



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MATRICES
COMESTIBLES CARGADAS CON HIERRO COMO UNA
POTENCIAL ALTERNATIVA DE SUPLEMENTACIÓN ORAL PARA
CERDOS**

Emerson Patricio Durán Durán

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: Carolina Paz Valenzuela Venegas
Universidad de Chile

Financiamiento: Fondecyt 11140249

SANTIAGO, CHILE
2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MATRICES
COMESTIBLES CARGADAS CON HIERRO COMO UNA
POTENCIAL ALTERNATIVA DE SUPLEMENTACIÓN ORAL PARA
CERDOS**

Emerson Patricio Durán Durán

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: Carolina Paz Valenzuela Venegas
Universidad de Chile

Financiamiento: Fondecyt 11140249

| | | |
|--------------------|-------|-------|
| Nota Final | | |
| Prof. Guía | | |
| Profesor Corrector | | |
| Profesor Corrector | | |

AGRADECIMIENTOS

Le dedico todo esto a mi abuelita Juana Riquelme, quien es un pilar fundamental en mi vida y de quien siempre estaré muy agradecido por el apoyo, compañía, confianza y amistad que supo entregarme por tantos años, esté donde esté, sé que está orgullosa.

Agradezco a la gente que de una u otra forma me ha apoyado a lo largo de la carrera: a mi madre, tíos, amigos y tantas otras personas que jamás imaginé serían tan importantes en mi formación no sólo como profesional, sino también como persona.

Agradezco a mi mentora la Dra. Carolina Valenzuela, por guiarme en este camino y mostrarme todas las posibilidades que este tiene para mi futuro profesional, respondiendo siempre con mucho entusiasmo, confianza y dedicación ante mis ganas de explorar más allá de los límites de mi memoria de título, viviendo a raíz de esto grandes experiencias que me han hecho disfrutar y aprender al máximo de todo este proceso.

A todas estas y más personas, gracias.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue elaborar y caracterizar matrices comestibles cargadas con hierro (Fe) hemo y no hemo encapsulado. Se elaboraron matrices de alginato de sodio y diferentes concentraciones de suero de leche (SL) (30%, 40%, 50% y 60% p/v), que fueron sometidas a diferentes tiempos de refrigeración y secado. Se seleccionó una matriz óptima control (MC). En la MC se vehiculizaron distintas concentraciones de Fe hemo (M1) y mezclas de Fe hemo/no hemo (M2) por gelificación iónica. Las matrices se caracterizaron por aspecto, análisis químico proximal, contenido de Fe, color, morfología, propiedades mecánicas, hinchamiento y Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR). La MC seleccionada tuvo una concentración de 40% p/v de SL, M1 con 0,9% p/v de Fe hemo y M2 con 0,9% p/v de Fe hemo/0,5% p/v de no hemo. Los tiempos de refrigeración y secado fueron 48 h. Todas las matrices fueron redondas con dimensiones promedio de 3,5 cm de diámetro, 1,3 cm de alto y peso de 8,1-8,7 g. El contenido de Fe fue mayor para M2 (2,76 mg/g) ($p < 0,05$). La morfología mostró superficies heterogéneas similares para las tres matrices. El hinchamiento reveló que MC y M1 aumentan de peso en medio gastrointestinal, mientras que M2 aumenta de peso en medio gástrico y disminuye en medio intestinal. El FTIR mostró la formación de un nuevo material con predominio de enlaces O-H y C-O. Para continuar con estudios de suplementación *in vivo* se seleccionaría M2 por contener más Fe y tener mejor comportamiento en incubación gastrointestinal.

Palabras clave: Encapsulación, eritrocitos, matrices, suero de leche, sulfato ferroso.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and to characterize edible matrices loaded with encapsulated heme and non heme iron (Fe). Sodium alginate matrices were elaborated with different concentrations of milk whey (30%, 40%, 50% y 60% w/v), these matrices were subjected to different cooling and drying times. An optimal matrix (control, MC) was selected. Into the MC were included different concentrations of heme Fe (M1) and mixture of heme/non-heme Fe (M2) encapsulated by ionic gelation. The matrices were characterized by appearance, proximal chemical analysis, Fe content, color, morphology, mechanical properties, swelling and FTIR. Results: the MC selected had a milk whey concentration of 40% w/v, M1 with 0.9% w/v heme Fe and M2 with 0.9% w/v heme Fe/0.5% w/v non heme Fe. The cooling and drying time were 48 h. All matrices were rounded with average dimensions of 3.5 cm in diameter and 1.3 cm in height, and weight 8.1-8.7 g. The Fe content was higher for M2 (2.76 mg/g) ($p < 0.05$). The morphology showed similar rough and heterogeneous surfaces for the three matrices. The swelling showed that MC and M1 gain weight in the gastric and intestinal medium, while than M2 gain weight in the gastric medium, but decrease at intestinal condition. The FTIR showed that a new material was developed, with a predominance of O-H and C-O bonds. To continue with *in vivo* supplementation studies, M2 could be selected for its higher Fe content and has a better behavior in gastrointestinal incubation.

Key words: Encapsulation, erythrocytes, ferrous sulfate, matrices, milk whey.

INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) se puede encontrar en dos formas en los alimentos: como Fe no hemo en alimentos de origen vegetal y lácteos, y como Fe hemo en carnes, vísceras y otros alimentos de origen animal que contengan hemoglobina y/o mioglobina (Hooda *et al.*, 2014). En el cerdo ambos tipos de Fe se absorben por vías diferentes en el enterocito y el Fe hemo es más biodisponible (Quintero-Gutiérrez *et al.*, 2008; Lipiński *et al.*, 2013).

En producción porcina es común que los cerdos lactantes presenten anemia por deficiencia de Fe, lo que tiene como principal consecuencia un bajo peso al destete (Mahan, 2006; Lipiński *et al.*, 2010; Underwood y Suttle, 1999). El tratamiento preventivo habitual es la administración de Fe parenteral, sin embargo, estudios recientes indican que estados de depleción, deficiencia y anemia se detectan al destete. Por tanto, este tipo de suplementación no es suficiente para mantener un estado de nutrición de Fe óptimo (Perri *et al.*, 2016; Antileo *et al.*, 2016). Como otra forma de suplementar Fe se han estudiado diversos métodos orales, los cuales no han tenido buenos resultados debido a la baja biodisponibilidad del Fe no hemo (que es la forma más usada en gran parte de los estudios), mala palatabilidad del Fe, necesidad de usar múltiples dosis, baja absorción de Fe durante la primera semana de vida, entre otras (Zimmerman *et al.*, 1959; Loh *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 2010; Lipiński *et al.*, 2010; Ishaya y Ishaya, 2012).

Las desventajas mencionadas sobre la suplementación oral de Fe se pueden reducir mediante su encapsulación. La encapsulación es una técnica emergente en nutrición animal, que ha demostrado mediante estudios en ratas y humanos proteger el Fe, aumentar su biodisponibilidad, mejorar su palatabilidad, permitir la liberación del Fe en su sitio de absorción, proporcionarle un medio de vehiculización y permitir mezclar diferentes formas de Fe (hemo/no hemo), aprovechando así la alta biodisponibilidad del Fe hemo y su capacidad de potenciar la absorción del no hemo (Lysionek *et al.*, 2002; Tondeur *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). Según nuestro conocimiento, el único trabajo que haya usado la encapsulación para mejorar la suplementación oral de Fe en cerdos, fue realizado por Antileo *et al.* (2016), en donde a los

cerdos se les entregó un suplemento de Fe en forma de micropartículas, elaboradas por atomización con maltodextrina como material encapsulante; y aunque tres dosis durante la lactancia tuvieron una respuesta similar a la suplementación parenteral, los cerdos mostraron conductas de rechazo al suplemento (Valenzuela *et al.*, 2016a), y el hecho de tomar a los cerdos para entregar uno a uno el suplemento fue considerado un exceso de manejo por los productores. Así, una opción factible de complemento a la suplementación parenteral podría ser el desarrollo de un suplemento oral en formato de un elemento de enriquecimiento ambiental comestible tipo matriz, en donde el Fe se encuentre encapsulado y presente un sabor agradable para los cerdos.

El concepto de matriz se refiere a estructuras poliméricas de variadas formas, tamaños y texturas (gel, sol-gel, sólida, etc.), elaboradas con materiales comestibles (proteínas, polisacáridos, lípidos y sus mezclas), y usadas en diferentes ámbitos como el alimentario y farmacéutico (Yang *et al.*, 2011). También tienen la capacidad de vehiculizar una amplia gama de moléculas como fármacos o nutrientes (Matricardi *et al.*, 2006; Rosas-García y De Luna-Santillana, 2010). Uno de los materiales adecuados para formular estas matrices es el alginato de sodio, un polisacárido biodegradable e inocuo obtenido desde las algas pardas (Yang *et al.*, 2011). El alginato ha sido ampliamente usado en encapsulación de Fe, principalmente por el método de gelificación iónica, ya que tiene una alta eficiencia de encapsulación, encapsula formas de Fe no hemo y hemo (Valenzuela *et al.*, 2014; Churio *et al.*, 2018), y tiene la capacidad de liberarlo a nivel de duodeno (Valenzuela *et al.*, 2016b). Otro ingrediente interesante para la elaboración de estas matrices es el suero de leche, que aporta proteínas que podrían mejorar la formación estructural de las matrices (Leon *et al.*, 2016), también aporta nutrientes al cerdo (De Wit, 1998) y podría aumentar el consumo de las matrices, ya que es un material con componentes aromáticos similares a la leche, pudiendo generar una buena aceptabilidad de las matrices por continuidad sensorial en los cerdos (Zijlstra *et al.*, 1996). Actualmente no hay estudios en donde se hayan desarrollado y caracterizado este tipo de matrices para vehiculizar Fe. Así, el objetivo de este estudio fue elaborar y caracterizar matrices comestibles cargadas con Fe hemo y no hemo encapsulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la elaboración de las matrices se utilizó alginato de sodio (Sigma-Aldrich, USA) y suero de leche (Prinal S.A, Chile). Como fuente de Fe hemo se usaron eritrocitos bovinos atomizados (EBA) (Lican Cells Ltda, Chile), y como fuente de Fe no hemo se utilizó sulfato ferroso heptahidratado (Merk S.A). Otros reactivos fueron de grado analítico adquiridos en Merk S.A o Sigma-Aldrich.

Elaboración de matrices comestibles sin Fe

Se preparó una solución de alginato de sodio al 2% p/v en agua destilada, a la cual se le agregaron las siguientes concentraciones de suero de leche: 30%, 40%, 50%, y 60% p/v. Estas mezclas fueron homogenizadas con agitador mecánico. Posteriormente 20 mL de cada mezcla fue distribuida en moldes de silicona de forma redonda con diámetro de 3,5 cm y profundidad de 2 cm, y se refrigeraron a 4°C, un tiempo necesario para que se solidifiquen y presenten consistencia de gel, estudiándose este proceso a las 24, 48 y 72 h post-refrigeración. Luego se desmoldaron y fueron sumergidas en una solución reticulante (CaCl₂ al 5% p/v en agua destilada) por 30 min (en este paso se produce la gelificación iónica que es el método de encapsulación usado). Las matrices desmoldables y manipulables fueron seleccionadas para su secado, en estufa a 50°C, éste proceso se realizó a dos tiempos: 24 y 48 h.

Selección de una matriz óptima

Se realizó una selección basada en un análisis cualitativo. Para seleccionar una matriz óptima se siguió la metodología planteada por Ozdemir y Floros (2008), quienes plantearon la utilización de una escala ordinal para asignar puntajes a criterios subjetivos como la pegajosidad y apariencia en la selección de películas de suero de leche con distintas concentraciones de conservantes. En este estudio se elaboró una escala con puntajes del 1 al 3, para evaluar los siguientes criterios de selección post-refrigeración: 1) características de

superficie, 2) desmoldado, 3) consistencia y 4) capacidad de deformación, los criterios de selección post-secado fueron: 1) características de superficie, 2) presencia de fisuras y 3) consistencia. Se seleccionó un tipo de matriz como la óptima. La matriz resultante de este proceso se llamó matriz control (MC). En la Tabla 1 se presenta una categorización de los parámetros a medir post-refrigeración y post-secado que orientaron a la selección de una matriz óptima. Se le asignó un valor a cada uno de los criterios mencionados anteriormente, que van del 1 al 3. En donde 1 = características deseables (óptimo) y 3 = características no deseables. La matriz óptima fue la que reunió la mayor cantidad de calificaciones 1, y en casos donde más de una matriz tuvo evaluaciones iguales, se seleccionó la óptima según la que incorporó la menor concentración de suero de leche en su formulación y que se formó con los menores tiempos de refrigeración y secado.

Tabla 1. Categorización de los criterios para la selección de una matriz óptima.

| Criterios | Categorías post-refrigeración | | |
|------------------|--|---|--|
| | 1 | 2 | 3 |
| Superficie | Lisa. | Medianamente irregular. | Muy irregular. |
| Desmoldado | Fácil desmoldado, a veces necesitando que se le despeguen los bordes del molde, no quedan partes de la matriz en el molde. | Fácil desmoldado, pero la cara abaxial o parte de ella queda adherida al molde. | Muy difícil de desmoldar. |
| Consistencia | Tipo gel, la matriz soporta la manipulación y al presionarla levemente vuelve a su forma original. | Friable, la matriz soporta una manipulación delicada, sin embargo, al presionarla se desintegra. | Líquida, la matriz no gelifica. |
| Deformación | Baja, la matriz se mantiene con la forma del molde y puede ser manipulada sin adherirse en las superficies. | Media, la mezcla se puede desmoldar, pero algunas zonas quedan adheridas en las superficies, pudiendo haber desintegración. | Alta, la mezcla se deforma al sacarla del molde. |

| Categorías post-secado | | | |
|-------------------------------|---|---|--|
| Superficie | Lisa y sin presencia de grietas en la superficie. | Medianamente irregular, observándose una grieta de menor tamaño (< 1 mm). | Irregular, se observan varias grietas de variados tamaños. |
| Fisuras | No presenta fisuras o presenta unas muy pequeñas. | Presenta fisuras que recorren parte de una de sus caras, pero no comprometen la estabilidad de la matriz. | Presenta una o más fisuras, que recorren gran parte del cuerpo de la matriz, partiéndola en dos o comprometiendo su estabilidad o forma. |
| Consistencia | La matriz es dura y firme. | La matriz es quebradiza. | La matriz es blanda y puede romperse fácilmente a la manipulación. |

Elaboración de matrices cargadas con Fe

Una vez obtenida la mezcla óptima control (MC) se repitió el proceso de su elaboración, pero esta vez a la solución formadora de esa matriz se le agregaron diferentes concentraciones de Fe hemo (0,5%; 0,6%; 0,7%; 0,8%; 0,9% y 1% p/v). Luego se estableció una concentración de Fe hemo óptima, en base a los mismos criterios de la Tabla 1. A esta matriz se le denominó M1 (matriz hemo).

A la solución formadora de la matriz M1 se le agregó Fe no hemo en diferentes concentraciones (0,5%; 0,6%; 0,7%; 0,8%; 0,9% y 1% p/v). Así, en base a los criterios descritos anteriormente se seleccionó un tipo de matriz cargada con Fe hemo/no hemo denominada M2 (matriz mezcla). Se seleccionó la matriz que contuvo la mayor cantidad de Fe no hemo y hemo, y que presentó las mejores propiedades según los criterios descritos en la Tabla 1.

Caracterización de matrices comestibles cargadas con Fe

Las matrices MC, M1 y M2 fueron caracterizadas por los siguientes análisis en triplicado:

Apariencia, dimensiones y peso

La apariencia de las matrices se capturó por fotografía digital (Sony DSC-HX1, Sony Corporation, Japan). Se midió el tamaño de las matrices, determinándoles el largo, ancho y alto con una regla milimétrica y el peso con una balanza analítica.

Contenido total de Fe

Se determinó el contenido de cenizas totales (A.O.A.C., 1996) y luego se determinó el contenido de Fe total por espectrometría de absorción atómica (GBC, 905AA, Australia), siguiendo las indicaciones del método de digestión ácida 999.11 (AOAC, 1996). Las mediciones espectrofotométricas se realizaron con una curva patrón trazada a una longitud de onda de 248,3 nm con una solución estándar de hierro comercial de 1.000 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (J.T. Baker, EE. UU.).

Análisis químico proximal

Se realizó un análisis químico proximal (A.O.A.C., 1996), determinándose humedad, proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda y ceniza, y por diferencia se calculó el contenido de extracto no nitrogenado.

Color

Fue medido con un colorímetro (Konica- Minolta CR- 300, Japón), utilizando la escala de color de Hunter Lab.

Propiedades mecánicas

Se determinó la resistencia a la presión y deformación de las matrices usando el ensayo de tracción con un durómetro TSS digital (OC- SPA, Inglaterra), equipado con una sonda de metal de 1 mm de diámetro, que fue incrustada en la matriz a una velocidad de 1,5 mm/s, Los resultados se expresaron como la fuerza máxima de penetración y la deformación en mm.

Morfología

A pequeños trozos de las matrices se les realizó microscopía electrónica de barrido. Para esto se realizaron cortes transversales al medio de las matrices húmedas para tomar muestras para observar la morfología. Luego las muestras fueron deshidratadas a través de su paso por una serie de acetonas a distintas concentraciones y fueron secadas a punto crítico. Luego se montaron sobre una superficie de aluminio cilíndrico, sobre el que se fijaron las muestras usando cinta de doble cara. A continuación, las muestras se recubrieron con oro por pulverización catódica dos veces a 20 kV en una atmósfera de argón (PELCO 91000). La microscopía electrónica de barrido se realizó en un LEO 1420 VP (Cambridge, RU), utilizando un voltaje de aceleración de 25 kV.

Comportamiento de las matrices sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro*

Las matrices fueron sometidas por separado a dos procesos distintos de incubación gastrointestinal, uno de simulación gástrica y consecutivamente otro intestinal. En el primero, cinco matrices en duplicado fueron inmersas por una hora en incubación en

condición gástrica. La condición gástrica consistió en una dispersión de 2 g/L de NaCl, 10 g/L de pepsina en agua destilada, con un pH ajustado a 2,0 con HCl 1 N. Las matrices se incubaron una hora a 37°C con agitación constante a 150 rpm. Posterior a éste tiempo, las mismas matrices fueron sometidas a un proceso de digestión intestinal, en el cual se sumergieron por tres horas en una solución tampón “Phosphate Buffer Saline” (PBS), pH 7,4 a 50°C, a la cual se le agregaron 50 g/L de pancreatina de cerdo (tripsina, amilasa, lipasa, ribonucleasa y proteasa) (Sigma Aldrich®, USA) y 31,2 g/L de ácidos biliares conjugados de cerdo (Sigma Aldrich®, USA).

Se determinó el peso de las matrices antes y después de cada proceso de incubación. El porcentaje de cambio de peso de las matrices se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Cambio de peso \%} = \left(\frac{PF - PI}{PI} \right) \times 100\%$$

Dónde: PF es peso final y PI es peso inicial.

Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)

Los análisis FTIR se realizaron al suero de leche, alginato de sodio, eritrocitos bovinos atomizados (Fe hemo), sulfato ferroso heptahidratado (Fe no hemo) y en las diferentes matrices (MC, M1 y M2), con un espectrómetro (ATR/FTIR interspec 200-X, Estonia). Las mediciones espectroscópicas en muestras de matrices se realizaron directamente utilizando el accesorio PIKE Miracle TM en una placa de cristal de reflexión simple. Un promedio de 10 exploraciones sobre el rango espectral de 600 a 4000 cm⁻¹ se realizaron por muestra.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se encontraron distribuidos de forma normal (Shapiro-Wilk, p>0,05). Se aplicó una prueba de ANOVA y de Tukey (p<0,05) para determinar diferencias significativas. Los estadígrafos utilizados fueron promedio ± desviación estándar. Las pruebas se procesaron con el programa Statistix 8 (Analytical Software 2003, Tallahassee, FL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de matrices óptimas

Para la mezcla MC se seleccionó como matriz óptima la que contuvo 40% de suero de leche y que tuvo 48 h de refrigeración y de secado, ya que esta fue la que obtuvo los mejores puntajes según los criterios de selección de la Tabla 1. Así, en la Tabla 2 se presentan los puntajes asignados a las MC para los diferentes criterios post-refrigeración y post-secado.

Para la mezcla M1 y M2 se seleccionaron las matrices con 0,9% de Fe hemo, y 0,5% p/v de Fe no hemo, respectivamente, cuyos puntajes asignados se muestran en la Tabla 2. Para ambas matrices los tiempos de refrigeración y secado también fueron de 48 h. Estas matrices fueron las que tuvieron la mejor puntuación según los criterios descritos en la Tabla 1 (datos no mostrados). De los procedimientos realizados para llegar a obtener estas matrices óptimas se desprenden diferentes observaciones con respecto a las ventajas y desventajas de la mayor inclusión de los ingredientes y los tiempos de refrigeración y secado, los cuales se presentan en la Tabla 3.

Tabla 2. Puntajes asignados a las matrices MC, M1 y M2 en el proceso de elaboración según su concentración de suero de leche (SL, % p/v), tiempo de refrigeración (TR, horas), tiempo de secado (TS, en horas), concentración de Fe hemo (FH) y Fe no hemo (FNH).

| Tipos de matrices | Post-refrigeración ¹ | | | | Post-secado ² | | |
|--|---------------------------------|---|---|----|--------------------------|---|---|
| | S | D | C | Df | S | F | C |
| SL (30), TR (24), TS (24) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (40), TR (24), TS (24) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (50), TR (24), TS (24) | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| SL (60), TR (24), TS (24) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| SL (30), TR (48), TS (24) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (40), TR (48), TS (24) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (50), TR (48), TS (24) | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| SL (60), TR (48), TS (24) | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| SL (30), TR (72), TS (24) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| SL (40), TR (72), TS (24) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (50), TR (72), TS (24) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| SL (60), TR (72), TS (24) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| SL (30), TR (24), TS (48) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| SL (40), TR (24), TS (48) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (50), TR (24), TS (48) | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| SL (60), TR (24), TS (48) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| SL (30), TR (48), TS (48) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| SL (40), TR (48), TS (48) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| SL (50), TR (48), TS (48) | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| SL (60), TR (48), TS (48) | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| SL (30), TR (72), TS (48) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 |
| SL (40), TR (72), TS (48) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (50), TR (72), TS (48) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| SL (60), TR (72), TS (48) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,5%) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,6%) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,7%) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,8%) | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,9%) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (1%) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,5%), FNH (0,5%) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,5%), FNH (0,6%) | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,5%), FNH (0,7%) | 3 | 3 | 2 | 2 | - | - | - |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,5%), FNH (0,8%) | 3 | 3 | 2 | 2 | - | - | - |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,5%), FNH (0,9%) | 3 | 3 | 2 | 2 | - | - | - |
| SL (40), TR (48), TS (48), FH (0,5%), FNH (1%) | 3 | 3 | 2 | 2 | - | - | - |

¹Criterios de evaluación de refrigeración: S: superficie, D: desmoldado, C: consistencia, Df: deformación, ²Criterios de evaluación de secado: S: superficie, C: consistencia, F: fisuras.

1 = características deseables (óptimo), 3 = características no deseables.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de la inclusión de distintas concentraciones de ingredientes en la formulación de matrices y de los diferentes tiempos de refrigeración y secado.

| | | |
|-------------------------|--------------------|--|
| % Suero de leche | Ventajas | A mayor concentración hay menor formación de fisuras y las matrices fueron más firmes. |
| | Desventajas | A mayor concentración hay una mayor dificultad para mezclar, la mezcla se hace más grumosa y viscosa, hay mayor dificultad de desmolde y necesita un mayor tiempo de refrigeración y secado. |
| % Fe hemo | Ventajas | A mayor concentración hay un secado más rápido, hay menor formación de fisuras, estas son más localizadas y la matriz es más firme. |
| | Desventajas | A concentraciones mayores de 0,9% la homogenización se dificulta, hasta el punto de no poder mezclar las formulaciones. |
| % Fe no hemo | Ventajas | A mayor concentración, se requiere un menor tiempo de secado. |
| | Desventajas | A concentraciones mayores de 0,5% la homogenización se dificulta, hasta el punto de no poder mezclar las formulaciones. |
| Refrigeración | Ventajas | A mayor tiempo de refrigeración existe mayor firmeza de la matriz, menor desprendimiento, desmolde más fácil y se reduce el tiempo de secado. |
| | Desventajas | A mayor tiempo de refrigeración existe mayor formación de fisuras y las matrices son más quebradizas. |
| Secado | Ventajas | A mayor tiempo de secado hay mayor firmeza de las matrices. |
| | Desventajas | A mayor tiempo de secado las matrices se hacen más quebradizas y presentan más fisuras. |

De la Tabla 3 se desprende que: 1) la mayor inclusión de ingredientes hizo que las mezclas fueran más viscosas y, por lo tanto, presentaran mayor dificultad de homogenización. Entre todos los ingredientes, la inclusión de Fe hemo implicó el aumento más importante de viscosidad, esto debido a su alto contenido de proteínas (Valenzuela *et al.*, 2014), siendo una fracción muy importante la hemoglobina, que tiene propiedades gelificantes (Salvador *et al.*, 2009). La concentración de suero de leche usada en la mezcla hace que esta varíe no sólo sus propiedades químicas y contenido nutricional, sino que también la viscosidad de la mezcla, ocurriendo el mismo efecto que con el Fe hemo (Nicound *et al.*, 2015; Bos y Vliet, 2001). 2) El tiempo de refrigeración y secado están correlacionados con una mayor deshidratación de la matriz, así un mayor tiempo de refrigeración y secado tienen consecuencias como mayor cantidad y grosor de fisuras en la superficie de las matrices, haciéndolas más quebradizas. A mayor tiempo de secado las matrices se deshidrataron más, así las matrices fueron más firmes, hasta un límite en el cual se volvían quebradizas, por lo que debe existir un equilibrio para que haya un buen desmolde y a la vez se generen la menor cantidad de fisuras posibles, ya que estas comprometen la estabilidad de las matrices.

Es difícil comparar algunos de los resultados descritos en este estudio, ya que en la literatura no hay reportes de matrices formuladas con alginato de sodio y suero de leche que vehiculicen Fe. Se encontró información de micro-matrices elaboradas en base a alginato de sodio denominadas “beads” o perlas, que también fueron sometidas a procesos de reticulación con CaCl_2 y fueron usadas para vehiculizar ambas formas de Fe (hemo y no hemo) (Huguet *et al.*, 1994; Perez-Moral *et al.*, 2013; Benerjee *et al.*, 2007; Valenzuela *et al.*, 2014, 2016b; Churio *et al.*, 2018). En el trabajo de Valenzuela *et al.* (2014), se logró vehiculizar mayores concentraciones de Fe hemo (en forma de eritrocitos completos) alcanzando el 30% p/v. Sin embargo, en el presente trabajo esto no fue posible porque en la formulación de las matrices, además del alginato, también se adicionaba suero de leche, que le aportó una alta viscosidad a las dispersiones formadoras de matrices.

En relación a las concentraciones usadas de Fe no hemo en este trabajo, éstas fueron más cercanas a las reportadas por estudios como Churio *et al.* (2018), donde se alcanzaron

concentraciones de 1-3% p/v. Estos autores describieron dificultades para la encapsulación de algunas sales inorgánicas de Fe no hemo, debido a que al usarlas en altas concentraciones se transformaron en una pasta viscosa. Perez-Moral *et al.* (2013), quienes también describieron dificultades para encapsular sales de hierro inorgánicas con alginato de sodio por gelificación iónica, propusieron que los iones de Fe^{2+} y Ca^{2+} compiten por los puntos de unión dentro de las perlas de alginato. Otra posible explicación en el caso de la encapsulación del sulfato ferroso, es que este posee la misma carga negativa que los residuos de ácido gulurónico del alginato, dificultando su encapsulación por gelificación iónica (Banerjee *et al.*, 2007).

Caracterización

Aspecto, tamaño y peso

El aspecto físico de las matrices después de los procesos de refrigerado y secado se presenta en la Figura 1. La MC mostró un color amarillo claro, por estar compuesta por suero de leche (insumo de color similar), mostró superficies lisas por ambos lados y sin fisuras. M1 y M2 fueron similares en cuanto a apariencia, ambas de color marrón debido a la inclusión de Fe hemo como eritrocitos, los cuales tienen una pigmentación marrón, típica del grupo hemo (Wismer-Pedersen, 1988; Huguet *et al.*, 1994).

Las matrices fueron redondas debido al molde utilizado. Las tres matrices resultaron moldearse adecuadamente, sin presentar desprendimientos al momento del desmolde.



Figura 1. Aspecto de la matriz control (MC), matriz hemo (M1) y matriz mezcla (M2).

Las dimensiones y el peso de las matrices se presentan en la Tabla 4. Ambas variables no mostraron diferencias entre los tres tipos de matrices. El tamaño y peso de las matrices depende del molde que se use y el volumen de la mezcla. El molde a utilizar puede estar pensado en función de la dosis de Fe que se quiera entregar, las preferencias del animal o la forma de suministro.

Tabla 4. Dimensiones de tamaño y peso para las matrices MC, M1 y M2. Los valores indican promedio \pm desviación estándar.

| | MC | M1 | M2 |
|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Diametro (cm) | 3,48 \pm 0,9 | 3,74 \pm 0,3 | 3,83 \pm 0,2 |
| Alto (cm) | 1,16 \pm 0,2 | 1,35 \pm 0,2 | 1,34 \pm 0,1 |
| Peso (g) | 8,68 \pm 0,9 | 8,07 \pm 0,6 | 8,34 \pm 0,6 |

Letras distintas en superíndices indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

El alginato es un polisacárido lineal que contiene cantidades variables de ácido β -D-manurónico (grupos M) y ácido α -L-gulurónico (grupos G), teniendo una composición, relación y secuencia que dependerán de la fuente de la cual provenga, y que determinan las propiedades físicas y químicas del polímero (Batchelor *et al.*, 2002; Lupo *et al.*, 2012). La formación de las matrices tiene relación con la propiedad del alginato de formar estructuras tipo gel moldeables a diversos tamaños y formas (Lupo *et al.*, 2012). Esta propiedad depende de la proporción de los grupos G y M del alginato. Así, si el alginato presenta una mayor cantidad de bloques G, formará un gel de alta fuerza y porosidad, y al presentar una mayor cantidad de bloques M forma un gel de fuerza media, pero con alta resistencia a la sinéresis y poros más pequeños (Hernández *et al.*, 2005).

Morfología

La Figura 2 muestra las imágenes obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido de las matrices MC, M1 y M2. Estos análisis revelan que las matrices tienen una superficie rugosa y heterogénea, lo que difiere de otros trabajos que utilizan sólo alginato para formar micro-matrices, donde la superficie se observa mayormente lisa y homogénea (Benerjee *et al.*, 2007; Valenzuela *et al.*, 2014). En otros trabajos en donde se han elaborado micro-

matrices en base a alginato y proteínas de suero de leche también se han descrito superficies mayormente lisas (Rajam *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013; Zandi *et al.*, 2014).

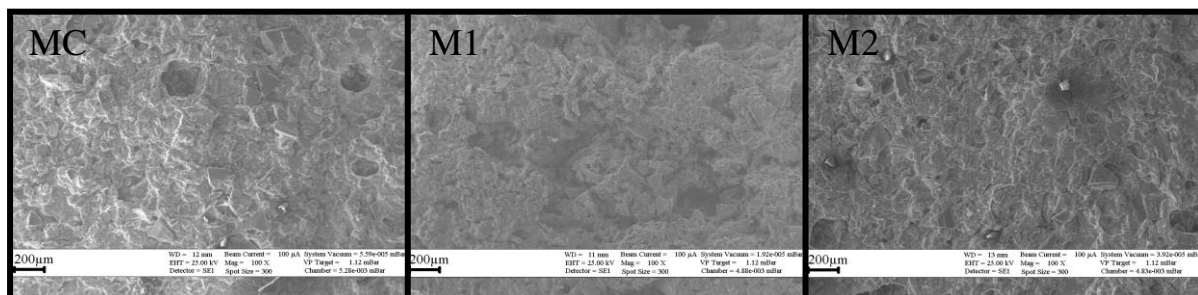


Figura 2. Imágenes obtenidas con microscopía electrónica de barrido de cortes transversales de las matrices.

La superficie rugosa y heterogénea de las tres matrices se puede deber principalmente a dos factores: 1) en este estudio no se utilizaron proteínas de suero de leche, sino que suero de leche completo, que incluye variados nutrientes, y según lo que describe Fundueanu *et al.* (1999), un aumento de ingredientes, conlleva a un aumento en la formación de irregularidades en el material resultante. 2) La inclusión de fuentes de Fe a la mezcla aporta a la formación de rugosidades y a que las superficies de las micro-matrices sean heterogéneas (Valenzuela *et al.*, 2014; Kulkarni *et al.*, 2008). Liu *et al.* (2012), describe que la apariencia final de una matriz dependerá de la proporción de sus materiales, siendo más lisas las elaboradas sólo con alginato, volviéndose más rugosas a medida que se le agregan diferentes materiales a encapsular, lo cual podría traducirse en que los materiales encapsulados ocupan los espacios dejados por el material muralla. Se describe también, que las estructuras conformadas sólo con alginato poseen una alta porosidad, la cual genera una mayor difusión de moléculas, y que esta porosidad va disminuyendo a medida que se le van agregando moléculas, disminuyendo con esto también la velocidad de difusión de los compuestos encapsulados (Smidsrød y Skja, 1990).

Contenido total de Fe

En la Figura 3 se presenta el contenido de Fe de las matrices. MC contiene niveles traza de Fe a pesar de no haber sido agregado este mineral en su formulación, debido a que el Fe se encuentra en la mayoría de los ingredientes alimentarios, por encontrarse en alta

concentración en la naturaleza (Whittemore, 1979). El contenido de Fe de M1 fue superior al de MC como era de esperar, por la adición de los eritrocitos atomizados, pero bastante inferior al contenido de Fe de M2, lo cual se explica por el aporte de las diferentes fuentes de Fe usadas, ya que los eritrocitos bovinos atomizados contienen 2,5 mg de Fe/g (Valenzuela *et al.*, 2014), a diferencia de la fuente de Fe no hemo (sulfato ferroso heptahidratado) que contiene aproximadamente 162 mg de Fe/g (Churio *et al.*, 2018), siendo este segundo mucho más concentrado, por ser una sal inorgánica de Fe.

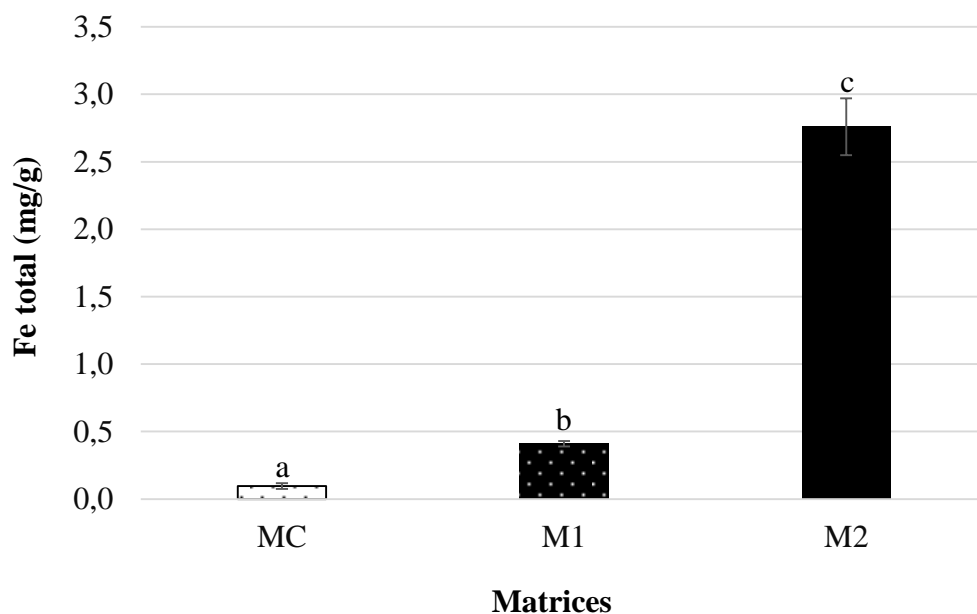


Figura 3. Contenido de Fe total de las distintas matrices. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La cantidad que puede aportar cada fuente de Fe es tan diferente, que hace cuestionarse si es eficiente agregar el Fe hemo en vez de agregar sólo Fe no hemo, que es lo que se ha hecho en muchos estudios anteriores de fortificación de alimentos con Fe y suplementación para humanos y animales (Martinez-Navarrete *et al.*, 2002; Zlatkin *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2003). Sin embargo, el Fe hemo es más biodisponible que el no hemo en cerdos (Quintero-Gutiérrez *et al.*, 2008; Lipiński *et al.*, 2013), además, es capaz de aumentar la biodisponibilidad del Fe no hemo (South *et al.*, 2000) y absorberse por una vía diferente a nivel intestinal (Staroń *et al.*, 2017). El Fe hemo se absorbe mediante un receptor/transportador llamado “proteína transportadora del grupo hemo 1” (HCP1), que

captura al grupo hemo completo desde las hemoproteínas y lo internaliza intacto por endocitosis al interior de los enterocitos (Shayeghi, 2005). En cambio, el Fe no hemo es transportado al interior de los enterocitos por el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) (Lipiński *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2010).

Análisis químico proximal

En la Tabla 5 se presentan los resultados del análisis químico proximal de las matrices. Con respecto a la humedad, no se observan diferencias entre las 3 matrices, teniendo M1 una mayor humedad, lo cual puede deberse a su mayor porcentaje de Fe hemo, que tiene una naturaleza higroscópica, que podría captar agua del ambiente (Labrude *et al.*, 1988). Con respecto a la proteína cruda, M1 tiene los valores más elevados, debido a que el Fe hemo tiene una alta concentración proteica en su composición, cercano al 90%, ya que se trata de eritrocitos completos, en donde la hemoglobina es un componente importante (Wisner-Pedersen, 1988). Con respecto al contenido de cenizas de las matrices, el porcentaje es mayor en M2 que en MC y M1, debido a la cantidad de Fe inorgánico usado en esa matriz. Los resultados obtenidos para el extracto no nitrogenado indican que MC tiene un mayor contenido, el cual se explica por la mayor concentración de suero de leche y alginato en comparación a M1 y M2, ya que estos últimos además tienen Fe hemo/no hemo como parte de su formulación, disminuyendo con esto la concentración de suero de leche y alginato por efecto dilución. Las diferencias obtenidas en fibra cruda se podrían explicar por contaminación en la formulación o el análisis, y por la composición del alginato de sodio, el cual es de origen vegetal (Yang *et al.*, 2011), sin embargo, se hubiesen esperado valores mayores en MC, lo que no ocurrió.

Tabla 5. Análisis químico proximal de las matrices MC, M1 y M2.

| AQP | MC | M1 | M2 |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Humedad (%) | 4,8 ± 0,0 ^a | 5,2 ± 0,0 ^b | 4,4 ± 0,0 ^a |
| Materia seca (%) | 95,2 ± 0,0 ^a | 94,8 ± 0,0 ^a | 95,6 ± 0,0 ^a |
| Proteína total (%) | 11,8 ± 0,1 ^a | 13,8 ± 0,3 ^b | 11,9 ± 0,0 ^a |
| Fibra cruda (%) | 0,9 ± 0,0 ^a | 1,05 ± 0,1 ^a | 1,35 ± 0,1 ^b |
| Extracto etéreo (%) | 0,3 ± 0,0 ^a | 0,1 ± 0,0 ^a | 0,1 ± 0,0 ^a |
| ENN (%) | 73,1 ± 0,1 ^b | 71,0 ± 0,1 ^a | 71,3 ± 0,0 ^a |
| Cenizas (%) | 9,2 ± 0,0 ^a | 8,9 ± 0,1 ^a | 10,9 ± 0,1 ^b |

ENN: extracto no nitrogenado. Distintas letras en superíndices indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Color y propiedades mecánicas

En la Tabla 6 se presentan los resultados de los parámetros de color y propiedades mecánicas de las matrices. En cuanto al color, se observa que MC presenta parámetros de color muy diferente con respecto a M1 y M2. MC tiene el parámetro L^* más alto y los parámetros a^* y b^* más bajos, que las otras matrices, esto se traduce en que tiene un color más claro, y M1 y M2 tonos más oscuros (como ya se había descrito en la sección de apariencia de las matrices). Observándose también diferencias entre M1 y M2 para estos parámetros.

Tabla 6. Color y propiedades mecánicas de las matrices.

| | MC | M1 | M2 |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| L^* | 60,5 ± 9,0 ^a | 23,2 ± 9,3 ^b | 29,7 ± 6,1 ^c |
| a^* | 10,2 ± 2,8 ^a | 16,4 ± 5,3 ^b | 11,0 ± 3,2 ^c |
| b^* | 41,8 ± 8,6 ^a | 29,3 ± 7,6 ^b | 33,4 ± 4,5 ^c |
| Deformación (mm) | 0,87 ± 0,3 ^a | 0,74 ± 0,3 ^a | 0,81 ± 0,3 ^a |
| Resistencia a la fractura (Kg) | 5,19 ± 1,9 ^a | 1,50 ± 0,9 ^b | 2,13 ± 0,8 ^b |

*Distintas letras en superíndices denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las propiedades mecánicas de un alimento son de suma importancia, ya que influyen sobre la aceptación por parte del animal y sus capacidades de consumo. Así, en cuanto a los resultados de las mediciones de propiedades mecánicas, estos muestran que MC es más resistente a la fractura que M1 y M2, lo cual puede deberse al tipo de interacciones químicas formadas entre el material muralla (entre moléculas del suero de leche y alginato de sodio) con el Fe hemo y no hemo, ya que, según Devi y Kakati (2013) en presencia de proteínas (las aportadas por el suero de leche), el alginato es capaz de formar estructuras más firmes y menos porosas. Sin embargo, al adicionar diferentes fuentes de Fe a las mezclas, la interacción molecular entre el alginato y el suero de leche se ve disminuida, lo cual quiere decir que la resistencia del material muralla disminuye. A pesar de que todavía no se conocen bien las interacciones entre el alginato con los iones de Fe, en el trabajo realizado por Perez-Moral *et al.* (2013) se propone que los iones de Fe⁺² (de la fuente de Fe no hemo) y Ca⁺² (del suero de leche y el CaCl₂) compiten por los puntos de unión con los grupos M y G que conforman el alginato, disminuyendo con esto las interacciones químicas que dan estabilidad a las matrices de alginato. Otra posible explicación que describen algunos autores es que el alginato no puede encapsular especies aniónicas (como el sulfato ferroso) como fue mencionado anteriormente (Banerjee *et al.*, 2007). M1 y M2 no presentan grandes diferencias en los valores de resistencia a la fractura.

Los resultados no arrojaron diferencias entre los valores de las tres matrices para la deformación, esto debido a que este análisis mide la elasticidad del material, la cual en este caso está dada netamente por las características químicas del alginato de sodio y no se ven afectadas por la inclusión de las distintas fuentes de Fe (Hernández *et al.*, 2005).

Comportamiento de las matrices sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro*

En la Figura 4 se muestran los resultados para el comportamiento de las matrices sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro*, donde números positivos indican que la matriz aumentó de peso y números negativos que el peso disminuyó. Los resultados se traducen en que MC y M1 aumentan de peso, tanto en el medio de incubación gástrico como en el intestinal (es decir absorben líquido), sin mayores diferencias entre sí. Mientras que M2 presenta un menor aumento de peso y significativamente menor que MC y M1 en el medio de incubación gástrico, y su peso se reduce significativamente en el medio de incubación

intestinal, lo cual se interpreta como una liberación de contenido y líquido (hecho observado al realizar los experimentos), siendo también significativamente diferente a MC y M1.

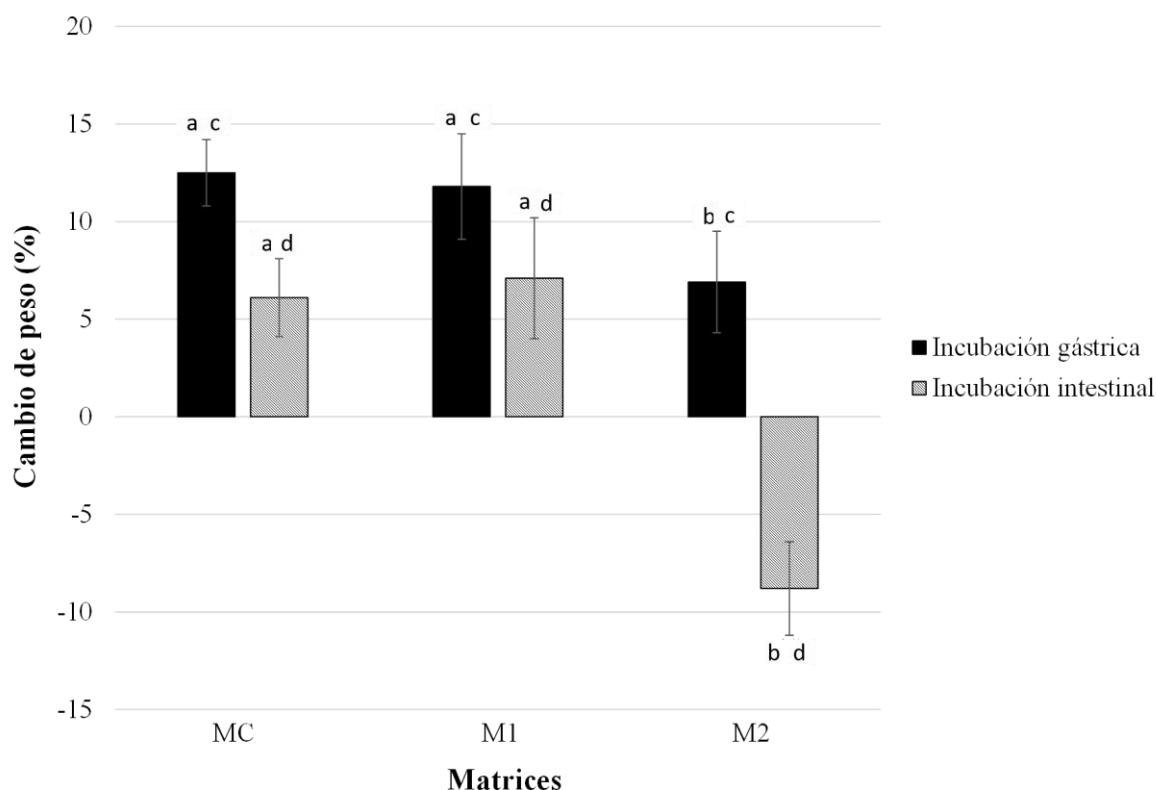


Figura 4. Resultados del comportamiento de las matrices (expresado como cambio de peso porcentual) sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro*. a y b indican diferencias significativas entre matrices. c y d indican diferencias significativas entre la condición gástrica e intestinal para una misma matriz ($p < 0,05$).

Entre las propiedades que tiene el alginato, está la capacidad de retener moléculas de agua debido a su estructura química e hidrosolubilidad, esta característica está dada por sus grupos carboxílicos, y, por lo tanto, depende de la cantidad de éstos (Hernández *et al.*, 2005). El comportamiento diferente mostrado por las matrices al estar sometidas a digestión gástrica e intestinal se debe a que el alginato se comporta de manera distinta frente a los diferentes medios de incubación (gástrico e intestinal). En el medio gástrico (pH ácido), el alginato sódico hidratado se convierte en una estructura porosa e insoluble llamada “ácido algínico”, y, en pH básico, como el de la incubación intestinal, la capa

externa del ácido algínico se convierte en una capa viscosa soluble (Chen *et al.*, 2004). Esto se traduce en que la liberación de moléculas encapsuladas en micro-matrices de alginato en soluciones con pH ácido es mínima, pero aumenta drásticamente en pH básico (Pelletier *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 2004; Vallée *et al.*, 2009; Valenzuela *et al.*, 2016b).

Las diferencias en los resultados de M2 en comparación a MC y M1 se deben a la incorporación de Fe no hemo a la fórmula, esto genera la formación de una estructura con menor potencial higroscópico, absorbiendo una menor cantidad de líquido en condiciones gastrointestinales, y ocurre, además, en la condición intestinal, una total desintegración. Los resultados obtenidos para la matriz M2 demuestran, que esta puede funcionar como un suplemento comestible capaz de encapsular Fe hemo y no hemo, soportando el paso por condiciones gástricas, y desintegrándose al final de la incubación intestinal, pudiendo de esta manera entregar el Fe en su sitio de absorción de forma controlada, tal como ya lo han descrito otros autores en micro-matrices de alginato de sodio que encapsulan Fe hemo (Valenzuela *et al.*, 2016b).

Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR):

Mediante un FTIR se analizaron las muestras de los materiales utilizados en las matrices con el fin de establecer los diferentes tipos de interacciones moleculares que ocurren. Para esto se analizaron muestras de los materiales formadores de las matrices, los dos tipos de Fe y las tres matrices obtenidas. Los resultados se muestran en la Figura 5.

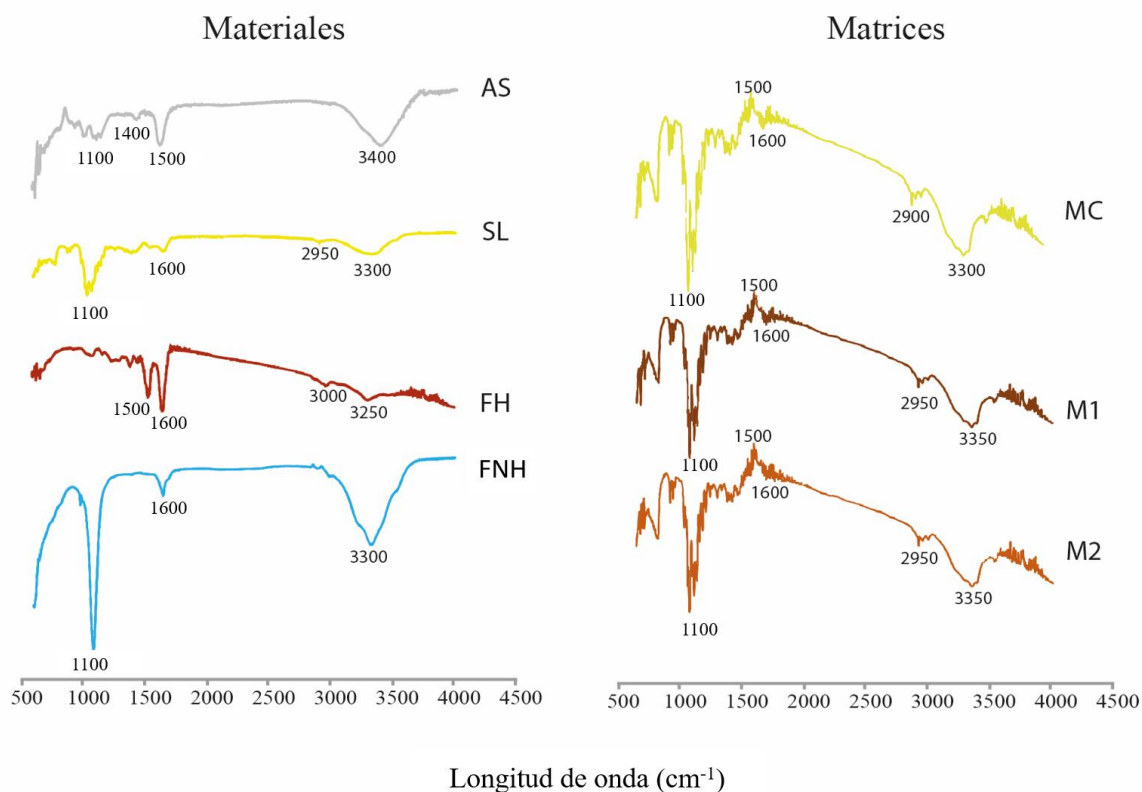


Figura 5. FTIR de los materiales utilizados en las matrices: alginato de sodio (AS), suero de leche (SL), Fe hemo (FH) y Fe no hemo (FNH), y las tres matrices: MC, M1 y M2.

Los picos de absorción cercanos al 3500 cm^{-1} en los espectros de alginato de sodio, suero de leche, Fe hemo y Fe no hemo son indicativos de enlaces O-H de tipo hidrofílico, siendo más notorios en el alginato de sodio y el Fe no hemo (Van Hoogmoed *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2004). Como es de esperarse, el espectro mostrado en esta misma área en las matrices MC, M1 y M2, muestra una absorción similar a la de los materiales que las componen, siendo el alginato determinante en esto, ya que en las tres matrices resultantes se observa prácticamente la misma curva que muestra el alginato por sí solo, a pesar de la presencia o no de las diferentes fuentes de Fe.

En la Figura 5, el pequeño pico mostrado entre 2900 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} en la curva de Fe hemo y suero de leche, representa el estiramiento de enlaces C-H, lo cual está asociado con interacciones hidrofóbicas de ácidos grasos, fosfolípidos y ésteres de colesterol (Petibois y Délereis, 2004; Valenzuela *et al.*, 2014). Por el contrario, el espectro mostrado en este

mismo sector para alginato de sodio y Fe no hemo presenta una absorción insignificante en esta área debido a su naturaleza hidrofílica. Este mismo pico puede observarse en las tres matrices resultantes, habiendo pocas diferencias entre ellas, por lo que su presencia se debe en gran parte a la inclusión de suero de leche.

El FTIR del alginato de sodio muestra dos picos cercanos a los 1400 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} aproximadamente, los cuales han sido descritos en estudios anteriores, como “vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas” del enlace C-O del ión de sal de carboxilato. Sin embargo, esta vibración de estiramiento del grupo carboxilato cambió en el análisis FTIR realizado a las matrices MC, M1 y M2 como resultado del reemplazo de iones de sodio por iones de calcio, después de la gelificación iónica (Daemi y Barikani, 2012), lo que indica la participación del grupo COO^- en el proceso de reacción con el Ca^{2+} , resultando en la formación de estructuras de “caja de huevos”, ampliamente reportadas en la literatura (Dalmoro *et al.*, 2012).

En la curva correspondiente al Fe hemo, en los 1500 y 1600 cm^{-1} se observan dos picos representativos de las bandas de amina I (correspondiente a enlaces C=O) y amina II (enlaces N-H), los cuales tienden a desaparecer en las curvas de las matrices MC, M1 y M2, esto da indicios de que se han formado nuevos enlaces moleculares (Zhao *et al.*, 2009).

En el análisis FTIR realizado a las matrices MC, M1 y M2 se observan alrededor de los $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, picos correspondientes a enlaces de tipo C-O, los cuales pueden observarse en las curvas FTIR del Fe no hemo, suero de leche y alginato de sodio en menor medida, sin embargo, como las tres matrices finales muestran un pico similar, podría deducirse que se debe principalmente a la interacción entre alginato de sodio y suero de leche. Además, se observa que el pico de MC es mayor que en M1 y M2, por lo que la adición de nuevos ingredientes a la mezcla disminuye este tipo de interacciones en el material, dando prioridad a otros (Zhao *et al.*, 2009).

Conclusiones

En este estudio fue posible la elaboración de matrices comestibles de suero de leche y alginato de sodio por gelificación iónica cargadas con Fe, logrando obtener matrices óptimas con concentraciones de Fe hemo de 0,9% y matrices de mezcla con concentraciones de Fe hemo de 0,9% y no hemo de 0,5% p/v.

Las matrices conservaron la forma del molde utilizado. MC fue más resistente a la fractura que M1 y M2 y se logró la generación de un nuevo material polimérico con predominio de enlaces O-H y C-O, evidenciado por FTIR.

Las 3 matrices aumentaron de peso en la incubación gástrica, mientras que en la intestinal MC y M1 aumentaron de peso y M2 se desintegró lentamente.

Los resultados muestran la obtención de matrices útiles para ser utilizadas como un suplemento capaz de suministrar Fe, siendo M2 la que reúne las mejores características, debido a su mayor contenido de Fe y mejor comportamiento gastrointestinal *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

ANTILEO, R.; FIGUEROA, J.; VALENZUELA, C. 2016. Characterization of a novel encapsulated oral iron supplement to prevent iron-deficiency anemia in neonatal piglets. *J. Anim. Sci.* 94:157-160.

A.O.A.C. 199,6. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 16th ed. International. Gaithersburg, USA. 3210 p.

BANERJEE, A.; NAYAK, D.; LAHIRI, S. 2007. A new method of synthesis of iron doped calcium alginate beads and determination of iron content by radiometric method. *Biochem. Eng. J.* 33:260-262.

BARBOSA, T.; TADDEI, J.; PALMA, D.; ANCONA-LOPEZ, F.; BRAGA, J. 2012. Double-blind randomized controlled trial of rolls fortified with microencapsulated iron. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 58(1):118-124.

BATCHELOR, H.; BANNING, D.; DETTMAR, P.; HAMPSON, F.; JOLLIFFE, I.; CRAIG, D. 2002. An *in vitro* mucosal model for prediction of the bioadhesion of alginate solutions to the esophagus. *Int. J. Pharm.* 238(1–2):123-132.

BOS, M.; VAN VLIET, T. 2001. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Adv. Colloid Interfac.* 91(3):437-471.

CHEN, S.; WU, Y.; MI, F.; LIN, Y.; YU, L.; SUNG, H. 2004. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N, O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *J. Control. Release* 96(2):285-300.

CHURIO, O.; PIZARRO, F.; VALENZUELA, C. 2018. Preparation and characterization of iron-alginate beads with some types of iron used in supplementation and fortification strategies. *Food Hydrocolloid* 74:1-10.

DAEMI, H.; BARIKANI, M. 2012. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. *Sci. Iran.* 19:2023-2028.

DALMORO, A.; BARBA, A.; LAMBERTI, G.; GRASSI, M.; D'AMORE, M. 2012. Pharmaceutical applications of biocompatible polymer blends containing sodium alginate. *Adv. Polym. Tech.* 31:219-230.

DEVI, N.; KAKATI, D. 2013. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. *J. Food Eng.* 117:193-204.

DE WIT, J. 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.* 81(3):597-608.

FUNDUEANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. 1999. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials* 20(15):1427-1435.

HANSEN, S.; TRAKOOLJUL, N.; SPEARS, J.; LIU, H. 2010. Age and dietary iron affect expression of genes involved in iron acquisition and homeostasis in young pigs. *J. Nutr.* 140:271-277.

HERNÁNDEZ E.; LÓPEZ G.; GARCÍA P. 2005. Evaluación de derivados carboximetilados del alginato de sodio como superabsorbente. *Rev. Cuban. Quím.* 3:239-240.

HOODA, J.; SHAH, A.; ZHANG L. 2014. Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes. *Nutrients* 6:1080-1102.

HUGUET, M.; GROBOILLOT, A.; NEUFELD, R.; PONCELET, D.; DELLACHERIE, E. 1994. Hemoglobin encapsulation in chitosan/calcium alginate beads. *J. Appl. Polym. Sci.* 51:1427-1432.

ISHAYA, V.; ISHAYA, M. 2012. Iron Nutrition and anaemia in piglets: a review. *J. Vet. Adv.* 2(6):261-265.

KULKARNI, A.; SOPPIMATH, K.; AMINABHAVI, T.; DAVE, A.; MEHTA, M. 2000. Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *J. Control. Release* 63(1-2):97-105.

LABRUDE, P.; RASOLOMANANA, M.; VIGNERON, C.; THIRION, C.; CHAILLOT, B. 1989. Protective effect of sucrose on spray drying of oxyhemoglobin. *J. Pharm. Sci.* 78(3):223-229.

LEON, A.; MEDINA, W.; PARK, D.; AGUILERA, J. 2016. Mechanical properties of whey protein/Na alginate gel microparticles. *J. Food Eng.* 188:1-7

LEONARD, M.; DE BOISSESON, M.; HUBERT, P.; DALENCON, F.; DELLACHERIE, E. 2004. Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. *J. Control. Release* 98(3):395-405.

LIPÍŃSKI, P.; STYŚ, A.; STARZYŃSKY, R. 2013. Molecular insights into the regulation of iron metabolism during the prenatal and early postnatal periods. *Cell. Mol. Life Sci.* 70:23-38.

LIPÍŃSKI, P.; STARZYŃSKI, R.; CANONNE-HERGAUX, F.; TUDEK, B.; OLIŃSKI, R.; KOWALCZYK, P.; DZIAMAN, T.; THIBAudeau, O.; GRALAK, M.; SMUDA, E.; WOLIŃSKI, J.; USIŃSKA, A.; ZABIELSKI, R. 2010. Benefits and risks of iron supplementation in anemic neonatal pigs. *Am. J. Pathol.* 177(3):1233-1243.

LIPÍŃSKI, P.; STYŚ, A.; STARZYŃSKY, R. 2013. Molecular insights into the regulation of iron metabolism during the prenatal and early postnatal periods. *Cell. Mol. Life Sci.* 70:23-38.

LIU, L.; WAN, Y.; XIE, Y.; ZHAI, R.; ZHANG, B.; LIU, J. 2012. The removal of dye from aqueous solution using alginate-halloysite nanotube beads. *Chem. Eng. J.* 187:210-216.

LOH, C.; LEONG, H.; TOO, L.; MAH, K.; CHOO, Y. 2001. The effects of iron supplementation in preweaning piglets. *Mal. J. Nutr.* 7:41-49.

LUPO P.; GONZÁLEZ A.; MAESTRO G. 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Ali.* 3(1):130-151.

LYSIONEK, A.; ZUBILLAGA, M.; SALGUEIRO, M.; PINEIRO, A.; CARO, R.; WEILL, R.; BOCCIO, J. 2002. Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in powdered milk produced from fortified fluid milk: a prophylactic study in rats. *Nutrition* 18:279-281.

MAHAN, D. 2006. Necesidades de minerales en cerdos seleccionados por un alto contenido en magro y cerdos seleccionados por un alto contenido en magro y cerdas de alta productividad. *Av. Technol. Por.* 12(3):18-26.

MARTINEZ-NAVARRETE, N.; CAMACHO, M. M.; MARTINEZ-LAHUERTA, J.; MARTINEZ-MONZÓ, J.; FITO, P. 2002. Iron deficiency and iron fortified foods—a review. *Food Res. Int.* 35(2-3):225-231.

MATRICARDI, P.; ONORATI, I.; COVIELLO, T.; ALHAIQUE, F. 2006. Drug delivery matrices based on scleroglucan/alginate/borax gels. *Int. J. Pharm.* 316(1):21-28.

NICOUD, L.; LATTUADA, M.; YATES, A.; MORBIDELLI, M. 2015. Impact of aggregate formation on the viscosity of protein solutions. *Soft Mater* 11(27):5513-5522.

OZDEMIR, M.; FLOROS, J. 2008. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. *J. Food Eng.* 86(2):215-224.

PELLETIER, S.; HUBERT, P.; PAYAN, E.; MARCHAL, P.; CHOPLIN, L.; DELLACHERIE, E. 2001. Amphiphilic derivatives of sodium alginate and hyaluronate for cartilage repair: rheological properties. *J. Biomed. Mater. Res. A* 54(1):102-108.

PEREZ-MORAL, N.; GONZALEZ, M.; PARKER, R. 2013. Preparation of iron-loaded alginate gel beads and their release characteristics under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloid.* 31:114-120.

PERRI A., FRIENDSHIP, R.; HARDING, J. 2016. An investigation of iron deficiency and anemia in piglets and the effect of iron status at weaning on post-weaning performance. *J. Swine Health Prod.* 24:10-20.

PETIBOIS, C.; DÉLÉREIS, G. 2004. Oxidative stress effects on erythrocytes determined by FT-IR spectrometry. *Analyst* 129:912-916.

QUINTERO-GUTIÉRREZ, A.; GONZÁLEZ-ROSENDO, G.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, J.; POLO-POZO, J.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. 2008. Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. *Int. J. Boil. Sci.* 4(1):58.

RAJAM, R.; KARTHIK, P.; PARTHASARATHI, S.; JOSEPH, G.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. 2012. Effect of whey protein–alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *J. Funct. Foods* 4(4):891-898.

RIBEIRO, C.; BARRIAS, C.; BARBOSA, M. 2004. Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. *Biomaterials* 25:4363-4373.

ROSAS-GARCÍA, N.; DE LUNA-SANTILLANA, E. 2010. Diseño de una matriz microencapsulante a partir de compuestos biodegradables para la elaboración de un bioinsecticida. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 22(3):135-142.

SALVADOR, P.; TOLDRÀ, M.; SAGUER, E.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. 2009. Microstructure–function relationships of heat-induced gels of porcine haemoglobin. *Food Hydrocolloid.* 23(7):1654-1659.

SHAYEGHI, M.; LATUNDE-DADA, G.; OAKHILL, J.; LAFTAH, A.; TAKEUCHIK, K.; HALLIDAY, N.; KHAN, Y.; WARLEY, A.; MCCANN, F.; HIDER, R.; FRAZER, D.; ANDERSON, G.; VULPE, C.; SIMPSON, R.; MCKIE, A. 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122:789-801.

SMIDSRØD, O.; SKJA, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 8:71-78.

SOUTH P.; LEI X.; MILLER D. 2000. Meat enhances nonheme iron absorption in pigs. *Nutr. Res.* 20(12):1749-1759.

STAROŃ, R.; LIPIŃSKI, P.; LENARTOWICZ, M.; BEDNARZ, A.; GAJOWIAK, A.; SMUDA, E.; KRZEPTOWSKI, W.; PIESZKA, M.; KOROLONEK, T.; HAMZA, I.; SWINKELS, D.W.; VAN SWELM, R.; STARZYŃSKI, R. 2017. Dietary hemoglobin rescues young piglets from severe iron deficiency anemia: Duodenal expression profile of genes involved in heme iron absorption. *PLoS ONE*, 12, e0181117.

TANG, Z.; HUANG, X.; BAXI, S.; CHAMBERS, J.; SABOUR, P.; WANG, Q. 2013. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. *Food Res. Int.* 52(2):460-466.

TONDEUR, M.; SCHAUER, C.; CHRISTOFIDES, A.; ASANTE, K.; NEWTON, S.; SERFASS, R.; ZLOTKIN, S. 2004. Determination of iron absorption from intrinsically labeled microencapsulated ferrous fumarate (sprinkles) in infants with different iron and hematologic status by using a dual-stable-isotope method. *Am. J. Clin. Nutr.* 80(5):1436-1444.

UNDERWOOD, E.; SUTTLE, N. 1999. *The mineral nutrition of livestock*, 3th ed. CABI Publishing., Walling-ford. 369 p.

VALENZUELA, C.; LAGOS, G.; FIGUEROA, J.; TADICH, T. 2016a. Behavior of suckling pigs supplemented with an encapsulated iron oral formula. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 13:6-9.

VALENZUELA, C.; HERNÁNDEZ, V.; MORALES, M.; PIZARRO, F. 2016b. Heme iron release from alginate beads at *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Biol. Trace Elem. Res.* 172(1):1-7.

VALENZUELA, C.; HERNÁNDEZ, V.; MORALES, M.; NEIRA-CARRILLO, A.; PIZARRO, F. 2014. Preparation and characterization of heme iron-alginate beads. *LWT-Food Sci. Tech.* 59(2):1283-1289.

VALLÉE, F.; MÜLLER, C.; DURAND, A.; SCHIMCHOWITSCH, S.; DELLACHERIE, E.; KELCHE, C.; LEONARD, M. 2009. Synthesis and rheological properties of hydrogels based on amphiphilic alginate-amide derivatives. *Carbohydr. Res.* 344(2):223-228.

VAN HOOGMOED, C.; BUSSCHER, H.; DE VOS, P. 2003. Fourier transform infrared spectroscopy studies of alginate-PLL capsules with varying compositions. *J. Biomed. Mater. Res.* 67:172-178.

WISMER-PEDERSEN, J. 1988. Use of haemoglobin in foods—a review. *Meat Sci.* 24(1):31-45.

XU, X.; WANG, Q.; CHUL CHOI, H.; KIM, Y. 2010. Encapsulation of iron nanoparticles with PVP nanofibrous membranes to maintain their catalytic activity. *J. Membrane Sci.* 348(1):231-237.

XU, Z.; LIU, S.; WANG, H.; GAO, G.; YU, P.; CHANG, Y. 2014. Encapsulation of iron in liposomes significantly improved the efficiency of iron supplementation in strenuously exercised rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 162:181-188.

YANG, J.; XIE, Y.; HE, W. 2011. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydr. Polym.* 84(1):33-39.

YUAN, L.; GENG, L.; GE, L.; YU, P.; DUAN, X.; CHEN, J.; CHANG, Y. 2013. Effect of iron liposomes on anemia of inflammation. *Int. J. Pharm.* 454(1):82-89.

ZANDI, M.; MOHEBBI, M.; VARIDI, M.; RAMEZANIAN, N. 2014. Evaluation of diacetyl encapsulated alginate–whey protein microspheres release kinetics and mechanism at simulated mouth conditions. *Food Res. Int.* 56:211-217.

ZHAO, H.; ZHENG, W.; MENG, Z.; ZHfOU, H.; XU, X.; LI, Z.; ZHENG, Y. 2009. Bioelectrochemistry of hemoglobin immobilized on a sodium alginate-multiwall carbon nanotubes composite film. *Biosens. Bioelectron.* 24(8):2352-2357.

ZIJLSTRA, R.; WHANG, K.; EASTER, R.; ODLE, J. 1996. Effect of feeding a milk replacer to early-weaned pigs on growth, body composition, and small intestinal morphology, compared with suckled littermates. *J. Anim. Sci.* 74(12):2948-2959.

ZLOTKIN, S.; ARTHUR, P.; YEBOAH, K.; YEUNG, G. 2001. Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:791-795.

ZIMMERMANN, M.; ZEDER, C.; CHAOUKI, N.; SAAD, A.; TORRESANI, T.; HURRELL, R. 2003. Dual fortification of salt with iodine and microencapsulated iron: a randomized, double-blind, controlled trial in Moroccan schoolchildren. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:425-432.

ZIMMERMAN, D.; SPEER, V.; HAYS, V.; CATRON, D. 1959. Injectable iron dextran and several oral iron treatments for the prevention of iron-deficiency anaemia of baby pigs. *J. Anim. Sci.* 18(4):1409-1415.