. Además, ambas cuantificaciones se llevaron a cabo después de cada paso de la digestión en los fluidos digestivos simulados (saliva, jugos gástricos e intestinales) (ver sección IA.2.3. del Capítulo IA).

IB.2.6.1 Cuantificación de hierro

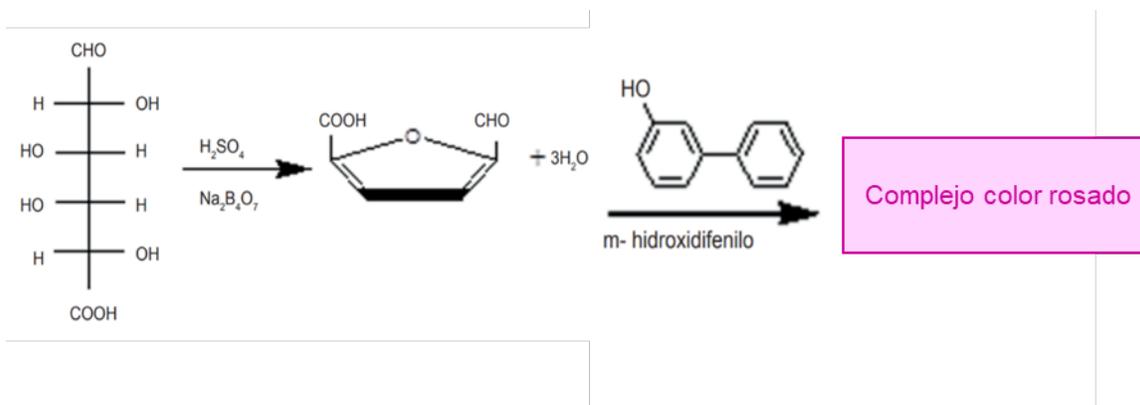
Los cationes de hierro libres se determinaron utilizando el quelante selectivo 2,2'bipiridilo (Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina), de acuerdo a Moss y Mellon 1942, Heaney y Davison 1977, Elmagirbi *et al.*, 2012.



Para determinar el contenido de hierro libre total, se agregaron 10 μL de ácido ascórbico 0.045 M (Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina) a 20 μL de muestra. Después de 5 minutos, se añadieron 770 μL de una solución de HCl 0.1 M y acetato de sodio 0.1 M a cada tubo. Luego, se agregaron 200 μL del reactivo 2,2'bipiridilo, las muestras se agitaron en *vórtex* y se incubaron durante 15 minutos. La absorbancia de los complejos rojos se leyó a 521 nm. Como blancos se prepararon tubos en los que las muestras fueron reemplazadas por agua milli Q. El ion ferroso libre se determinó usando el mismo quelante en ausencia de ácido ascórbico.

IB.2.6.2 Cuantificación de pectina.

La pectina se determinó usando m-hidroxidifenilo (Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina) para el análisis de los ácidos urónicos (Ibarz *et al.*, 2006; Kintner y van Buren, 1982). El procedimiento que emplea el m-hidroxidifenilo como cromóforo es el más utilizado y se caracteriza por ser cuantitativo, sensible y específico. Este método se basa en la aparición de un cromógeno de color rosado cuando el ácido urónico es calentado a 80 - 100 $^{\circ}\text{C}$ en una mezcla de ácido sulfúrico/tetraborato de sodio y posteriormente tratado con m-hidroxidifenilo.



Para ello, se añadieron 1.25 mL de solución de ácido sulfúrico / tetraborato de sodio (tetraborato de sodio 0.0125 M; ácido sulfúrico 36.8 N) a 0.25 mL de muestra y se enfrió en baño de hielo. Las muestras se agitaron en *vórtex* y se calentaron a 80 °C durante 6 min. Después de enfriar en baño de hielo, se añadieron 0.025 mL de m-hidroxidifenilo (0.15 % p/v de m-hidroxidifenilo en 0.5 % p/v de NaOH) a cada tubo. Para cada muestra, se leyó la absorbancia a 520 nm a los 15 minutos. El blanco se preparó reemplazando la muestra por agua milli Q.

IB.2.7. Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en tres ensayos independientes. Para el análisis de datos se utilizaron los valores promedio. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó para todos los ensayos, utilizando el programa estadístico InfoStat 2008 (Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina). Para la comparación de medias se utilizó el método de Tukey y si $p < 0.05$ la diferencia se consideró estadísticamente significativa.

IB.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IB.3.1. Observación microscópica

La microscopía electrónica de barrido (SEM) reveló que las cápsulas de hierro-pectina fueron esféricas y el diámetro de las mismas fue entre 1 y 2 μm (Figura IB2). La superficie externa resultó ser mayormente lisa (Figura IB2 A) y la estructura interna mostró una textura compacta (Figura IB2 BI), con orificios regulares, (Figura IB2 BII). Las cápsulas de hierro-pectina que contenían microorganismos presentaron imágenes claras de bacterias atrapadas distribuidas homogéneamente en la superficie externa de las mismas (Figura IB2 C). El interior de las cápsulas exhibió una textura compacta con orificios (Figura IB2 DI y DII), también con grupos de microorganismos atrapados en el material gelificado de hierro-pectina (Figura IB2 DIII). Los orificios observados en la superficie interna probablemente se debieron a la eventual contracción y evaporación del agua durante el proceso de liofilización (Martin-Dejardin *et al.*, 2013).

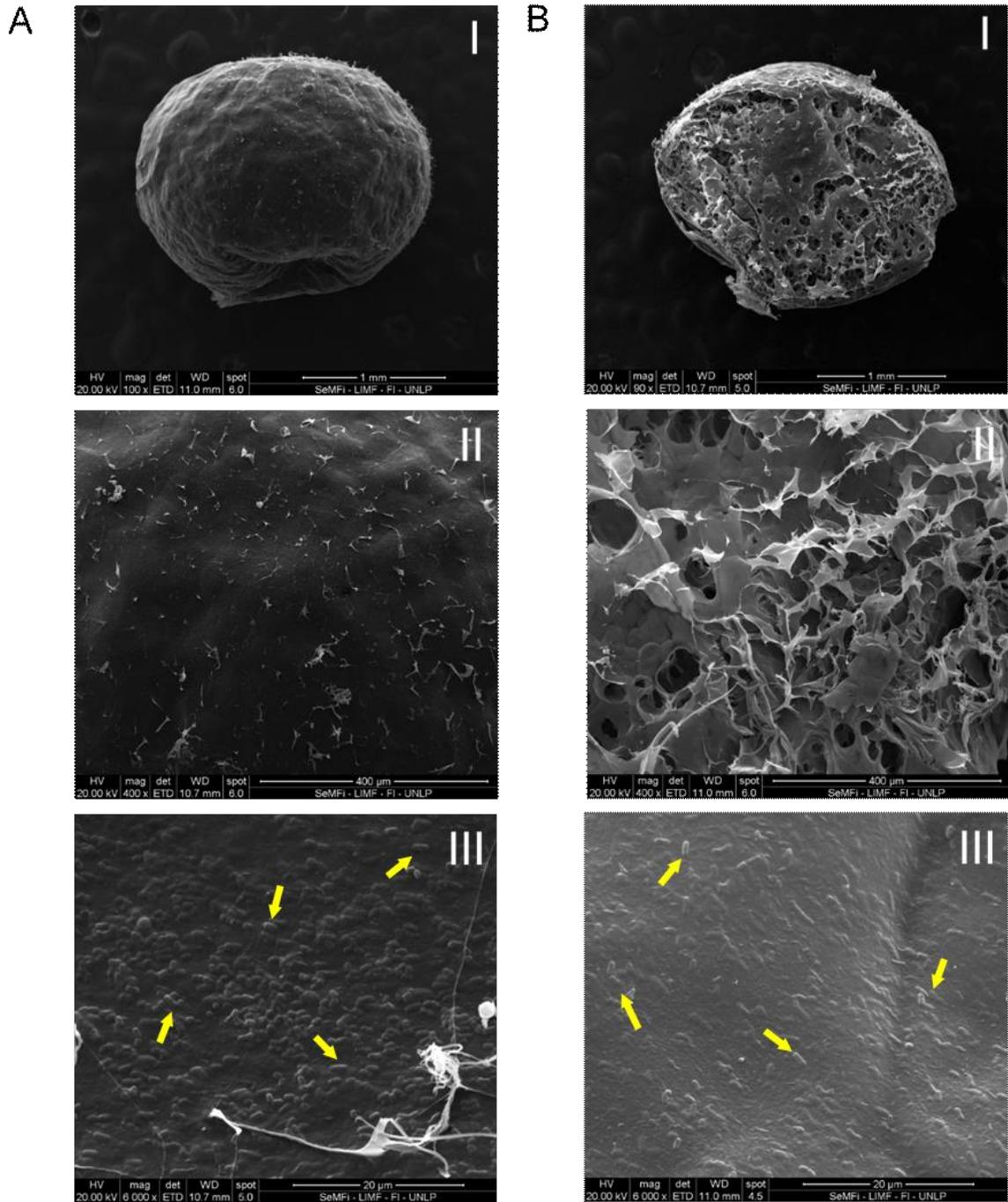


Figura IB2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de: Superficie externa (A) e interna (B) de las cápsulas de hierro-pectina con *L. plantarum* CIDCA 83114. I, II y III indican diferentes escalas. Las flechas amarillas señalan las bacterias atrapadas en la matriz pectina-hierro.

IB.3.2. Viabilidad bacteriana

El recubrimiento completo de microorganismos en cápsulas de hierro-pectina los estabilizó durante el almacenamiento, ya que no se observó una disminución significativa de la viabilidad luego de 60 días de conservación a 4 °C ($p > 0.05$) (Figura IB3).

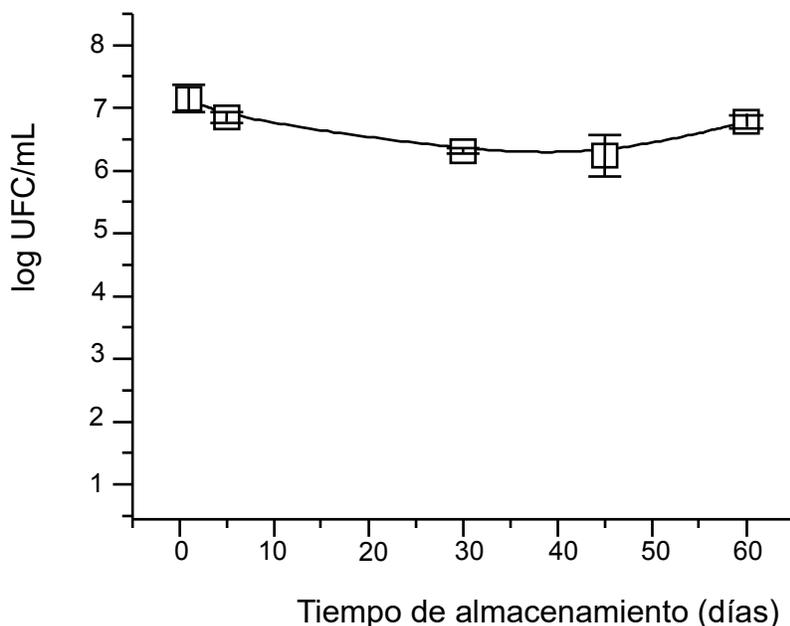


Figura IB3. Viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 encapsulada y liofilizada durante el almacenamiento a 4 °C. Viabilidad antes de la liofilización: $N_0 = 8.32 \pm 0.03$ log UFC/mL.

Como el sitio de acción las bacterias probióticas es el intestino, la estabilidad y la liberación adecuada de microorganismos durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal es muy importante. Las bacterias no encapsuladas superaron adecuadamente el proceso de liofilización y la exposición a saliva, sin embargo, las condiciones gástricas condujeron a una disminución significativa de la viabilidad. En trabajos anteriores, se informó que distintos sustratos fermentados con esta cepa, tales como lactosuero, permeado de suero, deben neutralizarse antes de la deshidratación para evitar daños bacterianos o la muerte (Golowczyc *et al.*, 2013). Este comportamiento es consistente con la sensibilidad de esta cepa al bajo pH observado en este capítulo (Figura IB4).

Las cápsulas que contenían microorganismos previamente se disgregaron por completo en PBS para determinar la concentración bacteriana antes del proceso digestivo, que fue de 7.30 ± 0.43 log UFC/mL (Figura IB4). La baja viabilidad observada después del contacto de las cápsulas con la saliva indica que las cápsulas estaban mayormente intactas, lo que demuestra su estabilidad. Las cápsulas se desintegraron por completo una vez que llegaron a las condiciones intestinales, liberando 6.45 ± 0.21 log UFC/mL, un valor ligeramente inferior al obtenido para las cápsulas desintegradas en PBS antes de la exposición a condiciones digestivas simuladas.

Teniendo en cuenta que los recuentos en placa de bacterias encapsuladas se llevaron a cabo utilizando 10 cápsulas disgregadas en PBS, la viabilidad bacteriana fue de 6.30 log UFC/cápsula (2.0×10^6 UFC/cápsula) al momento de ser ingerido y 5.45 log UFC/cápsula (2.83×10^5 UFC/cápsula) al final del proceso digestivo. De acuerdo con las recomendaciones de organismos internacionales como EFSA o FDA, los beneficios del consumo de probióticos se pueden lograr cuando los productos que contienen probióticos tienen al menos 7 log UFC de microorganismos viables por gramo en el momento de su consumo (Aquilina *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2014; Phuapaiboon *et al.*, 2013; Tripathi y Giri, 2014). **Por lo tanto, el consumo de solo 5 cápsulas cumpliría los valores recomendados al momento de ser ingerido, y el consumo de 35 cápsulas garantizaría estas concentraciones, también en el intestino.** Se puede deducir que la encapsulación fue muy importante para proporcionar a las bacterias una matriz de contención que permita su liberación en el intestino, luego de atravesar las condiciones gástricas (Figura IB4).

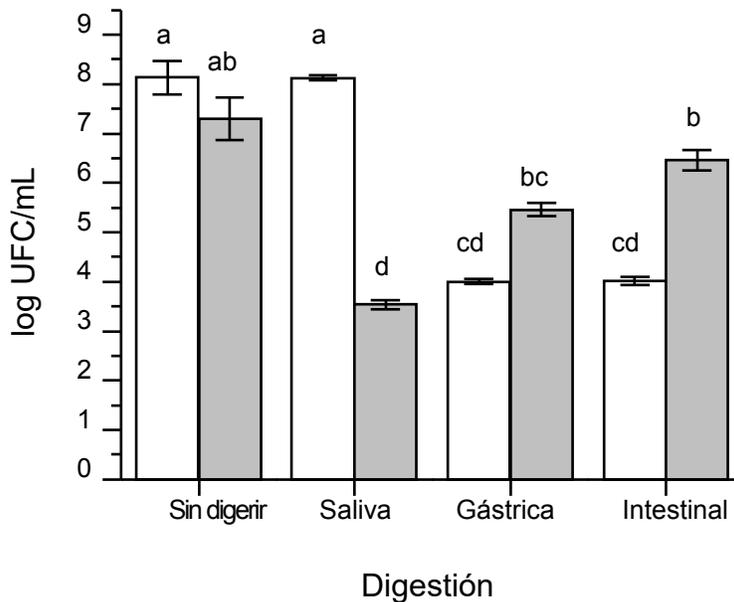


Figura IB4. Viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 después de la liofilización y exposición a saliva y condiciones gástricas e intestinales. Barras blancas: microorganismos no encapsulados, barras grises: microorganismos encapsulados. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

IB.3.3. Cuantificación de hierro y pectina de las cápsulas

Como el objetivo de este capítulo se centró no sólo en la estabilidad bacteriana sino también en el uso de las cápsulas como fuente de hierro, la integridad de las cápsulas se determinó cuantificando la liberación de hierro y pectina luego de exponerlas a condiciones simuladas de saliva y gastrointestinales (Figura IB5 A). Es importante señalar que en ensayos preliminares, realizados sin la adición de ácido ascórbico a la reacción de complejación de hierro con 2,2'-bipiridilo (quelante selectivo de cationes ferrosos), no se pudo detectar hierro. En otras palabras, los complejos coloreados con hierro sólo se observaron cuando se incorporó ácido ascórbico al medio de reacción, lo que indica que la concentración de catión ferroso estaba por debajo del límite de detección del método.

Otro punto a destacar es que en el Capítulo IA, se obtuvo como resultado mediante espectroscopía de Mössbauer que los cationes Fe(II) fueron el componente principal de las cápsulas (71.5 %). Sin embargo, el hierro liberado de las cápsulas desintegradas en solución acuosa se identificó como Fe(III), a diferencia de los experimentos de Mössbauer en los que se

usaron muestras liofilizadas trituradas (no en solución). Esto parece indicar que la forma ferrosa componente de las cápsulas se oxidó al entrar en contacto con la solución acuosa. Esto indica que en solución, todo el hierro presente en las cápsulas se oxidó a catión férrico.

El catión férrico es mucho menos soluble que el ferroso [solubilidad a pH 7.0 en medio intestinal: Fe(III) (10^{-18} mol/L) frente a Fe (II) (5×10^{-3} mol/L)] (Andrews *et al.*, 2003). Por esta razón, el hierro generalmente se administra como sulfato ferroso. En los últimos años, se ha informado que los quelatos de hierro (NaFeEDTA o bisglicinato ferroso) son alternativas prometedoras al sulfato ferroso para la fortificación de alimentos porque son más estables cuando se agregan a los alimentos y están menos afectados por los inhibidores de absorción de hierro (Bovell-Benjamin *et al.*, 1999; Hurrell, 2002), como se observa cuando se agrega al *curry* en polvo, salsa de pescado o salsa de soja (Yeung, Glahn y Miller, 2005). En base a los resultados obtenidos, el ion férrico detectado en solución podría estar formando complejos solubles con cadenas cortas de pectina (es decir, el complejo explicaría el motivo por el que se encuentra soluble y no precipitó como Fe(OH)₃ a pH intestinal), lo cual también constituye una ventaja no concebida originalmente, ya que el Fe(III) se encuentra biodisponible para ser absorbido por las células intestinales mediante su mecanismo de conversión a Fe(II) mediado por la proteína DMT1. Se puede deducir entonces que no sería relevante el estado de oxidación del hierro, mientras se encuentre soluble y disponible para su absorción.

Una vez que se incorporó el ácido ascórbico, el contenido total de hierro de las 10 cápsulas disueltas en 1 mL de medio de liberación (que sólo era férrico) fue de 2.06 ± 0.01 mM ó 2.06 μ mol Fe/mL. Por lo tanto, se obtiene que cada cápsula contiene 0.206 μ moles de hierro.

Se liberó una baja concentración de hierro en la saliva (0.12 ± 0.04 mM). La mayor liberación de hierro se produjo después de la exposición a condiciones gástricas e intestinales (0.79 ± 0.06 y 1.14 ± 0.04 mM, respectivamente), que en conjunto representaron la concentración total de hierro en las cápsulas (Figura IIB5 A).

El hierro también se cuantificó en cápsulas sin bacterias en las mismas condiciones (controles), sin mostrar diferencias significativas con respecto a las cápsulas que contenían bacterias en todas las condiciones excepto cuando se expusieron a condiciones intestinales, en las cuales la liberación de hierro fue de 0.77 ± 0.02 mM (aproximadamente 68 % menor que para las cápsulas que contienen bacterias).

Finalmente, la cuantificación de pectina mostró un comportamiento similar al del hierro (Figura IIB5 B). En efecto, se liberaron bajas concentraciones de pectina en la saliva simulada, y la mayor liberación se produjo después de la exposición a la solución intestinal (Figura IIB5 B).

Contrariamente a lo que se observó para la liberación de hierro, las cápsulas vacías (controles) mostraron una concentración de pectina que era aproximadamente un 50% más alta que la de las cápsulas que contenían bacterias.

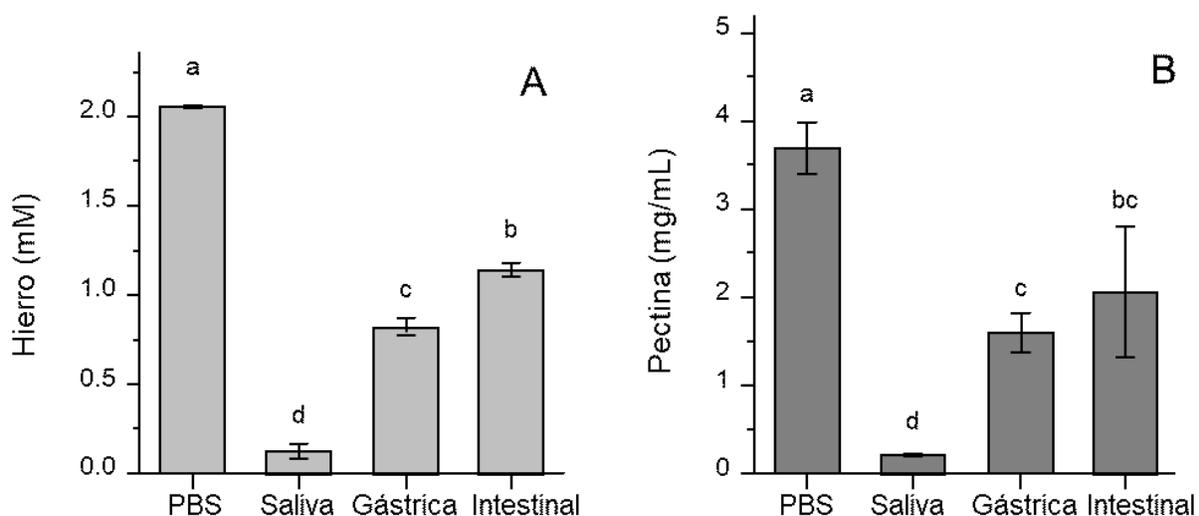


Figura IB5. A. Liberación del hierro de las cápsulas luego de la exposición a condiciones salivales, gástricas e intestinales. **B.** Liberación de pectina de las cápsulas en las mismas condiciones. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos para la liberación de hierro (Figura IB5 A) y pectinas (Figura IB5 B) mostraron la disgregación total de las cápsulas en el intestino, siguiendo un patrón similar al obtenido para los microorganismos. Es interesante observar que la mayor concentración de hierro para las cápsulas cargadas con bacterias (con respecto a las vacías) podría atribuirse al hecho de que las cápsulas se disgregaron por completo en el fluido intestinal. Además, la superficie bacteriana está cargada negativamente (Gómez-Zavaglia *et al.*, 2002), por lo que parte del hierro podría adsorberse especialmente las formas catiónicas $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ o $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ que tienen alta relación carga/tamaño.

Para la liberación de pectinas se observó el comportamiento opuesto, es decir que para las cápsulas con bacterias se detectó una menor cantidad de pectina liberada cuando se comparó con las cápsulas sin bacteria. Esto podría explicarse considerando que la parte interna de las cápsulas cargadas con bacterias (Figura IB2 BI y BII) mostró una textura compacta con orificios, lo que indica una menor densidad de pectina en las cápsulas.

Teniendo en cuenta que las recomendaciones de ingesta de hierro pueden variar dentro de 3 a 20 mg/día (Allen *et al.*, 2006) y que la concentración total de hierro proveniente de 10 cápsulas disueltas en 1 mL de medio de liberación fue de 2.06 ± 0.01 mM (Figura IB5 A), se puede calcular que cada cápsula contenía $0.206 \mu\text{mol}$ de hierro ($\sim 11.5 \mu\text{g}$). **Esto indica que el consumo de ~500 cápsulas proporcionaría una ingesta de 5.75 mg de hierro, de los cuales aproximadamente el 60% se liberaría en el intestino** (de acuerdo con la información trazada en la Figura IB5 A).

IB.4. CONCLUSIONES

La administración de probióticos ha sido un desafío porque los microorganismos están expuestos a ambientes perjudiciales tanto a nivel tecnológico como fisiológico. Además, los microorganismos resistentes a los procesos tecnológicos no siempre son resistentes a las condiciones digestivas (bajo pH del estómago, bilis, jugos digestivos) y viceversa. La encapsulación es una de las estrategias para proteger los microorganismos contra ambos problemas.

Los resultados obtenidos sustentan el uso de las cápsulas de pectina-hierro en la encapsulación de *L. plantarum* CIDCA 83114 para su eventual uso como ingredientes en la formulación de alimentos funcionales (por ejemplo, incorporados en yogures).

Teniendo en cuenta la problemática mundial de lograr las recomendaciones de ingesta diaria de hierro, el consumo de las cápsulas diseñadas en este capítulo podría ser una fuente alternativa de hierro, adecuada para ser incorporada como ingrediente funcional no solo por su contenido probiótico sino también por su contenido de hierro. Otra ventaja es que la presencia de hierro complejado con pectina en la saliva (se liberó una baja concentración de hierro en la saliva - Figura IB5 A-), evitaría el sabor metálico en la boca, como el que se manifiesta en los suplementos que contienen hierro.

El principal logro de este capítulo fue el desarrollo de un solo producto que permite la triple administración de hierro, microorganismos probióticos y fibra dietaria. Las bacterias encapsuladas mostraron tener una buena viabilidad luego de su liberación de las cápsulas tanto

antes como también luego de la digestión gastrointestinal simulada. El uso de estas cápsulas podría ser una estrategia adecuada para contribuir a lograr la ingesta de hierro recomendada.

CAPÍTULO II

PARTE A. Síntesis y caracterización de nanopartículas (NP) de óxido de hierro Fe_3O_4 decoradas con pectina.

IIA.1. INTRODUCCIÓN

IIA.1.1. Fortificación de alimentos con hierro.

La fortificación de alimentos fue definida a nivel mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como "la práctica de aumentar deliberadamente el contenido de un micronutriente esencial, es decir, vitaminas y minerales (incluidos oligoelementos) en un alimento, independientemente de si los nutrientes estaban presentes originalmente en los alimentos antes del procesamiento o no, para mejorar la calidad nutricional del suministro de alimentos y proporcionar un beneficio para la salud pública con un riesgo mínimo para la salud" (Ahmad & Ahmed, 2019).

Fortificar alimentos con hierro es una de las iniciativas más utilizadas para afrontar el problema de la deficiencia de hierro y sus consecuencias sobre la salud humana, entre las que se destacan los problemas causados por el desarrollo de la anemia ferropénica. Esta herramienta puede ser una estrategia eficaz, sostenible y rentable para aumentar el consumo de hierro en la dieta (Baltussen *et al.*, 2004), pero es un desafío porque los compuestos de hierro que presentan elevada biodisponibilidad, como FeSO_4 , son químicamente reactivos y causan alteraciones organolépticas inaceptables en los alimentos (von Moos *et al.*, 2017). Por el contrario, los compuestos de hierro insolubles en agua, como fosfato férrico (FePO_4), pirofosfato férrico [$\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$] o hierro elemental, tienen poco impacto en las propiedades sensoriales y se utilizan a menudo en la industria alimentaria a pesar de su mala absorción (Hurrell, 2002).

Debido a que el hierro soluble proveniente de la dieta debe reducirse a ferroso para ingresar a las células de la mucosa, para la fortificación de alimentos se han preferido las sales de hierro bivalentes como sulfato ferroso (20 % de hierro), fumarato, succinato, glutamato y lactato ferroso a las preparaciones de sales férricas (Nagpal & Choudhury, 2004). Además, estas sales son las preparaciones de hierro menos costosas disponibles en el mercado. Sin embargo, las formulaciones líquidas de sulfato ferroso sólo están disponibles como jarabes a base de sorbitol, debido a que la sal es fácilmente oxidable en un ambiente húmedo, lo que representa una gran desventaja a la hora de fortificar alimentos que requieran el agregado de líquidos en su elaboración. El fumarato ferroso (33 % de hierro) tiene una eficacia similar al sulfato ferroso, es moderadamente soluble en agua, ambientalmente más estable y casi insípido (Nagpal & Choudhury, 2004). Estas sales tienen una buena biodisponibilidad, sin embargo, esta característica disminuye notablemente en presencia de inhibidores de la absorción presentes en

la dieta tales como fitatos o ácido tánico (Nagpal & Choudhury, 2004). Por lo tanto, esto es una limitación a la hora de elegir estas sales para fortificar alimentos / leches / fórmulas fortificadas que contengan estos inhibidores.

IIA.1.2. Nanopartículas de hierro

La modificación de las propiedades superficiales, en particular la disminución del tamaño de partícula (a través de técnicas coloidales, emulsificación o uso de superficies recubiertas, entre otros) (Rossi *et al.*, 2014), puede ser una estrategia interesante para superar las desventajas de la suplementación de alimentos con minerales sin alteraciones en las propiedades organolépticas (von Moos *et al.*, 2017; Fidler *et al.*, 2004; Lomer *et al.*, 2002). De hecho, la formación de soluciones coloidales estables a partir de compuestos originalmente poco solubles puede mejorar la biodisponibilidad de los mismos (von Moos *et al.*, 2017; Fidler *et al.*, 2004). Los enterocitos pueden absorber polioxohidróxido de Fe (III) nanoparticulado (insoluble a pH duodenal) y otras partículas de hierro de tamaño nanométrico que van de 9 μm a 50 nm mediante diferentes vías endocíticas, entre las que se encuentran las células M de las placas de Peyer (Perfecto *et al.*, 2017; Florence, 1997; Pereira *et al.*, 2013).

La reducción del tamaño de los compuestos de hierro a nanoescala aumenta notablemente su área superficial específica en relación con la masa, lo que conduce a una mejor solubilidad y biodisponibilidad *in vivo*, equivalente a las del FeSO_4 , pero sin reaccionar con la matriz alimentaria (Nagpal & Choudhury, 2004; Rohner *et al.*, 2007, Hilty *et al.*, 2010, Hilty *et al.*, 2011). Por lo tanto, los compuestos de hierro insolubles en agua como FePO_4 , $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ o hierro elemental, se utilizan a menudo en la industria alimentaria a pesar de la mala absorción ya que tienen poco impacto en las propiedades sensoriales (Hurrell, 2002).

Si bien hay pocos datos sobre las nanopartículas (NP) de FePO_4 , otras NP de importancia alimentaria inducen efectos adversos en las células intestinales humanas o en animales de experimentación (Schubbe *et al.*, 2012, Gehrke *et al.*, 2013, McCracken *et al.*, 2013, Trouiller *et al.*, 2009, Sharma *et al.*, 2012, Shukla *et al.*, 2014, Park *et al.*, 2015, van der Zande *et al.*, 2014). Sin embargo, no está claro si los efectos adversos observados están estrictamente relacionados con el tamaño de partícula. Además, no se informaron efectos adversos luego de la exposición de ratas a nanopartículas de $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$ (Srinivasu *et al.*, 2015) o de Fe_2O_3 (Yun *et al.*, 2015). La alimentación de ratas con deficiencia de hierro con una dieta conteniendo compuestos

nanométricos de hierro/zinc (10 ó 20 mg Fe kg⁻¹) durante 13 días no produjo una acumulación tisular de hierro (Hilty *et al.*, 2010).

Nagpal y Choudhury, en su trabajo publicado en el año 2004, demostraron que sus nanopartículas de FePO₄ no indujeron toxicidad directa o estrés oxidativo en líneas celulares gastrointestinales humanas, independientemente de la presencia de mucus o del estado de transformación de las células. Además, la alimentación de ratas con dietas enriquecidas con nanopartículas de FePO₄ no produjo ningún resultado adverso toxicológicamente relevante ni acumulación de hierro tisular cuando se administró en los niveles de ingesta recomendados (Nagpal & Choudhury, 2004). Dosis 100 veces más altas que la dosis diaria recomendada de hierro para las mujeres no produjeron efectos adversos, lo que sugiere que la ingesta de nanopartículas de FePO₄ tienen una toxicidad comparable a la del FeSO₄. Por lo tanto, las nanopartículas de FePO₄ podrían explorarse más a fondo como fortificantes alimentarios.

Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (Fe₃O₄ y γ-Fe₂O₃) resultan particularmente adecuadas para aplicaciones biomédicas debido a su baja toxicidad, a sus propiedades superparamagnéticas y a la metodología de separación simple (Ali *et al.*, 2016; Hussain *et al.*, 2005; Kunzmann *et al.*, 2011; Calero *et al.*, 2014). Sin embargo, las fuertes atracciones magnéticas entre las nanopartículas y la elevada energía superficial inducen su aglomeración, lo que eventualmente podría afectar su biodistribución si se ingieren como suplementos alimentarios. Para evitar agregados de nanopartículas de gran tamaño y altas concentraciones locales de hierro, el recubrimiento de nanopartículas con polímeros hidrofílicos parece una estrategia adecuada que proporciona biocompatibilidad a las nanopartículas de hierro (Sheng-Nan *et al.*, 2014). Entre tales compuestos, las pectinas son polímeros naturales con propiedades beneficiosas para el bienestar intestinal (Abbaspour *et al.*, 2014). La combinación de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro con pectina parece ser una estrategia clave para el suministro oral de hierro. Por ser parte de la fibra dietética soluble, las pectinas no se hidrolizan en la parte superior del tracto gastrointestinal (Assifaoui *et al.*, 2011; Das y Ng, 2010; Das, Ng & Ho, 2010; Dhalleine *et al.*, 2011) y podrían prevenir la mayoría de los efectos secundarios del hierro.

IIA.1.3. Caracterización fisicoquímica de nanopartículas

IIA.1.3.1. Difracción de rayos X (XRD) de nanopartículas de hierro.

Las propiedades magnéticas de estas nanopartículas de hierro se ven afectadas por la presencia de impurezas. Durante la síntesis de nanopartículas de magnetita mediante la técnica de coprecipitación, se obtiene magnetita o goethita (α -FeOOH) o mezcla de magnetita-goethita, dependiendo de las condiciones del proceso (Mahadevan *et al.*, 2007). Por lo tanto, la cuantificación de la fase de magnetita es esencial para correlacionar con las propiedades magnéticas, ópticas y químicas de las nanopartículas sintetizadas.

Se pueden utilizar métodos de análisis de las fases existentes basados en la medición de cualquier propiedad inherente de la fase en su conjunto, como la disolución selectiva de una fase en ácido o base, o la estructura cristalina. La abundancia de una fase se puede estimar mediante calorimetría diferencial de barrido, que se basa en la medición de la cantidad de calor desprendida durante la transición de fase, o bien, mediante difracción de rayos X (XRD) que tiene la ventaja de ser un método no destructivo (Mahadevan *et al.*, 2007).

El análisis cuantitativo por XRD relaciona el patrón de difracción de una mezcla con las intensidades superpuestas de los componentes individuales expuestos por separado durante el mismo período. La absorción constante de la muestra es una ventaja que no está presente en muchos casos. En tales casos, se emplea el análisis mediante la adición de una cantidad conocida de patrón interno (Clark & Reynolds, 1936), para corregir los efectos relacionados con la absorción. La base teórica para el análisis cuantitativo fue dada por Klug y Alexander (Klug & Alexander, 1974) y la intensidad del i -ésimo pico de difracción viene dada por la ecuación IIA1.

$$I_{ij} = \frac{K_{ij} c_j}{\rho_j \mu} \quad \text{Ec. IIA1}$$

donde K_{ij} es una constante de calibración que no depende de la composición de la muestra, c_j es la fracción en peso de la fase j en la muestra, ρ_j es la densidad de la fase j , y μ es el coeficiente de absorción de masa de la muestra. La ecuación anterior se basa en la presunción de que la muestra es completamente homogénea desde el punto de vista de la absorción. Se puede considerar que una muestra es homogénea si se cumple satisfactoriamente la condición

de $\mu_j D_j \leq 0.01$, donde μ_j representa el coeficiente de absorción lineal de la fase j y D_j el tamaño de las partículas (Zevin *et al.*, 1995).

IIA.1.3.2. Espectroscopía Infrarroja (IR)

La espectroscopia se define como la interacción de la luz con la materia. La luz es la radiación electromagnética en el espectro de energía continuo, llamado espectro electromagnético. Las principales regiones del espectro electromagnético se muestran a continuación (Derrick *et al.*, 2000) (Figura IIA1):

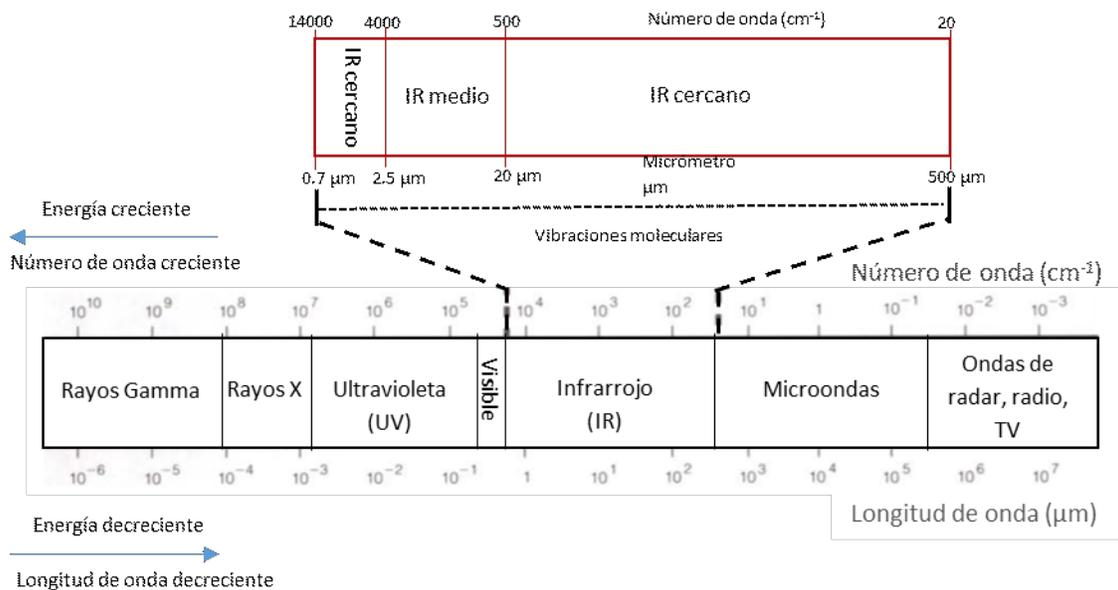


Figura IIA1. Regiones del espectro electromagnético (adaptado de Derrick *et al.*, 2000).

La absorción molecular de la radiación electromagnética en la región infrarroja del espectro promueve transiciones entre los niveles de energía rotacional y vibracional del estado de energía electrónica más bajo a uno más alto. Ésta es la principal diferencia con la absorción de la

radiación en la región visible y ultravioleta de mayor energía, que induce transiciones entre niveles de energía vibracional y rotacional de diferentes niveles electrónicos (Ismail *et al.*, 1997).

La espectroscopia infrarroja estudia las vibraciones moleculares. Los grupos funcionales se pueden asociar con bandas de absorción características, que corresponden a sus vibraciones fundamentales (Berthomieu & Hienerwadel, 2009).

En una molécula, el movimiento de los átomos está restringido por los enlaces moleculares, estos movimientos posibles se conocen como grados de libertad. Para una molécula con N átomos, el número total de grados de libertad será $3N$ (Derrick *et al.*, 2000). Los $3N$ grados de libertad se pueden asignar a los movimientos de traslación, rotación y vibración de la molécula. Las moléculas lineales tienen solo dos grados de libertad de rotación ya que dos direcciones de rotación son equivalentes. (Derrick *et al.*, 2000). Por lo tanto, el total de grados de libertad de traslación y rotación es 6 (5 para moléculas lineales). Todos los movimientos restantes, $3N - 6$ (5 para moléculas lineales), son grados de libertad vibratoria ($3N - 5$ en el caso de moléculas lineales). Las transiciones vibratorias son las más importantes en la espectroscopia IR (Derrick *et al.*, 2000).

Un modo vibracional es activo en el espectro infrarrojo (es decir, absorbe la luz infrarroja incidente) si hay un cambio en el momento dipolar de la molécula cuando en él incide la radiación IR.

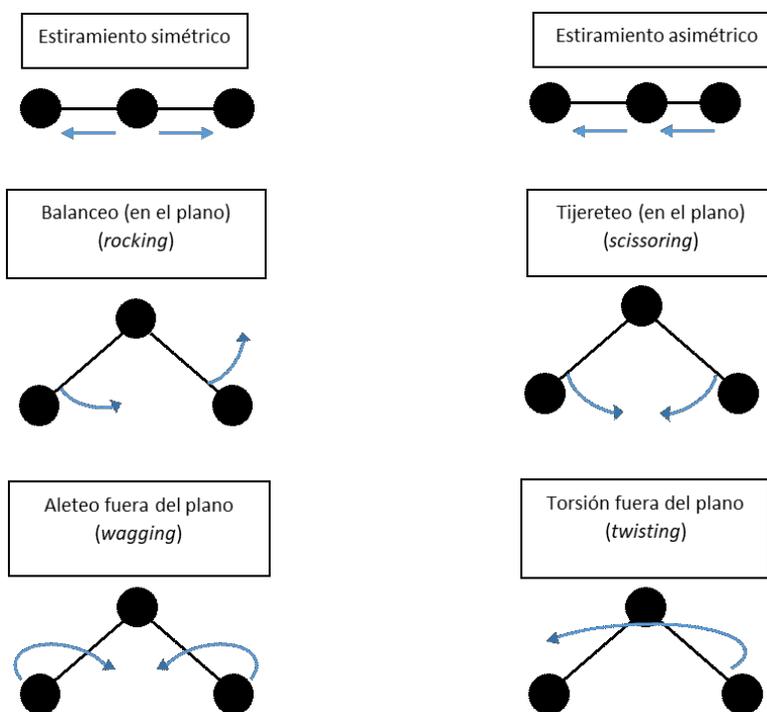


Figura IIA2. Modos de vibraciones moleculares.

Espectros infrarrojos

Un espectro IR representa la respuesta del detector función de una magnitud relacionada con la energía. La respuesta del detector indica el grado de interacción de la radiación electromagnética IR con la muestra, ya que es proporcional a la intensidad resultante de la radiación IR que llega al detector luego de pasar a través de la muestra (Derrick *et al.*, 2000). La respuesta del detector puede registrarse en modo de Absorbancia o Transmitancia, que están relacionadas a través de la ecuación IIA2:

$$A = \log \frac{1}{T} \quad \text{Ec. IIA2}$$

donde, A es la absorbancia y T es la transmitancia (%T/100).

Con respecto a la magnitud relacionada con la energía, que se grafica en el eje x de los espectros, por lo general se utiliza el "número de onda", que es la inversa de la longitud de onda, y se expresa en cm^{-1} . La región del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo se extiende desde el extremo final del rojo del espectro visible hasta la región de microondas, desde los 14000 hasta los 20 cm^{-1} (Derrick *et al.*, 2000). La región infrarroja del espectro electromagnético se divide en tres subregiones: infrarrojo cercano (NIR), medio (MIR), y lejano (FIR).

El rango espectral de mayor uso para el análisis químico es la región de IR medio (MIR), cuyo rango de frecuencias es de 4000 a 400 cm^{-1} (Derrick *et al.*, 2000). En la Tabla IIA1, se presentan los números de onda característicos de los principales grupos funcionales.

Tabla IIA1. Números de onda característicos de absorción de los diferentes grupos funcionales en el IR medio (Peris, 2009).

Grupo	Clase de compuesto	Región (cm⁻¹)	Intensidad	
C-H	Alcano	2965-2850	fuerte	
	Alqueno	3095-3010	media	
	Alquinos	3300	fuerte	
	Aromático	3050-3150	fuerte	
	Aldehídos		2900-2820	débil
			2775-2700	débil
C-C	Alcano	700-1200	débil	
	Alqueno	1680-1620	variable	
	Alquinos	2260-2100	variable	
C=O	Cetonas	1725-1705	fuerte	
	Aldehídos	1740-1720	fuerte	
	Ácidos carboxílicos	1725-1700	fuerte	
	Ésteres	1750-1730	fuerte	
	Amidas	1700-1630	fuerte	
	Anhídridos	1850-1800	fuerte	
C-O	Alcoholes, ésteres, ác. Carboxílicos, éteres	300-1000	fuerte	
-O-H	Alcoholes	3400-3200	fuerte y ancha	
	Ácidos carboxílicos	3300-2500	fuerte y ancha	
-N-H	Aminas y amidas primarias y secundarias	3500	Variable y ancha	
C≡N	Nitrilos	2260-2240	media	
C-X	Fluoruros	1400-1000	fuerte	
	Cloruros	800-600	fuerte	
	Bromuros	600-500	fuerte	
	Yoduros	500	fuerte	

Objetivos específicos

Los objetivos de este capítulo fueron:

- Sintetizar nanopartículas (NP) de Fe_3O_4 funcionalizadas con pectina
- Caracterizar las NP desde el punto de vista fisico-químico
- Determinar el efecto de las NP funcionalizadas con pectina sobre *L. plantarum* CIDCA 83114 durante la liofilización, almacenamiento y pasaje a través del tracto gastrointestinal.

IIA.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IIA.2.1. Síntesis de nanopartículas (NP) de Fe₃O₄

Se adicionaron 120 mL de NH₃ 1.5 N gota a gota sobre 80 mL de una solución de FeCl₂.4H₂O 0.25 M / 0.50 M FeCl₃.6H₂O en agitación continua durante 30 minutos a 60 °C (Ngenefeme *et al.*, 2013). Las NP magnéticas obtenidas fueron sonicadas durante 60 minutos a 60 °C en un sonicador con un pulso continuo a 35 kHz (Elma Schmidbauer GmbH, Hohentwiel, Germany), luego fueron separadas con imán, lavadas con agua destilada y deshidratadas a 60 °C durante 48 h. Finalmente, los agregados de partículas magnéticas (M) fueron molidos en un mortero para su uso posterior.

Las partículas magnéticas fueron recubiertas con pectina sumergiendo 300 mg de partículas en 26.5 mL de una solución 0.5 % p/v de pectina comercial (ácido galacturónico ≥74.0 %, Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina) (adaptado del protocolo de Ngenefeme *et al.*, 2013, la relación de masa fue de Fe₃O₄:pectina = 2.24:1). La solución de pectina fue acidificada a pH 2.0 bajo agitación continua durante 30 minutos. Las partículas magnéticas recubiertas con pectina fueron lavadas y deshidratadas en las mismas condiciones que las partículas sin la cobertura de pectina.

IIA.2.2. Caracterización fisicoquímica de las partículas magnéticas

IIA.2.2.1. Difracción de rayos X en polvo. Los patrones de difracción de rayos X en polvo (XRD) de las partículas se registraron en el rango angular de $10^\circ \leq 2\theta \leq 90^\circ$, en un difractómetro Philips PW 3710, equipado con un filtro de Ni en el haz difractado (radiación Cu-Kα 1,5418 Å, 50 kV-80 mA). Los barridos se realizaron a 25 °C en pasos de 0.02 °, con un tiempo de adquisición de 1 segundo para cada paso.

IIA.2.2.2. Espectroscopía FTIR. Se obtuvieron los espectros FTIR de las partículas obtenidas y de la pectina comercial. Se colocaron aproximadamente 5 mg de cada muestra sobre el cristal portamuestras de un espectrómetro ATR-FTIR Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, MA, USA). Los espectros fueron registrados en el rango de 4000-500 cm⁻¹ mediante la acumulación de 64 barridos con una resolución espectral de 4 cm⁻¹, usando el software OMNIC (versión 8.3, Thermo Scientific, MA, USA).

IIA.2.2.3. Mediciones de tamaño de partícula y de potencial zeta (ζ). Las mediciones del tamaño de partícula fueron realizadas en un analizador Horiba Nano-SZ 100 (Horiba, Japan) a 37 °C. Se determinó el tamaño de partícula promedio (Z-average) y el índice de polidispersión usando dispersión dinámica de la luz a un ángulo de 173° con el software Horiba (Horiba NextGen Projet SZ100 for Windows). El potencial ζ se determinó usando una combinación de técnicas de medición: Electroforesis y Velocimetría Laser Doppler (Electroforesis Laser Doppler). Los valores de potencial ζ fueron provistos directamente por el instrumento. Los promedios y los desvíos estándar de Z-average y de potencial ζ fueron obtenidos a partir de al menos 10 determinaciones para cada muestra.

IIA.2.3. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento.

Se trabajó con la cepa *L. plantarum* CIDCA 83114. Los microorganismos se crecieron en caldo MRS en microaerobiosis. Una vez alcanzada la fase estacionaria ($\sim 2 \times 10^8$ UFC/mL), las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos y los pellets, lavados dos veces con PBS.

IIA.2.4. Preparación de compósitos y determinación del efecto inhibitor del hierro.

La pectina comercial se preparó en agua destilada al 1 % p/v, y los pellets bacterianos obtenidos en la sección anterior se resuspendieron en esta solución de pectina.

Para evaluar el efecto inhibitor del hierro sobre los microorganismos, se agregaron 0 (control), 0.01, 0.10 y 1.00 mg/mL de nanopartículas de Fe_3O_4 (M) y de nanopartículas de Fe_3O_4 cubiertas con pectina (cM) a la suspensión obtenida. Las mezclas (compósitos) se mantuvieron bajo agitación continua durante 60 minutos. Los microorganismos se contaron en placa realizando diluciones en serie en PBS e incubando a 37 °C durante 48 horas en condiciones aeróbicas.

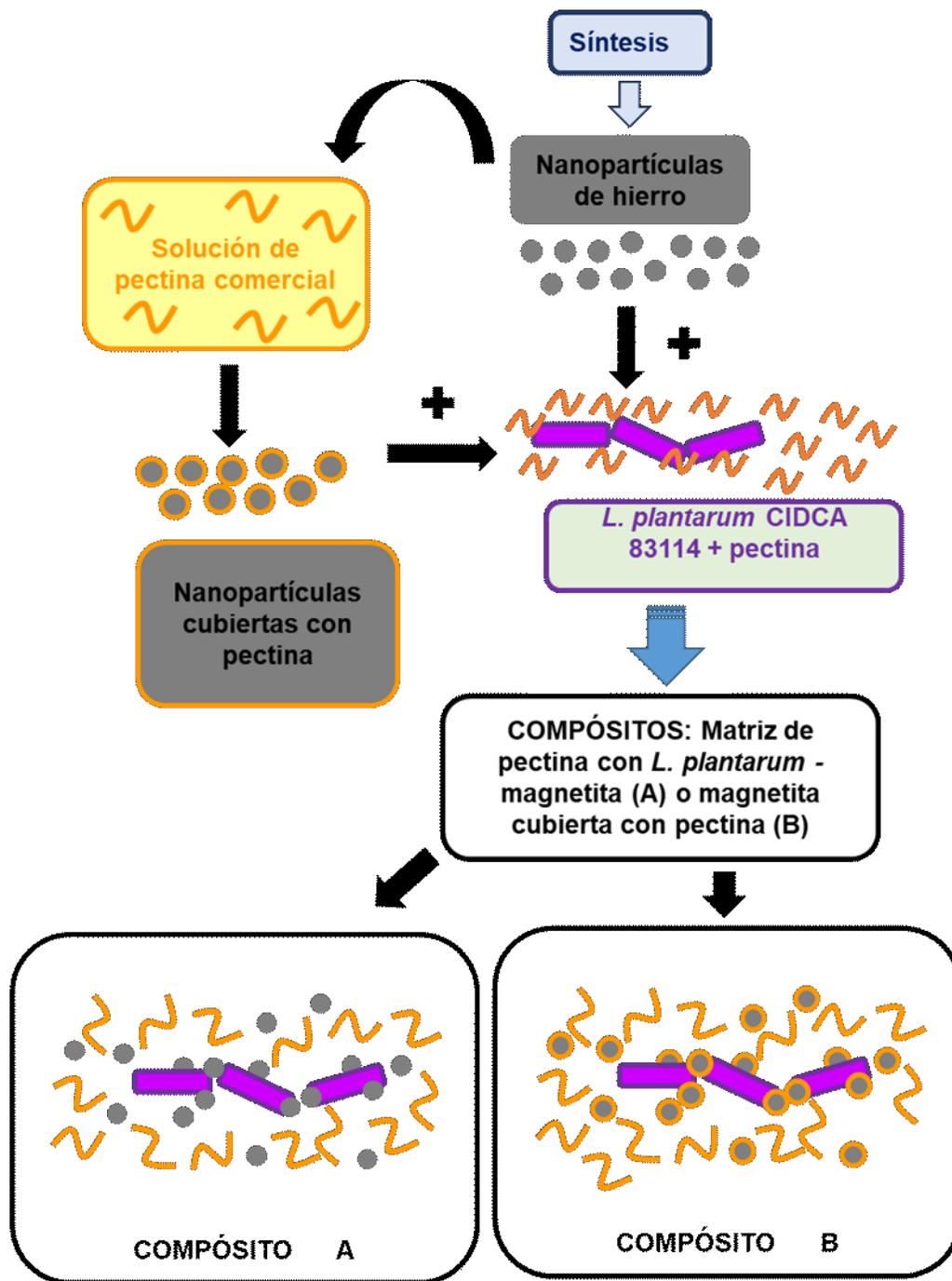


Figura IIA3. Esquema teórico de la producción de los compósitos.

IIA.2.5. Liofilización

Los compósitos de pectina con la concentración máxima de partículas cubiertas con pectina que no mostraron efecto inhibitor para las bacterias fueron liofilizados en un equipo Heto FD4 (Heto Lab Equipment, Dinamarca). Se realizaron recuentos en placa antes y después de la liofilización y durante 60 días de almacenamiento a 4 °C. Como controles se usaron microorganismos suspendidos en pectina al 1 % p/v, en M y en PBS, así como cultivos frescos.

IIA.2.6. Microscopía

IIA.2.6.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM). Los productos obtenidos (partículas magnéticas solas y en compósitos de pectina y bacterias) fueron montados sobre un substrato metálico con una cinta adhesiva bifaz de carbono, y recubiertos con una película de oro mediante el método de bombardeo (*sputtering*) empleando un Edwards S150B. Las muestras fueron analizadas usando un microscopio electrónico de barrido (FEI, Quanta 250 FEG) con un voltaje de aceleración de 5 kV y un detector de electrones para condiciones de alto vacío.

IIA.2.6.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM). La morfología de las muestras fue examinada por TEM (JEM 1200EX II Jeol, Japan) usando un voltaje de aceleración de 100 – 120 kV. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital (ES500W Erlangshen CCD Gatan). Una gota de la suspensión acuosa diluida de cada muestra fue depositada sobre la superficie de una grilla de cobre, que fue recubierta con una película delgada y amorfa de colodion (Servicio central de microscopía electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP).

IIA.2.7. Digestión *in vitro*.

Los experimentos fueron realizados tanto con las partículas magnéticas deshidratadas como con compósitos liofilizados (sección IIA.2.5). Se siguió el protocolo de la sección IA.2.3 (Capítulo IA).

IIA.2.8. Liberación de hierro.

El hierro liberado fue cuantificado antes y luego de la exposición a saliva, ambientes gástrico e intestinal simulados empleando el ensayo colorimétrico Fer-Color (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina), siguiendo la metodología de la sección IA.2.13. del Capítulo IA.

IIA.2.9. Viabilidad bacteriana.

Se realizó conteo en placa de bacterias antes y después de cada etapa de la digestión *in vitro*.

IIA.2.10. Reproducibilidad de los resultados

Todos los experimentos fueron realizados en triplicado usando tres ensayos independientes. Las diferencias relativas fueron reproducibles, independientemente de la preparación empleada. El análisis de la varianza (ANOVA) se llevó a cabo usando el *software* estadístico Infostat v2009 (Córdoba, Argentina). Si $p < 0.05$ la diferencia fue considerada estadísticamente significativa.

IIA.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IIA.3.1. Análisis fisicoquímico de las nanopartículas de hierro

IIA.3.1.1. Difracción de rayos X

La estructura cristalina de las partículas sintetizadas se evaluó mediante XRD previo y posterior al recubrimiento (Figura IIA4 A y B). El patrón M de los espectros de XRD presenta los picos correspondientes a las fases cristalinas de magnetita (Xavier *et al.*, 2014). No se pudieron detectar otros picos de difracción cristalinos de óxido de hierro, lo que indica que la estructura cristalina de las nanopartículas obtenidas consistió en cristales de magnetita prácticamente puros (Fe_3O_4 cúbico) (Xavier *et al.*, 2014). No se observó ninguna alteración en la estructura cristalina de las nanopartículas después de recubrirlas con pectinas (magnetita cubierta) (Figura IIA4 B), lo que significa que las NP sintetizadas fueron estables luego del proceso de recubrimiento.

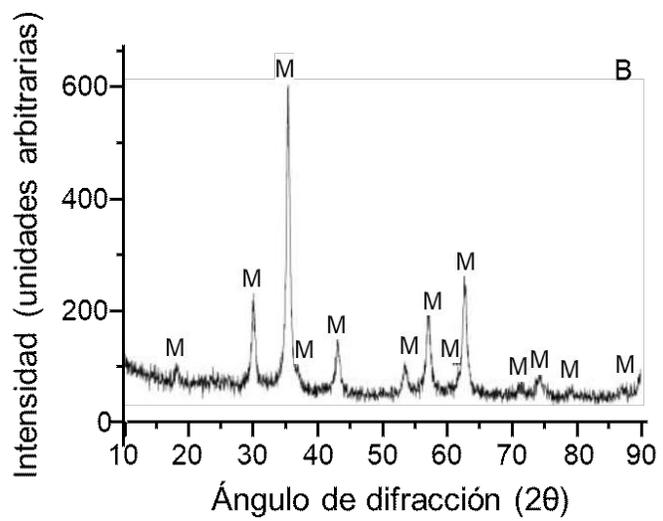
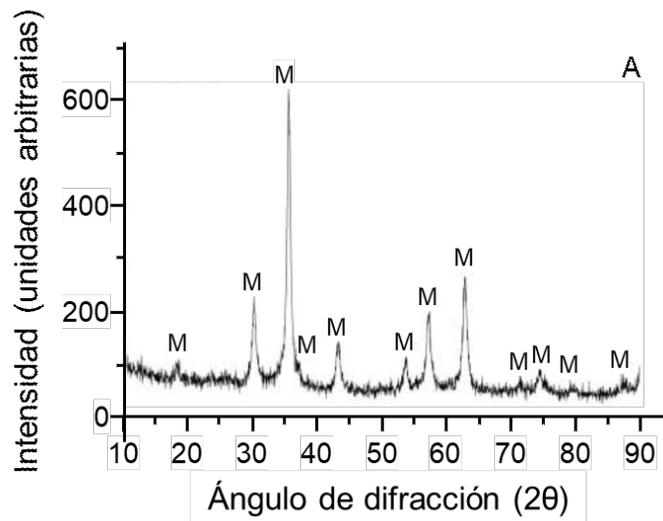


Figura IIA4. Espectros de difracción por rayos X de las partículas Fe_3O_4 sin recubrir (A), y cubiertas con pectina comercial (B).

IIA.3.1.2. Análisis por FTIR

Por medio de la espectroscopia infrarroja se pudo obtener un análisis cualitativo de las muestras mediante el estudio de las bandas de absorción que presentaron y su correlación con los grupos funcionales que tienen absorción característica en el espectro IR.

La Figura IIA5 muestra los espectros FTIR de pectina, M y cM. La banda a 1739 cm^{-1} puede ser asignada al modo vibracional $\nu\text{C=O}$ de ésteres o ácidos orgánicos, que corresponde a los galacturonatos de metilo de las pectinas. La banda ancha a 1610 cm^{-1} es el resultado de dos bandas, la de moléculas de agua embebidas en las moléculas de pectina, con un máximo en 1610 cm^{-1} , y el hombro en 1638 cm^{-1} , asociado al modo vibracional νCOO^- de ácidos galacturónicos (Xavier & Paskocimas, 2014). La relación entre la banda a 1739 cm^{-1} y la banda a 1638 cm^{-1} está directamente relacionada con el grado de metoxilación de las pectinas (Aburto *et al.*, 2015). Las bandas alrededor de 1400 cm^{-1} fueron atribuidas a los modos vibracionales δCH_2 , y el grupo de bandas en la región de $1200\text{-}850\text{ cm}^{-1}$, a la región de la "huella digital" (*fingerprint*) de los carbohidratos, una región compleja, rica en bandas correspondientes a la unión C-O-C glicosídica, y a los modos vibracionales δCOH y $\nu\text{C-C}$ (La Cava *et al.*, 2018). Dentro de este grupo, las bandas a 1147 cm^{-1} y 1015 cm^{-1} , así como el hombro a 1100 cm^{-1} han sido atribuidas a los ácidos urónicos presentes en pectinas (Aburto *et al.*, 2015).

Por otra parte, el espectro de Fe_3O_4 (M) se caracterizó por la presencia de una banda a 549 cm^{-1} , atribuida al modo vibracional $\nu\text{Fe-O}$, y el hombro a 620 cm^{-1} , correspondiente al modo vibracional $\delta\text{Fe-O}$ (Santos *et al.*, 2014). La banda a 1620 cm^{-1} indica la presencia de restos de humedad luego de la deshidratación a $60\text{ }^\circ\text{C}$.

En el espectro de cM, las bandas de M y de las pectinas pudieron ser claramente identificadas, especialmente las bandas a 549 cm^{-1} ($\nu\text{Fe-O}$), y las correspondientes al ácido urónico (1739 , 1638 , 1147 , 1100 , 1015 cm^{-1}). Esto pone en evidencia la eficiencia en el recubrimiento de M con pectinas para la obtención de cM (Figura IIA5).

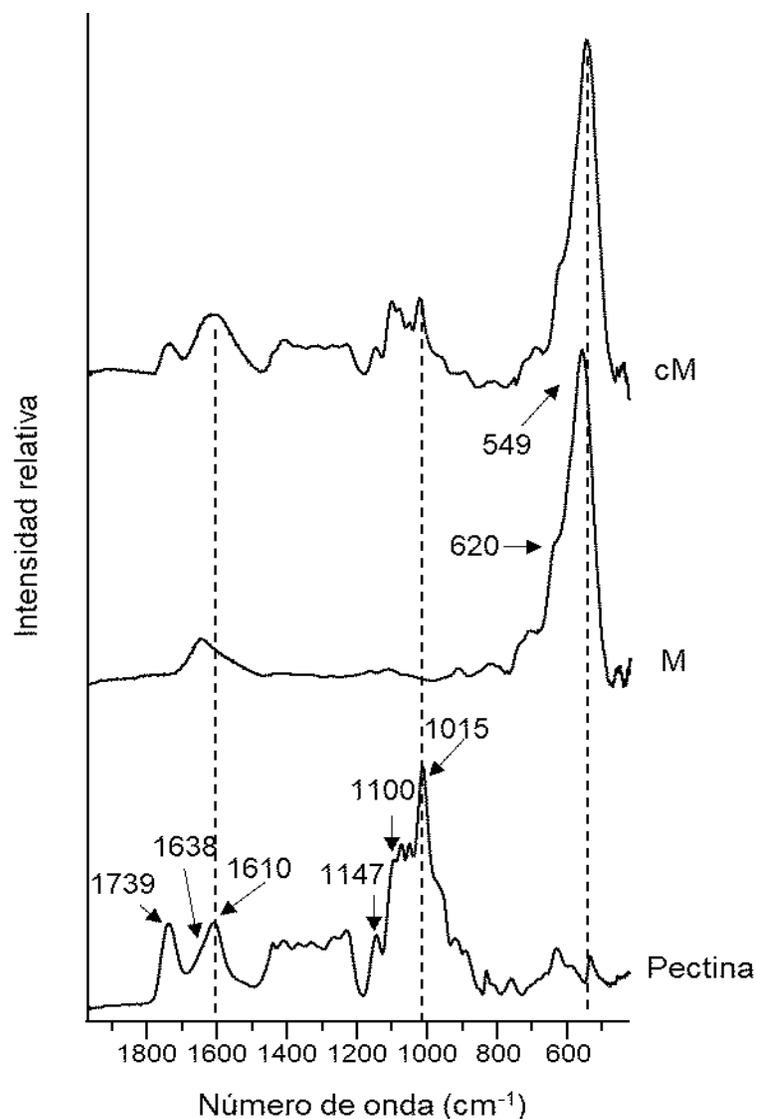


Figura IIA5. Espectros FTIR de M, cM y pectina comercial en la región de 1800 - 500 cm^{-1}

IIA.3.1.3. Parámetros hidrodinámicos, topología y morfología de M y cM

El valor obtenido de potencial zeta para las muestras dispersas en agua desionizada fue de -0.15 ± 0.10 mV para M, y de -29.30 ± 7.09 mV para cM (Tabla IIA2). En las soluciones ácidas y básicas, las partículas de Fe_3O_4 sin modificar usualmente convierten los residuos Fe-OH superficiales en las formas Fe-OH_2^+ y Fe-O^- , respectivamente (Habibi, 2014). En los materiales ensayados, la densidad de los sitios cargados sobre la superficie de las partículas magnéticas

en agua desionizada resultó baja (Tabla IIA2). Después de la adsorción de pectina (cM), la incorporación de grupos carboxilo determinó un aumento del valor absoluto del potencial ζ arrojando un valor más negativo, debido a la desprotonación parcial de los grupos ácidos al pH experimental (pH 4.0). Este cambio en el valor del potencial ζ contribuiría a la dispersión de cM (Arora *et al.*, 2017).

El diámetro hidrodinámico de M y el de cM presentaron distribución unimodal, indicando un adecuado control sintético sobre el tamaño, a pesar de que los índices de polidispersión (PDI) fueron moderadamente altos (> 0.7) (Tabla IIA2). Por otra parte, el tamaño de partícula en agua destilada se incrementó aproximadamente 18 veces luego del recubrimiento con pectinas ($p < 0.01$) (Tabla IIA2, Figura IIA6). El gran tamaño de las partículas secundarias de cM obtenido a partir de las mediciones DLS fue una consecuencia del recubrimiento polimérico de las partículas magnéticas primarias que afectó su dispersión.

Tabla IIA2. Tamaño de partícula y potencial ζ de M y cM

Muestra	Potencial ζ (mV)	PDI	Tamaño (nm)
M	-0.15 \pm 0.10	0.72	192.67 \pm 29.07
cM	-29.30 \pm 7.09	0.81	3502.19 \pm 291.04

Los grandes agregados observados resultarían tanto de la adsorción de pectina sobre las partículas, como de la matriz de gel de pectina conteniendo a las partículas (ver esquema de Figura IIA3). Desde el punto de vista molecular, el aumento del tamaño hidrodinámico estaría asociado a:

1) la expansión de la red de pectina a baja fuerza debida a las repulsiones coulombicas entre los grupos cargados a lo largo de la cadena del polímero, lo que obliga al polímero a adoptar una conformación alargada en forma de varilla. Por el contrario, frente a la adición de electrolitos o los cambios en el pH, se apantallan las fuerzas electrostáticas repulsivas y las cadenas poliméricas se contraen, adoptando una conformación más favorecida entrópicamente. Esto se conoce como efecto polielectrolítico (Lowe & McCormick, 2002);

2) el impedimento estérico de las cadenas (Sahu y Dutta, 2011).

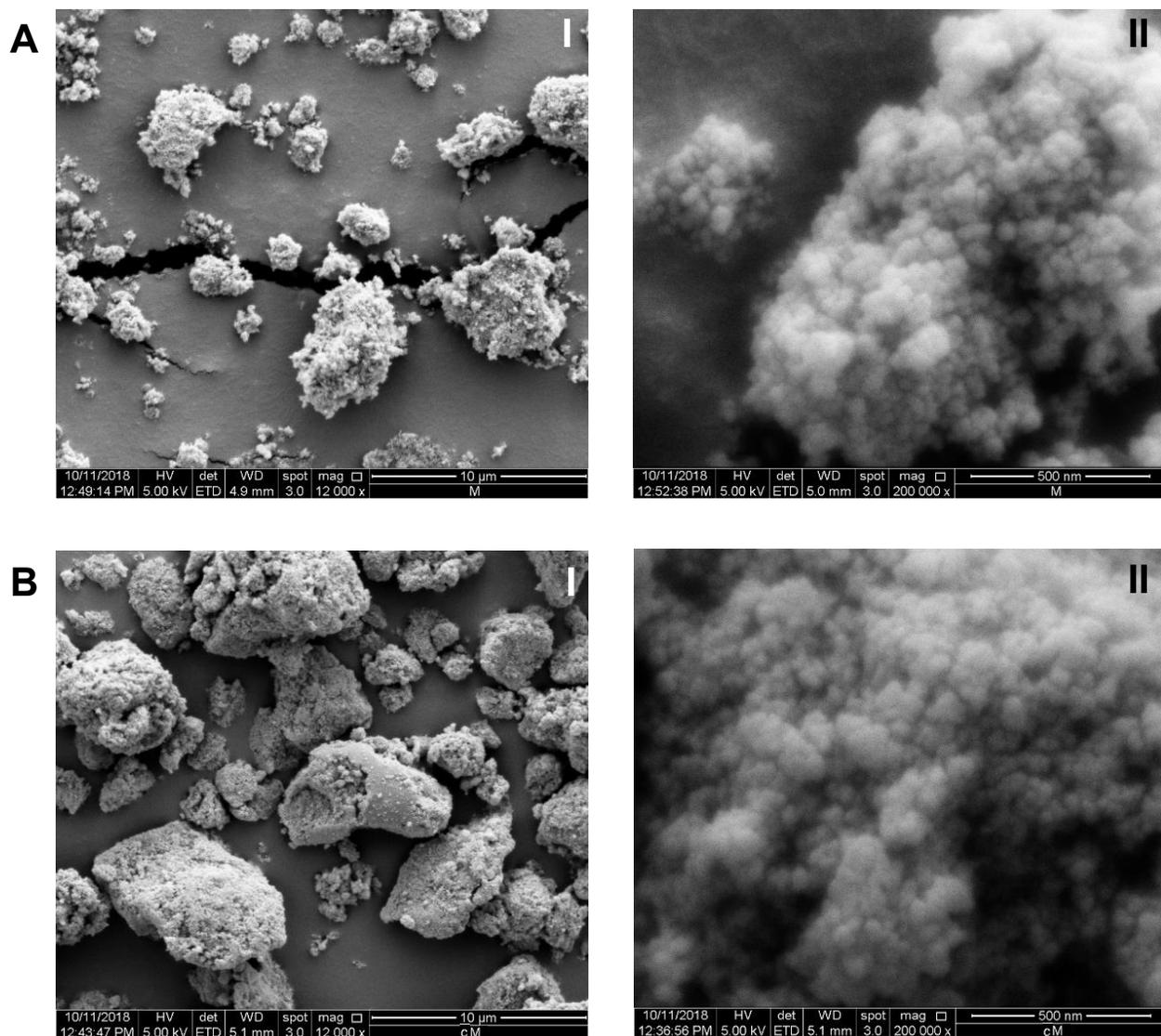


Figura IIA6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido para muestras de M (A) y cM (B). I y II denotan diferentes escalas.

La Figura IIA6 A (I y II) muestra las nanopartículas magnéticas sin la cubierta de pectina (M) con diámetros aproximados entre 150 – 200 nm, consistente con los resultados de DLS (Tabla IIA2). Los contornos de las partículas cM aparecen menos resueltos en las imágenes SEM debido a las cadenas de pectina adsorbidas sobre la superficie, aunque el tamaño individual no parece haber variado cuando se compara con M (Figura IIA6 B I y II).

Las imágenes TEM muestran que M están constituidas por varios pequeños cristales de óxido de hierro (Figura IIA7 A I y II). Luego del recubrimiento con pectina, las nanopartículas se agregan dando lugar a partículas de mayor tamaño (de aproximadamente 3000 nm) rodeadas por la pectina (Figura IIA7 B I y II), también consistentes con los resultados de DLS.

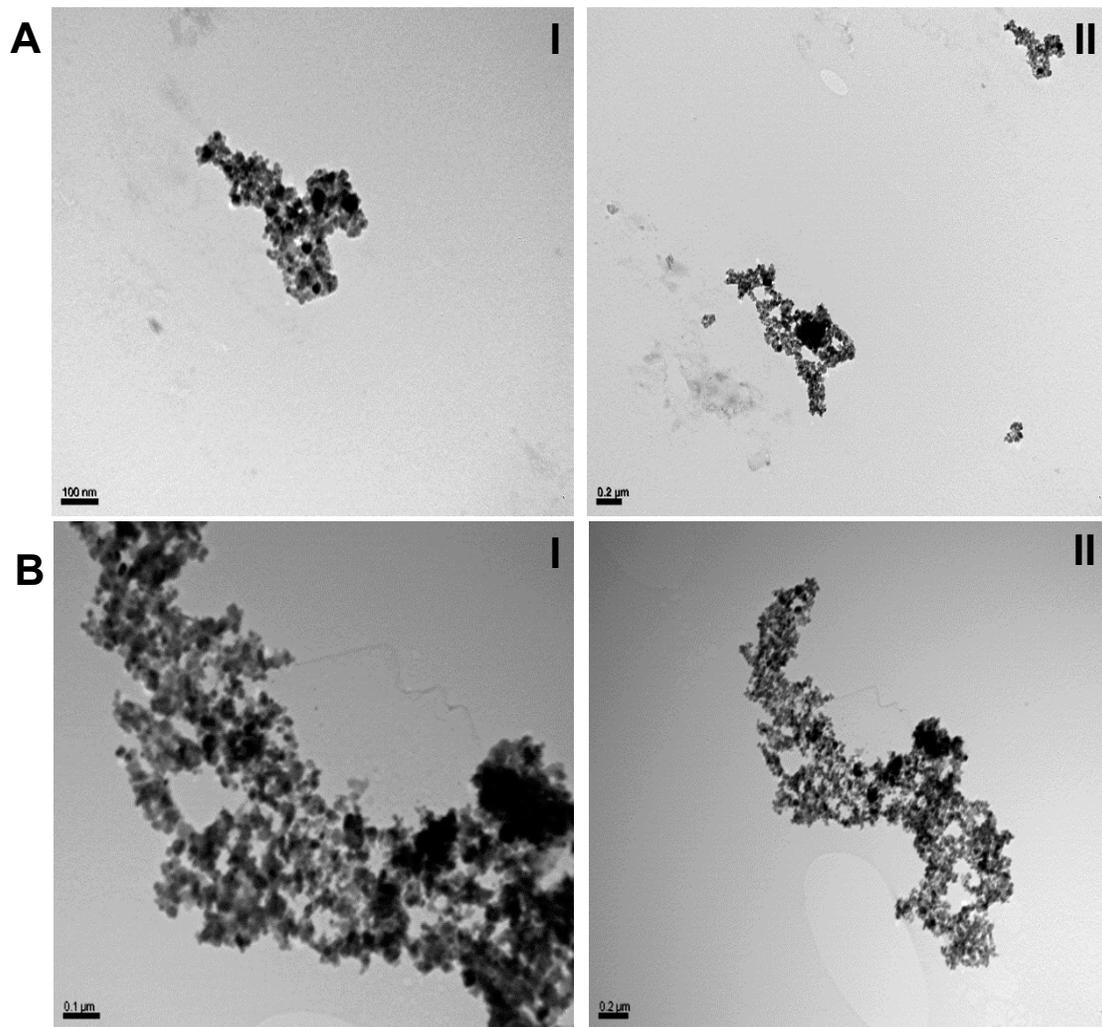


Figura IIA7. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión para muestras de M (A) y cM (B). I y II corresponden a diferentes escalas.

IIA.3.2. Estabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 en los compósitos

IIA.3.2.1. Efecto inhibitorio del hierro sobre bacterias.

Es sabido que el Fe(II) cataliza la producción de ROS a partir de O₂ conduciendo a un efecto deletéreo sobre las membranas lipídicas (Dai *et al.*, 2013); por este motivo fue evaluada la viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 luego de su exposición a diferentes cantidades de M y de cM (0; 0.01; 0.10 y 1.00 mg/mL). Dado que la viabilidad de las bacterias lácticas no resultó significativamente afectada por la presencia de óxidos de hierro (ANOVA test, $p > 0.05$) (Tabla IIA3), los experimentos siguientes fueron realizados utilizando la mayor concentración de nanopartículas ensayada (1.00 mg/mL).

Tabla IIA3. Efecto de M y cM sobre la viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114.

Muestra	Concentración de hierro (mg/mL)	Antes de liofilizar (UFC/mL)	Después de liofilizar (UFC/mL)
Control 1 (PBS)	0	12.36 ± 0.04	11.88 ± 0.34
Control 2 (pectina)	0	12.32 ± 0.04	12.26 ± 0.08
M	1.00	12.39 ± 0.04	12.14 ± 0.05
cM	1.00	12.38 ± 0.01	12.18 ± 0.09

IIA.3.2.2. Imágenes microscópicas de los compósitos.

Las imágenes SEM exhiben agregados de los compósitos, en los que no pueden visualizarse las nanopartículas individuales (Figura IIA8).

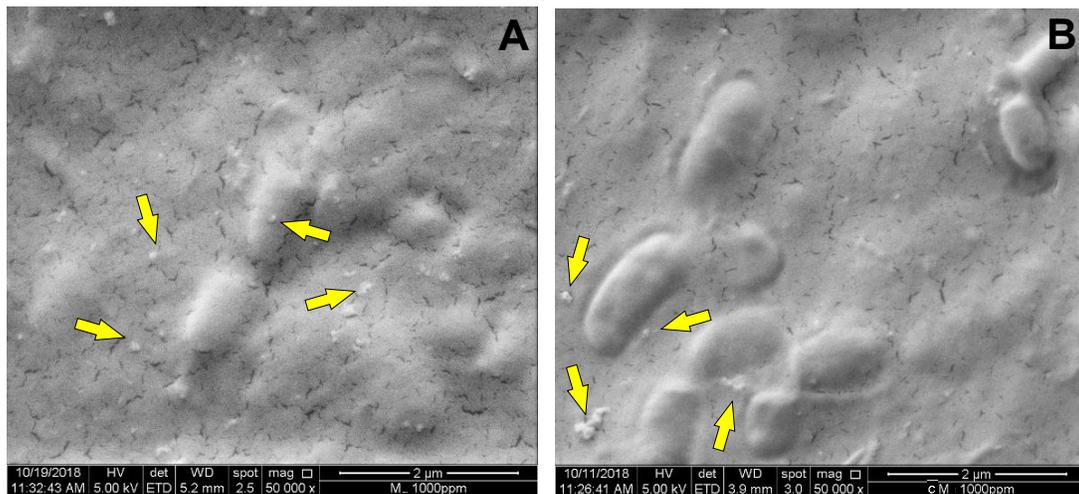


Figura IIA8. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de compósitos de *L. plantarum* CIDCA 83114 liofilizados con pectina en presencia de nanopartículas. A: bacterias en matriz de M y pectina; B: bacterias en matriz de cM y pectina. Las flechas señalan grupos de nanopartículas.

Por otra parte, en las imágenes TEM se observan bacterias junto a nanopartículas (Figura IIA9). En los compósitos que contenían M se observaron partículas aglomeradas y agregadas (Figura IIA9 A). Por el contrario, en los compósitos obtenidos con cM hay una matriz (gel de pectina) que retiene aglomerados de NP y bacterias, y la distribución de estos componentes en la matriz es homogénea (Figura IIA9 B). Por otra parte, el perfil de cada bacteria exhibe una capa externa con aspecto de gel, identificada como pectina.

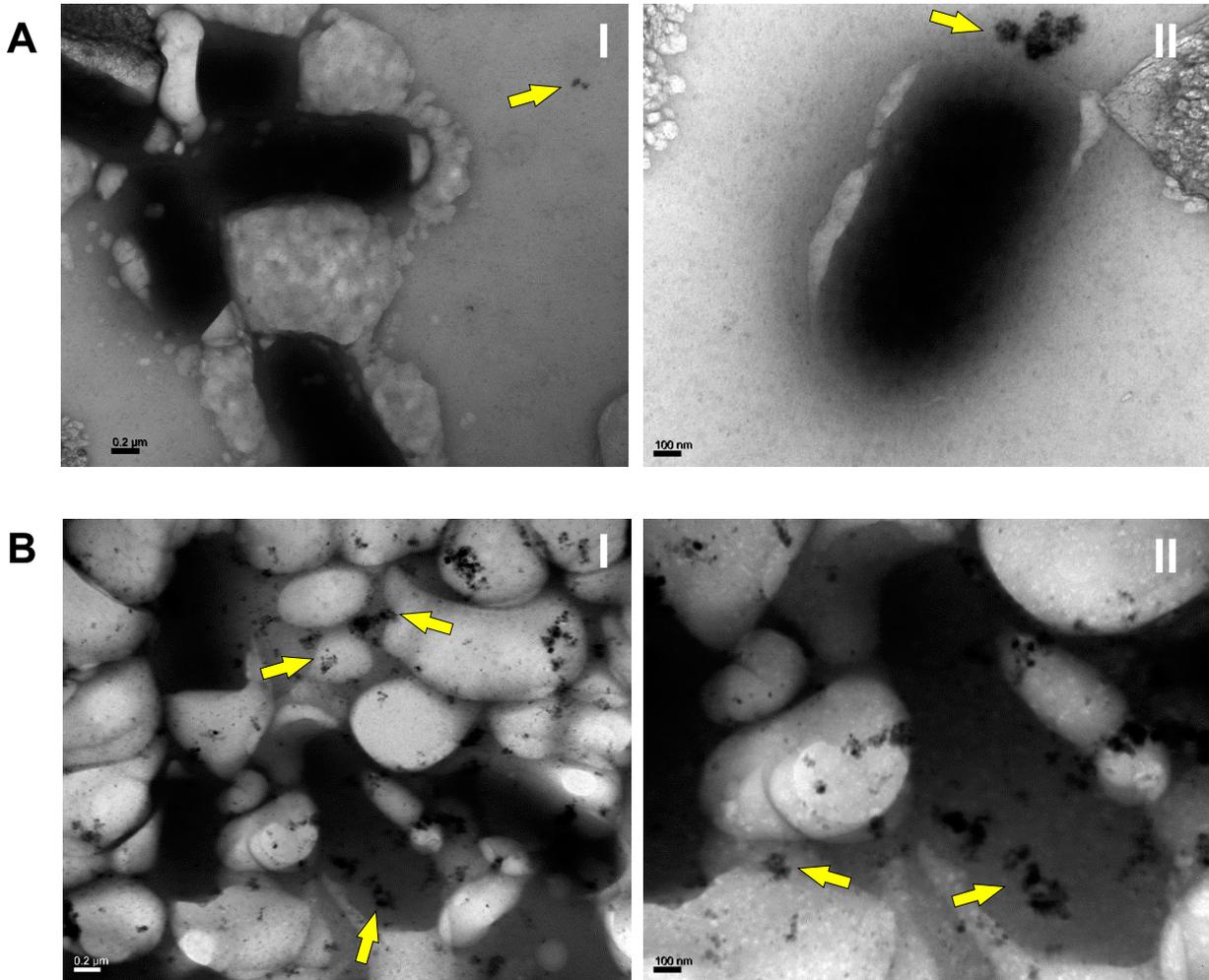


Figura IIA9. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de compósitos liofilizados de pectina, nanopartículas y *L. plantarum* CIDCA 83114. A: compósito con bacterias, pectina y M; B: compósito con bacterias, pectina y cM. I y II denotan un aumento de 50000x y 100000x, respectivamente. Las flechas señalan diferentes cúmulos de nanopartículas.

Las imágenes TEM fueron tomadas sin tinción negativa, porque se esperaba que las bacterias aparecieran más brillantes que las NP, debido a que están constituidas principalmente por átomos más livianos, y poco dispersivos. Por lo tanto, la aparición de estructuras oscuras significaría que las NP magnéticas se localizaron cerca de la membrana de las bacterias.

IIA.3.2.3. Liberación de hierro durante la digestión gastrointestinal simulada.

El modelo *in vitro* gastrointestinal permitió realizar los ensayos de liberación de hierro durante períodos de tiempo breves y estudiar la liberación específica (boca, estomago e intestino) ahorrando costo y tiempo. Las formas solubles del hierro esperables en los sobrenadantes de saliva, jugo gástrico y ambiente intestinal simulados son Fe(II) y Fe(III), así como los complejos de pectinas con estos cationes. La liberación de hierro en dichas formulaciones se presenta en la Figura IIA10.

El control, preparado en PBS, exhibió una liberación de hierro elevada para las cuatro muestras ensayadas. Este valor de hierro liberado fue significativamente mayor para los compósitos que contenían bacterias y cM ($p < 0.05$). En saliva simulada, la liberación de hierro fue baja en todas las muestras, probablemente debido al poco tiempo de contacto (Figura IIA10).

En medio gástrico simul

ado, la liberación de hierro fue inferior a $2.55 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ (Figura IIA10), esto puede ser explicado considerando que a pH 2.5 (medio gástrico), el medio no fue suficientemente ácido para disolver las partículas magnéticas. Además, los grupos carboxilo de las pectinas se encuentran mayoritariamente en su forma neutra (-COOH), induciendo la contracción de la red de pectina alrededor de las partículas, atrapándolas y evitando la disolución y liberación de hierro.

Finalmente, la exposición de las muestras a la solución intestinal simulada generó un incremento en la liberación de hierro (Figura IIA10).

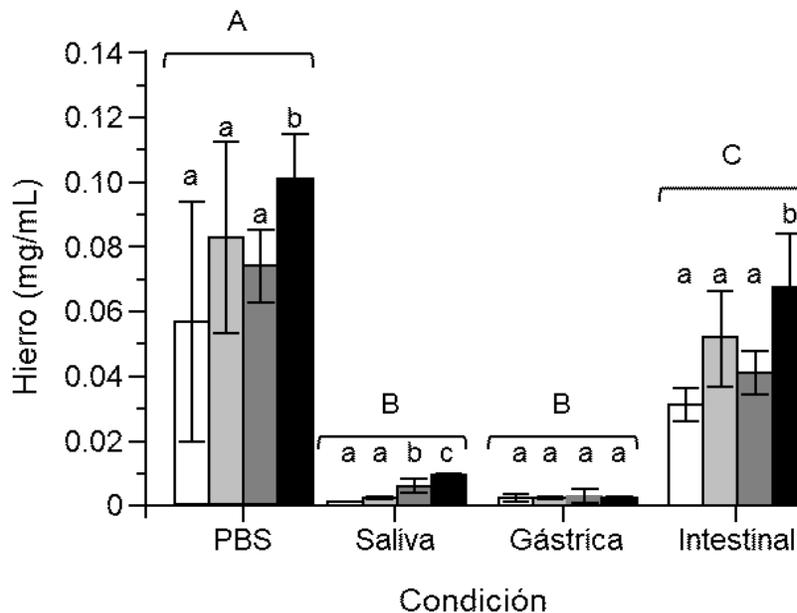


Figura IIA10. Cuantificación del hierro de diferentes formulaciones de magnetita luego de la exposición a los entornos de la digestión gastrointestinal simulada. Barras blancas: M. Barras color gris claro: cM. Barras color gris oscuro: compósito con *L. plantarum* CIDCA 83114 y 1.00 mg/mL de M. Barras negras: compósito con *L. plantarum* CIDCA 83114 y 1.00 mg/mL de cM. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos dentro de un mismo ambiente ($p < 0.05$). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre entornos.

En líneas generales, el medio básico conduce a la ionización del material magnético, formando sitios superficiales Fe-O^- que afectan su solubilidad (Habibi, 2014). En el caso puntual de las muestras analizadas, la menor concentración de hierro libre de las muestras con M (barra blanca) podría explicarse por su escasa solvatación y la consecuente disminución de la superficie expuesta al medio. El uso de cM en el compósito resultó muy relevante para la liberación de hierro en el medio intestinal. La interacción entre las partículas de magnetita y la pectina, facilitada por la acidificación y calentamiento a 60 °C, parece contribuir a solvatar las partículas. Además, debe considerarse que a pH intestinal (pH 8), los grupos carboxilo están desprotonados y solvatados ($-\text{COO}^-$), por lo que las cadenas poliméricas se expanden (Habibi, 2014).

El efecto sinérgico de los grupos Fe-O^- y $-\text{COO}^-$ en la liberación de hierro pudo observarse en el compósito de cM con bacterias. Por el contrario, el compósito con M quedó atrapado de alguna manera en el gel hinchado, y liberó una menor concentración de hierro que las formulaciones

con cM. Otros suplementos de hierro comerciales recubiertos con polímeros hidrofílicos exhibieron perfiles de liberación de hierro similares a los observados en los medios gastro-intestinales simulados (Schafer *et al.*, 2000).

Considerando el problema mundial de alcanzar la ingesta diaria recomendada de hierro y el desafío de incluir hierro soluble en los productos alimentarios, el diseño de NP propuesto en este capítulo parece una estrategia interesante para resolver este problema.

IIA.3.2.4. Viabilidad bacteriana durante la digestión *in vitro* y el almacenamiento.

La digestión gastrointestinal simulada *in vitro* se realizó inmediatamente luego de la liofilización de las muestras y se procedió a realizar el recuento bacteriano o a la conservación de las mismas para el estudio de la viabilidad durante el tiempo de almacenamiento.

La Figura IIA11 muestra la viabilidad de los microorganismos liofilizados durante la digestión *in vitro*. Como se puede observar, no existen diferencias significativas con respecto a la viabilidad antes de la digestión *in vitro* y después de la exposición a las soluciones simuladas de saliva y ambiente gástrico. Sin embargo, en condiciones intestinales simuladas, se observa una caída de 1 log UFC/mL (Figura IIA11). Además, en los compósitos que contienen nanopartículas (M o cM) y bacterias, el decaimiento de la viabilidad resultó menor en los tres medios simulados (Figura IIA11).

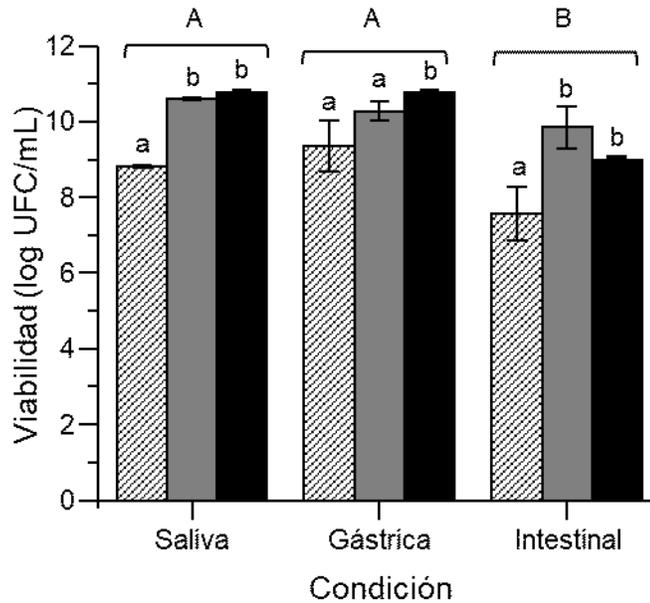


Figura IIA11. Viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 liofilizada en compósitos de pectina al 1% p/v con M (barras grises oscuras) o cM (barras negras) después de la exposición a las soluciones gastrointestinales simuladas. Barras grises claras: microorganismos liofilizados sin pectina (controles). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de un mismo ambiente ($p < 0.05$). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre entornos.

El proceso de liofilización redujo escasamente la viabilidad, y el recubrimiento de las partículas magnéticas con pectina parece haber pasivado la superficie evitando la activación del oxígeno molecular (Tabla IIA3). Luego de 60 días de almacenamiento, la viabilidad bacteriana fue 11.33 ± 0.01 log UFC/mL, es decir que presentó un decaimiento de solamente 0.85 log UFC/mL con respecto al de tiempo cero (Figura IIA12).

Considerando que los beneficios del consumo de probióticos pueden ser obtenidos cuando se administran en concentraciones de al menos 7 log UFC de microorganismos viables por gramo de producto (Kim *et al.*, 2017), los valores obtenidos tanto luego de la digestión como después de 60 días de almacenamiento garantizan la ingestión de las cantidades requeridas. Como la pectina forma parte de la fibra dietaria, la ingesta de las NP con pectina facilitaría su llegada al intestino ya que las pectinas no serían hidrolizadas en el tracto gastro-intestinal superior (Figura

IIA12). Debido a su condición de fibra dietaria, las pectinas han sido usadas en sistemas de transporte y liberación de drogas cuyo destino es el intestino (Hill *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2007; Marras-Marquez *et al.*, 2015). En este capítulo, las bacterias probióticas, cuyo *target* también es el intestino, llegarían al sitio de acción transportadas por las pectinas.

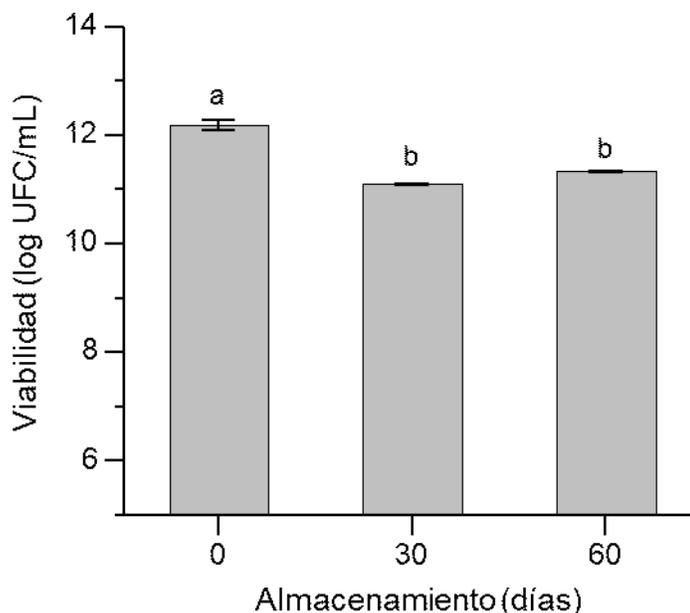


Figura IIA12. Viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 después de liofilizar en pectina al 1% p/v y 1.00 mg/mL de cM a 4 °C. Viabilidad antes de la liofilización: 12.38 ± 0.01 UFC/mL.

Desde el punto de vista tecnológico, la presencia de carbohidratos poliméricos, tales como las pectinas, genera matrices amorfas en las cuales las reacciones bioquímicas se ven restringidas debido a la elevada a que la viscosidad de la matriz disminuye los movimientos vibracionales y rotacionales (Tymczyszyn *et al.*, 2012; Romano *et al.*, 2016; Morris *et al.*, 2010). Esto asegura una alta viabilidad bacteriana durante el almacenamiento (Figura IIA12).

En síntesis, la elevada viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 tanto después de la digestión *in vitro* como durante el almacenamiento de las muestras, demuestra la eficiencia de las pectinas no solamente como agentes protectores adecuados para microorganismos probióticos sino también como matrices amorfas durante el almacenamiento.

IIA.4. CONCLUSIONES

La pureza de las nanopartículas de Fe_3O_4 (M y cM) analizada por XRD permitió observar que la estructura cristalina de las NP consistió en cristales de magnetita prácticamente puros (Fe_3O_4 cúbico). Esto significa que las nanopartículas sintetizadas no sufrieron modificaciones luego del proceso de recubrimiento con pectina. La eficiencia del recubrimiento con este polímero en la obtención de cM, se pudo confirmar con los espectros FTIR de cM, los cuales mostraron la presencia de bandas características de la pectina.

Una vez sintetizadas y demostrada la pureza de las nanopartículas M y cM, evaluar el efecto inhibitorio de las NP de Fe_3O_4 sobre la viabilidad de *L. plantarum* CIDCA 83114 fue un paso fundamental para avalar la propuesta del compósito de pectina, NP y esta cepa bacteriana. La mayor cantidad de NP a la que se expuso a las bacterias fue de 1 mg/mL y no produjo una disminución significativa de la viabilidad respecto de la viabilidad del control de bacterias en pectina, sin el agregado de las NP.

El siguiente paso fue analizar la capacidad del compósito de liberar el hierro de las nanopartículas en el intestino. Luego de la digestión gastrointestinal simulada, se pudo observar que la mayor liberación de hierro se produjo en la solución intestinal. Además, las nanopartículas de Fe_3O_4 cubiertas con pectina (cM) mostraron una liberación de hierro significativamente mayor que las nanopartículas sin cubrir (M), permitiendo deducir que la cubierta de pectina interviene de manera positiva facilitando la disponibilidad de hierro de las nanopartículas en medio intestinal.

Si bien la viabilidad de las bacterias luego de la digestión gastrointestinal simulada disminuyó en medio intestinal, esto también ocurrió en el control de bacterias en pectina sin el agregado de nanopartículas. Además, los compósitos con M y cM mostraron una viabilidad significativamente mayor que el control en medio intestinal.

Por último, se evaluó la viabilidad bacteriana durante 60 días de conservación de los compósitos a 4 °C. Al finalizar el tiempo de conservación, el conteo en placas de agar arrojó valores altos de viabilidad bacteriana con una disminución respecto del inicio de la conservación, lo que permite concluir que la matriz de pectina tiene gran eficiencia como agente protector para los microorganismos probióticos.

En este capítulo se desarrolló un sistema de transporte probiótico basado en nanopartículas de hierro y pectinas. El procedimiento de recubrimiento de las partículas magnéticas resultó

particularmente relevante en la liberación dirigida del hierro. Además, la presencia de una fuente de hierro en el ambiente acuoso del compósito no afectó la viabilidad bacteriana. Su eficiencia tanto en el transporte de hierro como en la estabilización bacteriana lo convierte en un ingrediente funcional contribuyendo a superar la deficiencia de hierro a nivel poblacional, con aplicaciones potenciales en el desarrollo de alimentos funcionales.

CAPÍTULO II

PARTE B. Incorporación de las nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas, en kefir de agua.

IIB.1. INTRODUCCIÓN

IIB.1.1. Bebidas funcionales naturalmente probióticas

Las bebidas funcionales confieren beneficios para la salud y reducen el riesgo de enfermedades humanas. Es por este motivo que la industria alimentaria tiene gran interés en su desarrollo (Yépez *et al.*, 2019). El kefir es una bebida fermentada tradicional, muy difundida en los países de Europa del este (Leite *et al.*, 2013). Actualmente, su consumo se ha extendido en todo el mundo y se considera como un producto saludable con alto valor nutricional en Europa, Asia y América del Norte y del Sur (Kakisu *et al.*, 2011; da CP Miguel *et al.*, 2011).

El kefir tiene demostradas propiedades beneficiosas para la salud del huésped, entre las que se encuentran los efectos antimutagénicos contra 2,3-dimetil-4-aminobifenilo (DMAB) y N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), los efectos hipocolesterolémicos y antiaterogénicos, los efectos anticancerígenos, la actividad antimicrobiana (*e.g.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*), antifúngica y antioxidante, entre las más importantes, y actividad β -galactosidasa (Plessas *et al.*, 2017).

El kefir se obtiene por inoculación de los gránulos de kefir (iniciadores de la fermentación) en un sustrato (generalmente leche). Los gránulos de kefir consisten en una matriz de polisacáridos y proteínas que contiene una mezcla compleja de lactococos, lactobacilos, bacterias ácido acéticas y levaduras que se encuentran en asociación simbiótica. Si bien la leche (de oveja, cabra, vaca) es generalmente el sustrato de fermentación, existen otros sustratos cuyo uso se ha incrementado a lo largo del tiempo (jugos de frutas, melaza, entre otros) (Santos *et al.*, 2003; Harta *et al.*, 2004). Estas preparaciones son a base de agua y los gránulos son conocidos como gránulos de kefir de agua.

Aunque las leches fermentadas son las bebidas funcionales más difundidas en Europa occidental y América (Marsh *et al.*, 2014), las bebidas fermentadas no lácteas han recibido un creciente interés debido al aumento del número de consumidores que deciden optar por dietas alternativas (veganas, vegetarianas, etc.) (Kandylis *et al.*, 2016; Prado *et al.*, 2008). Además, las matrices alimentarias alternativas a la leche pueden aportar importantes combinaciones de antioxidantes, fibra, minerales y vitaminas, evitando alérgenos e intolerancias lácteas.

IIB.1.1.1. Kefir de agua

El kefir de agua es una bebida fermentada ácida y ligeramente alcohólica cuya fermentación se inicia al inocular gránulos de kefir de agua en soluciones de carbohidratos (Bengoa *et al.*, 2020). Los gránulos de kefir de agua consisten en un exopolisacárido que contiene dextrano, un polímero de glucosa, compuesto principalmente por enlaces lineales α -D-1,6 con un bajo porcentaje de cadenas laterales unidas por enlaces α -1,3 (Coma *et al.*, 2019; Fels *et al.*, 2018). Ésta es la principal diferencia con los gránulos de kefir de leche, los cuales tienen un heteropolisacárido más complejo llamado kefirán (Farnworth, 2006). El consorcio de microorganismos presentes en el gránulo de kefir de agua también es diferente (Stadie *et al.*, 2013; Laureys y de Vuyst, 2014). En efecto, la población bacteriana del kefir de agua consiste en una población dominante de *Zymomonas*, bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), bacterias ácido acéticas (*Acetobacter* y *Gluconacetobacter*) y bifidobacterias (Marsh *et al.*, 2013). La población de levaduras del gránulo de kefir de agua está compuesta principalmente por *Saccharomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Zygotorulaspóra*, *Dekkera*, *Zygosaccharomyces* y *Meyerozyma* (Marsh *et al.*, 2013).



Figura IIB1. Kefir de agua, matriz rica en dextrano (transparente)

Para la producción de la bebida, los microorganismos presentes en los gránulos transparentes de dextrano, fermentan una solución de sacarosa (hasta 80 g/L) (Waldherr *et al.*, 2010). Los gránulos de kefir se consiguen en dietéticas y resisten los ciclos de fermentación, lo que permite su reutilización de manera indefinida. Debido a esto y a su gran aporte probiótico, las bebidas fermentadas con gránulos de kefir de agua son altamente consumidas por consumidores

preocupados con los alimentos que ingieren, en particular los veganos y vegetarianos. En este caso, los consumidores suelen tener un aporte deficiente o nulo de diversos nutrientes, tales como el hierro, que se encuentra en mayores concentraciones y más biodisponible en alimentos de origen animal (hierro hemínico). Esto hace a las poblaciones veganas más propensas a tener enfermedades asociadas a la deficiencia de hierro (McGirr *et al.*, 2017).

Los riesgos de desarrollar anemia por deficiencia de hierro hacen que sea necesario combatir este problema recurriendo a herramientas como la fortificación con hierro de alimentos asociados a la dieta vegana. Es por este motivo que resulta interesante el desarrollo de una bebida de kefir fortificada con NP de hierro.

IIB.1.2. Ensayos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* representan modelos necesarios para estudiar el efecto de fármacos o ingredientes alimentarios en el huésped. Con este fin, cada año, se utilizan millones de animales de experimentación en todo el mundo, ya sea de manera completa o sus órganos o tejidos (Doke & Dhawale, 2015). Para este propósito, los animales son sacrificados y los animales que sobreviven a los ensayos son sacrificados al final de un experimento para evitar el sufrimiento (Doke & Dhawale, 2015). Esto ha planteado un dilema ético, siendo tema de debate durante mucho tiempo. Así, se han aprobado varias leyes para controlar el uso de los animales y minimizar el sufrimiento de los animales durante la experimentación. Actualmente se aplica la estrategia conocida como las 3 R, que significa reducción, refinamiento y reemplazo del uso de animales de laboratorio (Ranganatha & Kuppast, 2012). Este enfoque recomienda el uso de un número mínimo de animales, es decir, la "reducción" del número total de animales utilizados en un experimento. El uso de animales debe planificarse y "refinarse" cuidadosamente de tal manera que se minimice el dolor y el sufrimiento causados durante el experimento. Además, si es posible, los animales superiores deberían ser "reemplazados" por metodologías alternativas y organismos inferiores.

Es en este sentido que para estudiar la toxicidad de un compuesto en un sistema vivo se puede recurrir al uso de un organismo inferior como la *Artemia salina*, que es muy sensible a una gran variedad de tóxicos.

IIB.1.2.1. *Artemia salina* como sistema vivo para medir toxicidad

Artemia salina es un crustáceo branquiópodo que carece de caparazón rígida, su cuerpo es delgado y alargado y su longitud puede variar en función de las condiciones ambientales y del sexo, llegando a alcanzar 10-15 mm en etapa adulta (Sánchez Romero, 2018).

Este crustáceo posee uno de los mejores sistemas de osmorregulación, lo que le permite vivir en un gran rango de salinidades. Además, se encuentra adaptado a un amplio rango de temperaturas desde 6 a 35 °C (Sánchez Romero, 2018). Si bien presenta una gran resistencia a condiciones extremas, *Artemia salina* presenta la capacidad de producir quistes cuando la supervivencia de la población se pone en peligro, como es el caso de ambientes con elevada salinidad, baja concentración de oxígeno o escasez de alimento. Todas las hembras poseen la habilidad de poder reproducirse de forma ovovivípara u ovípara. La reproducción ovípara genera embriones en estado de gástrula que son encapsulados, dando lugar a lo que se conoce como quiste (Sánchez Romero, 2018).

Estos quistes poseen una gran resistencia a temperaturas extremas, siendo viables aun a temperaturas inferiores al punto de congelación o incluso luego de expuestos a temperaturas de ebullición durante períodos cortos. Además, la presencia de trehalosa como azúcar constitutivo de los quistes (15% de su peso seco), les otorga una mayor resistencia a la deshidratación, protegiendo las membranas y proteínas (MacRae, 2016).

El ciclo de vida de *Artemia salina* consta de 3 fases, el quiste (estado criptobiótico), la larva (nauplio, metanauplio y juvenil) y el adulto. Cuando se dan condiciones de temperatura, salinidad y oxigenación del agua adecuados, el metabolismo de los embriones encapsulados se reactiva. Primero, los quistes bicóncavos se hidratan adoptando una forma esférica, y permitiendo que el metabolismo del embrión se reactive. Esto se conoce como quiste activado o quiste hidratado (Sánchez Romero, 2018). Tras unas 24 horas, la membrana externa de los quistes se rompe (eclosión), dando lugar al embrión rodeado de una membrana. Durante las horas siguientes, el embrión se desprende de la cáscara vacía a la cual permanece unido dentro de la membrana de eclosión hasta que se completa su desarrollo. En un breve periodo, la membrana se desprende emergiendo el nauplio para nadar libremente (Sánchez Romero, 2018). En su primer estadio, el nauplio mide entre 400-500 micras de longitud y posee color anaranjado debido a las reservas de vitelo de las que se alimenta, ya que todavía no posee un aparato digestivo funcional. Éste es el estadio utilizado para los ensayos de toxicidad.

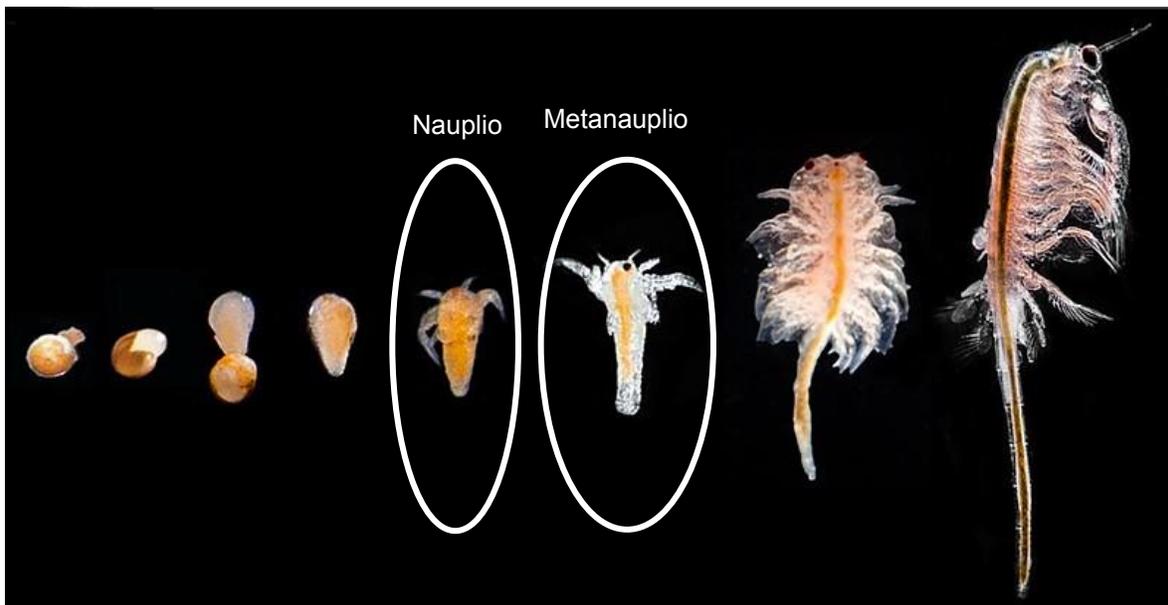


Figura IIB2. Ciclo de vida de artemia salina en donde se puede observar el desarrollo larvario desde la eclosión del quiste hasta la adultez, pasando por los estadios de nauplio y metanauplio. (Imagen: Yockteng, 2017).

Artemia es probablemente el único género animal cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua por ser fuente de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha sido un elemento clave para su utilización en ensayos biológicos (Pino Pérez *et al.*, 2010). Por razones prácticas, la disponibilidad permanente de huevos (quistes) a partir de los cuales se obtienen ofrece las siguientes ventajas en los ensayos de toxicidad:

- no hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente,
- se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica,
- rapidez del ensayo (entre 28 a 72 h desde la eclosión hasta el criterio de evaluación)
- bajo costo de los quistes,
- tamaño pequeño de cada nauplio permite realizar el ensayo en microplacas,
- las pruebas pueden realizarse donde y cuando sea necesario,
- fácil manipulación y mantenimiento en condiciones de laboratorio,
- se reduce el número de animales vertebrados superiores utilizados en laboratorios

El test de toxicidad con *Artemia salina* es mundialmente aceptado para evaluar este parámetro en una amplia diversidad de compuestos, evitando el uso de animales superiores. Se trata de un ensayo general y de amplio uso, que permite determinar el efecto letal de los compuestos sobre larvas de *Artemia salina* en estadio de nauplio, y de esta manera predecir su habilidad para producir la muerte de células en cultivo de tejidos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos (Pino Pérez *et al.*, 2010).

Los bioensayos de toxicidad tienen por objetivo clasificar sustancias de acuerdo a su peligrosidad. La DL50 es la dosis letal que provoca la muerte del 50% de la población y es un indicador clave para determinar la capacidad tóxica de muchas sustancias y reglamentar su uso (Pacheco Gómez, 2011). En la Tabla IIB1 se presenta la clasificación de la toxicidad de las sustancias en función de su DL50 (Baldera Paico y Dejo Tovar, 2018).

Tabla IIB1. Clasificación de la toxicidad.

Categoría	Rango de valores de DL50
Extremadamente tóxico	0.1 - 10 µg/mL
Altamente tóxico	10 - 100 µg/mL
Moderadamente tóxico	100 - 500 µg/mL
Ligeramente tóxico	500 - 1000 µg/mL
Prácticamente no tóxico	1000 - 1500 µg/mL
Relativamente inocuo	> 1500 µg/mL

IIB.1.3. Mecanismos de absorción de hierro en células intestinales y ensayos *in vitro* para su determinación

Como se mencionó en la sección 1.4.1 de la introducción general de esta tesis, la absorción de hierro hemínico es eficiente y es transportado, en compañía del anillo protoporfirina, por la proteína transportadora de hemo 1 (HCP1). Por el contrario, el hierro no hemínico de la dieta Fe(III) debe reducirse antes del transporte y la encargada de hacerlo es la enzima citocromo b duodenal (DCYTB) (Gulec *et al.*, 2014). Luego de la reducción, el Fe(II) se transporta a través de la membrana del borde en cepillo de los enterocitos mediante la acción de la proteína DMT1

(Gulec *et al.*, 2014). El hierro intracelular se transfiere rápidamente a través de la membrana basolateral por la proteína FPN1 cuando las demandas corporales de hierro son altas. La salida celular del hierro ferroso está funcionalmente acoplada con la oxidación del hierro a través de la hefestina (HEPH). En última instancia, el hierro férrico se une a la transferrina en los fluidos intersticiales o en los vasos sanguíneos y se distribuye por todo el cuerpo.

Cuando la demanda es baja, el hierro se puede almacenar como ferritina, un complejo proteico de almacenamiento de hierro intracelular (Gulec *et al.*, 2014).

Por su parte, el Fe(III) nanoparticulado (9 μm -50 nm) (insoluble a pH duodenal) puede ser captado a través de vías endocíticas mediadas por clatrin y micropinocitosis (Perfecto *et al.*, 2017).

Los mecanismos descritos justifican el uso de células intestinales Caco-2 para determinar la absorción de hierro y los mecanismos reguladores involucrados. Este modelo celular se ha utilizado ampliamente para estudios de bioaccesibilidad del hierro (Scheers *et al.*, 2014).

El modelo experimental de digestión *in vitro* para exponer a células Caco-2 y la posterior determinación de la formación de ferritina es una herramienta para evaluar y predecir la bioaccesibilidad del hierro de los productos fortificados para los seres humanos (Amagloh *et al.*, 2017).

Objetivos específicos

Teniendo en cuenta la problemática de la carencia de hierro que se aborda a lo largo de toda la tesis y el carácter naturalmente probiótico de las bebidas fermentadas con gránulos de kefir de agua, ampliamente consumidas por la población vegana, los objetivos de este capítulo son:

- Incorporar las nanopartículas (NP) de Fe_3O_4 (M) y de Fe_3O_4 cubiertas con pectina (cM) en bebidas fermentadas con gránulos de kefir de agua
- Evaluar la toxicidad de las NP en *Artemia salina* como modelo *in vivo*.
- Analizar los posibles cambios de pH y composición de polisacáridos presentes en las bebidas durante la vida útil de la bebida, así como también, cambios en la viabilidad de bacterias lácticas y levaduras totales.
- Realizar una digestión gastrointestinal simulada de las bebidas probióticas a diferentes tiempos de conservación a 4 °C
- Evaluar la toxicidad de las NP sintetizadas y de las preparaciones digeridas sobre células intestinales Caco-2/TC7
- Cuantificar la absorción del hierro proveniente de la digestión de las bebidas, en células intestinales Caco-2/TC7
- Investigar los mecanismos de internalización del hierro utilizando distintos inhibidores de la endocitosis

IIB.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IIB.2.1. Síntesis de Fe₃O₄

Las nanopartículas de Fe₃O₄ (M) o Fe₃O₄ cubiertas con pectina (cM) se sintetizaron de la misma manera que en el Capítulo IIA, sección IIA.2.1.

IIB.2.2. Test de toxicidad con *Artemia salina*

Se determinó la toxicidad de las NP de óxido de hierro utilizando *Artemia salina* como modelo animal (adaptado de Brix *et al.*, 2003; Rajabi *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015). Para ello, se adquirieron quistes inactivos de *Artemia salina* (Aquapex®-Artemia "pro", Israel). Para simular el agua de mar, se disolvió una sal marina comercial (1.5% p/v) en agua destilada y se adicionaron antibióticos Anti-anti™ (GIBCO, EE.UU) para evitar la contaminación. Se inocularon los quistes (0.2 % p/v) y se incubaron durante 36-38 h a 28-30 °C bajo burbujeo constante y con una fuente de luz incandescente de filamento de tungsteno de 75 W de potencia para estimular la eclosión. Luego de las 36 - 38 h de incubación, los nauplios resultantes de la eclosión de los quistes fueron utilizados para los ensayos de toxicidad.

Para este propósito, se transfirieron 10 nauplios a cada uno de los pocillos de una placa de cultivo de células que contenía agua de mar artificial. Se añadieron diferentes concentraciones de las nanopartículas de óxido de hierro a cada pocillo para completar un volumen final de 2.5 mL. Se incubó durante 24 h adicionales a 25 °C con agitación constante y luz. Se usaron tres réplicas para cada condición. Como control negativo se utilizó agua de mar artificial con antibióticos, y como control positivo se utilizó K₂Cr₂O₇. Después de 24 h de exposición, se contaron los nauplios sobrevivientes y se calculó el porcentaje de supervivencia de cada dosis de acuerdo con la ecuación IIB1.

$$\% \text{ supervivencia} = \frac{\text{nauplios vivos}}{\text{nauplios iniciales}} \times 100 \quad \text{Ec. IIB1}$$

IIB.2.3. Preparación de kefir de agua

Se trabajó con gránulos de kefir donados por un productor local. El kefir de agua se preparó inoculando 40 g/L de gránulos activos en una solución de azúcar mascabo comercial marca Seeberger (Ulm, Alemania) adquirida en un supermercado local preparada 30 g/L en agua corriente de clorada, 10 mL/L de jugo de limón. La fermentación tuvo lugar a 20-25 °C durante 24 horas. Los gránulos de kefir se filtraron y el sobrenadante se usó como bebida para la fortificación.

IIB.2.4. Fortificación de kefir con hierro

La bebida obtenida en la sección anterior se fortificó con ambos tipos de NP (M o cM) obteniendo, de este modo, dos tipos de muestras: Kefir con M y Kefir con cM. Para ello se usaron 1.5-3 mg de hierro/100 mL. Se usó como referencia la concentración de hierro de las leches fortificadas comerciales (1.5 mg/100mL; La Serenísima, Buenos Aires, Argentina). El contenido final de hierro de las bebidas de kefir fortificadas fue de 0.0145 mg/mL (1.45 mg/100 mL) tanto para Kefir con M como para Kefir con cM. Como control se fortificó Kefir con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en una concentración final de hierro de 2 mg/100mL (Kefir con FeSO_4). Se utilizó como control una bebida Kefir sin fortificación. Todas las muestras se almacenaron a 4 °C durante 35 días y las determinaciones se realizaron a los días 1, 15 y 35 de conservación. Como muestras controles se fortificó H_2O destilada con las mismas tres condiciones (H_2O con M, H_2O con cM y H_2O - FeSO_4)

IIB.2.5. Medición de pH

El pH de las muestras se midió con un electrodo de vidrio SenTix 41 (WTW GmbH, Weilheim, Alemania) a diferentes tiempos del almacenamiento a 4 °C.

IIB.2.6. Digestión *in vitro*

Los experimentos se llevaron a cabo en las bebidas de kefir sin fortificar y fortificadas con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, con NP de M o cM (ver sección IIB.2.4). Las muestras se sometieron a una digestión gastrointestinal, tal como se explicó en el Capítulo IA, sección IA.2.3.

IIB.2.7. Cultivo de células Caco-2/TC7

La línea celular de enterocitos humanos Caco-2/TC7 se creció en medio DMEM, en las condiciones de cultivo descritas en el Capítulo IA, sección IA.2.10.

IIB.2.8. Absorción de hierro por células Caco-2/TC7

Las células Caco-2/TC7 se sembraron en placas de cultivo de 24 fosas (inóculo ca. 1.0×10^5 células por fosa), utilizándose las monocapas en posconfluencia temprana. Antes del experimento, las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS. Luego, se agregó DMEM fresco con un contenido final de hierro equivalente a $100 \mu\text{M}$ (proveniente de la disolución teórica del hierro total proveniente tanto de una muestra digerida de H₂O con FeSO₄, H₂O con M o H₂O con cM, como de una muestra digerida de Kefir con FeSO₄, Kefir con M o Kefir con cM). Las células fueron incubadas con las diferentes muestras de Fe o control en medio DMEM a 37 °C durante 2, h. Posteriormente las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS y se añadió DMEM completo. Las células se incubaron 24 h adicionales a 37 °C para permitir la síntesis de ferritina. Transcurrido ese tiempo, las monocapas se lavaron dos veces con PBS-EDTA 2 mM para eliminar cualquier residuo de Fe. Luego, se añadió agua milli Q y las células se despegaron mecánicamente con un raspador. Las suspensiones celulares se sonicaron en un sonicador de punta (VCX-750 Sonics®, USA.) en baño de hielo, se hicieron 3 ciclos durante 15 segundos a 10000 W y se conservaron a -20°C hasta su análisis. Los lisados celulares se utilizaron para la determinación de ferritina.

Con el objetivo de determinar las vías de internalización de las NP de M y cM se utilizaron inhibidores de las vías endocíticas una hora antes y durante la incubación con las suspensiones de Fe. Los inhibidores utilizados fueron: wortmanina (25 nM), citocalasina D (10 μM), metil β ciclodextrina (5 mM) (Sigma–Aldrich Co. MO. USA), clorpromazina (10 μM) (Sanofi-Aventis. Gentilly, France) y nistatina 0,75 mM) (Denver Pharma. Buenos Aires, Argentina). La clorpromazina inhibe la vía de internalización de las clatrin, la nistatina y la metil β ciclodextrina inhiben la vía de las caveolas, mientras que la wortmanina y la citocalasina bloquean la macropinocitosis.

IIB.2.9. Cuantificación de ferritina.

La ferritina es la principal proteína almacenadora, transportadora y liberadora de forma controlada de hierro. La cuantificación de ferritina en las células Caco-2/TC7 indica en forma indirecta la eficiencia de absorción de hierro y su bioaccesibilidad. La determinación de ferritina se realizó utilizando un kit de Elisa comercial (Human Ferritin Elisa Kit, ThermoScientific™) El ensayo es un Elisa sandwich que contiene anticuerpos de captura anti-ferritina adheridos a los pocillos y se revela mediante anticuerpos de detección antiferritina conjugados con biotina-estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano). La peroxidasa cataliza la conversión de un compuesto coloreado tetrametilbencidina (TMB), siendo el color proporcional a la presencia de ferritina.

Los lisados celulares se utilizaron sin diluir y se preparó la curva estándar según las instrucciones del fabricante. Las mediciones de absorbancia se registraron a 450-550 nm en un lector de microplacas de fluorescencia Synergy HT (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, EE.UU.). Las concentraciones de las muestras se calcularon interpolando en base a la curva estándar.

IIB.2.10. Toxicidad sobre células Caco-2/TC7 de citotoxicidad

Con el fin de validar los ensayos de absorción de hierro por parte de las células Caco-2/TC7, se determinó la viabilidad de las mismas frente a las suspensiones de M y cM digeridas, con y sin los inhibidores de las vías endocíticas. Para ello se determinó la actividad deshidrogenasa mitocondrial utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Las células Caco-2/TC7 se utilizaron como en el ensayo de absorción de hierro. Las monocapas se lavaron dos veces con PBS y se añadieron las suspensiones de M y cM, incubándolas durante 24 h a 37°C. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y el medio se reemplazó por DMEM (sin colorante rojo fenol) que contenía 0.5 mg/mL de MTT. Luego de 3 h de incubación, se añadieron 0.2 mL de dimetilsulfóxido por pocillo para solubilizar los cristales de formazán. Los valores de densidad óptica (DO) se registraron en un lector de microplacas de fluorescencia Synergy HT a 490 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, EE. UU.). La viabilidad celular se determinó de acuerdo con la ecuación IIB2.

$$\% Viabilidad\ celular = \frac{DO_t}{DO_c} \times 100 \quad \text{Ec. IIB2}$$

donde, DO_t es la densidad óptica de las células tratadas (con las muestras digeridas y sin digerir), DO_c es la densidad óptica de las células control (no tratadas).

IIB.2.11. Bacterias ácido lácticas y levaduras totales

Se realizaron recuentos de bacterias lácticas totales y de levaduras en las bebidas Kefir, Kefir con M y Kefir con cM, a diferentes tiempos de conservación a 4 °C. Para este propósito, se hicieron diluciones seriadas de las muestras en PBS y se sembraron 100 μ L en placas de Petri con agar MRS para determinar las bacterias ácido lácticas totales y en medio YGC agar para determinar las levaduras totales. Las placas se incubaron en estufa a 30 °C durante 48 h. Los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de Colonia por mililitro de bebida fermentada (UFC/mL).

IIB.2.12. Perfiles HPLC de las bebidas de kefir

Para la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se utilizó un equipo de HPLC conectado a un detector por índice de refracción Waters 2414 modelo 410. La columna utilizada fue la Waters Sugar Pak I (10 μ m, 6.5 mm \times 300 mm) con una precolumna Waters Guard Pak LC (10 μ m; Milford, MA, USA). Las condiciones cromatográficas fueron: velocidad de flujo de 0.5 mL/min, temperatura de la columna de 80 °C y volumen de inyección de 50 μ L. Solvente de elución: agua recientemente destilada termostatzada a 80° C.

Las muestras fueron diluidas en agua destilada y filtradas con filtros de 0.45 μ m Millipore Durapore (Billerica, MA, USA).

Los cromatogramas fueron analizados usando el software WinPCcrom XY 2.0 (Buenos Aires, Argentina). Se utilizaron estándares de rafinosa, estaquiosa, glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa, galactosa, xilosa y pectina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) para determinar los tiempos de retención.

IIB.2.13. Reproducibilidad de resultados

Todos los experimentos se realizaron en triplicado usando tres preparaciones independientes. Las diferencias relativas fueron reproducibles independientemente de la preparación empleada.

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con el software estadístico Infostat v2009 (Córdoba, Argentina). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

IIB.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IIB.3.1. Evaluación de la toxicidad de las nanopartículas sobre *Artemia salina*.

En una primera instancia se analizó la toxicidad de las nanopartículas sintetizadas con el objetivo de conocer si pueden generar efectos perjudiciales para el consumidor al ser incorporadas en las bebidas de kefir.

Se determinó el porcentaje de mortalidad de los nauplios de artemia para cuatro concentraciones diferentes de hierro. El primer punto de todas las curvas corresponde a la condición de agua salada (de mar) sin adición de hierro (control).

Los resultados del experimento en *Artemia salina*, arrojaron valores prácticamente nulos de mortalidad para las muestras de M y cM en todo el rango de concentraciones estudiado (Figura IIB3). Ésto es consistente con la información publicada para NP de pirofosfato férrico (FePP) que no presentaron citotoxicidad al ser evaluadas en células intestinales humanas INT-407 y Caco-2 (Kim *et al.*, 2017).

Cabe destacar la importancia de este resultado, debido a que luego las nanopartículas se utilizaron para la fortificación de bebidas para el consumo humano con toxicidad nula avalada por este estudio. Esta característica convierte a las nanopartículas de Fe_3O_4 en un candidato óptimo para la fortificación de alimentos como herramienta para incrementar el consumo de hierro en la dieta.

En cuanto al $FeSO_4$, la mortalidad experimentó un pronunciado aumento a partir de los 250 $\mu g/mL$, llegando a valores cercanos al 100% para una concentración de 400 $\mu g/mL$.

La dosis para la cual el porcentaje de muerte fue del 50% (DL50), fueron determinadas para cada compuesto realizando una regresión lineal y una intrapolación en la curva. La DL50 para el $FeSO_4$ fue de 312.5 $\mu g/mL$, posicionándose dentro de los compuestos de toxicidad moderada-

baja (Tabla IIB1). La DL50 obtenida para el control positivo de $K_2Cr_2O_7$ fue de 23.64 $\mu\text{g/mL}$ clasificando como un compuesto "altamente tóxico".

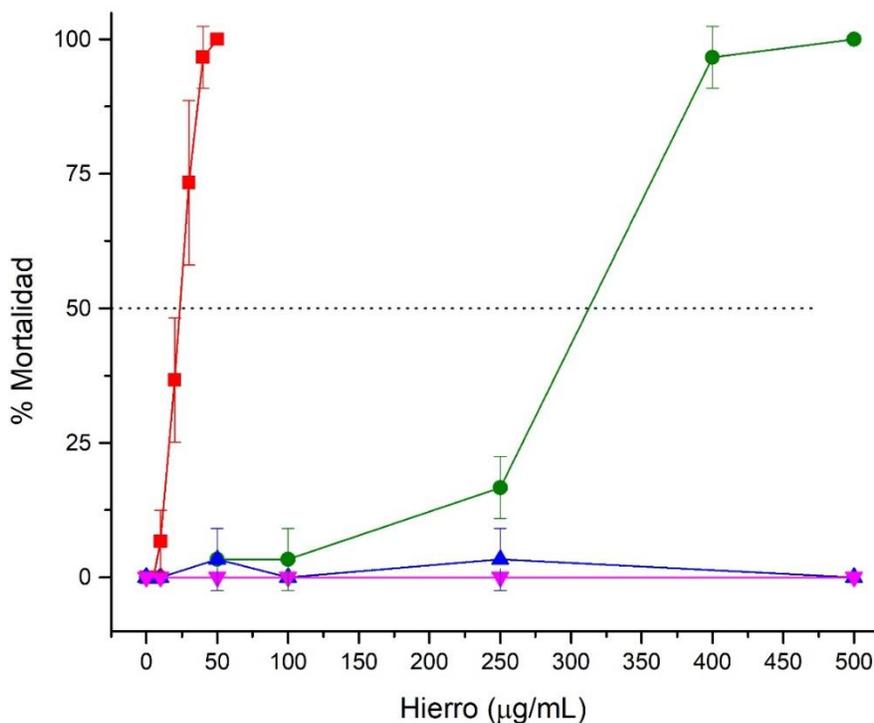


Figura IIB3. Test de toxicidad con *Artemia salina*. Respuesta dosis dependiente del porcentaje de mortalidad para cada muestra. En rojo se representa la respuesta frente al $K_2Cr_2O_7$ (control positivo de toxicidad); en verde la respuesta frente a $FeSO_4$; en azul, frente a nanopartículas de Fe_3O_4 (M) y en magenta, la respuesta frente a cM (M cubierta con pectina).

IIB.3.2. Variaciones producidas en las bebidas durante el tiempo de conservación

IIB.3.2.a. Variación de pH

Se puede apreciar una pequeña disminución del pH de todas las bebidas al cabo de un mes de conservación (Tabla IIB2), esta acidificación fue significativa ($p < 0.05$). El efecto de esta disminución del pH sobre la viabilidad de bacterias y levaduras será investigado en la sección IIB.3.3.

Tabla IIB2. Valores de acidez expresados en unidades de pH (upH) de las bebidas de kefir fortificadas. Las mediciones se hicieron al inicio y luego de un mes de conservación a 4°C.

Muestra	Día 0 (upH)	Día 30
Kefir (control)	3.50 ± 0.02	3.23 ± 0.02
Kefir + FeSO ₄	3.47 ± 0.04	3.08 ± 0.03
Kefir + M	3.49 ± 0.01	3.10 ± 0.01
Kefir + cM	3.49 ± 0.03	3.14 ± 0.00

IIB.3.2.b. Modificación de los perfiles cromatográficos de las bebidas fermentadas y fortificadas durante la conservación

En primer lugar, se realizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de 10 estándares de sacáridos para determinar sus tiempos de retención y así poder determinar la composición de sacáridos en las muestras de kefir (Figura IIB4).

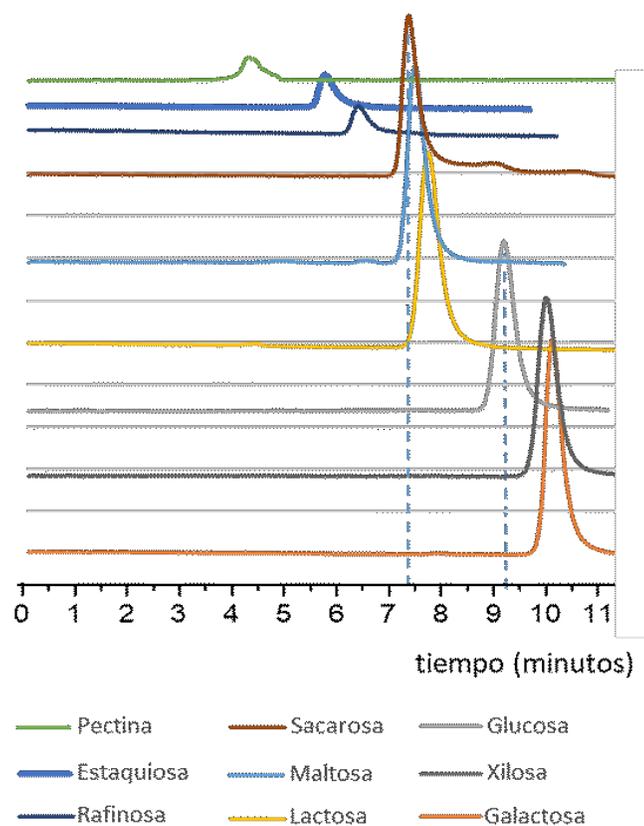


Figura IIB4. Cromatogramas de los estándares de sacáridos, obtenidos por SEC.

Se realizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de la bebida de kefir control y de las bebidas fortificadas con FeSO_4 , M o cM. Del análisis de los cromatogramas de HPLC se pudieron distinguir 6 bandas cromatográficas principales atribuibles a ciertos sacáridos presentes en todas las muestras.

Cabe mencionar que la sola comparación de los tiempos de retención entre estándar y analito no es criterio suficiente para establecer la identidad de un compuesto químico.

Los tiempos de retención obtenidos para los 6 picos que fueron de 4.90 min para el pico 1; 7.40 min para el pico 2; 9.25 min para el pico 3; 10.95 min para el pico 4; 12.60 min para el pico 5 y 13.40 min para el pico 6.

En la Figura IIB5 se observa la evolución en el tiempo de los principales sacáridos de la bebida kefir control (sin fortificar), en la misma se pueden apreciar las principales variaciones. El pico 2 podría atribuirse a sacarosa debido a que tienen un tiempo de retención similar, si bien este criterio no es suficiente para la identificación. Este pico no se vio afectado el primer día de conservación, pero expresó una disminución significativa y abrupta en el tiempo llegando niveles muy bajos a los 30 días. Los picos 3 y 4 mostraron un aumento significativo en el tiempo de conservación (Figura IIB6). El tiempo de retención del pico 4 no se corresponde con valores de la Figura IIB4, de los estándares. Los picos 5 y 6 tampoco se corresponden con los valores de tiempos de retención de ninguno de los estándares (Figura IIB4).

El pico 3, que podría corresponder a glucosa, presentó un aumento en su área que podría resultar de dos procesos opuestos. Por una parte, la hidrólisis de sacarosa en el medio ácido generado a partir del jugo de limón podría contribuir a aumentar la concentración de glucosa en el agua fermentada. Por otra parte, la glucosa es sustrato de los microorganismos liberados a la bebida desde los gránulos de kefir, de manera que ese consumo contribuiría a que su concentración no aumente proporcionalmente a la caída de la concentración de sacarosa. Igualmente, cabe destacar que en esta prueba control, el pico 3 atribuible a glucosa aumentó su área 4 veces luego de los 30 días de conservación.

La fermentación del citrato proveniente del jugo de limón, por acción de las bacterias ácido lácticas da lugar a la producción de compuestos aromáticos volátiles de cuatro carbonos, principalmente diacetilo acetoina y butanodiol. Estos compuestos podrían ser parte del perfil cromatográfico observado, considerando su tamaño molecular, y en ese caso deberían corresponderse con algunos de los picos de mayor tiempo de retención. En los ensayos control, es de esperar que su concentración aumente, pero en definitiva va a depender del balance entre producción, volatilidad y solubilidad del sustrato fermentado.

La misma tendencia de cambios se puede observar en las bebidas fortificadas con FeSO_4 (Figuras IIB7 y IIB8), con NP de M y NP de cM (Figuras IIB9 y IIB10) (Figuras IIB11 y IIB12).

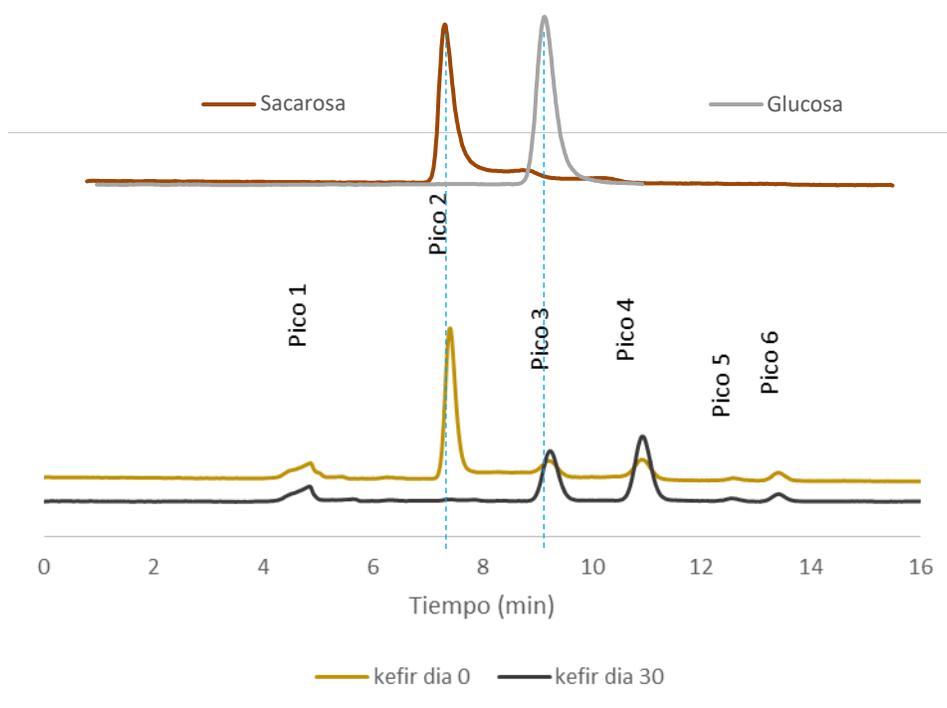


Figura IIB5. Cromatografía de exclusión por tamaño de kefir control. En color marrón: cromatograma correspondiente al día cero de conservación. En color gris oscuro: cromatograma correspondiente al día 30 de conservación a 4 °C. En marrón oscuro y gris claro se representan los cromatogramas de los patrones sacarosa y glucosa, respectivamente.

Para realizar una comparación más detallada de cada bebida, se analizaron las diferencias entre las áreas de cada pico en cada día de conservación de cada muestra inyectada (Figuras IIB6, IIB8, IIB10 y IIB12).

Para el caso del kefir sin fortificar, los picos 2, 3 y 4 fueron los que experimentaron diferencias significativas al día 30 respecto del día inicial de conservación (Figura IIB6).

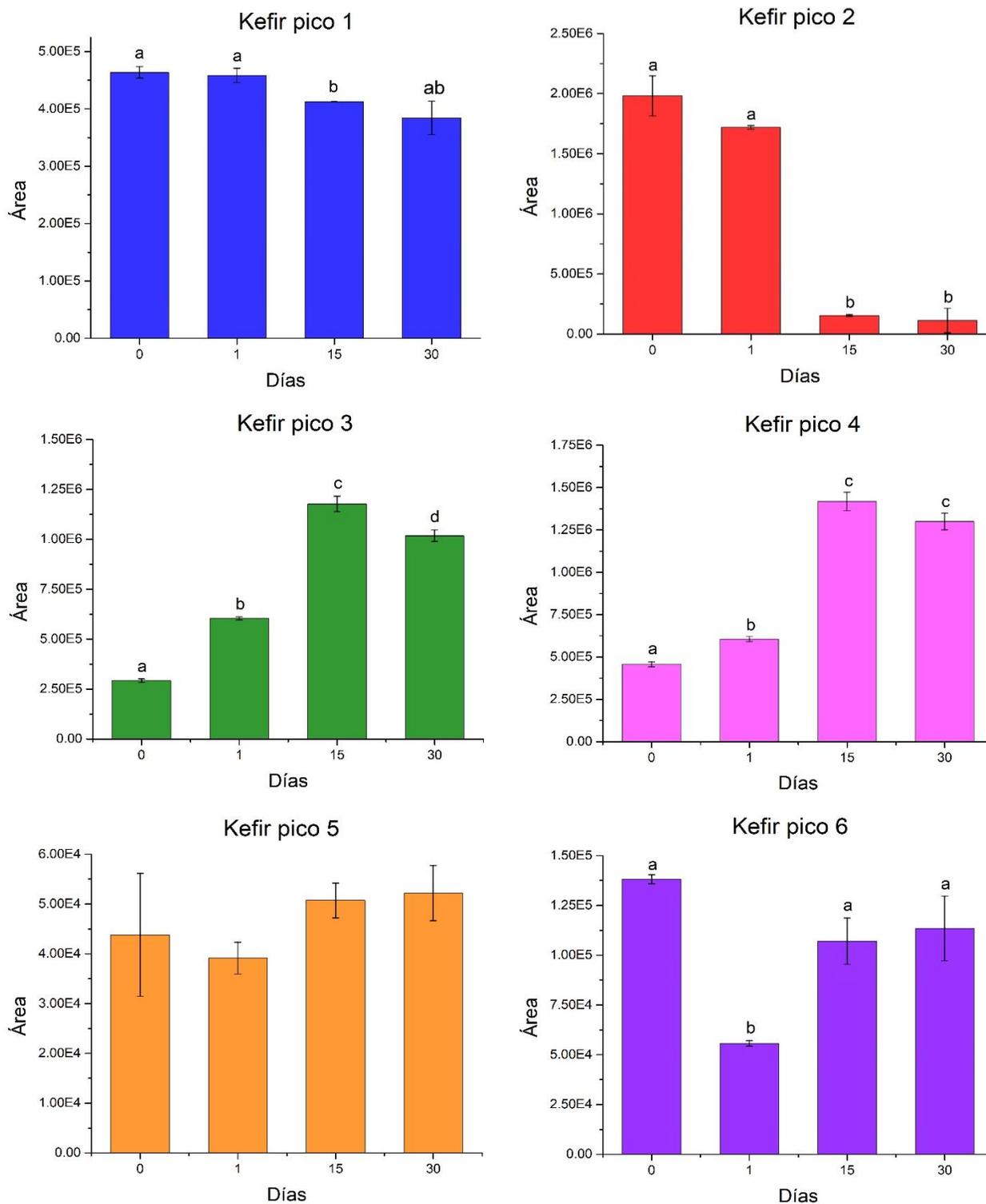


Figura IIB6. Representación del área de pico durante el tiempo de conservación de los 6 picos obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño para la muestra kefir control. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

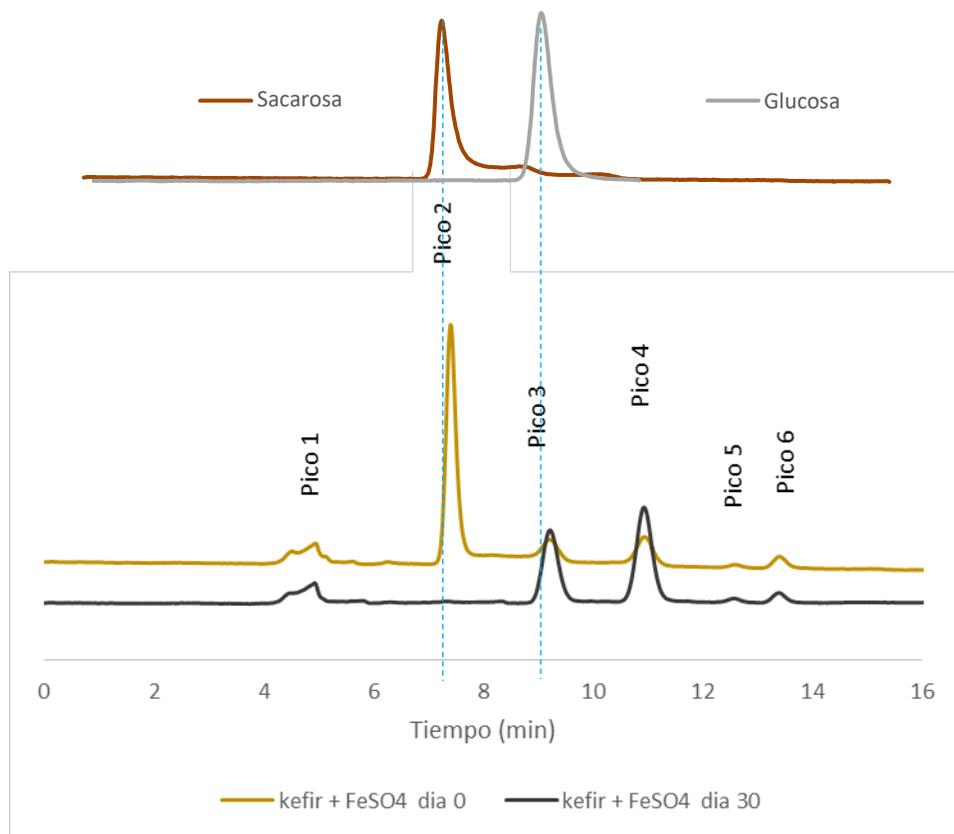


Figura IIB7. Cromatografía de exclusión por tamaño de kefir fortificada con FeSO_4 . En color marrón: cromatograma medido a día cero de conservación. En color gris oscuro: cromatograma medido al día 30 de conservación a 4 °C. En marrón oscuro y gris claro se representan los cromatogramas de los patrones sacarosa y glucosa, respectivamente.

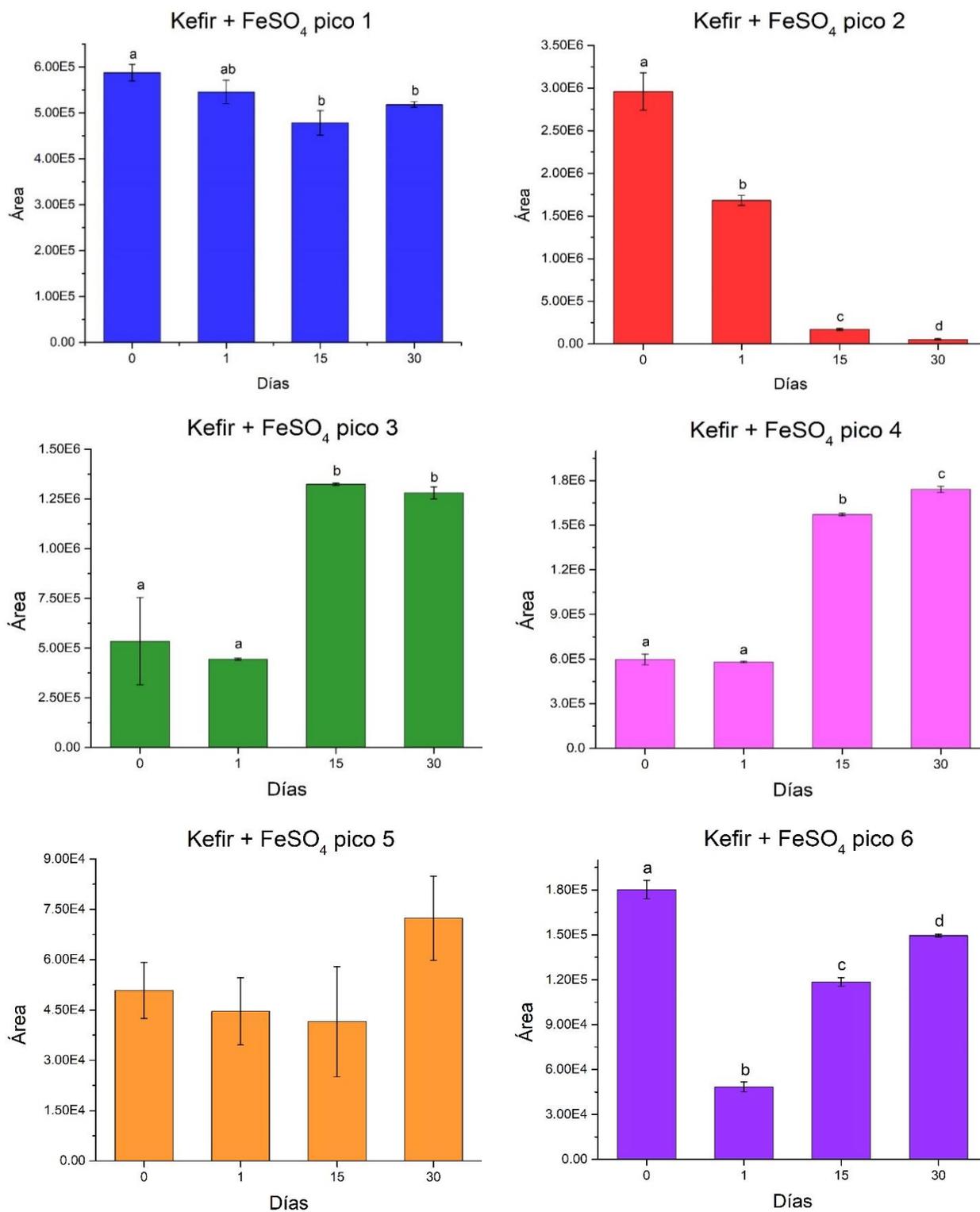


Figura IIB8. Representación del área de pico durante el tiempo de conservación de los 6 picos obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño para la muestra kefir fortificada con FeSO₄. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Analizando el perfil cromatográfico del kefir fortificado con FeSO_4 , se observaron algunas diferencias con los resultados de las muestras kefir control (Figura IIB8). En primer lugar, el área del pico 2 atribuible a sacarosa disminuyó al 50% del valor inicial luego de un día de incubación de la muestra en presencia de FeSO_4 , pero no se correlacionó con un aumento de área de los picos 3 y 4. Esto podría deberse a un proceso de degradación química oxidativa del azúcar, catalizado por Fe(II) en medio ácido. Concretamente, el catión ferroso puede catalizar la activación de O_2 disuelto en medio acuoso, dando lugar a radicales libres que pueden degradar parcialmente aquellos compuestos orgánicos más lábiles (Pi *et al.*, 2020).

Luego de 30 días de incubación, el incremento del área del pico 3 atribuible a glucosa en la muestra en presencia de FeSO_4 resultó inferior al incremento observado en la muestra kefir control, en consistencia con el efecto deletéreo propuesto.

Además, a los 30 días de incubación se observó un incremento de la señal del pico 5 en la muestra en presencia de FeSO_4 , atribuible a compuestos de bajo peso molecular (Figura IIB8).

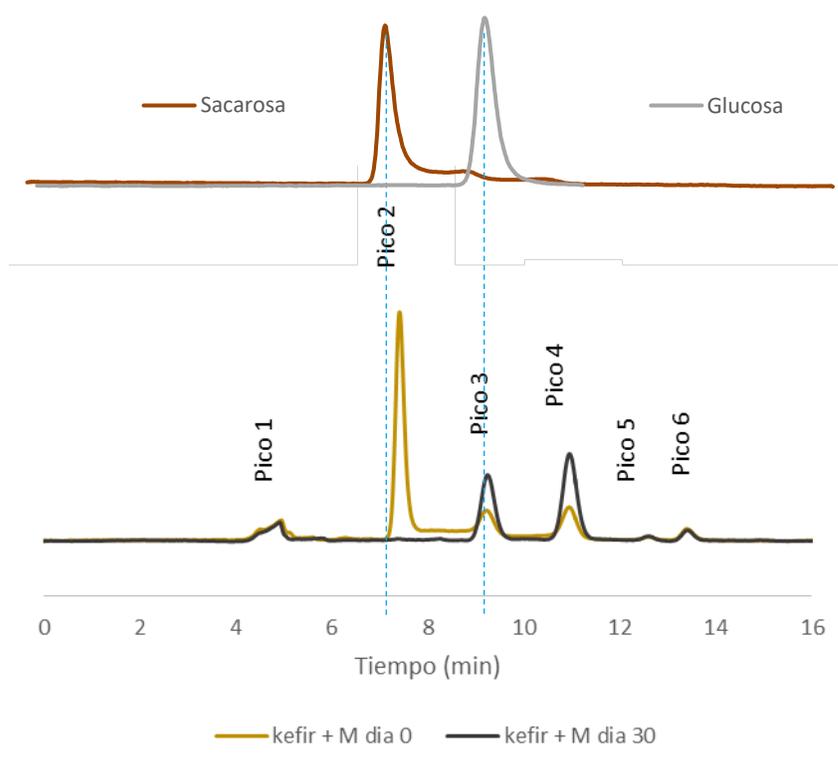


Figura IIB9. Cromatografía de exclusión por tamaño de kefir fortificada con NP de M. En color marrón: cromatograma medido a día cero de conservación. En color gris oscuro: cromatograma medido al día 30 de conservación a 4 °C. En marrón oscuro y gris claro se representan los cromatogramas de los patrones sacarosa y glucosa, respectivamente.

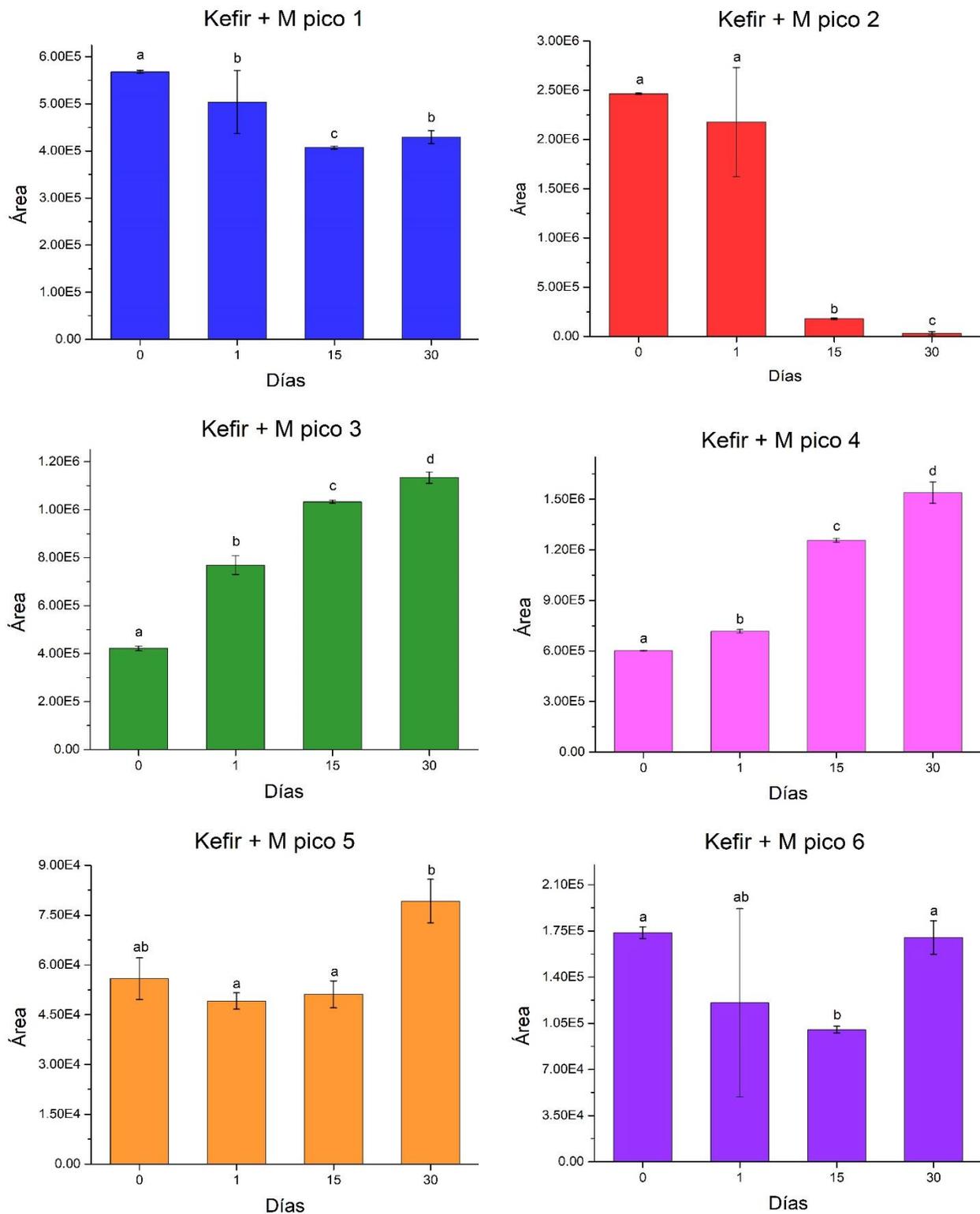


Figura IIB10. Representación del área de pico durante el tiempo de conservación de los 6 picos obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño para la muestra kefir fortificada con NP de M. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En el perfil cromatográfico de las muestras kefir fortificadas con M, se observó que el área del pico 2 atribuible a sacarosa evolucionó de manera similar al de la muestra kefir control sin fortificar (Figura IIB9). Esto indica que si bien no se produjo una disminución significativa del área luego de un día de incubación, la disminución fue drástica desde el registro correspondiente al día 15 de incubación. Además, el incremento del área del pico 3 atribuible a glucosa fue gradual en el tiempo, y resultó inferior al de la muestra kefir control a los 30 días de incubación. Los compuestos de bajo peso molecular representados en el pico 6, siguieron un perfil diferente en el tiempo de incubación, comparados con el control (Figura IIB10).

Este comportamiento en las muestras de agua de kefir fortificadas con M podría asociarse a dos procesos diferentes: la hidrólisis ácida de sacarosa que libera glucosa al medio, y el consumo de azúcares por parte de los microorganismos. En este contexto general, el hecho puntual de que el pico atribuible a glucosa no haya aumentado en la misma medida que en la muestra kefir control sugiere en principio un mayor consumo de glucosa por parte de los microorganismos y por lo tanto una estabilidad microbiológica en estas condiciones de suplementación con M.

Además, a los 30 días de incubación se observó un pequeño incremento de la señal del pico 5 en la muestra en presencia de M (Figura IIB10), atribuible a compuestos de bajo peso molecular, tal como se ve en presencia de FeSO_4 , y que podría deberse a una acumulación de productos oxidados. Sin embargo, el efecto deletéreo de M aparenta ser inferior al efecto de FeSO_4 , a juzgar por los perfiles en el tiempo de incubación del pico atribuible a sacarosa.

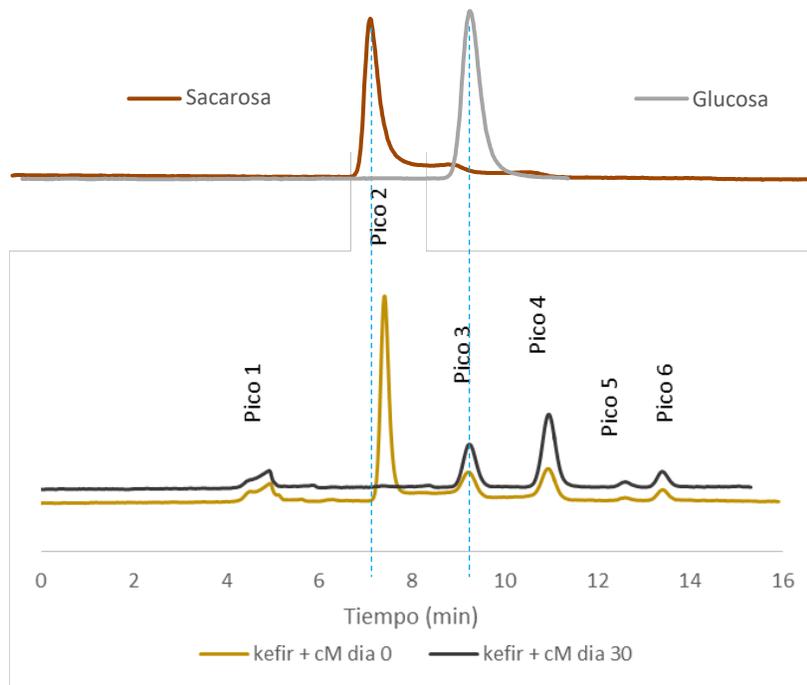


Figura IIB11. Cromatografía de exclusión por tamaño de kefir fortificada con NP de cM. En color marrón: cromatograma medido a día cero de conservación. En color gris oscuro: cromatograma medido al día 30 de conservación a 4 °C. En marrón oscuro y gris claro se representan los cromatogramas de los patrones sacarosa y glucosa, respectivamente.

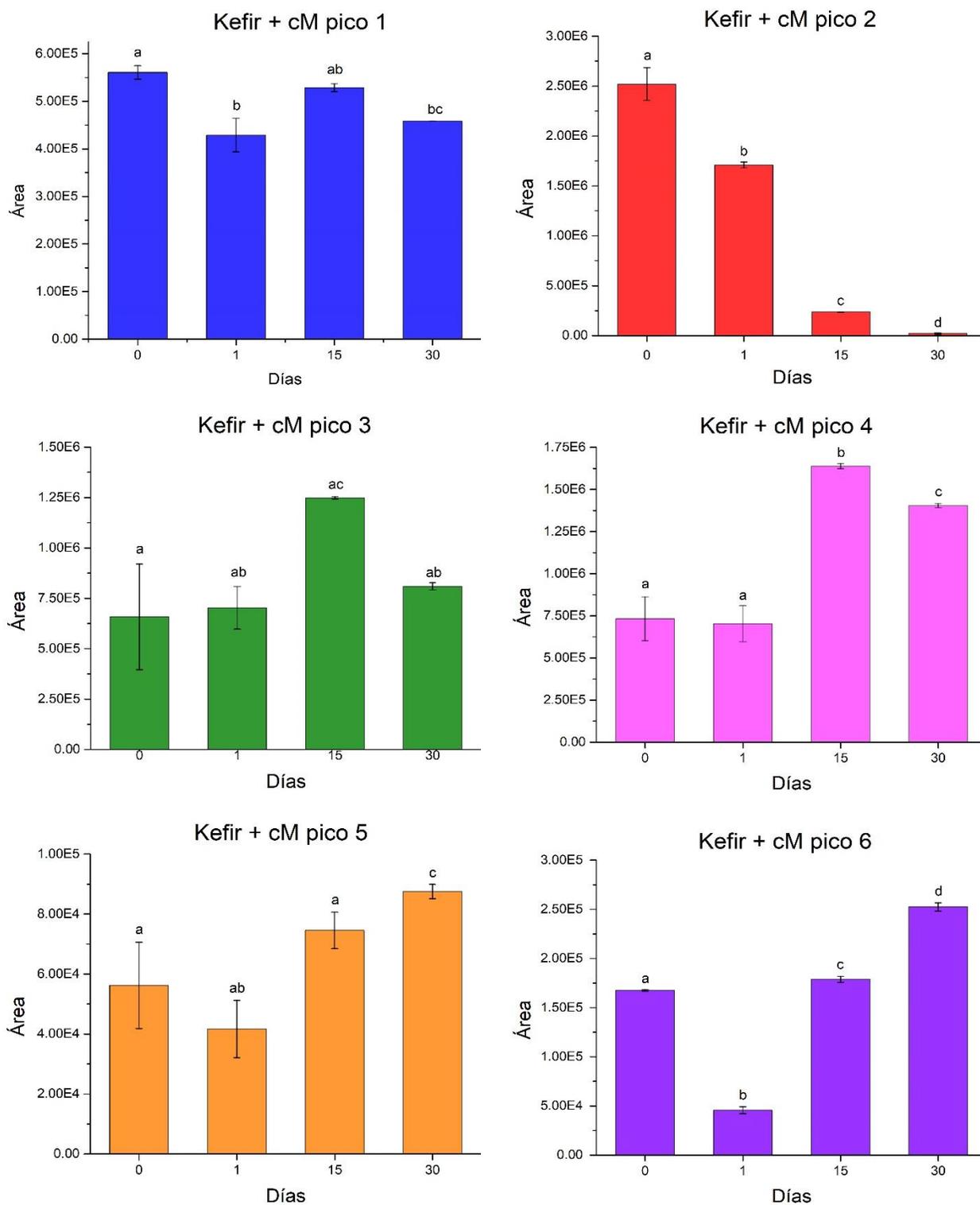


Figura IIB12. Representación del área de pico durante el tiempo de conservación de los 6 picos obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño para la muestra kefir fortificada con NP cM. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

El perfil cromatográfico obtenido cuando se suplementó con cM, mostró ciertas particularidades (Figura IIB11). En primer lugar, el área del pico 2 atribuible a sacarosa disminuyó al 65% de su valor inicial luego de un día de incubación (Figura IIB12). Esta disminución resultó inferior a la observada con suplemento de FeSO_4 , pero fue superior a la de la muestra kefir sin fortificar y a la de la muestra fortificada con M. Podría interpretarse que las cM presentan una superficie mejor solvatada debido a la cobertura superficial de pectina, exponiendo sitios -Fe-OH que podrían catalizar la activación de O_2 favoreciendo el efecto deletéreo de los radicales libres sobre los azúcares. De hecho, no se observó el incremento en el área del pico 2 atribuible a glucosa luego de un día de incubación con cM, indicando que no se liberó glucosa por hidrólisis ácida de sacarosa.

A los 15 días de incubación se observó el incremento del área de pico 3 atribuible a glucosa, y esto puede asociarse al proceso de hidrólisis de la sacarosa en medio ácido. Finalmente, la concentración de este compuesto volvió a disminuir en el perfil correspondiente al día 30 de incubación, alcanzando los valores iniciales, posiblemente debido al consumo de este compuesto por parte de los microorganismos presentes en el agua de kefir. De hecho, el área del pico 3 luego de 30 días de incubación correspondió al 75% del área obtenida en la muestra kefir sin fortificar (Figura IIB12).

Los picos 5 y 6 siguieron una evolución similar a la observada en muestras fortificadas con FeSO_4 . En definitiva, si bien existe cierta evidencia de degradación oxidativa de azúcares en fortificación con cM, también existen indicios de consumo de glucosa que puede asociarse a una estabilidad microbiológica y preservación del efecto probiótico del producto.

II.3.3. Determinación de la viabilidad bacteriana de las bebidas fortificadas

El recuento de las bacterias ácido lácticas y levaduras totales durante la conservación a 4 °C de las bebidas de kefir fortificadas se representa en las Figuras IIB13 y IIB14. La viabilidad de las bacterias disminuyó significativamente en el tiempo durante la conservación, sin embargo, los niveles de viabilidad al finalizar el período de conservación, se mantuvieron altos (Figura IIB13).

Por el contrario, la viabilidad de las levaduras luego de 30 días no fue significativamente diferente que la viabilidad de las mismas en el día cero (Figura IIB14). De este resultado se puede deducir que las NP de Fe_3O_4 no afectan la viabilidad de las bacterias y levaduras presentes en

el kefir de agua, lo cual es consistente con la información publicada para otros aditivos en kefir de agua (Montanuci *et al.*, 2012).

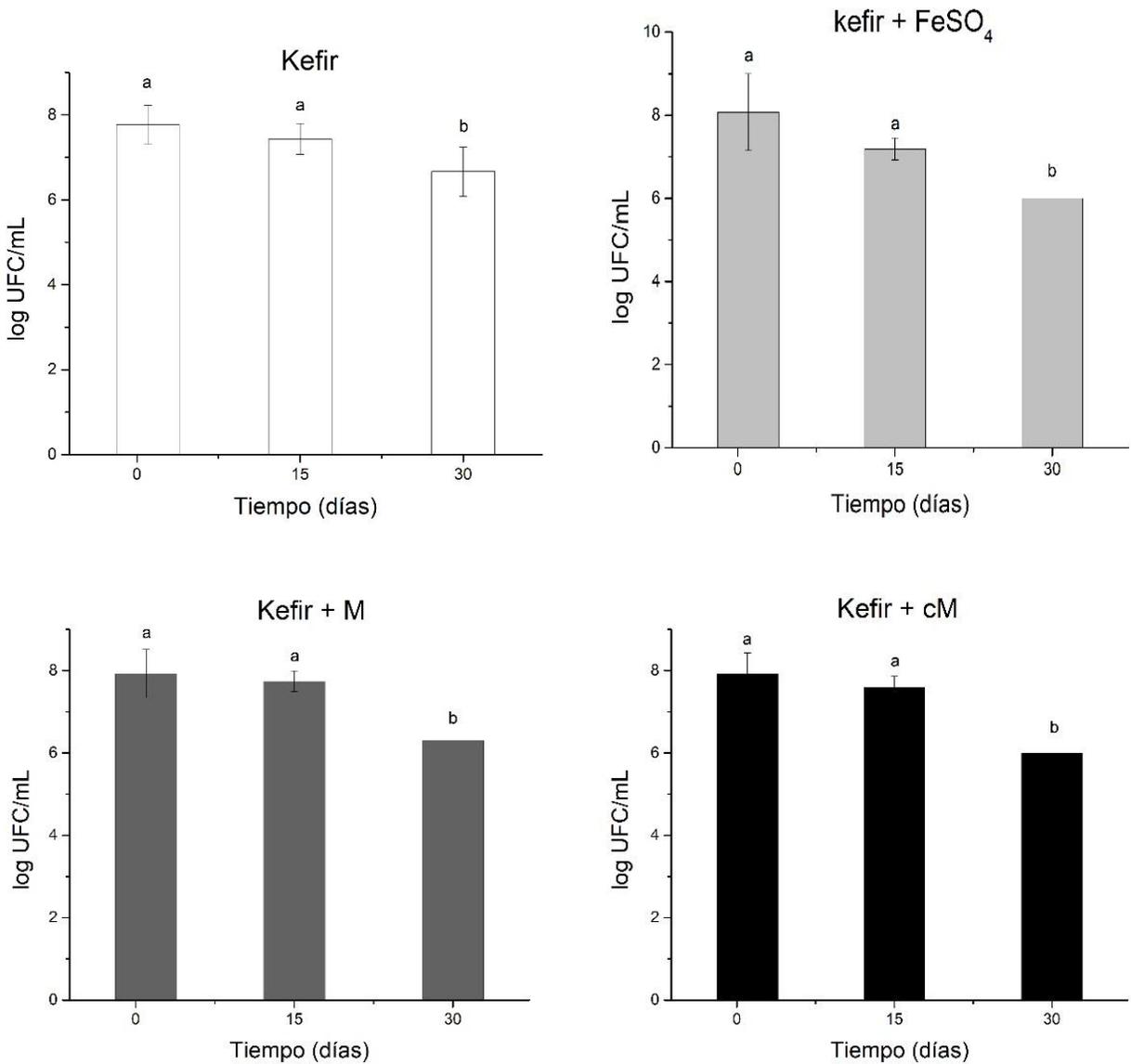


Figura IIB13. Efecto del tiempo de conservación a 4°C de las bebidas de kefir fortificadas sobre la viabilidad de bacterias ácido lácticas totales. Los diferentes colores de las barras representan la viabilidad en las diferentes bebidas: En blanco para kefir sin fortificar (control), en gris claro para kefir fortificado con FeSO₄, en gris oscuro para kefir fortificado con M y en negro para kefir fortificado con cM. Las letras distintas indican diferencias significativas (p ≤ 0.05).

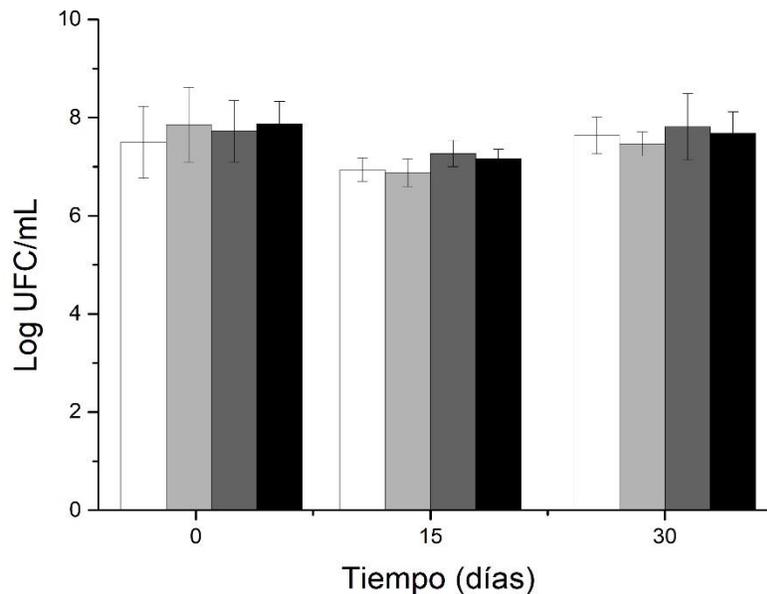


Figura IIB14. Efecto del tiempo de conservación a 4°C de las bebidas de kefir fortificadas sobre la viabilidad de levaduras totales. Los diferentes colores de las barras representan la viabilidad en las diferentes bebidas: En blanco para kefir sin fortificar (control), en gris claro para kefir fortificado con FeSO₄, en gris oscuro para kefir fortificado con M y en negro para kefir fortificado con cM.

IIB.3.4. Cuantificación de ferritina.

Con la finalidad de estudiar la incorporación de hierro por parte de los enterocitos se incubaron las células Caco-2/TC7 con las distintas bebidas digeridas fortificadas con hierro (FeSO₄, M y cM) suspendidas en kefir o agua. Las formulaciones fueron previamente digeridas *in vitro* utilizando soluciones gástrica e intestinal simuladas. Para determinar la bioaccesibilidad del hierro en las células se cuantificó la presencia de ferritina en los lisados celulares.

Se observó que todas las formulaciones aumentaron significativamente la concentración de ferritina en los enterocitos respecto al basal. El FeSO₄ fue más eficiente en el incremento de los valores de ferritina aumentándolos en un 107% en promedio, seguido por las formulaciones conteniendo cM que mostraron un aumento del 21% mientras que las formulaciones con M sola tuvieron un aumento del 15% respecto al basal. No hubo diferencias entre las formulaciones de hierro suspendidas en agua y kefir excepto para el FeSO₄ donde la formación de ferritina fue mayor para la muestra suspendida en kéfir (Figura IIB15), probablemente debido a la interacción

de la sal de hierro con los polisacáridos del kéfir (Hernandez-Torres 2018). Si bien la magnetita no fue superior al FeSO₄ en la formación de ferritina, sí pudo mejorar la incorporación de hierro biodisponible con respecto al control.

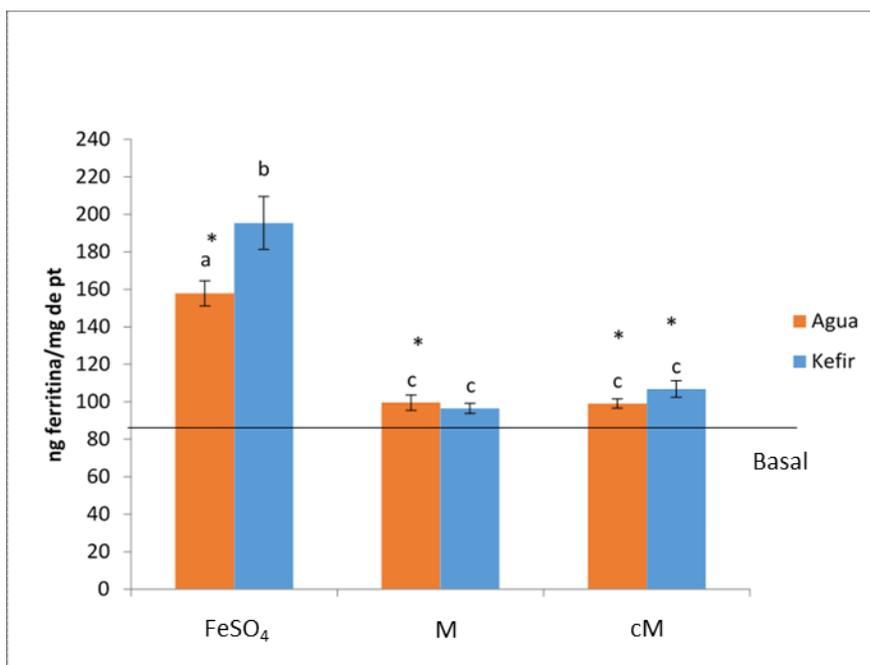


Figura IIB15. Formación de ferritina en células Caco-2/TC7 expuestas a distintas bebidas fortificadas con FeSO₄, NP de M y NP de cM, digeridas *in vitro*. El nivel basal de ferritina en células no expuestas (control) está indicado con una línea horizontal negra y es 85.00 ± 3.97 ng/mg de proteína (pt). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control. Las letras diferentes representan diferencias significativas respecto a las formulaciones entre sí ($p \leq 0.05$).

Dado que la fortificación con M es una forma novedosa de suplementación con hierro, se decidió investigar las vías de entrada de la magnetita y la magnetita cubierta a las células Caco-2/TC7. Para ello, se incubaron las células expuestas a las formulaciones de magnetita suspendida en agua y digeridas artificialmente en presencia de inhibidores de la endocitosis (Figura IIB16).

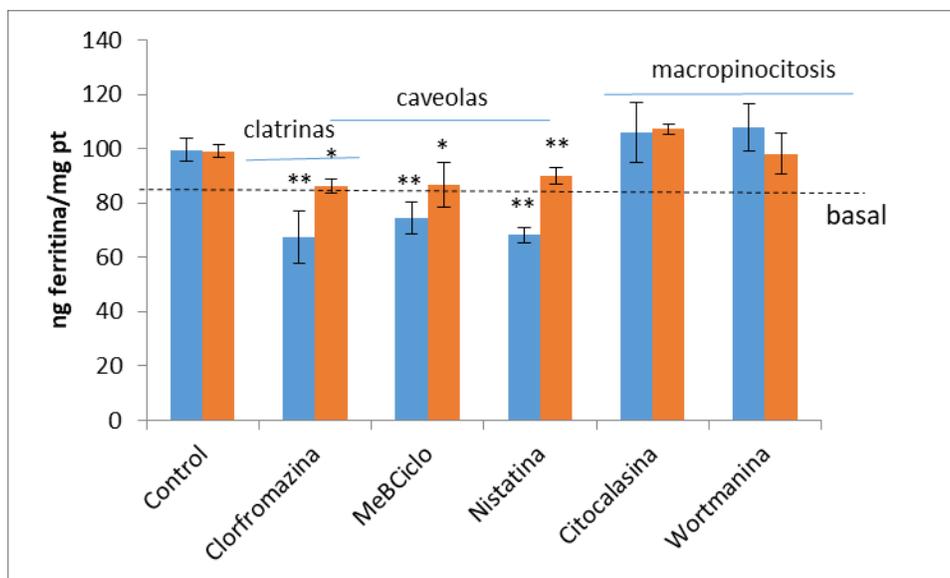


Figura IIB16. Cuantificación de ferritina en células Caco-2/TC7 expuestas a distintas formulaciones fortificadas con hierro digeridas *in vitro*. Barras celestes: agua fortificada con NP de M. Barras naranjas: agua fortificada con NP de cM. El nivel basal de ferritina en células no expuestas (control) está indicado con una línea horizontal negra, y es 85.00 ± 3.97 ng/mg de proteínas (pt). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control ($p \leq 0.05$).

Se observó que las células expuestas al inhibidor de la vía de las clatrin (clorfromazina) y las células expuestas a los inhibidores de la vía de las caveolas (metil β ciclodextrina y nistatina) disminuyeron significativamente la formación de ferritina respecto a las células no tratadas, indicando estas vías endocíticas como las más probables para la incorporación de M y cM por los enterocitos. Los inhibidores de la vía de la macropinocitosis no afectaron la formación de ferritina, por lo que esta vía sería empleada por las células Caco-2/TC7 para la incorporación de magnetita y magnetita cubierta.

Con el objetivo de validar los ensayos anteriores y comprobar que la funcionalidad de los enterocitos en cultivo no se vio afectada por la presencia de las formulaciones fortificadas con hierro y digeridas ni por los inhibidores de las vías endocíticas se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante la técnica de MTT (Figura IIB17). Se observó que la viabilidad celular fue cercana al 100% en todas las condiciones ensayadas (Figura IIB17 A y B), esto es un indicativo

de que las NP de Fe_3O_4 tienen una baja citotoxicidad, lo cual coincide con la información existente para otras NP de hierro (Kim *et al.*, 2017).

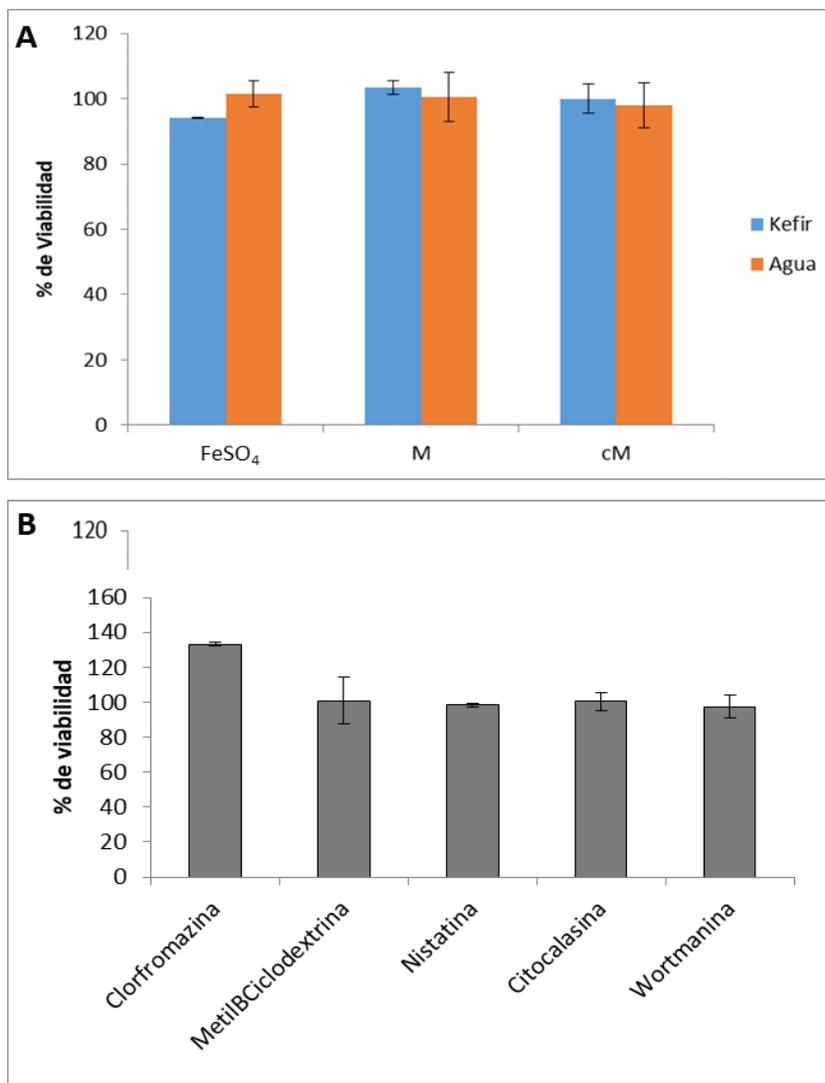


Figura IIB17. Viabilidad de células Caco-2/TC7 luego de exponerse a las bebidas fortificadas (A) y a los distintos inhibidores de la endocitosis (B), determinada mediante la actividad deshidrogenasa mitocondrial utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Si bien la magnetita no fue superior al sulfato ferroso en la formación de ferritina, sí pudo mejorar la incorporación de hierro biodisponible con respecto al control. Estos resultados son

diferentes a los encontrados por Kim *et al.*, 2017 para nanopartículas de pirofosfato férrico (FePP) recubiertas con dextrinas donde se observó que el recubrimiento mejoró significativamente el transporte de hierro evaluado tanto *in vitro* en células Caco-2 y células M de placas de Peyer, como *in vivo* en el plasma de ratas expuestas a una única dosis de las NP de FePP.

En cuanto a los inhibidores, el resultado arrojado indica que las vías endocíticas de las clatrininas y caveolas son las más probables para la entrada de NP de M y NP de cM a las células intestinales. Perfecto *et al.*, 2017 demostraron un resultado similar para NP de FePO₄ donde se observó su absorción en células Caco-2, principalmente a través de DMT1, por endocitosis y micropinocitosis mediadas por clatrina.

IIB.4. CONCLUSIONES

Las bebidas de kefir de agua actualmente comercializadas indican un tiempo de conservación no mayor que 30 días desde su elaboración, debido a la acidificación leve en ese período. En este capítulo se evaluaron diferentes aspectos de las bebidas fortificadas durante 30 días de conservación a 4 °C ya que es el tiempo recomendado en las bebidas de kefir comercializadas actualmente. Si bien las bebidas son consumidas en un período menor a los 30 días, la indicación del consumo es desde la fecha de elaboración, teniendo en cuenta el tiempo que pueden pasar en la heladera del comercio.

Se pudo observar que la conservación de las bebidas de kefir durante 30 días provocó una leve acidificación de las mismas, pero ésta fue independiente de la fortificación y no afectó la estabilidad de las bebidas.

Los datos aquí presentados arrojaron resultados muy alentadores para pensar a las nanopartículas de magnetita como posibles candidatos para fortificar bebidas debido a que en el bioensayo de toxicidad con *Artemia salina*, las nanopartículas resultaron ser no tóxicas en el rango de concentración estudiado. Si bien el sulfato ferroso presentó toxicidad moderada (DL50 = 312.5 µg/mL), las bebidas fortificadas con este compuesto tales como las leches, presentan un agregado muy por debajo de la DL50, ya que son fortificadas con 1.5-3 mg de hierro cada 100mL, es decir 15-30 µg/mL.

Mediante el análisis por HPLC se pudo observar que el pico 2 atribuible a sacarosa presentó una marcada disminución luego de 30 días de conservación, y el pico 3, atribuible a glucosa, presentó un aumento.

Si bien la coincidencia en los tiempos de retención en HPLC-SEC no es criterio de identidad entre estándar y el compuesto a analizar, el denominado pico 2 presenta un tiempo de retención similar al de sacarosa. Además, esta banda cromatográfica podría atribuirse a sacarosa por su disminución a lo largo del período de conservación de 30 días que, entre otros procesos, se puede deber al consumo de la misma por parte del consorcio de probióticos que continúan fermentando la bebida de kefir.

En el mismo sentido, el denominado pico 3 podría atribuirse a glucosa. Particularmente cabe destacar que su aumento moderado se correspondería con la hidrólisis parcial de la sacarosa debido al medio ácido (que lleva a incrementar su concentración), al mismo tiempo que se refleja un consumo de la misma por parte de los microorganismos (que disminuye su concentración), en total coincidencia con los resultados de conservación del producto y viabilidad aceptable de los microorganismos presentes. En presencia de Fe(II) o superficies con grupos expuestos -Fe-OH, se encontraron indicios indirectos de efectos deletéreos oxidativos, posiblemente por activación de O₂ catalizada por catión ferroso.

En definitiva, el perfil general cromatográfico de las bebidas fortificadas no presentó modificaciones extremas con respecto al kefir control, lo que también se corresponde con la buena conservación y estabilidad de los productos obtenidos.

En cuanto a la viabilidad de los microorganismos presentes en las bebidas de kefir, se observó una disminución de las bacterias lácticas totales al finalizar los 30 días de conservación a 4 °C. Esta tendencia se observó en las 4 muestras independientemente de la fortificación, permitiendo concluir que la presencia de hierro no es responsable de la pérdida de viabilidad bacteriana.

La determinación de la formación de ferritina puso de manifiesto que la incorporación de FeSO₄ en los enterocitos fue superior a la de las NP de M y NP de cM. No obstante, las NP mostraron una mayor formación de ferritina que la basal, por lo que se puede concluir que si bien la internalización celular no es tan efectiva como la del FeSO₄, su uso como fortificante sirve para aumentar la ingesta de hierro y, además, como alternativa a la hora de solucionar los efectos indeseados que trae aparejado el FeSO₄ en cuanto a las alteraciones organolépticas que produce en los alimentos.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

El hierro es un mineral esencial para el funcionamiento del cuerpo humano. Su consumo deficiente trae aparejados serios problemas de salud y es el principal déficit nutricional a nivel mundial. Para alcanzar los requerimientos diarios recomendados de hierro, actualmente se recurre a estrategias de fortificación de alimentos y suplementación de la dieta. Las sales de hierro que usualmente se utilizan para este fin tienen la gran desventaja de no poder cumplir en simultáneo con los requisitos de no alterar las propiedades organolépticas de los alimentos y el de lograr una buena absorción de hierro en el intestino. Es así que las sales que no alteran las propiedades organolépticas de los alimentos, una vez en solución son oxidadas formando precipitados difíciles de absorber para el intestino, y aquellas sales que poseen mejor absorción intestinal, generan cambios desagradables en los alimentos fortificados. Es por ello que las alternativas de incorporar al hierro en matrices poliméricas para impedir su precipitación y enmascarar las interacciones que puedan provocar los cambios en las propiedades organolépticas, resultan atractivas en la fortificación de alimentos y/o en la producción de formulaciones orales como suplementos.

Dentro del abanico de polímeros que se pueden utilizar como matriz, la pectina presenta algunas ventajas como la biocompatibilidad y nula toxicidad por ser un biopolímero que se encuentra abundantemente en la naturaleza formando parte de la lámina media de la pared celular de los vegetales. Algunos beneficios que aporta la pectina a la salud del consumidor como fibra dietaria son la regulación del estreñimiento, del sobrepeso y la obesidad, ayuda a reducir la hiperglucemia y a la regulación del colesterol, entre otros (Vilcanqui-Pérez, 2017).

Además, como la pectina forma parte de la fibra dietaria, presenta características que la hacen particularmente interesante porque no se hidroliza en la parte superior del tracto gastrointestinal. La pectina es degradada en el colon por la microflora que lo habita y esto le confiere una gran ventaja cuando el intestino es el *target* del material transportado, como es el caso del hierro y los microorganismos probióticos.

Por otro lado, la incorporación de probióticos a alimentos o bebidas funcionales está también en auge en la industria alimentaria debido a los múltiples beneficios que estos aportan a la salud de quien los consume. Las bacterias lácticas tienen estatus GRAS, es decir que son generalmente reconocidas como seguras y la mayor parte de ellas se encuentran incluidas en la lista de Presunción Calificada de Seguridad (QPS) de la Unión Europea (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2013). Estas características y su acción como probióticos permiten

que puedan ser utilizadas en la producción y preservación de alimentos y en aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la salud (medicina, industria farmacéutica, nutracéuticos). Sin embargo, para que las bacterias ejerzan su efecto probiótico deben llegar en concentraciones adecuadas a su lugar de destino, luego de ser consumidas. En otras palabras, las bacterias lácticas antes de llegar al intestino, deben superar diferentes factores que afectan su viabilidad como ser el procesamiento y almacenamiento de los alimentos y el pasaje a través del tracto gastrointestinal superior. Es en este sentido que pensar en una matriz contenedora o encapsulante es una buena estrategia para proveer a las bacterias una barrera protectora frente a las condiciones perjudiciales por las que tengan que atravesar tanto en el proceso biotecnológico como en la etapa digestiva luego de su consumo.

En el marco de los intereses anteriormente mencionados, en este trabajo se propusieron tres maneras diferentes de aportar hierro, pectina y bacterias probióticas a la dieta. La primera propuesta consistió en un sistema de cápsulas liofilizadas compuestas de una matriz de pectina y hierro que se lo puede utilizar tanto como herramienta para transportar hierro y aportar no sólo este mineral sino también fibra dietaria, o también se lo puede utilizar para además encapsular bacterias probióticas. La cepa probiótica utilizada fue *L. plantarum* CIDCA 83114. Si se quisiese implementar el uso de estas cápsulas en algún alimento, deberían considerarse alimentos sólidos, dado que en líquidos las cápsulas no conservarían la forma y estructura y aportarían texturas quizás indeseadas. Las barras de cereales aparecen como la opción ideal para innovar con el agregado de cápsulas inteligentes que aportarán hierro, probióticos y más fibra dietaria que una barra de cereal común.

En una segunda etapa del trabajo se planteó el desarrollo de formulaciones que contuvieran los tres elementos de interés (hierro, fibra dietaria y probióticos), pero que se pudieran aplicar en alimentos bebibles. Para esto, se pensó en utilizar el hierro en forma de nanopartículas, ya que como sal ferrosa en presencia de pectina hubiese gelificado iónicamente generando nuevamente las cápsulas anteriormente obtenidas. Para este objetivo se sintetizaron nanopartículas de óxido de hierro que resultaron ser puramente partículas de magnetita, y junto con la cepa probiótica *L. plantarum* CIDCA 83114, fueron incorporadas a una matriz de pectina para su posterior liofilización. Estos compósitos fueron caracterizados y la presencia de las nanopartículas de magnetita no afectó significativamente la viabilidad bacteriana. Es a partir de esta observación que se consideró la posibilidad de ser usado como un producto para fortificar alimentos o suplementar la dieta, y también, las nanopartículas podrían ser usadas para enriquecer alimentos

o bebidas probióticos tales como yogures o bebidas fermentadas con kefir sin afectar la viabilidad de los probióticos que estas bebidas naturalmente contienen.

Fue de esa deducción que se planteó la tercera propuesta de esta tesis que consistió en fortificar bebidas fermentadas con gránulos de kefir de agua, con nanopartículas de Fe_3O_4 . Para descartar la posibilidad de efectos adversos que esta propuesta pudiese tener en los consumidores, se evaluó la toxicidad de las mismas mediante el bioensayo con *Artemia salina*, que resultó ser baja. Cabe destacar la importancia de este resultado, debido a que esta característica convierte a las nanopartículas de Fe_3O_4 en un candidato inocuo para la fortificación de alimentos como herramienta para incrementar el consumo de hierro en la dieta.

Luego, el siguiente paso fue fortificar la bebida fermentada con gránulos de kefir de agua con las nanopartículas sintetizadas (M y cM). La viabilidad de los microorganismos presentes en el kefir que le confieren sus propiedades probióticas, fue investigada en las bebidas fortificadas y se pudo observar que no fue afectada por la presencia de las nanopartículas de hierro. Con estas dos primeras observaciones se puede considerar esta bebida fortificada como una innovación en el mercado naturista que brinda el aporte de probióticos y de hierro ayudando a alcanzar las necesidades diarias.

Se estudió también la absorción del hierro proveniente de las bebidas fortificadas con nanopartículas de magnetita y de magnetita cubierta con pectina, y si bien la formación de ferritina en células intestinales expuestas a la bebida fortificada con sulfato ferroso fue superior a las expuestas a las bebidas fortificadas con las nanopartículas, estas últimas mostraron una formación de ferritina superior a la basal (células control). Las vías endocíticas más probables para su incorporación en enterocitos fueron las de las clatrininas y las caveolas.

Es por este motivo que resulta interesante proponer este producto probiótico fortificado con Fe_3O_4 como un gran candidato para satisfacer las recomendaciones diarias de la ingesta de hierro.

Apéndice

Apéndice

1. Medios de cultivo bacteriano

Caldo nutritivo MRS (Biokar Diagnostics, Francia)

Para 1 litro de medio:

- Polipeptona	10,0 g
- Extracto de carne	10,0 g
- Extracto de levadura	5,0 g
- Glucosa	20,0 g
- Tween 80	1,08 g
- Fosfato dipotásico	2,0 g
- Acetato de sodio	5,0 g
- Citrato de amonio	2,0 g
- Sulfato de magnesio.....	0,2 g
- Sulfato de manganeso	0,05 g

pH del medio listo para usar a 25 ° C: 6,4 ± 0,2.

Agar nutritivo MRS (Biokar Diagnostics, Francia)

Caldo nutritivo MRS adicionado como agar en concentración 15g/L

Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC) (Merck, Alemania)

Extracto de levadura	5 g/L
Glucosa	20 g/L
Cloranfenicol	0.1 g/L
Agar	15 g/L

2. Medios de cultivo de células eucariotas

Medio Dulbecco modified Eagle's minimal essential médium (DMEM base) (Gibco BRL Life Technologies, USA)

DMEM 1000mL final

NaHCO₃ 2 g

pH 7.0 ± 0.2

Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

DMEM completo (Gibco BRL Life Technologies, USA)

DMEM 1000 mL final

Suero feal bovino Inactivado 180 mL

Aminoácidos no esenciales (GIBCO Life Technologies, USA) 13 mL

Penicilina / Streptomycin (1000 IU/mL, 1000 µg/mL) 13 mL

Gentamicina (50 mg/mL) (Parafarm, aporiti SACIFIA, Argentina) 10

NaHCO₃ 2 g

pH 7.0 ± 0.2

El suero fetal bovino se inactiva 30 min a 60 °C. Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

3. Soluciones buffers y reactivos

Buffer PBS

KH₂PO₄ 0.14 g/L

Na₂HPO₄ 0.79 g/L

NaCl 9.00 g/L

pH 7.4

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi, R.** (2014). Review on iron and its importance for human health. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(2), 164.
- Aburto, J., Moran, M., Galano, A., & Torres-García, E.** (2015). Non-isothermal pyrolysis of pectin: a thermochemical and kinetic approach. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 112, 94-104.
- Ahmad, A., & Ahmed, Z.** (2019). Fortification in beverages. In *Production and Management of Beverages* (pp. 85-122). Woodhead Publishing).
- Albano, H., Pinho, C., Leite, D., Barbosa, J., Silva, J., Carneiro, L., ... & Teixeira, P.** (2009). Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for “Alheira”, a fermented meat sausage. *Food Control*, 20(8), 764-770.
- Ali, A., Hira Zafar, M. Z., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S., & Hussain, A.** (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, science and applications*, 9, 49.
- Allen, L., de Benoist, B., Dary, O., & Hurrell, R.** (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva: World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Amagloh, F. K., Atuna, R. A., McBride, R., Carey, E. E., & Christides, T.** (2017). Nutrient and total polyphenol contents of dark green leafy vegetables, and estimation of their iron bioaccessibility using the *in vitro* digestion/Caco-2 cell model. *Foods*, 6(7), 54.

- Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., ... & Williams, C. L.** (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews*, 67(4), 188-205.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F.** (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 215-237.
- Aquilina, G., Bach, A., Bampidis, V., Bastos, M. L., Flachowsky, G., Gralak, M. A., ... Westendorf, J.** (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Probiotic LACTINA® (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium*) for chickens for fattening and piglets. *EFSA Journal*, 11, 3170–3183.
- Arora, V., Sood, A., Shah, J., Kotnala, R. K., & Jain, T. K.** (2017). Synthesis and characterization of pectin-6-aminohexanoic acid-magnetite nanoparticles for drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 243-251.
- Assifaoui, A., Chambin, O., & Cayot, P.** (2011). Drug release from calcium and zinc pectinate beads: Impact of dissolution medium composition. *Carbohydrate polymers*, 85(2), 388-393.
- Bakirtzi, K., Law, I. K. M., Xue, X., Iliopoulos, D., Shah, Y. M., & Pothoulakis, C.** (2016). Neurotensin promotes the development of colitis and intestinal angiogenesis via Hif-1 α -miR-210 signaling. *The Journal of Immunology*, 196(10), 4311-4321.
- Baldera Paico, C. J., & Dejo Tovar, A. M.** (2018). Efecto biocida del extracto etanólico de hojas de lantana camara (lantana) sobre el estadio adulto de aedes aegypti y toxicidad sobre artemia salina (camarón salino) en condiciones de laboratorio. Tesis de grado. <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/3021/BC-TES-TMP-1840.pdf?sequence=1>
- Baltussen, R., Knai, C., & Sharan, M.** (2004). Iron fortification and iron supplementation are cost-effective interventions to reduce iron deficiency in four subregions of the world. *The Journal of nutrition*, 134(10), 2678-2684.

- Bengoa, A. A., Garrote, G. L., & Abraham, A. G.** (2020). Kefir y los Alimentos fermentados artesanales. CONICET digital. https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/120178/CONICET_Digital_Nro.5bb_b9d45-b79c-44f1-9225-01a54fe8454e_B.pdf?sequence=5
- Berthomieu, C., & Hienerwadel, R.** (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis research*, 101(2-3), 157-170
- Bhattacharjee, S.** (2016). DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of controlled release*, 235, 337-351.
- Bogantes, D., Flores, L., Castellón, E., & Uribe, L.** (2018). Encapsulation of entomopathogenic nematodes in polymer-based materials and their effect on *Galleria mellonella*. *Agronomía Costarricense*, 42(2), 9-27.
- Bongaerts, G. P., & Severijnen, R. S.** (2016). A reassessment of the PROPATRIA study and its implications for probiotic therapy. *Nature biotechnology*, 34(1), 55.
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzín, L., Lapasin, R., & Cesàro, A.** (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food chemistry*, 122(2), 416-423.
- Bourgeois, S., Gernet, M., Pradeau, D., Andremont, A., & Fattal, E.** (2006). Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of β -lactamases entrapped in pectin beads. *International journal of pharmaceutics*, 324(1), 2-9.
- Bovell-Benjamin, A. C., Allen, L. H., Frankel, E. N., & Guinard, J. X.** (1999). Sensory quality and lipid oxidation of maize porridge as affected by iron amino acid chelates and EDTA. *Journal of food science*, 64(2), 371-376.
- Brant, R. A.** (1994). Normos Mössbauer Fitting Program: Demo Version. Wissel gmbH.
- Bravo, J. A., Huaypar, Y., & Mejía, M. E.** (2007). Espectroscopia Mössbauer de Velocidad Cero y Aplicaciones. *Revista de Investigación de Física*, 9(02)

- Bries, A. E., Hurrell, R. F., & Reddy, M. B.** (2020). Iron absorption from bouillon fortified with iron-enriched *Aspergillus oryzae* is higher than that fortified with ferric pyrophosphate in young women. *The Journal of nutrition*, 150(5), 1109-1115.
- Brix, K. V., Cardwell, R. D., & Adams, W. J.** (2003). Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 54(2), 169-175.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J.** (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering*, 104(4), 467-483.
- Calero, M., Gutiérrez, L., Salas, G., Luengo, Y., Lázaro, A., Acedo, P., ... & Villanueva, A.** (2014). Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: two fundamental requirements for biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(4), 733-743.
- Călinoiu, L. F., Vodnar, D. C., & Precup, G.** (2016). The probiotic bacteria viability under different conditions. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 73(2), 55-60.
- Camaschella, C.** (2019). Iron deficiency. *Blood*, 133(1), 30-39.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P.** (2002). Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters*, 24(19), 1587-1591.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P.** (2003). Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 947-52.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P.** (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14(10), 835-847.

- Chaluvadi, S., Hotchkiss Jr, A. T., Call, J. E., Luchansky, J. B., Phillips, J. G., Liu, L. S., & Yam, K. L.** (2012). Protection of probiotic bacteria in a synbiotic matrix following aerobic storage at 4 C. *Beneficial microbes*, 3(3), 175-187.
- Champagne C.P. & Kailasapathy K.** (2008). Chapter 14: Encapsulation of probiotics. In: Garti, N. (Ed.), *Controlled Release Technologies for Targeted Nutrition*. Woodhead Publishing, CRC Press, London, pp. 344 – 369.
- Chávarri, M., Marañón, I., & Villarán, M. C.** (2012). Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. *In Probiotics*. IntechOpen.
- Chen, M. J., Chen, K. N., & Kuo, Y. T.** (2007). Optimal thermotolerance of *Bifidobacterium bifidum* in gellan–alginate microparticles. *Biotechnology and bioengineering*, 98(2), 411-419.
- Chen, X., Yang, G., Song, J. H., Xu, H., Li, D., Goldsmith, J., ... & Kelly, C. P.** (2013). Probiotic yeast inhibits VEGFR signaling and angiogenesis in intestinal inflammation. *PLoS One*, 8(5), e64227.
- Clark, G. L., & Reynolds, D. H.** (1936). Quantitative analysis of mine dusts: an X-Ray diffraction method. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 8(1), 36-40.
- Clogston, J. D., & Patri, A. K.** (2011). Zeta potential measurement. In *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* (pp. 63-70). Humana Press
- Coma, M. E., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G.** (2019). Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal*, 120, 109234.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V.** (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of controlled release*, 162(1), 56-67.

- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., ... & Clemente, A.** (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 99-118.
- Coulibaly, I., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Fauconnier, M. L., Lognay, G., & Thonart, P.** (2010). The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *International journal of microbiology*, 2010, 1-9.
- Coviello, T., Matricardi, P., Marianecchi, C., & Alhaique, F.** (2007). Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of controlled release*, 119(1), 5-24.
- Crispín, P. L. M., Caro, R. R., & Ochoa, M. D. V.** (2012). Pectina: Usos Farmacéuticos y Aplicaciones Terapéuticas. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 78, No. 1).
- da CP Miguel, M. G., Cardoso, P. G., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F.** (2011). Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1875-1884.
- Dai, J., Wu, S., Jiang, W., Li, P., Chen, X., Liu, L., ... & Li, F.** (2013). Facile synthesis of pectin coated Fe₃O₄ nanospheres by the sonochemical method. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 331, 62-66.
- Das, S., & Ng, K. Y.** (2010). Colon-specific delivery of resveratrol: Optimization of multi-particulate calcium-pectinate carrier. *International journal of pharmaceutics*, 385(1-2), 20-28.
- Das, S., Ng, K. Y., & Ho, P. C.** (2010). Formulation and optimization of zinc-pectinate beads for the controlled delivery of resveratrol. *Aaps Pharmscitech*, 11(2), 729-742.
- De Blasio, C.** (2019). Thermogravimetric Analysis (TGA). In *Fundamentals of Biofuels Engineering and Technology* (pp. 91-102). Springer, Cham.

- De Man, J. C., Rogosa, D., & Sharpe, M. E.** (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.
- de Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Ramos, O. L.** (2017). Micro-and nano bio-based delivery systems for food applications: *In vitro* behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 23-45.
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J.** (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International dairy journal*, 20(4), 292-302.
- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G. P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F., ... & Sartori, M.** (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 38, S248-S255.
- Derrick, M. R., Stulik, D., & Landry, J. M.** (2000). Infrared spectroscopy in conservation science. Getty Publications.
- Dhalleine, C., Assifaoui, A., Moulari, B., Pellequer, Y., Cayot, P., Lamprecht, A., & Chambin, O.** (2011). Zinc-pectinate beads as an *in vivo* self-assembling system for pulsatile drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 414(1-2), 28-34.
- Diaz, J. V., Anthon, G. E., & Barrett, D. M.** (2007). Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13), 5131-5136.
- Doke, S. K., & Dhawale, S. C.** (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223-229.
- Durán, E., Villalobos, C., Churio, O., Pizarro, F., & Valenzuela, C.** (2017). Encapsulación de hierro: Otra estrategia para la prevención o tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro. *Revista chilena de nutrición*, 44(3), 234-243.

- Durán, P., Abeyá, E., Biglieri, A., Kogan, L., & Mangialavori, G.** (2007). Encuesta Nacional de Nutrición y Salud Documento de Resultados. Buenos Aires, Argentina. <http://www.extensioncbc.com.ar/wp-content/uploads/ENNyS-2007.pdf>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).** (2013). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11), 3449.
- Einhorn-Stoll, U.** (2018). Pectin-water interactions in foods—From powder to gel. *Food hydrocolloids*, 78, 109-119
- El-Gibaly, I.** (2002). Oral delayed-release system based on Zn-pectinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 232(1-2), 199-211.
- Elmagirbi, A., Sulistyarti, H., & Atikah, A.** (2012). Study of ascorbic acid as iron (III) reducing agent for spectrophotometric iron speciation. *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, 1(1), 11-17.
- Eymery J.P. & Teillet J.** (2000) Spectrométrie Mössbauer, Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation. Tesis doctoral.
- Etchepare, M. D. A., Barin, J. S., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Wagner, R., Fries, L. L. M., & Menezes, C. R. D.** (2015). Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. *Ciência Rural*, 45(7), 1319-1326.
- FAO/OMS.** (2002a). Human vitamin and mineral requirements. Informe de una reunión consultiva conjunta de expertos. Roma. FAO. <http://www.fao.org/3/a-y2809e.pdf>
- FAO/OMS.** (2002b). WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London. https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Farnworth, E. R.** (2006). Kefir—a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Fu*, 2(1), 1-17.

- Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D.** (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate polymers*, 189, 296-303.
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., & Ouwehand, A. C.** (2019). The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 83.
- Fidler, M. C., Walczyk, T., Davidsson, L., Zeder, C., Sakaguchi, N., Juneja, L. R., & Hurrell, R. F.** (2004). A micronised, dispersible ferric pyrophosphate with high relative bioavailability in man. *British Journal of Nutrition*, 91(1), 107-112.
- Fijan, S.** (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*, 11(5), 4745-4767.
- Florence, A. T.** (1997). The oral absorption of micro-and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharmaceutical research*, 14(3), 259-266.
- Fonseca, F., Cenard, S., & Passot, S.** (2015). Freeze-drying of lactic acid bacteria. In *Cryopreservation and freeze-drying protocols* (pp. 477-488). Springer, New York, NY.
- Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., & Peñas, E.** (2016). Fermented foods in health promotion and disease prevention: An overview. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 3-20). London: Elsevier.
- García, S. M., Fantuzzi, G., Angelini, J. M., Bourgeois, M. J., Elgart, J. F., Etchegoyen, G., ... & Gagliardino, J. J.** (2018). Ingesta alimentaria en la población adulta de dos ciudades de la provincia de Buenos Aires: su adecuación a las recomendaciones nutricionales. *Actualización en Nutrición*, 19. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/73649/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L.** (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *The Journal of dairy research*, 68(4), 639.

- Gautier, J., Passot, S., Pénicaud, C., Guillemin, H., Cenard, S., Lieben, P., & Fonseca, F. (2013).** A low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1. *Journal of dairy science*, 96(9), 5591-5602.
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., & Marchioni, E. (2009).** Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International journal of food microbiology*, 129(1), 103-105.
- Gehrke H, Fruehmesser A, Pelka J, Esselen M, Hecht LL, Blank H, Schuchmann HP, Gerthsen D, Marquardt C, Diabate S, Weiss C, & Marko D. 2013.** *In vitro* toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology*, 7, 274-293.
- Gerez, C. L., Font de Valdez, G., Gigante, M. L., & Grosso, C. R. F. (2012).** Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Letters in applied microbiology*, 54(6), 552-556.
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., & de Valdez, G. F. (2009).** Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food control*, 20(2), 144-148.
- Ghibaud, F., Gerbino, E., Dall'Orto, V. C., & Gómez-Zavaglia, A. (2017).** Pectin-iron capsules: Novel system to stabilise and deliver lactic acid bacteria. *Journal of Functional Foods*, 39, 299-305.
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010).** Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in microbiology*, 161(6), 480-487.
- Golowczyc, M. A., Gugliada, M. J., Hollmann, A., Delfederico, L., Garrote, G. L., Abraham, A. G., ... & De Antoni, G. (2008).** Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *The Journal of dairy research*, 75(2), 211.

- Golowczyc, M. A., Silva, J., Abraham, A. G., De Antoni, G. L., & Teixeira, P. (2010).** Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 7-12.
- Golowczyc, M. A., Silva, J., Teixeira, P., De Antoni, G. L., & Abraham, A. G. (2011).** Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *International journal of food microbiology*, 144(3), 556-560.
- Golowczyc, M., Vera, C., Santos, M., Guerrero, C., Carasi, P., Illanes, A., ... & Tymczyszyn, E. (2013).** Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. *The Journal of dairy research*, 80(3), 374.
- Gómez Zavaglia, A., Kociubinski, G., Pérez, P., Disalvo, E., & De Antoni, G. (2002).** Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *Journal of applied microbiology*, 93(5), 794-799.
- Goodarzi, F., & Zendehboudi, S. (2019).** A comprehensive review on emulsions and emulsion stability in chemical and energy industries. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97(1), 281-309.
- Grimoud, J., Durand, H., De Souza, S., Monsan, P., Ouarné, F., Theodorou, V., & Roques, C. (2010).** *In vitro* screening of probiotics and synbiotics according to anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *International journal of food microbiology*, 144(1), 42-50.
- Gulec, S., Anderson, G. J., & Collins, J. F. (2014).** Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(4), G397-G409.
- Günter, E. A., & Popeyko, O. V. (2016).** Calcium pectinate gel beads obtained from callus cultures pectins as promising systems for colon-targeted drug delivery. *Carbohydrate polymers*, 147, 490-499.

- Habibi, N. (2014).** Preparation of biocompatible magnetite-carboxymethyl cellulose nanocomposite: characterization of nanocomposite by FTIR, XRD, FESEM and TEM. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 131, 55-58.
- Halleux, C., & Schneider, Y. J. (1994).** Iron absorption by CaCo-2 cells cultivated in serum-free medium as *in vitro* model of the human intestinal epithelial barrier. *Journal of cellular physiology*, 158(1), 17-28.
- Handelman, G. J., & Levin, N. W. (2008).** Iron and anemia in human biology: a review of mechanisms. *Heart failure reviews*, 13(4), 393-404.
- Harta, O., Iconomopoulou, M., Bekatorou, A., Nigam, P., Kontominas, M., & Koutinas, A. A. (2004).** Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter. *Food Chemistry*, 88(2), 237-242.
- Heaney, S. I., & Davison, W. (1977).** The determination of ferrous iron in natural waters with 2, 2' bipyridyl. *Limnology and Oceanography*, 22(4), 753-760.
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2010).** Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of food engineering*, 98(3), 309-316.
- Hernández Torres, M. A. (2018).** Caracterización fisicoquímica de un polímero obtenido a partir de tibicos (Kéfir de agua) y su evaluación como agente encapsulante de *Bacillus thuringiensis* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Calder, P. C. (2014).** Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506.

- Hilty FM, Arnold M, Hilbe M, Teleki A, Knijnenburg JTN, Ehrensperger F, Hurrell RF, Pratsinis SE, Langhans W, & Zimmermann MB.** 2010. Iron from nanocompounds containing iron and zinc is highly bioavailable in rats without tissue accumulation. *Nat. Nanotechnol.*, 5, 374-380.
- Hilty FM, Knijnenburg JTN, Teleki A, Krumeich F, Hurrell RF, Pratsinis SE, & Zimmermann MB.** 2011. Incorporation of Mg and Ca into Nanostructured Fe₂O₃ Improves Fe Solubility in Dilute Acid and Sensory Characteristics in Foods. *J. Food Sci.*, 76, N2- N10.
- Hotchkiss Jr, A. T., Liu, L., Call, J., Cooke, P., Luchansky, J. B., & Rastall, R. A.** (2008). Synbiotic matrices derived from plant oligosaccharides and polysaccharides. *New Delivery Systems for Controlled Drug Release from Naturally Occurring Materials*, 5, 69-77
- Hugo, A. A., Kakisu, E., De Antoni, G. L., & Pérez, P. F.** (2008). Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* *in vitro*. *Letters in applied microbiology*, 46(6), 613-619.
- Hurrell, R.** (2002). How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutrition reviews*, 60, S7-S15.
- Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., & Schlager, J. J.** (2005). *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19(7), 975-983.
- Ibarz, A., Pagán, A., Tribaldo, F., & Pagán, J.** (2006). Improvement in the measurement of spectrophotometric data in the m-hydroxydiphenyl pectin determination methods. *Food control*, 17(11), 890-893.
- Islan, G. A., de Verti, I. P., Marchetti, S. G., & Castro, G. R.** (2012). Studies of ciprofloxacin encapsulation on alginate/pectin matrixes and its relationship with biodisponibility. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(5), 1408-1420.

- Ismail, A. A., van de Voort, F. R., & Sedman, J.** (1997). Fourier transform infrared spectroscopy: principles and applications. In *Techniques and instrumentation in analytical chemistry* (Vol. 18, pp. 93-139). Elsevier.
- Jagannath, A., Raju, P. S., & Bawa, A. S.** (2010). Comparative evaluation of bacterial cellulose (nata) as a cryoprotectant and carrier support during the freeze drying process of probiotic lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 43(8), 1197-1203
- Kailasapathy, K.** (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources*, 4(033), 1-19.
- Kakisu, E., Abraham, A. G., Farinati, C. T., Ibarra, C., & De Antoni, G. L.** (2013). *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from *Escherichia coli* O157: H7. *The Journal of dairy research*, 80(1), 64.
- Kakisu, E., Bolla, P., Abraham, A. G., De Urraza, P., & De Antoni, G. L.** (2013). *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir: Protection of cultured Hep-2 cells against *Shigella* invasion. *International dairy journal*, 33(1), 22-26.
- Kakisu, E., Irigoyen, A., Torre, P., De Antoni, G. L., & Abraham, A. G.** (2011). Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 456-463.
- Kandyliis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A.** (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, 58-63.
- Kent, R. M., & Doherty, S. B.** (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Research International*, 64, 567-576.

- Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G.** (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 26(3), 927-939.
- Khorasani, A. C., & Shojaosadati, S. A.** (2017). Starch-and carboxymethylcellulose-coated bacterial nanocellulose-pectin bionanocomposite as novel protective prebiotic matrices. *Food Hydrocolloids*, 63, 273-285.
- Kim, H. J., Bae, S. H., Kim, H. J., Kim, K. M., Song, J. H., Go, M. R., ... & Choi, S. J.** (2017). Cytotoxicity, intestinal transport, and bioavailability of dispersible iron and zinc supplements. *Frontiers in microbiology*, 8, 749.
- Kintner III, P. K., & Van Buren, J. P.** (1982). Carbohydrate interference and its correction in pectin analysis using the m-hydroxydiphenyl method. *Journal of food Science*, 47(3), 756-759.
- Klemmer, K. J., Korber, D. R., Low, N. H., & Nickerson, M. T.** (2011). Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery. *International journal of food science & technology*, 46(11), 2248-2256.
- Klug, H. P., & Alexander, L.P.** (1974). X-Ray Diffraction Procedures. *John Wiley*, 1, 9-3.
- Kobyliak, N., Conte, C., Cammarota, G., Haley, A. P., Styriak, I., Gaspar, L., ... & Kruzliak, P.** (2016). Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutrition & metabolism*, 13(1), 14.
- König, H., Unden, G., & Fröhlich, J. (Eds.).** (2009). Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine (pp. 3-30). Heidelberg: Springer.
- Kristensen, N. B., Bryrup, T., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T. H., & Pedersen, O.** (2016). Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome medicine*, 8(1), 52.

- Kunzmann, A., Andersson, B., Vogt, C., Feliu, N., Ye, F., Gabrielsson, S., ... & Fadeel, B.** (2011). Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 253(2), 81-93.
- La Cava, E. L., Gerbino, E., Sgroppo, S. C., & Gómez-Zavaglia, A.** (2018). Characterization of pectins extracted from different varieties of pink/red and white grapefruits [*Citrus paradisi* (Macf.)] by thermal treatment and thermosonication. *Journal of food science*, 83(6), 1613-1621.
- Laureys, D., & De Vuyst, L.** (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 80(8), 2564-2572.
- Leite, A. M. D. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F.** (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341-349.
- Lewis, B. B., Buffie, C. G., Carter, R. A., Leiner, I., Toussaint, N. C., Miller, L. C., ... & Pamer, E. G.** (2015). Loss of microbiota-mediated colonization resistance to *Clostridium difficile* infection with oral vancomycin compared with metronidazole. *The Journal of infectious diseases*, 212(10), 1656-1665.
- Li, C., Zhao, J. L., Wang, Y. T., Han, X., & Liu, N.** (2009). Synthesis of cyclopropane fatty acid and its effect on freeze-drying survival of *Lactobacillus bulgaricus* L2 at different growth conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1659-1665.
- Li, D., Zhu, Z., & Sun, D. W.** (2018). Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 46-55.
- Liu, L., 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.

- Liu, L., Fishman, M. L., & Hicks, K. B.** (2007). Pectin in controlled drug delivery—a review. *Cellulose*, 14(1), 15-24.
- Lodato, P., De Huergo, M. S., & Buera, M. P.** (1999). Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(2), 215-220
- Lomer, M. C., Thompson, R. P., & Powell, J. J.** (2002). Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(1), 123-130.
- Lowe, A. B., & McCormick, C. L.** (2002). Synthesis and solution properties of zwitterionic polymers. *Chemical reviews*, 102(11), 4177-4190.
- Löwemark, L., Chen, H. F., Yang, T. N., Kylander, M., Yu, E. F., Hsu, Y. W., ... & Jarvis, S.** (2011). Normalizing XRF-scanner data: a cautionary note on the interpretation of high-resolution records from organic-rich lakes. *Journal of Asian Earth Sciences*, 40(6), 1250-1256.
- Ma, W. Q., Wu, J., Zhao, Z., Sun, H., Yue, M., & Feng, J.** (2013). Comparison of absorption characteristics of iron glycine chelate and ferrous sulfate in Caco-2 cells. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(2).
- MacRae, T. H.** (2016). Stress tolerance during diapause and quiescence of the brine shrimp, *Artemia*. *Cell Stress and Chaperones*, 21(1), 9-18.
- Mahadevan, S., Gnanaprakash, G., Philip, J., Rao, B. P. C., & Jayakumar, T.** (2007). X-ray diffraction-based characterization of magnetite nanoparticles in presence of goethite and correlation with magnetic properties. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 39(1), 20-25.
- Marlett JA, & Slavin JL** (1997). Position of the American Dietetic Association: Health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc* 1997; 97:1157-9

- Marras-Marquez, T., Peña, J., & Veiga-Ochoa, M. D.** (2015). Robust and versatile pectin-based drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 479(2), 265-276.
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D.** (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113-124.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D.** (2013). Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS microbiology letters*, 348(1), 79-85.
- Martin-Dejardin, F., Ebel, B., Lemetais, G., Minh, H. N. T., Gervais, P., Cachon, R., & Chambin, O.** (2013). A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2), 166-174.
- Mccracken C, Zane A, Knight DA, Dutta PK, & Waldman WJ.** 2013. Minimal Intestinal Epithelial Cell Toxicity in Response to Short- and Long-Term Food-Relevant Inorganic Nanoparticle Exposure. *Chem. Res. Toxicol.*, 26, 1514-1525.
- McGirr, C., McEvoy, C. T., & Woodside, J. V.** (2017). Vegetarian and vegan diets: Weighing the claims. In *Nutrition Guide for Physicians and Related Healthcare Professionals* (pp. 203-212). Humana Press, Cham.
- Montanuci, F. D., Pimentel, T. C., Garcia, S., & Prudencio, S. H.** (2012). Effect of starter culture and inulin addition on microbial viability, texture, and chemical characteristics of whole or skim milk Kefir. *Food Science and Technology*, 32(4), 580-865.
- Morilla, M.** (2018). Técnicas de determinación de tamaño y potencial Z. <https://docplayer.es/93461381-Tecnicas-de-determinacion-de-tamano-y-potencial-z-maria-jose-morilla.html>

- Morris, G. A., Kök, S. M., Harding, S. E., & Adams, G. G.** (2010). Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 27(1), 257-284.
- Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., & Sohrabvandi, S.** (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(1), 1-18.
- Moss, M. L., & Mellon, M. G.** (1942). Colorimetric determination of iron with 2, 2'-bipyridyl and with 2, 2', 2'-terpyridyl. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 14(11), 862-865.
- Murata, Y., Miyashita, M., Kofuji, K., Miyamoto, E., & Kawashima, S.** (2004). Drug release properties of a gel bead prepared with pectin and hydrolysate. *Journal of controlled release*, 95(1), 61-66.
- Nagpal, J., & Choudhury, P.** (2004). Iron formulations in pediatric practice. *Indian pediatrics*, 41(8), 807-816
- Narkar, M., Sher, P., & Pawar, A.** (2010). Stomach-specific controlled release gellan beads of acid-soluble drug prepared by ionotropic gelation method. *Aaps Pharmscitech*, 11(1), 267-277.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A., & Orlando, P.** (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 319-323.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Orlando, P., & Coppola, R.** (2012). Biochemical traits, survival and biological properties of the probiotic *Lactobacillus plantarum* grown in the presence of prebiotic inulin and pectin as energy source. *Pharmaceuticals*, 5(5), 481-492.

- Ngenefeme, F. T. J., Eko, N. J., Mbom, Y. D., Tantoh, N. D., & Rui, K. W.** (2013). A one pot green synthesis and characterisation of iron oxide-pectin hybrid nanocomposite. *The Journal of Nutrition*, 132(4), 806S–812S.
- Nualkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryanskiy, V. V., & Charalampopoulos, D.** (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International*, 53(1), 304-311.
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, O., & Favaro-Trindade, C. S.** (2007). Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of microencapsulation*, 24(7), 685-693.
- Oliveira, G. F., Ferrari, P. C., Carvalho, L. Q., & Evangelista, R. C.** (2010). Chitosan–pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. *Carbohydrate polymers*, 82(3), 1004-1009.
- Oyedotun, T. D. T.** (2018). X-ray fluorescence (XRF) in the investigation of the composition of earth materials: a review and an overview. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 2(2), 148-154.
- Pacheco Gómez, J. D.** (2011). Determinación de la toxicidad aguda (cl50) del extracto de polvillo de carbón frente a larvas de *Artemia franciscana* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Pamer, E. G.** (2016). Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. *Science*, 352(6285), 535-538.
- Park EJ, Sim J, Kim Y, Han BS, Yoon C, Lee S, Cho MH, Lee BS, & Kim JH.** 2015. A 13-week repeated-dose oral toxicity and bioaccumulation of aluminum oxide nanoparticles in mice. *Arch. Toxicol.*, 89, 371-379.
- Patel, S., & Goyal, A.** (2013). Evolving roles of probiotics in cancer prophylaxis and therapy. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 5(1), 59-67.

- Peña, A. S.** (2007). Intestinal flora, probiotics, prebiotics, synbiotics and novel foods. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 99(11), 653.
- Percy, L., Mansour, D., & Fraser, I.** (2017). Iron deficiency and iron deficiency anaemia in women. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 40, 55-67.
- Perdana, J., Bereschenko, L., Fox, M. B., Kuperus, J. H., Kleerebezem, M., Boom, R. M., & Schutyser, M. A.** (2013). Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying. *Food Research International*, 54(2), 1351-1359
- Pereira, D. I., Mergler, B. I., Faria, N., Bruggraber, S. F., Aslam, M. F., Poots, L. K., ... & Powell, J. J.** (2013). Caco-2 cell acquisition of dietary iron (III) invokes a nanoparticulate endocytic pathway. *PloS one*, 8(11), e81250.
- Pereira, D. I., Bruggraber, S. F., Faria, N., Poots, L. K., Tagmount, M. A., Aslam, M. F., ... & Powell, J. J.** (2014). Nanoparticulate iron (III) oxo-hydroxide delivers safe iron that is well absorbed and utilised in humans. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 10(8), 1877-1886.
- Pérez-Cobas, A. E., Moya, A., Gosalbes, M. J., & Latorre, A.** (2015). Colonization resistance of the gut microbiota against *Clostridium difficile*. *Antibiotics*, 4(3), 337-357.
- Perfecto, A., Elgy, C., Valsami-Jones, E., Sharp, P., Hilty, F., & Fairweather-Tait, S.** (2017). Mechanisms of iron uptake from ferric phosphate nanoparticles in human intestinal caco-2 cells. *Nutrients*, 9(4), 359.
- Peris, E.** (2009). Espectroscopia Vibracional (IR). <http://repositori.uji.es/xmlui/bitstream/handle/10234/169759/7-IR.pdf?sequence=1>
- Perry, S. F.** (1998). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular Biotechnology*, 9(1), 59-64
- Phuapaiboon, P., Leenanon, B., & Levin, R. E.** (2013). Effect of *Lactococcus lactis* immobilized within pineapple and yam bean segments, and jerusalem artichoke

powder on its viability and quality of yogurt. *Food and Bioprocess Technology*, 6(10), 2751-2762.

Pi, L., Cai, J., Xiong, L., Cui, J., Hua, H., Tang, D., & Mao, X. (2020). Generation of H₂O₂ by on-site activation of molecular dioxygen for environmental remediation applications: a review. *Chemical Engineering Journal*, 389, 123420.

Pino Pérez, O., & Jorge Lazo, F. (2010). Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de protección vegetal*, 25(1), 34-43.

Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, 10(suppl_1), S49-S66.

Plessas, S., Nouska, C., Mantzourani, I., Kourkoutas, Y., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2017). Microbiological exploration of different types of kefir grains. *Fermentation*, 3(1), 1.

Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & nutrition*, 6(3), 285-306.

Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41(2), 111-123.

Prezotti, F. G., Cury, B. S. F., & Evangelista, R. C. (2014). Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. *Carbohydrate polymers*, 113, 286-295.

Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M., & Naji, T. (2015). *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 20.

Ramsay, L. C., & Charles, C. V. (2015). Review of iron supplementation and fortification. In *Topics in Public Health*. IntechOpen.

- Ranganatha, N., & Kuppast, I. J.** (2012). A review on alternatives to animal testing methods in drug development. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(SUPPL 5), 28-32.
- Rao, S. C., Athalye-Jape, G. K., Deshpande, G. C., Simmer, K. N., & Patole, S. K.** (2016). Probiotic supplementation and late-onset sepsis in preterm infants: a meta-analysis. *Pediatrics*, 137(3).
- Rastall, R. A., & Gibson, G. R.** (2015). Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 42-46.
- Rathee, V. S., Sidky, H., Sikora, B. J., & Whitmer, J. K.** (2019). Explicit ion effects on the charge and conformation of weak polyelectrolytes. *Polymers*, 11(1), 183.
- Remuñán-López, C., & Bodmeier, R.** (1997). Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of controlled release*, 44(2-3), 215-225.
- Renard, C. M., & Thibault, J. F.** (1996). Degradation of pectins in alkaline conditions: kinetics of demethylation. *Carbohydrate Research*, 286, 139-150.
- Rohner F, Ernst FO, Arnold M, Hilbe M, Biebinger R, Ehrensperger F, Pratsinis SE, Langhans W, Hurrell RF, & Zimmermann MB.** 2007. Synthesis, characterization, and bioavailability in rats of ferric phosphate nanoparticles. *J. Nutr.*, 137, 614-619
- Rojas Ayala, C.** (1999). Estudio por espectroscopia Mössbauer de obsidianas arqueológicas peruanas. Tesis de grado.
file:///C:/Users/Flor/Downloads/Rojas_ach.pdf
- Romano, N., Schebor, C., Mobili, P., & Gómez-Zavaglia, A.** (2016). Role of mono-and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*, 90, 251-258.

- Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., & Gómez-Zavaglia, A.** (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560-566.
- Rossi, L., Velikov, K. P., & Philipse, A. P.** (2014). Colloidal iron (III) pyrophosphate particles. *Food chemistry*, 151, 243-247.
- Ruiz-Rodríguez, L., Bleckwedel, J., Eugenia Ortiz, M., Pescuma, M., & Mozzi, F.** (2017). Lactic acid bacteria. *Industrial Biotechnology: Microorganisms*, 1, 395-451.
- Saadatkah, N., Carillo Garcia, A., Ackermann, S., Leclerc, P., Latifi, M., Samih, S., ... & Chaouki, J.** (2020). Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98(1), 34-43.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.-L., Mattila-Sandholm, T., Vaari, A., Suomalainen, T., & Mättö, J.** (2005). Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and 157 acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology*, 99(6), 1330-9.
- Sahu, S., & Dutta, R. K.** (2011). Novel hybrid nanostructured materials of magnetite nanoparticles and pectin. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323(7), 980-987.
- Sánchez, L., Ismail, M., Liew, F. Y., & Brock, J. H.** (1996). Iron transport across Caco-2 cell monolayers. Effect of transferrin, lactoferrin and nitric oxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1289(2), 291-297.
- Sánchez Romero, A.** (2018). Efecto de la temperatura sobre el tiempo y la eficiencia de descapsulación y eclosión en el crustáceo euritermo *Artemia* sp. Tesis de grado. https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/26411/TFG_Sanchez_Romero_Ana.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J.** (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111-117.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J. M., & Marquina, D.** (2003). The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and applied Microbiology*, 26(3), 434-437.
- Santos, M. I., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E. E., & Gómez-Zavaglia, A.** (2014). Determination of amorphous/rubbery states in freeze-dried prebiotic sugars using a combined approach of near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Food research international*, 64, 514-519.
- Schafer, F. Q., Qian, S. Y., & Buettner, G. R.** (2000). Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cellular and molecular biology* (Noisy-le-Grand, France), 46(3), 657.
- Schechter, A. N.** (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 112(10), 3927-3938.
- Scheers, N. M., Almgren, A. B., & Sandberg, A. S.** (2014). Proposing a Caco-2/HepG2 cell model for *in vitro* iron absorption studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(7), 710-715.
- Schubbe S, Schumann C, Cavelius C, Koch M, Muller T, & Kraegeloh A.** 2012. Size-Dependent Localization and Quantitative Evaluation of the Intracellular Migration of Silica Nanoparticles in Caco-2 Cells. *Chem. Mater.*, 24, 914-923.
- Scott, K. P., Jean-Michel, A., Midtvedt, T., & van Hemert, S.** (2015). Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microbial ecology in health and disease*, 26(1), 25877.
- Serpa Guerra, A. M., Vélez Acosta, L. M., Barajas Gamboa, J. A., Castro Herazo, C. I., & Gallego, R. Z.** (2016). Compuestos de hierro para la fortificación de alimentos:

El desarrollo de una estrategia nutricional indispensable para países en vía de desarrollo.-Una revisión. *Acta Agronómica*, 65(4), 340-353.

Sharma, R., & Ahuja, M. (2011). Thiolated pectin: Synthesis, characterization and evaluation as a mucoadhesive polymer. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 658-663.

Sharma V, Singh P, Pandey AK, & Dhawan A. 2012. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 745, 84-91.

Sheng-Nan, S., Chao, W., Zan-Zan, Z., Yang-Long, H., Venkatraman, S. S., & Zhi-Chuan, X. (2014). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chinese Physics B*, 23(3), 037503.

Shukla RK, Kumar A, Vallabani NVS, Pandey AK, & Dhawan A. 2014. Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice. *Nanomedicine*, 9, 1423-1434.

Sidiq, A., Gravina, R. J., Setunge, S., & Giustozzi, F. (2020). High-efficiency techniques and micro-structural parameters to evaluate concrete self-healing using X-ray tomography and Mercury Intrusion Porosimetry: A review. *Construction and Building Materials*, 252, 119030.

Sinha, V. R., & Kumria, R. (2001). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 224(1-2), 19-38.

Skolmowska, D., & Głabska, D. (2019). Analysis of Heme and Non-Heme Iron Intake and Iron Dietary Sources in Adolescent Menstruating Females in a National Polish Sample. *Nutrients*, 11(5), 1049.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). Principles of instrumental analysis. Cengage learning.

Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of microencapsulation delivery system for long-

term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. *BioMed research international*, 2013.

Soto, J. A., Cárdenas, J. A., & García, J. P. (2017). Inoculation of substrate with lactic acid bacteria for the development of *Moringa oleifera* Lam plantlets. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(2).

Souto-Maior, J. F. A., Reis, A. V., Pedreiro, L. N., & Cavalcanti, O. A. (2010). Phosphated crosslinked pectin as a potential excipient for specific drug delivery: preparation and physicochemical characterization. *Polymer International*, 59(1), 127-135.

Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *Silpakorn University International Journal*, 3(1-2), 206-228.

Srinivasu BY, Mitra G, Muralidharan M, Srivastava D, Pinto J, Thankachan P, Suresh S, Shet A, Rao S, Ravikumar G, Thomas TS, Kurpad AV, & Mandal AK. (2015). Beneficiary effect of nanosizing ferric pyrophosphate as food fortificant in iron deficiency anemia: evaluation of bioavailability, toxicity and plasma biomarker. *RSC Adv.*, 5, 61678- 61687.

Srivastava, P., & Malviya, R. (2011). Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry– An overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(1), 10-18.

Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food microbiology*, 35(2), 92-98.

Steele, T. M., Frazer, D. M., & Anderson, G. J. (2005). Systemic regulation of intestinal iron absorption. *IUBMB life*, 57(7), 499-503.

Tanis-Kanbur, M. B., Peinador, R. I., Calvo, J. I., Hernández, A., & Chew, J. W. (2020). Porosimetric membrane characterization techniques: A review. *Journal of Membrane Science*, 118750.

- Tavera-Quiroz, M. J., Romano, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zavaglia, A., & Bertola, N.** (2015). Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*, 16, 164-173.
- Thomas, L. V.** (2016). Probiotics—the journey continues. *International Journal of Dairy Technology*, 69(4), 469-480.
- Thomas, S., Thomas, R., Zachariah, A. K., & Kumar, R.** (Eds.). (2017). Thermal and rheological measurement techniques for nanomaterials characterization (Vol. 3). Elsevier.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K.** (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225-241.
- Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, & Schiestl RH.** 2009. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability *In vivo* in Mice. *Cancer Res.*, 69, 8784-8789.
- Tymczyszyn, E. E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gómez-Zavaglia, A., & Schebor, C.** (2012). Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 217-221.
- Vandamme, T. F., Lenourry, A., Charrueau, C., & Chaumeil, J. C.** (2002). The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate polymers*, 48(3), 219-231.
- Van Der Zande M, Vandebriel RJ, Groot MJ, Kramer E, Rivera ZEH, Rasmussen K, Ossenkoppele JS, Tromp P, Gremmer ER, Peters RJB, Hendriksen PJ, Marvin HJP, Hoogenboom R, Peijnenburg A, & Bouwmeester H.** 2014. Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica. *Part. Fibre Toxicol.*, 11, 8.

- Veiga, A. L.** (2008). Avances en espectroscopía Mössbauer: nuevas estrategias para experimentos de velocidad programable (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata)
- Vemmer, M., & Patel, A. V.** (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3), 380-389.
- Vilcanqui-Pérez, F.** (2017). 10. Fibra dietaria: nuevas definiciones, propiedades funcionales y beneficios para la salud. Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 67(2).
- Villanueva, M. E., Cuestas, M. L., Pérez, C. J., Dall, V. C., & Copello, G. J.** (2019). Smart release of antimicrobial ZnO nanoplates from a pH-responsive keratin hydrogel. *Journal of colloid and interface science*, 536, 372-380.
- Vlasova, A. N., Kandasamy, S., Chattha, K. S., Rajashekara, G., & Saif, L. J.** (2016). Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary immunology and immunopathology*, 172, 72-84.
- Von Moos, L. M., Schneider, M., Hilty, F. M., Hilbe, M., Arnold, M., Ziegler, N., ... & Naegeli, H.** (2017). Iron phosphate nanoparticles for food fortification: Biological effects in rats and human cell lines. *Nanotoxicology*, 11(4), 496-506.
- Waldherr, F. W., Doll, V. M., Meißner, D., & Vogel, R. F.** (2010). Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiology*, 27(5), 672-678.
- Walter, T., De Andraca, I., Chadud, P., & Perales, C. G.** (1989). Iron deficiency anemia: adverse effects on infant psychomotor development. *Pediatrics*, 84(1), 7-17.
- Würth, R., Hörmannsperger, G., Wilke, J., Foerst, P., Haller, D., & Kulozik, U.** (2015). Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in

simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. *Journal of functional foods*, 15, 116-125.

Xavier, C. S., Paskocimas, C. A., Motta, F. V. D., Araújo, V. D., Aragón, M. J., Tirado, J. L., ... & Delmonte, M. R. B. (2014). Microwave-assisted hydrothermal synthesis of magnetite nanoparticles with potential use as anode in lithium ion batteries. *Materials Research*, 17(4), 1065-1070.

Xu, X., Lu, Y., Zhang, D., Wang, Y., Zhou, X., Xu, H., & Mei, Y. (2015). Toxic assessment of triclosan and triclocarban on *Artemia salina*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 95(6), 728-733.

Yépez, A., Russo, P., Spano, G., Khomenko, I., Biasioli, F., Capozzi, V., & Aznar, R. (2019). In situ riboflavin fortification of different kefir-like cereal-based beverages using selected Andean LAB strains. *Food microbiology*, 77, 61-68.

Yeung, C. K., Glahn, R. P., & Miller, D. D. (2005). Inhibition of iron uptake from iron salts and chelates by divalent metal cations in intestinal epithelial cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(1), 132-136.

Yeung, C. K., Glahn, R. E., Welch, R. M., & Miller, D. D. (2005). Prebiotics and iron bioavailability—is there a connection? *Journal of food science*, 70(5), R88-R92.

Yockteng, J. (2017). Biología de la *Artemia* sp. <https://www.bioartemia.com/2017/03/03/biologia-de-la-artemia-sp/>

Yun JW, Kim SH, You JR, Kim WH, Jang JJ, Min SK, Kim HC, Chung DH, Jeong J, Kang BC, & Che JH. 2015. Comparative toxicity of silicon dioxide, silver and iron oxide nanoparticles after repeated oral administration to rats. *J. Appl. Toxicol.*, 35, 681-693.

Zevin, L. S., Kimmel, G., & Mureinik, I. (1995). Methodology of quantitative phase analysis. In *Quantitative X-Ray Diffractometry* (pp. 100-225). Springer, New York, NY.

- Zhang, S., Hu, H., Wang, L., Liu, F., & Pan, S.** (2018). Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food chemistry*, 244, 232-237.
- Zhang, Y. Y., Stockmann, R., Ng, K., & Ajlouni, S.** (2020). Revisiting phytate-element interactions: implications for iron, zinc and calcium bioavailability, with emphasis on legumes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-17.
- Zhao, G., & Zhang, G.** (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 333-338.
- Zheng, H., Gao, M., Ren, Y., Lou, R., Xie, H., Yu, W., ... & Ma, X.** (2017). An improved pH-responsive carrier based on EDTA-Ca-alginate for oral delivery of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *Carbohydrate polymers*, 155, 329-335.
- Zheng, L., & Sun, D. W.** (2006). Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 17(1), 16-23.
- Zimmermann, M. B., & Hurrell, R. F.** (2007). Nutritional iron deficiency. *The lancet*, 370(9586), 511-520.
- Zohuriaan, M. J., & Shokrolahi, F.** (2004). Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*, 23(5), 575-579.
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E.** (2010). Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 3-29). Springer, New York, NY.