



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Doctorado en Química Física y Analítica

Isótopos estables para la especiación
cuantitativa de zinc en leche y para investigar
la biodisponibilidad y metabolismo de nuevos
fortificantes de hierro en leche fórmula

TESIS DOCTORAL

MENCIÓN INTERNACIONAL

Sonia Fernández Menéndez

Oviedo 2017

**RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL**

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: “Isótopos estables para la especiación cuantitativa de zinc en leche y para investigar la biodisponibilidad y metabolismo de nuevos fortificantes de hierro en leche fórmula”	Inglés: “Stable isotopes for the quantitative speciation of zinc in milk and to investigate the bioavailability and metabolism of new iron fortifiers in formula milk”
2.- Autor	
Nombre: Sonia Fernández Menéndez	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Química Física y Analítica	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado-Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

Los *elementos traza esenciales* (i.e. Fe, Cu, Zn, Se, I) están presentes en el organismo en muy pequeñas concentraciones ($\mu\text{g/g}$, ng/g), pero son de vital importancia para el correcto desarrollo y funcionamiento del organismo. Un balance negativo de algún elemento traza puede resultar en desórdenes distintivos de deficiencia, como la anemia en los individuos deficientes en hierro. De igual forma, un consumo por exceso de elementos traza, resulta tóxico.

En el caso de los recién nacidos, especialmente durante los primeros meses de vida, su única fuente de nutrientes es a través de la leche materna, constituyendo un alimento ideal para el recién nacido, puesto que proporciona todos los nutrientes necesarios para cubrir sus necesidades. En concreto, proporciona elementos traza esenciales en las concentraciones adecuadas y en formas fisicoquímicas que presentan una elevada absorción y biodisponibilidad. Adicionalmente, se conoce que la composición de la leche materna varía a lo largo del periodo de lactancia y la edad gestacional adaptándose a las necesidades nutricionales del recién nacido. Por otro lado, las leches fórmula utilizadas para la alimentación del recién nacido como sustitución de la leche materna, están generalmente fortificadas en dichos elementos con objeto de evitar enfermedades derivadas de su deficiencia, pero la absorción y biodisponibilidad de los elementos desde dichas leches fórmula suele ser inferior a la observada desde leche materna.

Por tanto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral consistió en el uso de “*isótopos estables para la especiación cuantitativa de zinc en leche y para investigar la biodisponibilidad y metabolismo de nuevos fortificantes de hierro en leche fórmula*”. Este objetivo general se ha perseguido abordando los siguientes objetivos específicos:

I) Estudio del contenido de zinc y/o especies de zinc en leche materna: variación con el período de lactancia y la edad gestacional.

Conocer el aporte de zinc desde la leche materna, así como las formas



fisicoquímicas en las que está presente, resulta de gran interés puesto que este elemento está involucrado en el desarrollo psíquico, físico y motor del recién nacido. Se evaluó mediante ICP-MS la variación de los niveles y de las especies de Zn presentes en la leche materna (n= 124) a lo largo del periodo de lactancia: calostro, leche de transición (7,14 días tras el parto) y leche madura (28 días tras el parto) y dependiendo de la edad gestacional diferenciando entre parto pretérmino (<36 semanas) y parto a término (>36 semanas). A modo comparativo, se analizaron diferentes fórmulas lácteas comerciales destinadas a la alimentación de niños a término y pretérmino (n=16).

Los resultados del estudio mostraron que los niveles de Zn variaban a lo largo del periodo de lactancia, desde el calostro hasta la leche madura. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la edad gestacional. Los estudios de especiación del Zn en la leche materna por SEC-ICP-MS y dilución isotópica post columna mostraron que la mayor parte del Zn eluye asociado a compuestos de bajo peso molecular, dicha especie fue identificada por espectrometría de masas moleculares como citrato. Asimismo, no se encontraron diferencias en las especies presentes en los distintos tipos de leche (a término y pretérmino) a lo largo del periodo de lactancia.

Los resultados de análisis de leches fórmula (destinadas a la alimentación del recién nacido prematuro y a término) mostraron unos niveles de Zn similares a los encontrados en leche madura, tanto a término como pretérmino. Respecto a las especies presentes, el Zinc se encontró principalmente asociado a citratos y sales de bajos pesos moleculares.

II) Evaluación de la biodisponibilidad/absorción y metabolismo del hierro desde leche fórmula fortificada con un complejo de $^{57}\text{Fe(III)}$ -Lactoferrina y $^{57}\text{Fe(II)}\text{SO}_4$ en presencia de Lactoferrina.

El hierro en la leche materna se encuentra principalmente asociado a proteínas (de alto, medio y bajo peso molecular) las cuales presentan una biodisponibilidad y absorción superior a la encontrada en leches fórmulas fortificadas con hierro, generalmente en forma de sulfato ferroso. Con el objetivo de mejorar la absorción de las leches fórmula, la búsqueda de nuevas formas fisicoquímicas de hierro, similares a las encontradas en leche materna, resulta de gran interés. Asimismo, resulta interesante la búsqueda de co-fortificantes que incrementen la absorción y biodisponibilidad del hierro desde el sulfato ferroso o incluso que permita alcanzar un adecuado estatus de hierro utilizando menores dosis. Para ambos propósitos, en el presente capítulo se evaluó en ratas lactantes el papel de la lactoferrina, una proteína presente en la leche materna capaz de ligar al hierro, en la absorción/biodisponibilidad del hierro desde leches fórmula de dos maneras: mediante una nueva forma fisicoquímica, el complejo hierro-lactoferrina ($\text{Fe(III)}_2\text{-Lf}$) y, por otro lado, el posible efecto de la lactoferrina (Lf) en la absorción del FeSO_4 . Ambos compuestos de hierro fueron sintetizados con un isótopo enriquecido de hierro (^{57}Fe) y posteriormente caracterizados (en términos de estabilidad, concentraciones y abundancias).

Se desarrolló una metodología basada en el empleo de isotopos estables de Fe en



combinación con ICP-MS para la medida de los tejidos y fluidos de ratas alimentadas con los diferentes fortificantes ensayados. Dicha herramienta, denominada Isotope Pattern Deconvolution (IPD) permite calcular el contenido de Fe endógeno (presente en la rata de manera natural) y exógeno (trazador, ^{57}Fe utilizado como alimento) presentes en los diversos compartimentos en los cuales el hierro se distribuye dentro del organismo (funcional en los RBCs, transporte en el suero y almacenamiento en el hígado). Asimismo, se calculó la absorción y retención aparente para los diversos fortificantes ensayados.

Los resultados de absorción y/o retención aparentes observados en este trabajo indican que los principales factores que influyen a ambos parámetros son la dosis y la forma química del hierro (por ejemplo $^{57}\text{Fe(II)SO}_4 + \text{Lf}$ es claramente preferible al complejo $^{57}\text{Fe(III)-Lf}$ para aumentar la absorción del Fe).

El intercambio de ^{57}Fe fue del 50% en los glóbulos rojos, cercano al 70% en suero. Ello apunta a una rotación o intercambio más rápido del hierro exógeno (^{57}Fe) en el suero que en los glóbulos rojos. Los niveles más elevados de ^{57}Fe en hígado se encontraron cuando éste fue administrado como $^{57}\text{Fe(II)SO}_4$ en presencia de lactoferrina (73% de incorporación del ^{57}Fe). Por otra parte, el hierro exógeno encontrado en riñones fue inferior al 8%, lo que indica una baja tasa de intercambio de hierro en este órgano.

Teniendo en cuenta los resultados encontrados mediante HPLC-ICP-MS (con cuantificación mediante IPD post-columna), el hierro en el compartimento funcional resultó ser muy similar en todos los grupos estudiados, siendo sólo superior en el grupo fortificado con mayores dosis de hierro. Las subunidades de hemoglobina separadas por cromatografía de intercambio catiónico se identificaron en este trabajo y mostraron la misma incorporación de hierro en ambas isoformas, como se esperaba.

En el "hierro circulante" encontramos importantes diferencias en los grupos fortificados en comparación con el grupo control (alimentación materna). De hecho, el 77% del hierro total se encontró asociado a transferrina en el grupo materno. Este hecho importante no se observó en los otros grupos, donde el porcentaje de hierro total en transferrina fue siempre inferior al 10% (es decir, la especiación de Fe en la leche materna es claramente diferente a la de las fórmulas).

La distribución de hierro en el compartimento de almacenamiento parece estar relacionada principalmente con la dosis de los elementos administrados: como se esperaba, una mayor ingesta de hierro conduce a mayores niveles de hierro hepático, lo que confirma el papel crítico del compartimento de almacenamiento en el metabolismo del hierro y la homeostasis. Los resultados también revelan que la forma fisicoquímica utilizada para la fortificación no es un factor decisivo en el almacenamiento de hierro, ya que no hay diferencias significativas en los niveles de hierro (o incorporación de ^{57}Fe) cuando el hierro se fortifica en forma ferrosa o férrica.

En cuanto a la incorporación de hierro ^{57}Fe (exógeno) entre los grupos ensayados, está claro que los mejores resultados se obtuvieron cuando el hierro se fortificó como Fe(II)SO_4 en presencia de lactoferrina. Comparando tales resultados con



los descritos previamente por otros autores [Héctor et al. Electrophoresis, 33:15 (2012) 2407–15] usando la misma dosis de Fe(II)SO_4 pero sin lactoferrina, se puede ver que la Lf claramente aumentó la absorción de hierro. De nuevo, la forma fisicoquímica del elemento utilizado para la fortificación, así como su dosis, fueron aspectos clave para aumentar la biodisponibilidad y absorción del elemento.

III) Evaluación de la biodisponibilidad/absorción y metabolismo del hierro desde leche fórmula fortificada con un isótopo estable de hierro en forma de nanopartículas de ^{57}Fe -NPs.

Durante los últimos años, el uso de nanopartículas como suplementos nutricionales ha ido en aumento, generando resultados muy prometedores, puesto que parecen causar menores efectos secundarios en el tracto gastrointestinal, además de tener gran estabilidad. Por otro lado, aunque el uso de nanopartículas como fortificantes en alimentos no resulta tan común, los estudios disponibles actualmente muestran que el uso de las nanopartículas como fortificantes de elementos traza esenciales en alimentos puede ser prometedor puesto que parecen generar pocos cambios sensoriales en el alimento, y en algunos casos, una liberación del elemento más controlada, presentando además mayor biodisponibilidad.

En el presente capítulo se ha reproducido la síntesis de unas nanopartículas de oxo-hidróxido de Fe (III) patentada por Powell et al. (U.K. patent WO/2008/096130 2008 06.02.2008) pero utilizando un isótopo de hierro enriquecido (^{57}Fe). La estructura de estas nanopartículas resulta muy similar a la nanoestructura formada en el interior de la ferritina como método de almacenamiento natural de hierro dentro del organismo, por lo que es de suponer que su biodisponibilidad será alta y sus efectos adversos serán menores a los encontrados en otras nanopartículas de hierro.

Para estudiar el metabolismo, absorción y biodisponibilidad de las nanopartículas de oxo-hidróxido de hierro (III), se ha alimentado un grupo de ratas lactantes con leche fortificada con dichas nanopartículas a una concentración de hierro dada. A modo comparativo con el grupo anterior, se utilizó un grupo de ratas alimentadas con leche fórmula sin fortificación, y finalmente, un grupo de alimentación materna utilizada como grupo control. Dichas nanopartículas fueron sintetizadas y posteriormente caracterizadas en términos de tamaño, morfología, concentración, etc. Al igual que en el capítulo anterior, se utilizó la herramienta matemática IPD para llevar a cabo la determinación de hierro endógeno y exógeno (proveniente de la nanopartícula) total en los diferentes compartimentos de hierro (funcional, transporte y almacenamiento) en muestras biológicas.

Los resultados obtenidos tras el estudio *in vivo* mostraron que la fortificación de hierro en leche fórmula es necesaria para mantener un adecuado estatus de hierro en el organismo. Por otro lado, la incorporación de hierro exógeno (^{57}Fe) en suero, eritrocitos e hígado desde las NPs estudiadas fue superior al 57%. Dicha incorporación en sangre (suero y eritrocitos) fue ligeramente inferior a la encontrada en el capítulo anterior para otros fortificantes, pero en el hígado se observó una mayor incorporación a pesar de llevar a cabo la fortificación con una dosis baja de hierro. A través de la medida del



hierro excretado, se obtuvo la absorción aparente de dichas nanopartículas, resultando ser de un 91%.

Igualmente, se llevó a cabo la especiación mediante HPLC-ICP-MS y la cuantificación del hierro exógeno y endógeno mediante IPD, en las muestras anteriormente mencionadas. La especiación de hierro en el compartimento funcional (eritrocitos), mostró que existe poca variación entre grupos en este compartimento, lo que demuestra el mecanismo altamente regulado de hierro en el organismo. La especiación de suero de rata mostró la importancia de la fortificación con hierro en leche de fórmula para mantener un adecuado estatus de hierro en el compartimento de transporte, ya que mostraron concentraciones de hierro significativamente mayores en la fracción atribuida a la transferrina. En el hígado, los niveles encontrados para el grupo de NPs fueron superiores al grupo no fortificado, pero inferiores a los encontrados anteriormente en el grupo alimentado con leche fórmula fortificada con $\text{FeSO}_4 + \text{Lf}$.

No obstante, el ^{57}Fe se incorporó adecuadamente a las especies encontradas en eritrocitos, suero y hígado de rata desde las partículas ensayadas, mostrando que éstas se metabolizaron adecuadamente. El uso de las ^{57}Fe -NPs como fortificante de leche puede representar una buena alternativa para la fortificación con hierro en las leches fórmula.

RESUMEN (en Inglés)

The essential trace elements (i.e. Fe, Cu, Zn, Se, I) are present in the organism in very small concentrations ($\mu\text{g/g}$, ng/g), but are of vital importance for the proper development and functioning of the organism. A negative balance of some trace element may result in distinctive deficiency disorders, such as anaemia in iron deficient individuals. Similarly, a consumption by trace elements is toxic.

In the case of newborns, especially during the first months of life, their only source of nutrients is through breast milk, constituting an ideal food for the newborn, since it provides all the nutrients necessary to meet their growing needs. In particular, it provides trace elements essential in the appropriate concentrations and in physicochemical forms that present a high absorption and bioavailability. Additionally, it is known that the composition of breast milk varies throughout the lactation period and gestational age adapting to the nutritional needs of the newborn. On the other hand, the formula milk typically used for feeding the newborns as a substitute for breast milk, are generally fortified in such elements in order to avoid diseases derived from their deficiency, but the absorption and bioavailability of the elements from these formula milk usually is lower than that observed from breast milk.

Therefore, the general objective of the present Doctoral Thesis consisted in the use of "*stable isotopes for the quantitative speciation of zinc in milk and to investigate the bioavailability and metabolism of new iron fortifiers in formula milk*". This general objective has been pursued by addressing the following specific objectives:



I) Study of the zinc content and / or zinc species in breast milk: variation with the lactation period and gestational age.

Knowing the contribution of zinc from breast milk, as well as the physicochemical forms in which this element is present, is of great interest since this element is involved in the psychic, physical and motor development of the newborn. In this chapter, the variation in Zn levels and Zn species present in breast milk throughout the lactation period (n = 124) was evaluated by ICP-MS: colostrum, transitional milk (7,14 days postpartum) and (28 days postpartum) and depending on the gestational age, differentiating between preterm delivery (<36 weeks) and term delivery (> 36 weeks). Also, commercial milk formulas for the feeding of preterm and preterm infants (n = 16) currently in use were also analysed for comparison (n=16).

The results of the study showed that Zn levels varied throughout the lactation period, from colostrum to mature milk. However, no statistically significant differences were found with gestational age. Studies of Zn speciation in breast milk by SEC-ICP-MS and post-column isotope dilution showed that most of the Zn eluted associated with low molecular weight compounds, such species was identified by molecular mass spectrometry as citrate. Likewise, no differences were found in the species present in the different types of milk (term and preterm) throughout the lactation period.

The results of analysis of formula milk (intended for the feeding of the preterm and term newborns showed levels of Zn similar to those found in mature milk, both term and preterm. Regarding the present species, Zinc was found mainly associated to citrates and salts with low molecular weights.

II) Evaluation of bioavailability / iron uptake (absorption) and metabolism from formula milk fortified with a complex of ^{57}Fe (III) -Lactoferrin and $^{57}\text{Fe(II)SO}_4$ in the presence of Lactoferrin.

Iron in breast milk is mainly associated with proteins (high, medium and low molecular weight) which have a bioavailability and absorption superior to that found in iron fortified formulas, generally in the form of ferrous sulfate. In order to improve the absorption of formula milks, the search for new physicochemical forms of iron, similar to those found in breast milk, is of great interest. Also, it is interesting to find co-enhancers that increase the absorption and bioavailability of iron from ferrous sulphate or even achieve an adequate iron status using lower doses. For both purposes, in this chapter the role of lactoferrin, a protein present in breast milk capable of binding to iron, in the absorption / bioavailability of iron from formula milk was evaluated in two ways: in a new physicochemical form, iron-lactoferrin complex ($\text{Fe(III)}_2\text{-Lf}$) and, on the other hand, the possible effect of lactoferrin (Lf) on the absorption of FeSO_4 . Both iron compounds were synthesized with an iron enriched isotope (^{57}Fe) and subsequently characterized (in terms of stability, concentrations and abundances).

A methodology was developed based on the use of stable isotopes of Fe in combination with ICP-MS for the measurement of tissues and fluids of rats fed with the different fortificants tested. This tool, known as Isotope Pattern Deconvolution (IPD),



allows the calculation of the content of endogenous (naturally present in the rat) and exogenous (tracer, ^{57}Fe used for feeding) present in the various compartments in which the iron is distributed within the organism (functional in RBCs, transport in the serum and storage in the liver). Likewise, the apparent absorption and retention were calculated for the various fortificants tested.

The apparent absorption and / or retention results observed in this work indicated that the main factors influencing both parameters are the dose and the chemical form of iron (i.e. $^{57}\text{Fe(II)SO}_4 + \text{Lf}$ is clearly preferable to the $^{57}\text{Fe(III)-Lf}$ complex to increase Fe absorption).

Regarding the replacement or exchange of exogenous iron in the red blood cells it was almost 50%, and close to 70% in serum. This points out the faster rotation or exchange of exogenous iron (^{57}Fe) in the serum than in the red blood cells. The highest levels of ^{57}Fe in liver were found when it was given as $^{57}\text{Fe(II)SO}_4$ in the presence of lactoferrin (73% incorporation of ^{57}Fe). On the other hand, the exogenous iron found in kidneys was less than 8%, indicating a low rate of iron exchange in this organ.

Taking into account the results found by HPLC-ICP-MS (with quantification by post-column IPD), iron in the functional compartment was found to be very similar in all groups studied, being only superior in the fortified group with higher iron doses. The hemoglobin subunits separated by cation exchange chromatography were identified in this work and showed the same incorporation of iron in both isoforms, as expected.

In "circulating iron" we find important differences in the fortified groups compared to the control group (maternal feeding). In fact, 77% of total iron was associated with transferrin in the maternal group. This important fact was not observed in the other groups, where the percentage of total iron in transferrin was always less than 10% (i.e. Fe speciation in breast milk is clearly different from that of the formulas).

The distribution of iron in the storage compartment seems to be mainly related to the dose of the administered elements: as expected, a higher intake of iron leads to higher levels of hepatic iron, confirming the critical role of the storage compartment in the iron metabolism and homeostasis. The results also reveal that the physicochemical form used for fortification is not a decisive factor in the storage of iron since there are no significant differences in iron levels (or incorporation of ^{57}Fe) when iron is fortified in ferrous or ferric form.

Regarding the incorporation of iron ^{57}Fe (exogenous) among the groups tested, it is clear that the best results were obtained when iron was fortified as Fe(II)SO_4 in the presence of lactoferrin. Comparing such results with those previously described by other authors [Héctor et al. Electrophoresis, 33:15 (2012) 2407-15] using the same dose of Fe(II)SO_4 but without lactoferrin, it can be seen that Lf clearly increased iron absorption. Again, the physicochemical form of the element used for the fortification, as well as its dose, were key aspects to increase the bioavailability and absorption of the element.

III) Evaluation of bioavailability / iron uptake (absorption) and metabolism



from milk formula fortified with a stable iron isotope in the form of ^{57}Fe -NPs nanoparticles.

During the last years, the use of nanoparticles as nutritional supplements has been increasing, generating very promising results, since they seem to cause minor side effects in the gastrointestinal tract, besides having great stability. On the other hand, although the use of nanoparticles as fortifiers in foods is not so common, currently available studies have shown that the use of nanoparticles as fortifiers of essential trace elements in foods can be promising since they cause generally few sensory changes in food, and in some cases a release of the element is more controlled, furthermore presenting greater bioavailability.

In the present chapter, we have synthesized Fe (III) oxo-hydroxide nanoparticles, firstly made by Powell et al. (U.K. patent WO / 2008/096130 2008 06.02.2008) but using an enriched iron isotope (^{57}Fe). The structure of these nanoparticles is very similar to the nanostructure formed inside the ferritin as a method of natural storage of iron inside the organism, so it is assumed that its bioavailability will be high and its adverse effects will be lower than those found in Other nanoparticles of iron.

To study iron metabolism, absorption, and bioavailability from the Fe(III) oxo-hydroxide nanoparticles, a group of lactating rats were fed with formula milk fortified with these nanoparticles at a given iron concentration. In order to compare the results obtained, a group of rats was fed with formula milk without fortification and also a maternal feeding group, was used as a control group. These nanoparticles were synthesized and later characterized in terms of size, morphology, concentration, etc. As in the previous chapter, the IPD mathematical tool was used to carry out the determination of endogenous and exogenous iron (from the nanoparticle) in the different compartments of iron (functional, transport and storage) in biological samples.

The results obtained after the in vivo study showed that iron fortification in formula milk is necessary to maintain adequate iron status in the body. On the other hand, the incorporation of exogenous iron (^{57}Fe) in serum, erythrocytes and liver was superior to 57%. This incorporation in blood (serum and erythrocytes) was slightly lower than that found in the previous chapter for other fortifiers, but in the liver a greater incorporation was observed in spite of carrying out the fortification with a low dose of iron. Through the measurement of excreted iron, the apparent absorption of these nanoparticles was obtained, being 91%.

Also, speciation was performed by HPLC-ICP-MS and the quantification of exogenous and endogenous iron by IPD in the above-mentioned samples.

Iron speciation in the functional compartment (erythrocytes) showed that there is little variation between groups in this compartment, which demonstrates the highly-regulated mechanism of iron in the body. Speciation of rat serum showed the importance of iron fortification in formula milk to maintain adequate iron status in the transport compartment as they showed significantly higher iron concentrations in the



fraction attributed to transferrin. In the liver, the levels found for the group of NPs were higher than in the non-fortified group, but lower than those previously found for the groups that received formula milk fortified with FeSO₄ and Lf.

However, ⁵⁷Fe was appropriately incorporated into the species found in erythrocytes, serum and rat liver from the tested particles, showing that they were adequately metabolized. The use of ⁵⁷Fe-NPs as a milk fortifier may represent a good alternative for iron fortification in formula milks.

La gran duda, ¿iniciar una Tesis?. Al comenzar parece un camino muy largo y arduo, el cual sólo los valientes y tenaces son capaces de finalizar. Cuando te adentras, las adversidades que van surgiendo plantean ciertas dudas: ¿merece la pena seguir, luchar y proseguir o, por el contrario, es mejor tirar la toalla y dejarlo todo?. El fin del camino está siempre tan lejos...y tan lleno de trabas (becas y proyectos no concedidos, artículos rechazados, etc), que en numerosas ocasiones parece imposible ver el final. E, incluso, en el final del camino, a veces, se encuentran las mayores dificultades.

Muchos compañeros terminan, pero no crees que es algo que pueda llegarte. Pero un día, el fin del camino llega, el ciclo se acaba. Y, a pesar de la frustración de algunos momentos, la recompensa de lo aprendido (tanto personal como profesionalmente) permanece. Sobrevivir a ello no es una tarea de una única persona, si no que es posible gracias a una innumerable cantidad (¡y calidad!) de personas que directa o indirectamente, te acompañan a atravesar dicho camino. A ellos, me gustaría dedicarles unas breves palabras.

Primeramente, al Prof. Emérito Alfredo Sanz Medel, Catedrático de Química Analítica de la Universidad de Oviedo por permitirme seguir mi objetivo inicial: el trabajar en “alguna investigación relacionada con la nutrición”, y por darme la oportunidad de formar parte de su extraordinario grupo de investigación, por enseñarme en qué se basa y cómo se realiza una investigación de calidad, controlando y conociendo siempre el “por qué” de las cosas.

A la Dra. María Luisa Fernández Sánchez, Profesora Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo. Por tener siempre tiempo para atenderme con dudas puntuales o en los laboratorios. Por su manera de trabajar, en la que aprendí que no se puede dar un paso sin entender el camino hacia donde conduce y lo que significa.

A la Dra. Belén Fernández Colomer del Servicio de Neonatología del Hospital Central Universitario de Asturias (HUCA) por guiarnos en la parte médica del trabajo, por establecer una colaboración con nosotros en los proyectos, y proveernos de ayuda en momentos de escasez, así como por haber confiado en mi capacidad científica para desarrollar los retos que se presentaban en el proyecto.

A la Dra. Teresa Sánchez Álvarez y al Dr. Agustín Brea Pastor, de la unidad del Bioterio de la Universidad de Oviedo, por su gran ayuda con los estudios realizados con animales.

Al Prof. José Ignacio García Alonso, Catedrático de Química Analítica de la Universidad de Oviedo por sus enseñanzas y charlas en el despacho y en la Sala de Becarios acerca de dilución isotópica, deconvolución de perfiles isotópicos, factores de masas, interferencias espectrales, etc.

Al Dr. Héctor González Iglesias por el apoyo moral y profesional, por los emails y las explicaciones, las cuales fueron de vital ayuda durante el inicio.

A la Dra. Cristina Sarriego Muñiz por su inestimable ayuda durante los primeros años de la Tesis, por las charlas, los cafés, por dejarlo todo un fin de semana para subir a arreglar una fuga o solucionar un problema con el ICP-MS, siempre con la mejor de las sonrisas.

A FICYT, Laboratorios Ordesa y Grupo Castrillo por su participación en diversos proyectos. A la iniciativa Zn-Net (Action TD1304) del COST (European Cooperation in Science & Technology), por darme la oportunidad de viajar y aprender del trabajo de profesionales en otros laboratorios de gran prestigio, así como de permitirme divulgar mi investigación mediante la financiación de la asistencia a congresos.

A mis chicas y chicos de la sala, a todos “L@s Nach@s”, a todos mis compañeros de laboratorio del Grupo de Espectrometría Analítica tanto a las secciones de Proteómica, como Sensores y Glow. A todos los que están, y también a los que se han ido. Por su ayuda en mis comienzos y por los innumerables momentos vividos en cenas, congresos, repartos... En especial a Jeff y Mona y cómo no, a “las Marisas”: Raquel, Patri (y Sara ;)), por el apoyo mutuo, las charlas, los cafés en algunos casos tan necesarios para mantener la cordura.

No me olvido de mi querida compañera y amiga Rafaella R. Alves Peixoto. GRACIAS. Gracias por permitirme enseñarte lo que sé, por ayudarme a ser mejor científica y enseñarme innumerables cosas de dentro y fuera del campo de la investigación. Por toda la ayuda prestada, los cafés, las cenas, los vinos, y ahora en la distancia, los emails y whatsapps que nos mantienen al día trabajando juntas.

To Dr. Spiros A. Pergantis, Professor of Analytical Chemistry in the University of Crete, Greece. For allowing me to work in his laboratory, teaching me a huge number of things about molecular mass spectrometry, be with me at the laboratory and receive me with open arms every time that I came back, and discussing with me (and a freddo espresso!) all the results and the possible new approaches to deal with surprised difficulties.

To Michalis Aivaliotis (Scientific Director) and Nikos Kountourakis (MSc) from the Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB) Foundation for Research and Technology (FORTH), for their interest in my research, for my training in proteomics and for encourage me to keep working on it.

To all my Greek friends (Leonidas, Sofía, Eirini, Tzrasos, Claudio, Kiki, Ana, Alkisti, Marianna, Anneta...) for their help in the laboratory and for making me feel part of the group. For teaching me greek (more than “κάθε ώρα κάθε μέρα μόνο επιτυχίες” and “η καλύτερη ξένη μουσική στην πόλη”, χαχαχα). For all the “ενα φρέντο εσπρέσσο, ενάμιση ζάχαρη”. Spetial mention should be done to Manos and Lefko, for all the afternoons in the lab, all the coffee breaks and for becoming my greek family.

A mis amigos Erasmus (andaluces, valencianos, griegos, italianos, sirios, americanos e ingleses) especialmente (al ahora ya Doctor) Sergio Carneado Moreno, mi compañero de fiestas, alegrías, disgustos, esperas, viajes, confesiones, comidas, rakis y

demás. Doy gracias porque la vida haya juntado nuestros caminos en el mejor momento posible. Sé que las experiencias vividas han generado recuerdos imposibles de borrar, y espero que sigamos coincidiendo en congresos, y nos sigamos visitando donde quiera que el destino nos quiera llevar.

A todos mis Xeitinos: a los actuales (nuevos, escolinos y veteranos); a los que estuvieron y ya no están; y todos a los que, aunque no pertenecían, siempre estuvieron. Por nuestras tardes segando, por todas las sidras, risas, bailes (tradicionales o no), viajes, convivencias y confesiones compartidas. Por liberar mi mente del estrés en los momentos en los que más lo necesitaba, sobre todo en la recta final de escritura. Por todo el apoyo en los momentos difíciles y por entender mi cara (¡y mi humor!) tras una larga jornada de medida en los equipos... intentando siempre hacer que desconectara y pasara un tiempo agradable rodeado de buenos amigos.

Especial mención merecen Elena Trasmonte, Tati, Caridad, Noelia, Cristina Moncayo y tantas otras, por ser parte de éste trabajo, porque vosotras... ¡sí que sois la leche!

A todos los componentes de la cafetería, por todos los cafés y las tilas tan necesarias en momentos de estrés. Gracias especialmente a Fer, Fina y Raquel por su buen hacer, su sonrisa diaria y sus “sorpresas” para recuperar las fuerzas en los momentos de debilidad.

A Andrea, Sandra y Elena mis mejores amigas, por las charlas y audios interminables, por todo el apoyo a lo largo de todos estos años. Dicen que una amistad que dura más de 8 años dura para siempre... y nosotras hemos alcanzado con creces esa cifra. Espero que independientemente de lo que nos depare el futuro, nuestra relación siga fresca como el primer día.

A mis abuelos Luisa y Sabino, por estar siempre cuidando de mí, y por ayudarme en todo. A Eloína y Ramiro por su cariño incondicional. Y finalmente, pero no por ello menos importante, a mis padres. Porque sin ellos no habría llegado a donde estoy, paso a paso siempre hacia adelante, con paciencia, constancia y tenacidad. Recordándome siempre que, lo que bien se siembra, se recoge en abundancia.

“No se rindió y salió triunfante, incluso en un entorno de pesimismo extremo”

Fin de cámara 9. Portal

ÍNDICE



A. INTRODUCCIÓN	1
A.1. Consumo humano de productos lácteos	3
A.2. La leche materna humana	5
A.3. La leche fórmula	9
A.3.1. Características que ha de tener una leche fórmula	10
A.4. Composición y propiedades de la leche	12
A.4.1. Propiedades fisicoquímicas de la leche	13
A.4.2. Composición química de la leche	15
A.4.2.1. Lípidos	15
A.4.2.2. Hidratos de carbono	16
A.4.2.3. Proteínas	17
A.4.2.3.1. <i>Caseínas</i>	17
A.4.2.3.2. <i>Proteínas del suero</i>	18
A.4.2.3.3. <i>Relación entre caseínas y proteínas del suero</i>	19
A.4.2.4. Enzimas, vitaminas y minerales	21
A.3.2.5. Posibles contaminantes	22
A.5. La leche como fuente de oligoelementos	22
A.5.1. Hierro	25
A.5.2. Zinc	28
A.5.3. Necesidad de un aporte adecuado de oligoelementos	31
A.6. Suplementación y fortificación	32
A.6.1. Suplementación	32
A.6.2. Fortificación	33
A.7. Absorción y biodisponibilidad	35
A.7.1. Absorción mineral	35
A.7.2. Biodisponibilidad mineral	37
A.7.2.1. Métodos para el estudio de la biodisponibilidad mineral	40
A.8. Isótopos estables	41

A.8.1. Análisis mediante dilución isotópica (IDA)	43
A.8.2. Análisis mediante deconvolución de perfiles isotópicos (IPD)	44
A.8. Referencias bibliográficas	45
B. OBJETIVOS / OBJECTIVES.....	53
C. EXPERIMENTAL	63
C.1. Instrumentación analítica	65
C.1.1. Masas elementales	65
C.1.1.1. ICP-MS con celda de reacción/colisión.....	65
C.1.2. Masas moleculares	68
C.1.2.1. Fuente de ionización MALDI.....	68
C.1.2.2. Fuente de ionización ESI.....	70
C.1.2.3. Fuente de ionización SSI	72
C.1.3. Cromatografía acoplada a técnicas de masas.....	74
C.1.4. Instrumentación para el tratamiento de muestras biológicas.....	77
C.1.5. Otra instrumentación utilizada.....	77
C.2. Materiales y reactivos	78
C.2.1. Materiales	78
C.2.2. Reactivos generales utilizados	79
C.2.3. Materiales de referencia	80
C.2.4. Isótopos estables	80
C.3. Protocolos de limpieza de material y columnas.....	81
C.3.1. Descontaminación del material utilizado.....	81
C.3.2. Limpieza de columnas cromatográficas	81
C.4. Procedimientos experimentales	82
C.4.1. Procedimiento detallado de la preparación del soporte/material extractante para eliminar trazas metálicas (relleno Chelex 100)	82
C.4.2. Estudio de leche materna y fórmula	83
C.4.2.1. Mineralización de las muestras de leche.....	83

C.4.2.2. Obtención del suero de leche.....	83
C.4.2.3. Procedimiento de recolección y purificación de fracciones cromatográficas	84
C.4.2.4. Digestión trípica de proteínas	84
C.4.2.4.1. Limpieza de muestras mediante Zip-Tip o tips de C ₁₈	85
C.4.2.4.2. Protocolo de digestión trípica (en disolución).....	85
C.4.2.5. Obtención del complejo α -LA+Zn	86
C.4.2.6. Preparación de las muestras de leche para el análisis mediante masas moleculares	87
C.4.3. Estudios in vivo.....	87
C.4.3.1. Preparación del complejo ⁵⁷ Fe ₂ (III)-Lactoferrina	87
C.4.3.2. Preparación de las nanopartículas ⁵⁷ Fe(III)-NPs	88
C.4.3.3. Homogeneización y lisado de los tejidos	88
C.4.3.4. Mineralización de los tejidos, heces y eritrocitos.....	89
C.4.3.5. Preparación de las muestras para al análisis mediante IPD.....	89
C.4.3.6. Homogeneización y lisado de los eritrocitos	89
C.4.3.7. Fraccionamiento celular del hígado por centrifugación diferencial	90
C.4.3.8. Preparación de las muestras para al análisis mediante IPD post-columna	90
C.4.3.9. Procedimiento de recolección y purificación de fracciones cromatográficas.....	91
C.4.3.10. Preparación de la placa MALDI.....	91
C.5. Referencias bibliográficas	92
D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
DI. Determinación total y especiación integrada de zinc en leche humana y fórmula.....	97
DI.1. Cuantificación total de zinc en leche humana y fórmula mediante ICP-MS	99

DI.1.1. Introducción	99
DI.1.2. Métodos de determinación de Zn en leche	100
DI.1.3. Objetivo parcial	103
DI.1.4. Optimización de las condiciones de ICP-MS	104
DI.1.5. Estrategia analítica de cuantificación empleada.....	106
DI.1.6. Muestras de leche objeto de estudio.....	108
DI.1.7. Niveles de Zn encontrados en leche materna y fórmula	109
DI.1.8. Discusión de los resultados obtenidos	112
DI.1.9. Conclusiones del trabajo.....	115
DI.1.10. Referencias bibliográficas	116
DI.2. Especiación de zinc en leche humana y fórmula	119
DI.2.1. Introducción	119
DI.2.2. Objetivo parcial	123
DI.2.3. Especiación de leche mediante cromatografía líquida.....	124
DI.2.3.1. Perfil proteico de leche mediante HPLC-(SEC)-UV-Vis.....	124
DI.2.3.2. Perfil elemental de Zn en leche mediante HPLC-(SEC)-ICP-MS..	128
DI.2.3.3. Especiación cuantitativa de Zn en leche mediante HPLC-(SEC)-ICP-MS e IDA post-columna	131
DI.2.4. Conclusiones del trabajo.....	148
DI.2.5. Referencias bibliográficas	150
DI.3. Identificación de especies de zinc en leche humana mediante espectrometría de masas moleculares	153
DI.3.1. Introducción	153
DI.3.2. Objetivo parcial	159
DI.3.3. Optimización de las condiciones experimentales	160
DI.3.4. Identificación de Zn- α -Lactalbúmina.....	161
DI.3.5. Identificación y cuantificación de Zn-citrato	166
DI.3.6. Conclusiones.....	170
DI.3.7. Referencias bibliográficas	172

D.II. Absorción / biodisponibilidad y metabolismo del hierro desde leches fórmula fortificadas: efecto de la lactoferrina	173
DII.1. Absorción/biodisponibilidad del hierro desde leches fórmula fortificadas: efecto de la lactoferrina	175
D.II.1.1. Introducción	175
D.II.1.2. Absorción del hierro en el organismo	176
DII.1.3. Papel de la lactoferrina en la absorción del hierro	179
DII.1.4. Objetivo parcial	181
DII.1.5. Aplicación del IPD-ICP-MS en el estudio de la absorción/ distribución del hierro	182
DII.1.6. Exactitud en las medidas de las relaciones isotópicas del hierro	184
DII.1.6.1. Interferencias espectrales	185
DII.1.6.2. Tiempo muerto del detector	190
DII.1.6.3. Factor de discriminación de masas	191
DII.1.7. Precisión en las medidas de las relaciones isotópicas del hierro	193
DII.1.8. Validación de la metodología IPD	195
DII.1.9. Síntesis y caracterización de los fortificantes ensayados	196
DII.1.10. Grupos de animales ensayados	198
DII.1.11. Resultados del estudio nutricional	199
DII.1.12. Discusión de los resultados obtenidos	206
DII.1.13. Conclusiones del trabajo	212
DII.1.14. Referencias bibliográficas	215
DII.2. Especiación cuantitativa de hierro en tejidos y fluidos de rata alimentadas con leches fórmula fortificadas: efecto de la lactoferrina	219
D.II.2.1. Introducción	219
D.II.2.2. Objetivos parciales	222

D.II.2.3. Empleo de IPD-post-columna	223
D.II.2.4. Optimización de las condiciones de medida	225
D.II.2.5. Resultados obtenidos	226
D.II.2.6. Discusión de los resultados	235
D.II.2.7. Conclusiones del trabajo	238
D.II.2.8. Referencias bibliográficas	241

D.III. Biodisponibilidad y absorción del hierro desde leche fórmula fortificada con nanopartículas 243

D.III.1. Biodisponibilidad y absorción del hierro desde leches fórmula fortificadas con nanopartículas de hierro 245

D.III.1.1. Introducción	245
D.III.1.2. Objetivos parciales	248
D.III.1.3. Empleo de IPD para el estudio nutricional del hierro	249
D.III.1.4. Optimización de las condiciones de medida	249
D.III.1.5. Síntesis y caracterización de los fortificantes ensayados	249
D.III.1.6. Grupos de animales ensayados	258
D.III.1.7. Resultados obtenidos	259
D.III.1.8. Discusión de los resultados	264
D.III.1.9. Conclusiones	272
D.III.1.10. Referencias bibliográficas	275

D.III.2. Metabolismo del hierro desde leches fórmula fortificadas con nanopartículas de hierro..... 277

D.III.2.1. Introducción	277
D.III.2.2. Objetivos parciales	279
D.III.2.3. Empleo de IPD y optimización de condiciones	280
D.III.2.4. Resultados obtenidos	280
D.III.2.5. Discusión de los resultados	285
D.III.2.6. Conclusiones	291

D.III.2.7. Referencias bibliográficas	293
E. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	295
F. SUGERENCIA PARA TRABAJOS FUTUROS / OUTLOOK.....	301
G. PUBLICACIONES / SCIENTIFIC ARTICLES .	311
G.1. Factor de impacto de las publicaciones de la Tesis Doctoral...	313
G.2. Publicaciones de la Tesis Doctoral.....	314
G.3. Publicaciones relacionadas	315
G.4. Otras publicaciones	315

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

⁵⁷ Fe-NPs	Suplementación con nanopartículas ⁵⁷ Fe(III)
A.C.	Antes de Cristo
ABS	Bicarbonato amónico
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
API	Ionización a presión atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>)
AS	Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico o ácido sinapínico
BCR	<i>Bureau Community Reference</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
C ₁₈	Octadecilo
C ₈	Octil
CDR	Cantidad Diaria Recomendada
CPS	Cuentas por segundo
CHCA	Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
d.i.	Diámetro interno
Da	Dalton (unidad de masa)
DBU	1,8-Diazabicycloundec-7-eno
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDX	<i>Energy Dispersive X-ray spectrometer</i>
EEUU	Estados Unidos
ESI	Ionización por electrospray (<i>Electro Spray Ionization</i>)
et.al.	Et alii del latín “y otros”
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FIP	Fórmulas Infantiles en Polvo
FT-ICR-MS	(<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i>)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

HR-TEM	Mmicroscopio electrónico de transmisión de alta resolución (<i>High Resolution-Transmission Electron Microscopy</i>)
HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias
i+D	Investigación y Desarrollo
IAA	Ácido iodoacético
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i>
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Fuente de Acoplamiento Inductivo (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer</i>)
IDA	Análisis por Dilución Isotópica (<i>Isotopic Dilution Analysis</i>)
IDMS	Dilución Isotópica Espectrometría de Masas (<i>Isotopic Dilution Mass Spectrometry</i>)
IgA, IgG, IgM	Immunoglobulina A, Immunoglobulina G, Immunoglobulina M
IMBB	Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (Grecia)
in.	<i>Inch</i> (unidad de medida)
IPD	Deconvolución de perfiles isotópicos (<i>Isotope Pattern Deconvolution</i>)
IRMM	<i>Institute for reference Materials and Measurements</i>
IT	Trampa de iones (<i>Ion Trap</i>)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC	Cromatografía líquida
MALDI	Espectrometría de Masas mediante Desorción/Ionización con Láser asistida por Matriz (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
mM	milimolar (unidad de concentración)
MO	Microorganismos
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
nESI	Ionización por nano-electrospray (<i>nano-Electro Spray Ionization</i>)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NPG o 2-NPG	2-nitrofloroglucinol
NPN	<i>Non-Protein Nitrogen compounds</i>
NPs	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORS	Sistema de Octapolo de Reacción (<i>Octapole Reaction System</i>)
peek	<i>Polyetheretherketone</i>
PTFE	Politetrafluoretileno

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

qIT	Cuadrupolo Trampa de iones (<i>Quadrupole-IonTrap</i>)
QQQ	Triple cuadrupolo
QqTOF	Doble cuadrupolo tiempo de vuelo (<i>quadrupole-quadrupole-Time-of-flight</i>)
RBCs	<i>Red blood cells</i>
SNF	<i>Solids-non-fat</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSI	Fuente de ionización sónica (<i>Sonic Spray Ionization</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time of flight</i>)
TOF-TOF	Doble tiempo de vuelo (<i>Time-of-flight-Time-of-flight</i>)
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
UNICEF	<i>United Nations International Children's Emergency Fund</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Región Visible Ultravioleta
XRD	Difracción de Rayos X (<i>X-ray powder diffraction</i>)
μM	micromolar (unidad de concentración)



GRUPOS DEL ESTUDIO NUTRICIONAL

MF/AM	Alimentación materna (<i>maternal feeding</i>)
G1	Grupo 1. Fortificación de leche fórmula con Lactoferrina
G2	Grupo 2. Fortificación de leche fórmula con ^{57}Fe (III) $_2\text{-Lf}$
G3	Grupo 3. Fortificación de leche fórmula con $^{57}\text{FeSO}_4$ (baja dosis) y Lactoferrina
G4	Grupo 4. Fortificación de leche fórmula con $^{57}\text{FeSO}_4$ (alta dosis) y Lactoferrina
NF	No fortificado
$^{57}\text{Fe-NPs}$	Suplementación con nanopartículas $^{57}\text{Fe(III)}$

A. INTRODUCCIÓN

A.1. Consumo humano de productos lácteos

El Codex Alimentarius recoge la definición de leche como “la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración ulterior”, indicando que “podrán denominarse *leche* sólo los alimentos que se ajusten a la definición formulada” [1].

La leche está formada por agua, grasa, lactosa, caseína, proteínas de suero, vitaminas, enzimas y minerales (o cenizas) [2] en cantidades que varían dependiendo de la especie animal (ver Tabla A.1.) [3] adecuándose a los requerimientos de la cría que alimenta [4]. A parte de nutrir, la ingesta de leche mejora el sistema inmune protegiendo a la cría contra diversas enfermedades mediante la secreción de anticuerpos (específicos en cada especie). Generalmente, los mamíferos acuáticos poseen mayor porcentaje de grasa (lípidos), y en casi todas las especies el porcentaje de grasa está relacionado con el de proteínas: si uno es elevado, el otro también lo es [5].

	Tipo de leche				
	Humana	Vaca	Cabra	Oveja	Rata
<i>Grasas</i>	4.5	4.5	3.5	5.3	14.8
<i>Proteína</i>	1.1	3.7	3.1	5.5	11.3
<i>Lactosa</i>	6.8	4.9	4.6	4.6	2.9
<i>Cenizas</i>	0.2	0.7	0.79	0.9	1.5
<i>Sólidos totales</i>	12.6	13.8	12.0	16.3	31.7

Tabla A.1. Composición de la leche de algunas especies de mamíferos (por 100 g)

El consumo de productos lácteos ha formado parte de la alimentación del ser humano desde la antigüedad, creyéndose que su punto de inicio pudo tener lugar durante el periodo Neolítico, derivado del inicio de la domesticación del ganado [6,7]. Con la maduración del metabolismo, los individuos adultos de aquella época dejaban de producir *lactasa* (necesaria para la degradación de la *lactosa*) [8], la cual se cree que favorece la absorción de calcio en el intestino y quizá por ello está presente en la leche materna de

todas las especies mamíferas (ver Tabla A.1.) [9]. Hace alrededor de 11000 años, los agricultores aprendieron a transformar la leche mediante un proceso de fermentación en subproductos como el yogur o el queso [6,7], los cuales se digieren con mayor facilidad por contener menores niveles de lactosa.

Durante la edad de bronce (2900-2400 A.C.), una mutación en el gen C/T-13910 [10,11], permitió a individuos de Centroeuropa [6,10,12] continuar sintetizando la enzima lactasa pasada la edad lactante. Con el paso de los siglos, dicha mutación fue extendiéndose paulatinamente por Centroeuropa [7,12], resultando cada vez más común beber leche durante la edad adulta en épocas de escasez de comida. Durante el siglo XIX, el principal uso de la leche continuaba siendo mediante su transformación en queso y mantequilla, mientras la leche líquida era consumida únicamente en caso de enfermedad, vejez y, ocasionalmente, como sustitutivo de la lactancia materna [13]. A finales del pasado siglo XX comenzó a consumirse de manera masiva en Occidente, al ser considerado por los expertos un alimento saludable, seguro y que proporcionaba una gran cantidad de nutrientes [13]. Pero por aquella época, la leche de vaca era un producto que deterioraba fácilmente, capaz de transmitir enfermedades y producir serios problemas digestivos [14].

La revolución industrial, los cambios en el sector agrario, los avances técnicos, científicos y médicos y la regulación estatal que prohibía la adulteración de la leche, hicieron posible un mayor control de los procesos de almacenamiento y envasado para regular su mercado y permitir así la expansión de la leche líquida como alimento. Uno de los avances médicos que más favoreció al sector lechero fue el proceso de pasteurización, que permitía reducir la presencia de agentes patógenos (como levaduras, bacterias, mohos, protozoos, etc.) aplicando para ello un tratamiento térmico (ver Tabla A.2.) [9]. Este proceso fue realizado por primera vez por el microbiólogo Louis Pasteur en 1864 y fue implantado en la industria en 1921 [15].

Ocasionalmente el tratamiento térmico de la leche podía provocar una reducción de compuestos bioactivos y/o promover cambios en las especies presentes en la leche, pudiendo modificar su composición y, en consecuencia, su poder nutritivo [16,17]. Resultaba por tanto de gran interés el estudio de la composición, manipulación y

almacenamiento de la leche con el objetivo de conocer su poder nutritivo para mejorarlo o mantenerlo, pero nunca realizar procedimientos (o favorecer reacciones indeseadas) que pudieran disminuir la calidad del producto final.

Tipo de proceso	Condiciones	Finalidad
CALENTAMIENTO		
Pasteurización	62°C, 30 min 74°C, 15 seg 85°C, 4 seg	Destruir microorganismos (M.O.) patógenos y disminuir el número total de otros M.O.
CALENTAMIENTO		
Esterilización UHT (Uperización)	150°C, 2-4 seg	Destruir todos los M.O. Prolongar la vida útil del producto
Esterilización clásica	110-120°C, 20 min	
HOMOGENEIZACIÓN		Formar emulsión estable. Evitar separación de nata.

Tabla A.2. Procesos que se aplican a la leche para el consumo humano

En las últimas décadas, el consumo de leche y productos lácteos ha estado rodeado de gran controversia [18] asociando su consumo a gran número de patologías como el autismo, cáncer, enfermedades coronarias y digestivas, etc. [9,19]. Sin embargo, se ha comprobado empíricamente que el consumo moderado de leche no incrementa el riesgo de mortalidad [20], sino que permite mantener un peso adecuado [21], estimula la síntesis muscular, mejora la presión arterial y reduce la inflamación. Concretamente, durante los primeros años de edad el consumo de leche está asociado con un mejor desarrollo intelectual y superiores logros académicos [22] y la eliminación en la dieta de productos lácteos en los primeros años de vida disminuye la tasa de crecimiento y aumenta el riesgo de deficiencias nutricionales en la edad adulta [23].

A.2. La leche materna humana

Durante una reunión en 1976, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) aconsejaron encarecidamente a especialistas de todo el mundo fomentar la lactancia

materna para evitar la tendencia de aquellos días por la cual las madres tendían a recurrir a métodos artificiales de alimentación infantil, que podrían resultar inadecuados o podrían tener efectos adversos sobre la salud del lactante [24,25].

A pesar de que la lactancia materna está recomendada durante los seis primeros meses de vida [25,26], el tiempo máximo de lactancia que un niño ha de recibir no está estipulado y se suele prolongar a voluntad de la madre. El sector de la población que rechaza la ingesta de lácteos rechaza también la lactancia prolongada (>12 meses) y se apoya en las razones mencionadas en el apartado anterior para rechazar también el uso de leches fórmula (preparadas a partir de leche de vaca) como alternativa a la leche materna en recién nacidos.

En la actualidad, prácticamente todos los pediatras aconsejan en primera instancia la lactancia materna a todas las madres durante un mínimo de 6 meses, puesto que se ha demostrado su eficacia en la prevención y reducción de enfermedades y en la disminución de la morbilidad y mortalidad en niños [27,28]. De hecho, la OMS celebra anualmente en más de 170 países la Semana Mundial de la Lactancia Materna (del 1 al 7 de agosto), destinada a fomentar dicha práctica [29]. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos en promover esta recomendación, un estudio realizado en España en el año 2001, reveló que sólo el 23.6% de las madres seguían amamantando a sus hijos a los 6 meses [30].

La *leche materna* constituye el primer alimento extrauterino de los recién nacidos, y en la mayoría de los casos, ésta le aportará todos los nutrientes necesarios al inicio de su vida con el fin de garantizar un buen desarrollo físico, psíquico y psicomotor (ver Tabla A.3.) [17]. Además, les protege de frente a enfermedades, ayudándoles a desarrollar su propio sistema inmune [31]. Numerosos autores coinciden en que la alimentación materna durante los primeros 28 días tras el parto está asociada con un mayor volumen craneal (materia gris), mejores resultados en diversos aspectos del desarrollo cognitivo (capacidad lectora, numérica, de atención, percepción visual) y diversos test motores [25,26,32,33]. Además, constituye el alimento más completo para los neonatos puesto que contiene todos los macro- y micronutrientes necesarios para un correcto funcionamiento del organismo, en unas concentraciones adecuadas sus necesidades. Para ello, su composición varía de

manera natural a lo largo de la lactancia [17], dependiendo de la hora del día, entre madres [34] y dependiendo de la edad gestacional.

Componente (Unidades)	Calostro humano*	Leche humana*	Leche de vaca*	Leche formula[35]	Requerido para 300 kJ
<i>Energía</i> (kJ)	240	300	290	65-73	-
<i>Grasa</i> (g)	2.5	4.2	4.0	-	3
<i>Ác. linoleico</i> (mg)	-	400	70	400-607.2	200
<i>Ác. α-linoleico</i> (mg)	-	40	15	-	35
<i>Colesterol</i> (mg)	25	20	13 [†]	-	-
<i>Lactosa</i> (g)	5.0	6.3	4.6	-	5
<i>Otros sacáridos</i> (g)	1.8	1.3	0.1	-	-
<i>Proteínas</i> (g)	1.6	0.8	3.3	1.2-2.1	1.3
<i>Compuestos NPN</i> (g)	0.5	0.5	0.1	-	-
<i>Calcio</i> (mg)	30	35	115	41-67	35
<i>Magnesio</i> (mg)	3.5	3	11	4.6-8.3	4
<i>Zinc</i> (mg)	1	0.3	0.4	-	0.35
<i>Hierro</i> (μ g)	75	80	20	530-900	140
<i>Cobre</i> (μ g)	60	40	2	-	30
<i>Fósforo</i> (mg)	14	14	95	21-43	18
<i>Yodo</i> (μ g)	-	7	5	-	3.5
<i>Vitamina A</i> (RE [‡])	200	80	45	49-78 ^{††}	140
<i>Vitamina D</i> (μ g)	-	0.01	0.06	0.9-7	0.7
<i>Vitamina E</i> (mg)	1	0.4	0.1	0.5-2.1	0.5
<i>Tiamina, B1</i> (μ g)	2	17	45	39-75	30
<i>Rivoflavina, B2</i> (μ g)	30	30	180	73-155	40
<i>Niacina B3</i> (mg)	0.06	0.2	0.5	0.43-1.1	0.2-0.6
<i>Vitamina B6</i> (μ g)	-	6	65	39-57.6	25
<i>Ácido fólico</i> (μ g)	-	5	5	5.9-12	3
<i>Vitamina B12</i> (μ g)	-	0.01	0.4	0.1-0.22	0.1
<i>Vitamina C</i> (mg)	4	4	2.2	6.7-16	6

Tabla A.3. Composición aproximada de leche humana, leche fórmula y requerimientos mínimos para leches fórmula (<6 meses)

* Cantidades por 100g de leche † Leche de vaca desnatada: 2mg

‡ RE: Retinol equivalente = μ g retinol + μ g caroteno/6 †† μ g retinol

Atendiendo a ésta última característica, los neonatos pueden distribuirse en diferentes categorías según la semana en la que haya tenido lugar el parto [17]. No obstante, en la presente Tesis Doctoral sólo se diferenciará entre dos tipos: los recién

nacidos *a término* (AT) o *full term* cuando el nacimiento del bebé se produce tras 36 semanas de gestación y recién nacidos *prematuros* (PT) o *pre-term* cuando tiene lugar antes de 36 semanas.

Según va avanzando el periodo de lactancia, se pueden distinguir varios tipos de leche materna diferentes: la leche *pre-término*, el *calostro*, la *leche de transición* y la *leche madura*. La primera de ellas es segregada por las madres con partos prematuros. Estudios con lactantes prematuros demuestran que la alimentación con leche pre-término disminuye la incidencia de infección y de enterocolitis necrotizante y mejora el desarrollo neurológico, pero puede disminuir el crecimiento ponderal y lineal [17,36]. Ésta, contiene gran cantidad de proteínas y poca cantidad de lactosa, y en ocasiones es necesario utilizar “fortificadores de leche materna” para lograr alcanzar los niveles de elementos esenciales adecuados para el correcto desarrollo del recién nacido prematuro, cuyos requerimientos de micronutrientes son generalmente superiores a los de los recién nacidos a término [36,37], aunque siguen sin estar bien definidos [38]. Un mayor estudio de los requerimientos de los prematuros y su posterior aplicación para proveerles una nutrición mejorada puede mejorar el devenir de dichos neonatos, previniendo además deficiencias nutricionales como enfermedades metabólicas, de maduración y reduciendo o previniendo la anemia.

El *calostro* es rico en inmunoglobulinas, diversas proteínas como la albúmina y la lactoferrina, diferentes aminoácidos, vitaminas liposolubles, minerales y enzimas (Tabla A.3.). Su producción comienza durante los últimos meses del embarazo y finaliza durante los primeros cinco días tras el parto. Su alta concentración de inmunoglobulinas la hace un alimento de vital importancia por su prevención frente a diversas infecciones que pueden afectar al recién nacido.

Posteriormente, entre el cuarto y el sexto día tiene lugar un aumento brusco de la secreción de leche, y es en ese momento cuando comienza a producirse la *leche de transición*, la cual continúa segregándose hasta el décimo día tras el parto. Numerosos estudios confirman que la alimentación trófica temprana con calostro y leche de transición mejora la protección inmunológica y promueve la maduración intestinal del recién nacido [36]. La leche de transición posee un gran contenido de grasa, lactosa y vitaminas hidrosolubles, y su composición va variando hasta alcanzar la composición de la *leche*

madura (del décimo día en adelante). Este último tipo de leche es al cual se le denomina generalmente leche materna de manera general.

Se conoce que la composición de la leche madura varía a lo largo de los siguientes meses de la lactancia (2º, 3º, 4º mes) en diferente medida para cada elemento químico, pero sus variaciones son mucho más leves que las observadas entre los tipos de leche anteriormente mencionados (generados durante el primer mes) [17].

A.3. La leche fórmula

En los casos en los que la leche materna no puede ser administrada al neonato, bien porque la madre no genere leche, porque no opte por la lactancia materna o porque resulte incompatible con la salud de la madre y/o del niño, [31,34,35] se utilizan alternativamente las denominadas *leches fórmula*. Según una encuesta del Consejo de Nutrición Infantil de América, casi el 50% de las mamás que amamantaron durante los seis primeros meses tras el parto, también alimentaron a su bebé con biberones preparados con leche fórmula. Los padres y cuidadores que eligen realizar la alimentación con ambas (leche materna y fórmula infantil) toman esta decisión por una variedad de razones. Actualmente el número de madres que se reincorporan al trabajo es creciente, y pueden no tener tiempo suficiente o el lugar adecuado para extraer una cantidad de leche necesaria para cubrir las necesidades del recién nacido. Por otro lado, ciertas madres pueden tener problemas para amamantar, resultando insuficiente la cantidad de leche materna suministrada al recién nacido o quizá no producir suficiente leche para el apetito del bebé. Otras madres, por ejemplo, desean dar a otros (padres, cónyuges) la oportunidad de participar en la alimentación infantil. Algunas madres se plantean el uso de leche materna donada, pero especialistas recomiendan evitar donantes encontrados a través de redes sociales o internet, y en caso de que los padres se decanten por ésta práctica, recomienda recurrir siempre a profesionales (p.e. bancos de leche). En ningún caso resulta recomendable el uso de leche de vaca para la alimentación de niños menores de doce meses (Tabla A.1., Tabla A.3.) [9,34,39].

Las leches fórmula pueden ser emulsiones líquidas o sólidos pulverulentos para disolver en agua (denominadas fórmulas infantiles en polvo, FIP) [40] las cuales son

preparadas a partir de leche de vaca a la que se les ha añadido vitaminas, elementos esenciales y proteínas para adecuarse del mismo modo a las necesidades del neonato. Las FIP, a diferencia de las líquidas, no son estériles y son un excelente medio para la proliferación de microorganismos potencialmente patógenos, por ello para evitarlo, es necesario extremar el cuidado en las condiciones de producción, almacenamiento y manipulación [40]. Conociendo tal hecho, cabría pensar que las fórmulas líquidas listas para tomar podrían ser las más utilizadas por su seguridad, pero su mayor coste y su menor durabilidad una vez abiertas, las hace menos atractivas para su consumo frente a las sólidas, que son mucho más económicas y de mayor durabilidad.

Las industrias lecheras actuales poseen un gran compromiso con la adecuación de la leche a los distintos tipos de consumidores y, dentro de los productos lácteos destinados a la alimentación de niños, dedican gran parte de sus recursos de i+D al desarrollo de fórmulas lácteas cuya composición se asemeje lo más posible a la leche humana.

A.3.1. Características que ha de tener una leche fórmula

Actualmente existe en el mercado una gran variedad de leches fórmula para adecuarse a las necesidades específicas de los neonatos, entre ellas, se pueden distinguir: leches de iniciación o preparados para lactantes (<4-6 meses de edad); anti-reflujo; fórmulas libres de lactosa (para bebés con el síndrome de intolerancia a la lactosa) o hipoprotéicas (menor contenido proteico); fórmulas hipoalergénicas; de soja; fórmulas específicas para prematuros o de bajo peso al nacer; y leches o preparados de continuación (>6 meses de edad) entre otras.

Los métodos de obtención de la leche fórmula varían ligeramente entre industrias, a pesar de que todas siguen la normativa específica de cada país/continente. Las fórmulas han estado sujetas desde sus comienzos a legislaciones reguladas por los diferentes gobiernos para asegurar que su composición esté dentro de una banda establecida por unas directrices que son aceptadas a lo largo del mundo, permitiendo que los niveles de los nutrientes varíen en un rango específico entre las diferentes fórmulas comerciales existentes [41].

Además, los fabricantes sólo pueden utilizar sustancias nutricionales incluidas en la lista de sustancias permitidas. En EEUU, la introducción en el mercado de nuevas fórmulas o cambios importantes en fórmulas existentes sólo se produce tras comprobar clínicamente la fórmula, al contrario de lo que ocurre en la Comunidad Europea, donde cualquier fórmula que cumpla los requisitos de composición se interpreta como nutricionalmente segura y adecuada [41]. A nivel mundial, el organismo principal que se ocupa de la calidad de los alimentos protegiendo la salud de los consumidores y asegurando las prácticas en el comercio internacional de los alimentos es la Comisión del Codex Alimentarius [24,42], creada por la FAO y la OMS en 1963.

Las agencias gubernamentales que regulan las fórmulas infantiles se han preocupado siempre por la seguridad de las fórmulas y por aspectos como la contaminación con microorganismos, bacterias y partes de insectos [26]. Esta atención refuerza la confianza de la población acerca de que los gobiernos nacionales están asegurando la calidad de las leches fórmula infantiles. Mientras que muchos autores han comentado sobre cuestiones de seguridad relacionadas con las fórmulas infantiles, pocos han prestado atención a otro punto importante. La seguridad es asegurar que el producto no cause daño directo al neonato, pero eso no es suficiente para preparar una leche fórmula de calidad [43]. La calidad de la fórmula para lactantes depende no sólo de su seguridad, sino también de su adecuación nutricional, es decir, que se adecúe a las necesidades del recién nacido para asegurar su correcto aporte de nutrientes [31].

Existen autores que reconocen el esfuerzo de las industrias para mejorar la calidad de las fórmulas, sin embargo, ciertos autores como G. Kent [43] ponen en entredicho la calidad nutricional de las fórmulas criticando la definición de la fórmula en sí misma [44,45] y poniendo en entredicho la adecuación de las legislaciones vigentes. Diversos estudios revelan que los niños alimentados con fórmulas presentan generalmente valores inferiores en diversos indicadores de desarrollo infantil [32] comparados con los alimentados con leche materna. Por ello, Kent afirma que la idoneidad de las fórmulas no ha de basarse en su calidad nutricional sino exclusivamente por los resultados obtenidos tras utilizar las fórmulas como alimento en neonatos y ver si dicho alimento es suficiente para cubrir sus necesidades y evitar o erradicar ciertas enfermedades [43]. Aunque se han hecho esfuerzos para hacer que los resultados nutricionales de los lactantes alimentados

con leches fórmula sean más similares a los de los lactantes amamantados, ha habido un progreso limitado con respecto a los componentes bioactivos que pueden afectar los resultados a corto y largo plazo [46].

Las necesidades nutricionales de los recién nacidos sanos a término (>36 semanas) están razonablemente bien definidas y constituyen la base de las directrices para la composición de los preparados (fórmulas) para lactantes [41], pero en el caso de los niños prematuros (<36 semanas) esta selección es mucho más difícil debido a la heterogeneidad de la población [37], en la cual las necesidades específicas dependerán enormemente de la situación individual y personal del bebé prematuro.

La influencia de los aminoácidos en el desarrollo de los neonatos, su elevada tasa de crecimiento y el hecho de que las fórmulas lácteas infantiles son, en algunas ocasiones, la única fuente de aminoácidos durante la infancia, obligan a considerar cuidadosamente la composición de proteínas y aminoácidos de las fórmulas infantiles [37]. Las proteínas seleccionadas para la creación de nuevas fórmulas infantiles se deberán escoger teniendo en cuenta el papel que desempeñan los aminoácidos que producen más allá de la síntesis y crecimiento de proteínas en el interior del organismo.

A.4. Composición y propiedades de la leche

La leche es por una parte una *emulsión diluida* (suspensión de gotas de un líquido en otro líquido) de glóbulos de grasa que varían entre 0.1-22 μm de diámetro en una fase de plasma, la cual es una *dispersión coloidal* (sistema formado una fase fluida y otra fase dispersa en forma de partículas sólidas muy finas) formada por micelas de caseína (calcio, caseína y fósforo) suspendidas en una fase acuosa (suero) (ver Figura A.1.) que contiene lactosa solubilizada, proteínas de suero globulares y algunos minerales [34,39].

Cuando la leche es digerida, se separa en sus dos subproductos: una parte sólida o emulsión (más cuajada) donde se encuentran las grasas de la leche y otra parte líquida o disolución coloidal (suero de leche) que contiene las proteínas, vitaminas y minerales solubles en agua. La parte sólida es blanca y gelatinosa mientras que el suero es líquido. En el caso de la leche materna, la parte cremosa generada es más ligera y por ello es más

fácilmente digerida que en el caso de la leche fórmula. Es por ello que la industria encargada de desarrollar leches fórmula se está esforzando para generar fórmulas que contengan más parte líquida y menos parte cremosa (donde se encuentran las proteínas en dispersiones coloidales formando micelas [3]), para que así la leche fórmula sea digerida de manera más parecida a la leche materna.

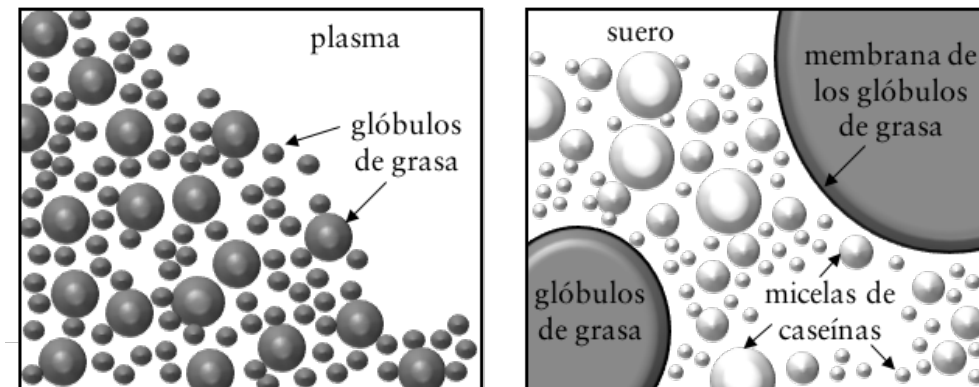


Figura A.1. Esquema de la composición de la leche vista al microscopio con un factor de magnificación de: 500X (izquierda) y 50.000X (derecha).

A.4.1. Propiedades fisicoquímicas de la leche

Entre las propiedades físicas de la leche están: el color, sabor, densidad y especificidad, gravedad, tensión superficial, formación de espuma, viscosidad, calor específico, características eléctricas, conductividad, punto de congelación y ebullición y la refractividad [47,48].

En la industria láctea, la medida de estas propiedades físicas (en la leche y productos lácteos) se realiza para obtener datos fiables que permitan desarrollar equipamientos que permitan determinar la concentración de un componente o un grupo de componentes (p.e. la gravedad específica se utiliza para estimar los “sólidos no grasos” (SNF por sus siglas en inglés *solids-non-fat*) y el punto de congelación se utiliza para determinar el agua añadida), o para asegurar el grado de ejecución de un cambio físico o químico (la valoraciones químicas se utilizan para seguir la acción bacteriana, y la viscosidad para establecer el grado de agregación de micelas de proteínas o de glóbulos de grasa) [34]. La variación natural de dichas propiedades es de gran interés (Tabla A.4.), y la precisión y

disponibilidad de métodos de medida son de gran importancia [39]. No obstante, puesto que dichas propiedades no fueron estudiadas en esta investigación, no serán discutidas en detalle.

	Leche			
	Plasma			
	Glóbulos de grasa	Micelas de caseínas	Suero	
Proteínas globulares			Partículas lipoprotéicas	
<i>Componentes principales</i>	Grasas	Caseína, agua, sales	Proteínas séricas	Lípidos, proteínas
<i>Considerado como</i>	Emulsión	Fina dispersión	Solución coloidal	Dispersión coloidal
<i>Diámetro de partícula</i>	0.1-10 μm	20-400 nm	3-6 nm	10 nm
<i>Densidad (20°C; $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)</i>	920	1100	1300	1100
<i>Visible con</i>	Microscopio	Ultramicroscopio	-	Microscopio electrónico
<i>Separable con</i>	Separador de leche	Centrífuga de alta velocidad	Ultrafiltración	Ultrafiltración
<i>pH isoeléctrico</i>	≈ 3.8	≈ 4.6	4-5	≈ 4

Tabla A.4. Propiedades de los principales componentes estructurales de la leche

Las propiedades estructurales y fisicoquímicas de las proteínas contenidas en la leche [48], las hace vehículos naturales para bioactivos (sustancias químicas presentes en el cuerpo en pequeñas cantidades que intervienen en funciones que conducen al bienestar del organismo), facilitando su utilización para el desempeño de numerosas tareas del metabolismo interno. Entre estas propiedades se encuentran: su capacidad para unir iones y pequeñas moléculas hidrofóbicas (como la micela de caseína que transporta bioactivos hidrofóbicos en el interior del organismo [49]); sus excelentes propiedades de interacción en la superficie; mecanismos de interligado o entrecruzamiento (*crosslinking*); su diferente comportamiento dependiendo del pH del medio; interacciones con otras macromoléculas

para formar complejos y conjugados con combinaciones sinérgicas de las propiedades de sus componentes; su biocompatibilidad y biodegradación siendo capaces de favorecer la entrada de iones, moléculas o drogas (conjugados de BSA y dextrano encapsulando ibuprofeno) en el organismo promoviendo su biodisponibilidad, entre otras funciones [50].

A.4.2. Composición química de la leche

La leche posee una elevada complejidad estructural, puesto que contiene más de 100 compuestos químicos diferentes y conocer su composición química supone un reto de gran interés para la ciencia y la industria. Esto es debido a que está compuesto de un gran número de compuestos: agua, grasa, lactosa, caseína, proteínas de suero, vitaminas, enzimas y minerales (o cenizas) los cuales interaccionan entre sí dentro del propio fluido.

El componente más abundante en la leche es el agua, que constituye en torno al 90% del volumen total de dicho fluido. En el caso de las leches fórmula sólidas (FIP), las recomendaciones del fabricante siempre estipulan disolver el polvo para que el preparado contenga en torno a un 87% de agua, similar al encontrado en leche.

A.4.2.1. Lípidos

La principal fuente de lípidos de la leche proviene de las grasas, las cuales son una importante fuente y reserva de energía acumulándose en el tejido adiposo desde los primeros días tras el nacimiento. Los diversos *ácidos grasos* (saturados, insaturados y poliinsaturados) funcionan como un vehículo para diferentes hormonas y vitaminas liposolubles. Éstos se distribuyen mayoritariamente en el interior de los glóbulos grasos, y en menor medida (<2%) en su membrana y en el plasma de la leche. En la leche de vaca, los glóbulos de grasa son de gran tamaño lo que ralentiza su completa digestión.

Las características funcionales de la grasa dependen enormemente de la naturaleza (longitud y saturación) de los ácidos grasos formados, cuya proporción puede cambiar dependiendo de la manipulación de la dieta, del animal y de cambios estacionales. Generalmente, el cociente entre ácidos grasos poliinsaturados/saturados da una idea de la dificultad para absorber calcio y lípidos. Cuanta mayor proporción de ácidos

poliinsaturados, más alto es el cociente y mayor es la dificultad para absorber calcio de manera adecuada.

Para conseguir que las leches fórmula se digieran mejor, las grasas generalmente utilizadas en las leches fórmula corresponden a aceites vegetales [34] mientras que, en otras ocasiones, algunas fórmulas contienen proteína hidrolizada, la cual ya está parcialmente fragmentada y puede ser más fácilmente digerida [51]. Es por ello que las leches fórmula suelen contener menores cantidades de colesterol comparando con la leche humana (ver Tabla A.3.). Un estudio reciente [52] ha demostrado que la composición total de grasas de diversas especies es similar a la humana, en cambio, existen importantes diferencias en cuanto a la composición de los lípidos que componen dicha grasa. Este hecho hace posible el uso de éstas como un económico material de partida para la preparación de leche fórmula simplemente añadiendo una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados y *1,3-dioleoyl-2-palmitoyglycerol* (actualmente utilizado en leches fórmula [53]) y lípidos de menor tamaño similares a los encontrados en la leche materna.

A.4.2.2. Hidratos de carbono

La *lactosa* (también denominado *azúcar de la leche*) es el hidrato de carbono distintivo de la leche de todas las especies. La lactosa es un disacárido formado por la unión de la D-glucosa y la D-galactosa unidos mediante un enlace β -1,4-glicosídico. Ésta, tiene un débil poder edulcorante, seis veces menor que la sacarosa. A parte de este disacárido, también se encuentran presentes en pequeñas cantidades la sacarosa y ambos monosacáridos libres (galactosa y glucosa).

La cantidad de leche producida por la madre depende de las posibilidades de síntesis de lactosa en la mama (a través de la enzima *lactosa sintetasa*), siendo éste un factor limitante en la producción de leche. Cuanta más lactosa se produce, la concentración osmótica en las células secretoras presentes en la mama se incrementa, incrementándose la cantidad de agua y por tanto incrementando el volumen de leche generado. El tejido mamario isomeriza la glucosa de la sangre transformándola en galactosa y la liga a un resto libre de glucosa a través de un enlace glucosídico para formar de este modo el

disacárido de lactosa [54]. Una menor proporción (10%) de la lactosa producida por la mama se realiza a partir de ácidos grasos volátiles.

La lactosa, además de ser una importante fuente de energía para el organismo [10], se cree que promueve la absorción de calcio de la dieta [9], previene el ataque de microorganismos protegiendo la flora intestinal [55] y además es eficazmente hidrolizada en recién nacidos incluso en niños pre-término [56]. Los niveles de lactosa encontrados en leche humana son superiores a los encontrados en leche de otras especies (ver Tabla A.3.). Algunos antropólogos han relacionado el contenido de lactosa en la leche y la inteligencia, explicando que la galactosa (generada tras la hidrólisis de la lactosa) contribuye a la formación de galactolípidos que son importantes para el desarrollo del sistema nervioso central.

A.4.2.3. Proteínas

La leche está compuesta por un gran número de proteínas específicas que no son encontradas en otros tejidos, clasificadas en dos categorías: caseínas y proteínas de suero.

A.4.2.3.1. Caseínas

El principal grupo son las *caseínas* que poseen una composición de aminoácidos idónea para favorecer el crecimiento y desarrollo de la cría y que corresponden a 4/5 de las proteínas presentes en la leche. Existen diferentes tipos de caseínas presentes en la leche de cada uno de los mamíferos: α_{S1} -, α_{S2} -, β -, γ - y κ -caseínas [39], cada una con una composición de aminoácidos, variaciones genéticas y propiedades funcionales propias de cada variedad. Éstas no tienen una estructura ordenada (no se desnaturalizan con el calor), sino que están formadas por polímeros que contienen un gran número de moléculas que pueden ser idénticas o diferentes. Algunas poseen una parte hidrofóbica y otra hidrofílica por lo que se ordenan espacialmente formando micelas (manteniéndose de este modo como una suspensión coloidal en la leche) que contienen agua y sales (principalmente calcio y fósforo). Las caseínas son por tanto digeridas con facilidad (coagulan o precipitan a pH 4.6), pero la mayor parte de las proteínas de suero son más difícilmente digeridas y algunas logran atravesar el intestino permaneciendo intactas. La leche humana contiene gran cantidad de β -caseína, mientras que en la leche de vaca la mayor parte de caseínas

corresponde a α -caseínas. Cada una posee unas características diferentes lo que les confiere distintas velocidades de tránsito intestinal y vaciado gástrico afectando a la digestión de la leche.

A.4.2.3.2. Proteínas del suero

El resto de proteínas de la leche componen el denominado *suero* o *proteínas de suero*, las cuales no contienen fósforo, pero contienen una gran cantidad de aminoácidos que poseen azufre en su estructura, formando enlaces disulfuro que pliegan la proteína formando estructuras más compactas espacialmente, lo que les confiere el nombre de proteínas globulares, con elevada hidrofobicidad. Estas proteínas permanecen solubles tras la precipitación de las caseínas y además pueden ser separadas entre sí fácilmente mediante diferentes técnicas basadas en sus propiedades físicas como el punto isoelectrico o su tamaño entre otras. Entre ellas, las más abundantes son la β -lactoglobulina y la α -lactalbúmina (cuyas proporciones dependen de la especie) además de albúmina sérica, inmunoglobulinas, lactoferrina, transferrina y muchas otras proteínas y enzimas en menor proporción.

La *β -lactoglobulina* (18.300Da) es la proteína mayoritaria de la leche de vaca (estando ausente de manera natural en la leche humana) y sus propiedades tienden a dominar las propiedades de la leche en su conjunto. Su solubilidad depende fuertemente del pH y de la fuerza iónica del medio. Esta proteína presenta una gran hidrofobicidad y es capaz de unir algunas moléculas apolares como la vitamina A (retinol) y algunos ácidos grasos.

La principal función biológica de la *α -lactalbúmina* (14.200 Da) es actuar como coenzima en la síntesis de la lactosa (formando parte de la enzima *lactosa sintetasa*). Esta proteína tiene un lugar de unión para iones calcio los cuales están fuertemente unidos a la proteína estabilizando su conformación. La reducción del pH hasta 4 conduce la pérdida del catión, lo cual produce una apertura de la proteína, estado en el cual es susceptible a una desnaturalización (por temperatura) a relativamente bajas temperaturas, que resulta irreversible [39]. Tiene además efecto antimicrobiano y mejora en la absorción de algunos elementos como el zinc.

La *lactoferrina* (80.000Da) es la segunda proteína de suero más abundante en la leche humana y es ampliamente conocida por su actividad antimicrobiana y antifúngica ya que altera la pared de los microorganismos causando su muerte y además liga al hierro, privándoles de su alimento. Su contenido en leche humana es superior al encontrado en leche de vaca, presentando la máxima concentración durante el calostro probablemente para proteger al recién nacido frente a posibles bacterias y disminuyendo progresivamente con el periodo de lactancia [57]. Se cree que la lactoferrina puede tener un efecto favorecedor en la absorción del hierro en el intestino.

Las *inmunoglobulinas* son anticuerpos sintetizados (por glándulas secretoras y enviadas a la sangre) en respuesta a la estimulación de diversos antígenos. Están formadas por moléculas de glicoproteínas con composiciones variables dependiendo de la clase e incluso dentro de la misma. Su función principal es inmunizar a la cría y por ello la concentración de anticuerpos es más alta en el calostro y decae con el periodo de lactancia. Existen varias clases de inmunoglobulinas presentes en leche materna: IgG, IgA e IgM. La IgG (150.000Da) es un polímero de dos cadenas pesadas (H o *heavy*) y dos cadenas ligeras (L o *light*) la cual reacciona contra una gran cantidad de antígenos e inhibe el crecimiento bacteriano. La IgA (160.000-385.000Da) está compuesta por dos dímeros unidos por un péptido de unión J, por otro lado, la IgM (900.000Da) es un pentámero de proteínas tipo IgG unidas a través del denominado componente-J que permite su estabilización. y puede ser un anticuerpo frente a grupos polisacáridos (como ocurre en las paredes de las células bacterianas) y actúa especialmente frente a “partículas” (incluidas bacterias y virus) siendo las primeras que aparecen con la exposición al antígeno [39].

La *albúmina sérica* (67.000Da) es una proteína minoritaria presente en el suero y suele estar presente en la leche de diferentes especies animales en similares proporciones.

A.4.2.3.3. Relación entre caseínas y proteínas del suero

La leche humana es pobre en proteínas si la comparamos con las secreciones mamarias de otras especies y contiene 3 veces menos calcio que la leche de vaca (Tablas A.1. y A.3.). Una de las grandes incógnitas de la leche humana es por qué su contenido proteico total es tan bajo (9 g/L) cuando se compara con otras especies como la leche de

vaca (35 g/L) [58]. Además de ello, la proporción de las proteínas que lo forman es diferente. En el caso de la leche humana la relación entre proteínas de suero y caseínas es de 80/20-60/40 (progreso producido desde el calostro hasta la leche madura) mientras que en la leche de vaca esta relación es de 20/80.

En el caso de la leche de vaca, la caseína representa aproximadamente el 80% del total de las proteínas presentes en la leche (siendo la α -caseína la más abundante), estando en el suero o fase acuosa de la leche el 20% restante [9]. Dentro de éste 20% existe una proteína que no está presente en la leche humana, la β -lactoglobulina, principal causante de alergias relacionadas con la leche [59] y aparentemente relacionada con el desarrollo de diabetes tipo I en menores de 18 meses [60] en niños alimentados con preparados a base de leche de vaca (leches fórmula). La posible causa sería una interacción de esta proteína con la superficie de células productoras de insulina. En la leche materna, al contrario que ocurre en la de vaca, el contenido de caseína es únicamente de un 20% (con un gran porcentaje de β -caseína) y el 80% de proteínas están presentes en el suero de la leche en una dispersión coloidal formando micelas [9].

A pesar de que las leches fórmula tratan de imitar la relación (caseínas:proteínas de suero) observada en leche humana, la leche a partir de la cual se produce (leche de vaca) contiene β -lactoglobulina como proteína más abundante, mientras que en leche humana la proteína predominante es la α -lactalbúmina. Es por ello que algunas fórmulas adoptan recetas enriquecidas con α -lactalbúmina, lo que además disminuye el contenido proteico, aliviando a los bebés de la alta carga de nitrógeno que produce un alto contenido proteico en las fórmulas. Es importante recordar que la β -lactoglobulina no se encuentra de manera natural en la leche humana, pero puede ser encontrada en leche humana de madres que consumen habitualmente leche de vaca, lo cual sugiere que esta proteína puede ser absorbida de manera intacta desde el tracto gastrointestinal y ser posteriormente transportada hasta la leche materna. Este hecho es de gran importancia para neonatos con alergias a leche de vaca, y también a la hora de proceder a la identificación de proteínas en la leche materna.

A.4.2.4. Enzimas, vitaminas y minerales

Existen numerosas enzimas que están presentes en la leche humana, las cuales participan en numerosos procesos biológicos, protegiendo contra microorganismos e incluso ayudando a la propia digestión de la leche en el estómago del recién nacido. La *lactoperoxidasa* es una enzima de gran estabilidad térmica y muy abundante en leche de vaca y casi inexistente en leche humana. Por el contrario, la *lisozima* está presente en leche humana pero no en leche de vaca, y es la encargada de potenciar la función defensiva de la lactoferrina, disolviendo la pared de los microorganismos patógenos. La lipoproteína *lipasa* está asociada a las micelas de caseínas y es encargada de degradar las grasas. Por otro lado, la *plasmína* es una proteasa de actividad similar a la tripsina, de origen sanguíneo y es resistente al calor incluso en procesos severos [61]. Por otro lado, la *fosfatasa alcalina* se utiliza como indicador del proceso de pasteurización debido a su sensibilidad al calor, si la leche está correctamente pasteurizada, la fosfatasa alcalina está inactiva.

Entre los componentes minoritarios y micronutrientes se encuentran las *proteínas no-nitrogenadas* (NPN) como: nucleótidos, urea, creatinina y aminoácidos libres (ácido glutámico, taurina, alanina y serina). Existen además diversas *vitaminas* solubles en grasa como el retinol (vitamina A), calciferol (vitamina D), α -tocoferol (vitamina E) y fitomenadiona (vitamina K). Además de las hidrosolubles (ácido ascórbico (vitamina C), tiamina (B1), rivo flavina (B2), niacina (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), ácido fólico (B9), cobalamina (B12) y biotina (vitamina H, B7 y B8). (Ver Tabla A.3.)

La leche posee además *minerales* como el calcio, fósforo, potasio, hierro, magnesio, sodio o zinc los cuales están presentes como iones o asociados a otras moléculas o proteínas de diversos tamaños. Muchos minerales están asociados entre sí formando sales como el fosfato de calcio. En leche, aproximadamente el 67% de calcio, el 35% de magnesio y el 44% del fosfato son sales unidas a las micelas de caseína que permanecen solubles en el suero. La leche contiene pequeñas cantidades de selenio, cobre, hierro, manganeso, sodio, zinc y otros elementos. Estos elementos serán comentados en detalle en la próxima sección.

A.4.2.5. Posibles contaminantes

A veces se detecta la presencia de contaminantes que pueden empeorar la calidad de la leche o producir efectos dañinos en el organismo [62] y, para evitarlo, es necesario llevar a cabo estudios para detectar su presencia y cuantificar su concentración, para lo cual la Química Analítica consta de numerosas metodologías dependiendo del analito a detectar/cuantificar. Entre ellos se encuentran: elementos potencialmente tóxicos como As, Cd, and Pb [63], sustancias prohibidas, micotoxinas o compuestos orgánicos (DDT, PCBs, dioxinas).

A.5. La leche como fuente de oligoelementos

El cuerpo humano está compuesto por numerosos elementos químicos que son obtenidos mediante la ingesta de agua, grasas, carbohidratos y proteínas. De entre todos ellos únicamente siete (Fe, Zn, Cu, Se, I, Cr, Co) son considerados *elementos traza esenciales* u *oligoelementos* [64]. Esta denominación surge de que, a pesar que se encuentran en bajas concentraciones en el organismo, son de vital importancia para asegurar su correcto funcionamiento. Algunos de los oligoelementos controlan importantes procesos biológicos facilitando la unión de moléculas a sus sitios receptores en la membrana celular, alternando las estructuras o la naturaleza iónica de la membrana para prevenir o permitir que moléculas específicas entren o salgan de una célula e inducir la expresión génica resultante en la formación de proteínas implicadas en procesos vitales.

Para que un elemento químico se considere *esencial*, han de cumplirse una serie de requisitos: el organismo no puede crecer ni completar su ciclo vital sin ese elemento, puesto que éste posee una influencia directa en sus procesos metabólicos. Además, las funciones concretas que realiza en el organismo no pueden ser sustituidas totalmente por ningún otro elemento, y una ingesta insuficiente del elemento produce deficiencias en dichas funciones que únicamente pueden ser revertidas a través de la ingesta del propio elemento [65,66]. Debido a su carácter esencial y a la incapacidad del ser humano para sintetizar dichos elementos, es necesario aportarlos mediante la alimentación. Es por tanto necesario hablar de requerimientos diarios o ingesta recomendada, es decir, estipular cuales son los

niveles diarios necesarios para asegurar un buen funcionamiento del organismo evitando el riesgo de sufrir patologías derivadas de su deficiencia.

El *requerimiento promedio* es la ingesta que es suficiente para satisfacer los requerimientos de la mitad de los individuos en un grupo de población dado. Si el requisito de nutrientes en un grupo de población tiene una distribución estadística normal, significa que una ingesta equivalente al requisito promedio es suficiente para el 50% de los individuos de ese grupo, pero insuficiente para el 50% restante (ver Figura A.2.). Para muchos nutrientes, el requisito promedio puede usarse para estimar cuántas personas en un grupo de población están ingiriendo muy poco del nutriente en cuestión.

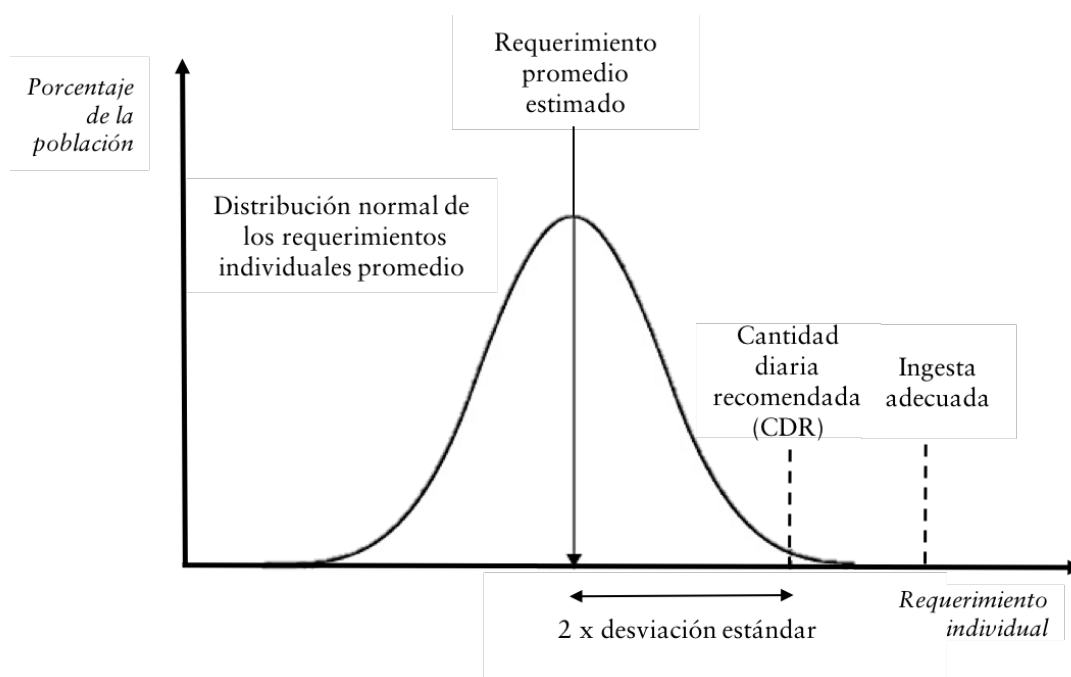


Figura A.2. Requerimiento promedio estimado (suficiente para la mitad de la población) y la cantidad diaria recomendada (suficiente para casi todo el mundo) para un determinado nutriente

La *cantidad diaria recomendada* (CDR) es la ingesta que resulta suficiente para satisfacer las necesidades de la mayor parte de los individuos (97.5%) en un grupo de población determinado. Para muchas personas, la CDR excede sus requerimientos reales. Una menor ingesta no significa necesariamente que la persona en cuestión está desarrollando un déficit (ver Figura A.2.). Además de para elementos traza esenciales,

estos conceptos son aplicables a vitaminas y elementos mayoritarios (Na, K, Mg, Ca, Cl y P).

En el caso concreto de los elementos traza esenciales u oligoelementos, el requerimiento promedio, la cantidad diaria recomendada y la ingesta adecuada de un individuo estarán todas dentro del *rango óptimo* de concentraciones en las que un elemento traza puede estar presente su organismo para mantenerlo en un estado óptimo de funcionalidad (ver Figura A.3.). Dentro de dicho rango, la respuesta del organismo es óptima repercutiendo en el bienestar del individuo. Si la concentración en el organismo fuera inferior o superior a dicho rango, se pueden presentar patologías derivadas de su deficiencia o toxicidad, respectivamente. Dichas deficiencias están relacionadas directamente con el oligoelemento cuya concentración está fuera del rango óptimo.

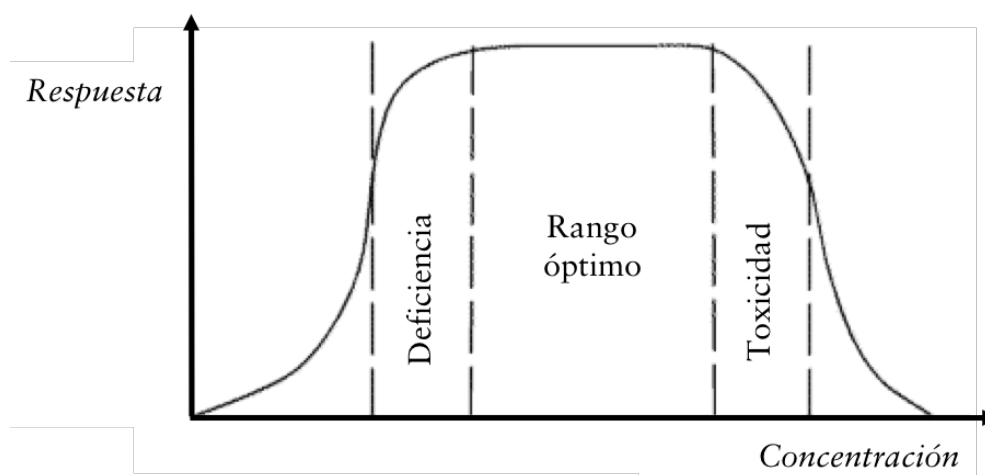


Figura A.3. Relación entre la concentración en el organismo de un elemento traza esencial y la respuesta (funcionalidad) del organismo

En el caso concreto de los recién nacidos, el aporte de los oligoelementos anteriormente mencionados se realiza a través de la leche (materna o fórmula), la cual constituye el principal alimento de los neonatos, estando íntimamente ligado la ingesta de elementos esenciales con su adecuado desarrollo físico y psicosomático. Es por ello que el estudio de la composición de la leche que se utiliza como alimento para neonatos resulta de gran importancia para conocer si existe un aporte adecuado de los elementos requeridos, para evitar posibles estados de deficiencia.

La presente Tesis Doctoral se ha enfocado en el estudio de dos de los oligoelementos más abundantes en el organismo: el hierro (Fe) y el zinc (Zn), los cuales participan activamente en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos de vital importancia para un buen funcionamiento del organismo.

A.5.1. Hierro

Este elemento es el oligoelemento o elemento traza esencial más abundante en el organismo, esencial para los seres vivos. La mayor parte del hierro presente en el organismo (67%) se encuentra asociado a la hemoglobina, una proteína compuesta por cuatro subunidades, cada una con un grupo hemo, que consiste en el ligando porfirina con un átomo de hierro, y una cadena proteica. Ésta tiene como función principal el transporte de oxígeno desde los pulmones hacia el resto del cuerpo. Otro 3.5% se encuentra unido a la mioglobina, una proteína hémica capaz de almacenar oxígeno, que se encuentra localizada principalmente en el músculo esquelético y cardiaco. Una menor proporción (3%) se encuentra unido a diferentes enzimas, como los citocromos que poseen un grupo hemo y proteínas con núcleos hierro/azufre que intervienen en procesos de transferencia de electrones y fosforilación oxidativa. El resto (25%), se encuentra ligado a proteínas que intervienen en la homeostasis y metabolismo del elemento, interviniendo en su almacenamiento (ferritina y hemosiderina) o en su transporte (transferrina) (Figura A.4.).

Atendiendo a la función que realizan en el organismo cada una de las proteínas que contienen hierro, éste puede clasificarse en tres compartimentos: funcional, transporte y depósito. El compartimento *funcional* está formado por diferentes compuestos como la hemoglobina, mioglobina, y enzimas que requieren hierro como cofactor (o como grupo prostético), bien en su forma iónica o como grupo hemo, para realizar su función en el organismo. El estado de éste compartimento se puede controlar mediante los niveles de hierro en los eritrocitos o glóbulos rojos (*RBCs* en inglés). El departamento de *reserva o depósito* almacena el exceso de hierro a través de la saturación de ferritina y en menor medida como hemosiderina. Ambas se encuentran mayoritariamente en el hígado, médula ósea, bazo, músculo esquelético e incluso se pueden encontrar en bajos niveles en la circulación sanguínea [67].

A. INTRODUCCIÓN

Ambos compartimentos están interconectados por el tercer compartimento: el de *transporte*. El hierro es transportado en el plasma mediante transferrina (Tf), una molécula portadora de hierro, que se une a los receptores de transferrina en la superficie celular.

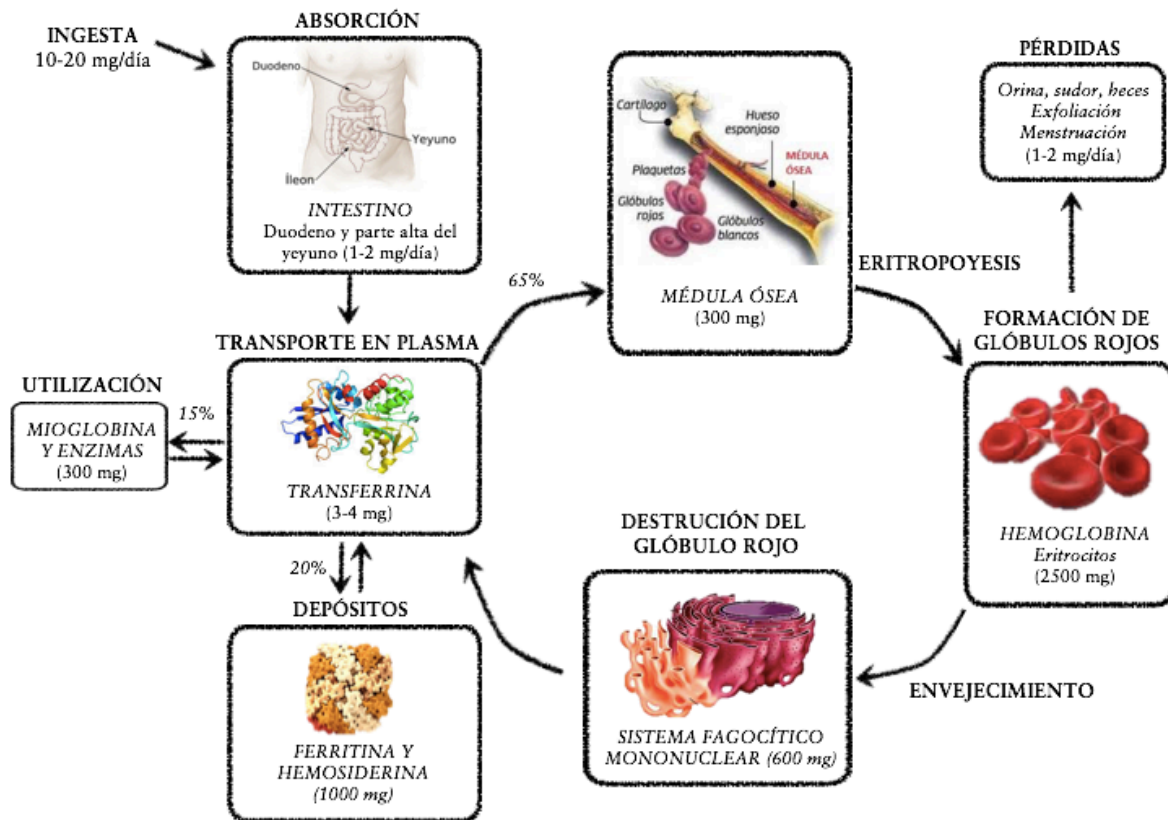


Figura A.4. Esquema del ciclo biológico del hierro en el ser humano

Este bioelemento es esencial para asegurar un buen funcionamiento del organismo, sin embargo, un exceso de hierro es potencialmente tóxico y provoca daños celulares y la formación de radicales libres [68]. Bajo condiciones fisiológicas normales, del hierro total ingerido (10-20 mg), únicamente un 10% es captado en el duodeno y parte alta del yeyuno en presencia de pH ácido. Dicho proceso depende de numerosos factores y será explicado con mayor detalle en el Capítulo II. El hierro es transportado en el plasma unido a la transferrina que lo lleva hasta las células de la médula ósea, se utiliza gracias a la mioglobina y diversas enzimas. En el caso de que haya un exceso de hierro, la Tf transporta el exceso de hierro hacia los depósitos, donde se almacena en la ferritina y/o hemosiderina. El hierro en la médula ósea se utiliza para la formación de los glóbulos rojos, los cuales

tienen un periodo de vida determinado (120 días), pasado ese tiempo son destruidos por los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear principalmente en el bazo, hígado y médula ósea. El hierro ahí contenido se enlaza con la Tf quien se encarga de transportarlo para la formación de nuevos RBCs, para realizar diversas funciones o hacia el hígado para su almacenamiento. Entre los numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos para los que puede ser utilizado el hierro se encuentran el transporte de oxígeno a los tejidos, la síntesis de ADN, y el transporte de electrones. Mientras que el hierro encontrado en los compartimentos funcional, de transporte y los diversos tejidos suele permanecer constante, el Fe del compartimento de reserva varía en función de la cantidad presente en el organismo y la disponibilidad del hierro en la dieta. Parte del Fe se pierde mediante la orina, heces, menstruación, o sudor; sin embargo, a diferencia de otros metales, el cuerpo no tiene ningún mecanismo fisiológico para excretar hierro a través del hígado o los riñones y es por ello que el balance del metabolismo de este elemento en el organismo tiene gran repercusión. Por ello, la homeostasis o regulación adecuada del conjunto de reacciones químicas en las que participa (metabolismo y concentraciones de Fe en los tejidos) es de vital importancia para mantener un estado de salud óptimo.

Si no se alcanzan los niveles adecuados de ingesta diaria, pueden aparecer diversas patologías derivadas de su deficiencia como son la síntesis proteica deficiente, deficiencias en el sistema inmune, incremento del ácido láctico, incremento de la cantidad de noradrenalina y enfermedades cardiopulmonares. Sin duda alguna una de las patologías más importantes debidas a una deficiencia de hierro es la anemia, la cual está caracterizada por una baja hemoglobina, disminución de los depósitos de hierro y bajos niveles séricos de hierro y ferritina. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la deficiencia de hierro se considera el primer trastorno nutricional en el mundo. Esta deficiencia de hierro ocurre generalmente durante el periodo de crecimiento o cuando la cantidad ingerida no es capaz de contrarrestar un detrimento de hierro asociado a una pérdida de sangre.

Para mantener el buen funcionamiento del organismo, es necesario un aporte diario de hierro que varía según el sexo y la edad del individuo. Para el recién nacido, la leche materna es el alimento ideal pese a que contiene niveles bastante bajos de hierro (0.2-0.4 mg/L). Sin embargo, la elevada eficacia del hierro para ser aprovechado desde leche materna resulta en una menor incidencia de deficiencia de hierro en los lactantes

amamantados. Los niños no amamantados deben ser alimentados con leches fórmula a las que se le haya añadido una cantidad determinada de hierro con el objetivo de prevenir deficiencias de hierro (anemia), no obstante, el aprovechamiento del hierro desde las leches fórmula no es tan elevado como en la leche materna y por ello son necesarios los estudios enfocados a mejorar este aspecto.

Por otro lado, la ingesta excesiva de hierro causa irritación gástrica, dolor abdominal, diarrea, estreñimiento, náuseas, vómitos, pudiendo incluso a producir la muerte.

A.5.2. Zinc

El zinc, es el segundo elemento traza esencial más abundante en el organismo, encontrándose en el músculo esquelético (57%), huesos (29%), y diversos órganos como piel (6%), hígado (5%), cerebro (1.5%), riñones (0.7%) y corazón (0.4%) [69,70]. El zinc está compartimentado en la célula donde las concentraciones totales de zinc son tan altas como las de algunos metabolitos mayoritarios (≥ 0.25 mM). Allí es almacenado en orgánulos y es liberado y distribuido dinámicamente por al menos 24 transportadores de zinc y alrededor de una docena de metalotioneínas (MTs, proteínas más abundantes ricas en cisteína que contienen zinc) [71]. Dichos reguladores y transportadores son quienes controlan la homeostasis de este elemento dentro de la célula de manera precisa. Es por ello, que la expresión y la regulación de estos transportadores y las interacciones del zinc con otros iones ayudan a entender la patogénesis de las enfermedades relacionadas con el zinc [72], además de ser capaz de determinar la progresión de numerosas enfermedades [73]. Por ejemplo, se ha observado cómo el aporte de Zn en forma de suplemento adicional a la dieta resulta muy beneficioso para el tratamiento de la diarrea aguda en niños [74], y produce efectos positivos en los parámetros hematológicos, en la función cardiorrespiratoria y promoción de fuerza en el caso de atletas y personas sanas [75].

El carácter indispensable del zinc se induce claramente observando la cantidad de proteínas a las que se asocia y las numerosas funciones del organismo en las cuales está involucrado, tal y como puede observarse en la Tabla A.5.. Este elemento es un factor clave en más de 200 reacciones enzimáticas (actuando como cofactor), influye en las

membranas celulares y en la estructura de las proteínas (estabilizando su estructura cuaternaria), posee una función antioxidante y por ello la pérdida de zinc en las membranas biológicas aumenta la susceptibilidad de la célula al daño oxidativo y afecta a su función. Además, está involucrado en el curado de heridas y participa en la percepción de distintos sentidos como la vista, el olfato y el gusto, así como la coordinación manual-visual.

Funciones fisiológicas del zinc	Síntomas y signos de la deficiencia de zinc
Función cerebral (neuromodulador en las sinapsis) Respuesta frente al stress Mantiene la homeostasis de los tejidos epiteliales Citoprotector: propiedades antioxidantes, antiapoptóticas y antiinflamatorias Metabolismo del hueso Crecimiento e integridad celular Maduración sexual. Fertilidad y reproducción Mantenimiento de la función ocular normal. Sentido del gusto y del apetito. Visión nocturna Agente inmunorregulador Función cardiorrespiratoria Regulación de la presión sanguínea	Retraso en el crecimiento corporal Alteraciones esqueléticas Anorexia Alteraciones en la madurez sexual y la capacidad reproductiva Depresión de la función inmune Ceguera nocturna Dermatitis Alopecia Diarrea

Tabla A.5. Funciones fisiológicas, síntomas y signos de deficiencia de zinc

El zinc actúa también como neuromodulador de la sinapsis, produciendo neurotransmisores celulares y es de vital importancia para el crecimiento y la división celular, característica de gran importancia durante el embarazo y el desarrollo fetal [65,76,77]. Al inicio del embarazo, un suministro adecuado de zinc materno es esencial para llevar a cabo la embriogénesis, puesto que éste participa en la regulación de la estructura y función de la cromatina (encargada de formar el material cromosómico durante la interfase), y con ello, la expresión de genes esenciales para el desarrollo del embrión, influyendo en el fenotipo final de todos los órganos [76]. Por otro lado, la

importancia del Zn en la maduración sexual, mental y el desarrollo de adecuadas conexiones neuronales ha sido ampliamente estudiada y reportada por numerosos autores [78].

La mayoría de la acumulación fetal de zinc se produce después de la semana 24 de gestación, momento a partir del cual las concentraciones de zinc fetal aumentan de manera constante. El zinc obtenido por a través del cordón umbilical se almacena en el hígado fetal, y el transporte y acumulación de éste elemento está mediada por MTs. Durante el último trimestre, la madre transfiere al feto hasta 1.5 mg de zinc /kg/día [76]. El alto riesgo de deficiencia de zinc en neonatos prematuros deriva de una combinación de tres factores principales: (a) bajas reservas corporales debido al tiempo reducido para la transferencia placentaria de zinc; (b) la ingesta potencialmente insuficiente, y (c) el aumento de las pérdidas endógenas [73].

El requerimiento de zinc en niños prematuros oscila entre 1.1-2.0 mg/kg/día [79], mientras que en el caso de los niños a término (de 0 a 6 meses) es de alrededor de 2 mg/día [75, 80]. La cantidad diaria recomendada (CDR) durante 0-6 meses se calculó multiplicando la ingesta media de leche materna (0.78 L/día) y la concentración promedio de zinc en la leche materna en los primeros meses postparto. La posibilidad de que la concentración de zinc pueda interactuar con otros elementos como el cobre, hace que la cantidad de zinc diaria ingerida recomendada no alcance niveles superiores, aunque se ha estudiado que si existe una relación zinc:cobre inferior a 20:1 no se observa interacción entre ambos elementos en la suplementación de prematuros [79].

La deficiencia de éste elemento es un problema de importancia global, puesto que ello conlleva a numerosos estados de morbilidad (estado insalubre de un individuo) y mortalidad (Tabla A.5.) [81]. Una disminución del contenido de zinc en el organismo disminuye la actividad inmunológica, genera diversos problemas hormonales (de crecimiento y maduración sexual) e incluso el proceso de cicatrización de heridas se ve comprometido. Además, puede provocar pérdida de apetito, alopecia, diarrea, lesiones oculares y cutáneas e incluso impotencia en hombres. En el caso concreto de los recién nacidos, quizá una de las consecuencias más importantes es el detrimento de su función cognitiva, provocando problemas neurológicos y psicológicos [77].

En el caso de los recién nacidos, el límite máximo de ingesta diaria está establecido en los 4 mg/día. Una ingesta puntual de zinc muy elevada o de suministrada de forma crónica a través de suplementos nutricionales puede causar desde alteraciones digestivas (náuseas, vómitos, dolor abdominal) a calambres musculares, y en algunos casos causar síntomas parecidos a los de la gripe, fiebre, fatiga, vómitos, deshidratación, además de interferir con las funciones de otros oligoelementos como el cobre y el hierro []. No obstante, el rango de concentraciones entre los cuales el zinc puede estar en el organismo sin presentar ningún efecto o adverso es muy amplio, de tal modo que no es común que se produzcan intoxicaciones por una ingesta elevada de este elemento [82]. Se conocen pocos estudios que reflejen efectos adversos por una ingesta excesiva de zinc, más allá de deficiencias sintomáticas de deficiencia de cobre en niños debido a una suplementación de Zn prolongada cobre [83].

A.5.3. Necesidad de un aporte adecuado de oligoelementos

Las necesidades de oligoelementos en los recién nacidos están afectadas por diversos factores clínicos como: el peso de nacimiento, la edad gestacional en la que se produjo el alumbramiento (a término o prematuro) o las enfermedades que puedan padecer y su elevado ritmo de desarrollo les hace más propensos a presentar deficiencias de oligoelementos. Generalmente, la alimentación exclusiva con leche materna está considerada la forma más adecuada para alcanzar las necesidades nutricionales en niños a término durante los primeros 6 meses de vida [25,26].

Si se ha optado por alimentar al recién nacido con leche fórmula, ésta debe poseer una concentración de elementos suficiente como para cubrir los requerimientos del neonato. La adición de estos oligoelementos a las leches está regulada mediante normativa específica [1] y, a pesar de que generalmente las leches fórmula contienen mayor cantidad de oligoelementos que los encontrados en leche materna, es común encontrar niños que presentan patologías derivadas de la deficiencia de ciertos elementos esenciales.

Se plantea entonces la necesidad de llevar a cabo acciones que eliminen o al menos disminuyan la aparición de estas situaciones de riesgo de deficiencia, mediante el empleo de sustancias que le proporcionen la cantidad de elemento restante para asegurar su buen

funcionamiento. Este aporte puede realizarse de manera externa (como un complemento a la alimentación) o bien incluyendo dicho aporte en el alimento. Este objetivo se desarrolla través de la suplementación o fortificación, conceptos que serán descritos en el siguiente apartado.

A.6. Suplementación y fortificación

Al inicio de la presente Tesis Doctoral se utilizaban ambos términos indistintamente para referirse a “la ingesta adicional de un nutriente que generalmente no es obtenido en la cantidad adecuada mediante la dieta diaria”, puesto que la información de la cual disponía así lo proponía. Inicialmente, la ligera diferencia que se proponía para discernir entre suplementación y fortificación residía en el modo en el que fuera realizado dicho aporte al alimento. En los casos en los que el alimento ya disponía del elemento a añadir se hablaba de *suplementación* (por ejemplo, leche suplementada con una mayor concentración de calcio), mientras que en caso de que el alimento no contuviera dicho nutriente y éste fuera añadido a posteriori para mejorar su aporte nutricional, se hablaba de *fortificación* (tal es el caso de cereales fortificados con 7 vitaminas y hierro). Éste punto de vista fue el que se utilizó durante la escritura de los primeros artículos recogidos en la presente tesis doctoral.

Una profundización en el tema corroboró que existen diferencias entre las definiciones utilizadas al inicio de éste trabajo y las que son empleadas actualmente por gran cantidad de autores [84,85,86]. Para facilitar la comprensión del presente texto y mantener una uniformidad con la bibliografía actual, se ha optado por adoptar las definiciones de suplementación y fortificación que son actualmente utilizadas. Éstas serán definidas brevemente en los siguientes apartados, donde se comparará además sus similitudes y diferencias con el objetivo de clarificar ambos conceptos.

A.6.1. Suplementación

Los *suplementos alimenticios* (*food supplements o dietary supplements*) son vitaminas y minerales altamente concentrados producidos por industrias farmacéuticas en forma de comprimidos, cápsulas, tabletas, pastillas o inyecciones, administradas a los

individuos como parte de campañas de nutrición específicas o del cuidado general de la salud [87,88]. Su utilización para mejorar la salud de un individuo se conoce por tanto como *suplementación*. Organizaciones como UNICEF fomentan el uso de suplementos (como vitamina A, hierro y yodo) en grupos de riesgo de poblaciones desfavorecidas, puesto que se ha comprobado que su empleo disminuye el riesgo de deficiencia de dichos elementos, mejorando la salud de los individuos suplementados. Entidades como el Banco Mundial corroboran que el coste de la suplementación es muy bajo en determinados elementos teniendo en cuenta los beneficios que aporta realizar estas suplementaciones a poblaciones de riesgo, especialmente en niños en países en vías de desarrollo [89,90] (Tabla A.6.).

A.6.2. Fortificación

La *fortificación alimenticia* (*food fortification*) está enfocada a la adición o aporte de nutrientes esenciales en alimentos. Alimentos que contengan, por tanto, nutrientes exógenos se indica que están *fortificados* (independientemente de si antes poseían o no dicho nutriente en su composición). La FAO recomienda a los gobiernos de países con altos índices de malnutrición que consideren la fortificación de ciertos alimentos con elementos esenciales (como por ejemplo con vitamina A, hierro o yodo) apoyándose en la regulación que la propia organización propone en colaboración con la *Codex Alimentarius Commission* quienes elaboran regulaciones aplicables a diferentes tipos de alimentos dependiendo del elemento fortificado (Tabla A.6.) [42].

La fortificación alimentaria resulta atractiva puesto que no requiere que la parte de la población que se va a favorecer de dicho proceso modifique su dieta, sino que las fortificaciones pueden ser implementadas por la industria alimentaria resultando beneficiados así un mayor número de consumidores [27]. Se han realizado pocos estudios acerca del coste de la fortificación de nutrientes, pero con los datos de los que se dispone [90], el Banco Mundial estima que la fortificación de alimentos resulta eficiente y efectiva respecto al coste que supone llevarla a cabo.

Surge aquí el concepto de *enriquecimiento*, el cual se aplica generalmente a una fortificación realizada a un alimento que poseía un elemento químico que, debido al procesado o tratamiento de la muestra (por ejemplo, UHT en el caso de la leche) ha

perdido gran parte (o la totalidad) de dicho elemento. La fortificación se utiliza en este caso para enriquecer la muestra con un elemento o compuesto cuya concentración disminuyó pero que inicialmente estaba presente en el alimento.

Ambos conceptos de suplementación y fortificación son criterios que están asociados, pero poseen diferencias palpables (como puede observarse en la Tabla A.6.), puesto que la suplementación tiene como objetivo final la prevención y el tratamiento de enfermedades derivadas de la deficiencia de un nutriente mientras que la fortificación es comúnmente utilizada para prevenir dichas deficiencias en los individuos sanos. La gran utilidad de la fortificación de alimentos se observa en el claro descenso del riesgo de presentar patologías derivadas de la deficiencia de nutrientes en países en vías de desarrollo [27].

Suplementación	Fortificación
Dosis elevadas y frecuentes	Dosis pequeñas
Menor cobertura	Amplia cobertura
Bajo coste	Coste inferior
Múltiples puntos de contacto	Única distribución
Mayores recursos humanos	Único programa
Frecuentes/ Múltiples programas	Monitorización constante para la regulación de su producción y distribución
	Sostenible a largo plazo
Mayores efectos adversos	Menores efectos adversos
	Identificación de la comida idónea
	Correcta dosis/Biodisponibilidad
Recordatorios regulares	

Tabla A.6. Diferencias entre suplementación y fortificación

Ciertamente, los conceptos de suplementación y fortificación coinciden con la idea inicial de “añadir un nutriente a la dieta”, y es lógico pensar que el desarrollo de estrategias de suplementación, pueden ser de gran utilidad también para la fortificación de alimentos si dicho nutriente está en una forma fisicoquímica que no interacciona con el resto de componentes del alimento y se mantiene su integridad química.

Es por ello que el objetivo actual de la industria alimentaria reside en buscar formas fisicoquímicas de elementos químicos (oligoelementos o elementos traza esenciales como el Fe, Zn) que reduzcan el coste de producción mejorando la efectividad del suplemento/fortificante. Para diferenciar dicha efectividad es preciso conocer su comportamiento en el cuerpo una vez que es ingerido, para alcanzar dicho propósito se llevan a cabo estudios en los cuales se trata de discernir entre las diferentes formas fisicoquímica propuestas para llevar a cabo la suplementación/fortificación de un elemento dado. Para ello, resulta necesario introducir dos nuevos conceptos de gran importancia para el tema que se aborda en la presente Tesis Doctoral como son la biodisponibilidad y absorción de un elemento químico, que van a condicionar dicha efectividad.

A.7. Absorción y biodisponibilidad

Entre ambos conceptos existe también cierta controversia, puesto que numerosos autores proclaman que para que un elemento sea biodisponible ha de ser primeramente absorbido [91,92,93], mientras que otros postulan que su absorción intestinal dependerá de la biodisponibilidad de la forma en la que se encuentra el elemento en el alimento [94]. Algunos exponen incluso que existe la posibilidad de modificar la biodisponibilidad de un alimento dependiendo del procesado y preparación de la comida para aumentar la biodisponibilidad de un componente desde un alimento [94]. Al igual que en el apartado anterior, con el objetivo de dotar al lector de las herramientas básicas para la comprensión del texto, se definirán ambos conceptos en el modo en el que han sido utilizados en la presente memoria.

A.7.1. Absorción mineral

La *absorción intestinal* es el proceso por el cual los nutrientes ingeridos y digeridos atraviesan la membrana y posteriormente pasan al torrente sanguíneo [17,65]. El proceso de digestión está mediado por una mezcla de disoluciones ácidas provenientes de la bilis cuya función es modificar la estructura química de los nutrientes (p.ej. proteínas) transformándolos en especies químicas que puedan ser fácilmente transportadas y posteriormente absorbidas en la parte inicial del intestino delgado, principalmente en el duodeno y yeyuno. Una vez presentes en el torrente sanguíneo, seguirán la ruta metabólica

correspondiente para su posterior distribución en los diferentes tejidos y fluidos del organismo donde realizan su función. La absorción de nutrientes está influida por diversos parámetros como puede ser la edad, el alcohol, la cafeína, el estrés [17], ciertos medicamentos [95] y presencia/ausencia de otros nutrientes [96].

En el caso del hierro, éste se absorbe en las células mucosas del intestino delgado, principalmente en el duodeno, mediante un proceso activo y saturable. La eficacia de la absorción aumenta con la deficiencia de hierro (diminución en la ingesta) y se reduce cuando se deprime la eritropoyesis. Una parte del Fe absorbido se almacena temporalmente como ferritina en la célula de la mucosa [97]. Existen una serie de productos capaces de influir en la absorción del hierro no-hemo, como son: los ácidos ascórbico, cítrico, málico, láctico, tartárico, succínico; productos de fermentación de la soja, carne, pollería, pescado, y algunos aminoácidos como la cisteína y la vitamina E. Y también por otro lado, existen inhibidores de su absorción como: polifenoles de las plantas, cereales, salvado, fibra o incluso cantidades elevadas de cinc en la dieta [94].

En el caso del zinc, la absorción intestinal no está regulada por el estatus de zinc, sino que se absorbe como un porcentaje de la ingesta. Entre el 3% y el 38% del zinc ingerido mediante la dieta se absorbe en el tubo digestivo proximal [73], y es regulada mediante los transportadores ZnT1, ZnT2, ZnT4, Zip-4 y diversas MTs. De este modo, el estatus del zinc en el organismo afecta a la expresión de dichos transportadores en un intento de alcanzar la homeostasis de zinc [98]. El modelo de absorción, caracterizado adecuadamente mediante el modelo de respuesta a la saturación, dictamina que dietas basadas en alimentos con bajo contenido en zinc, están asociados con una absorción eficiente debido a una adaptación homeostática, pero menor zinc absoluto absorbido diariamente [99]. Por otro lado, dietas con alto contenido en zinc están asociadas con menores eficiencias de absorción, pero mayor cantidad de zinc diario absorbido [100]. Además de la cantidad de Zn disponible en el alimento, la presencia de diversas sustancias como la fibra, los fitatos pueden interferir con su absorción, compuestos orgánicos que forman complejos estables con Zn a pH intestinal reducen su absorción, e iones con propiedades fisicoquímicas similares a Zn (p. ej., metales divalentes como Ca, Cu y Cd) compiten por sitios de unión [97]. Al contrario, las sustancias orgánicas solubles de bajo peso molecular tales como aminoácidos y ácidos orgánicos actúan como ligandos de unión

a Zn y facilitan la absorción [97] así como la presencia de glucosa, lactosa y otras proteínas favorecen la absorción del zinc [73].

A.7.2. Biodisponibilidad mineral

En 1997 el concepto de *biodisponibilidad* fue definido como “la fracción de un nutriente ingerido que se utiliza para funciones metabólicas normales o para procesos metabólicos” [101], aplicando dicho concepto principalmente a vitaminas, minerales y aminoácidos. Por otro lado, otros autores la definieron como “la fracción de cualquier nutriente que se ingiere que potencialmente puede alcanzar sus tejidos diana”.

Numerosos autores consideran que el concepto de *biodisponibilidad* incluye intrínsecamente la definición de absorción, resaltando la importancia de que el nutriente ingerido ha de ser previamente digerido, absorbido (o transformado en una forma absorbible) y que posteriormente ha de atravesar eficazmente la barrera intestinal, para distribuir el nutriente por la sangre circulante y poder ser transportado a los lugares de acción o a sus reservorios corporales (tejidos y fluidos corporales específicos en los que puede ser fisiológicamente eficaz) y allí ha de ser utilizado en funciones normales del cuerpo [91,92,93,94,95]. Este concepto es crítico para la gran cantidad de nutrientes que son ingeridos diariamente a través de la comida y que son posteriormente utilizados en diversas funciones vitales, incorporándose eficientemente a los diversos tejidos diana.

A lo largo de las diferentes etapas de la ruta metabólica de un nutriente en el organismo, pueden tener lugar ciertos cambios en su biodisponibilidad. Algunos de estos puntos clave son: la liberación del nutriente de la matriz dietética, efectos de las enzimas digestivas en el intestino, absorción, unión y captación por la mucosa intestinal, transferencia a través de la pared intestinal a la sangre o a la circulación linfática, distribución sistémica, deposición sistémica (en los almacenes), uso metabólico y funcional además de la excreción (a través de orina y/o heces). En el caso del hierro y el zinc, el factor limitante de su biodisponibilidad es la absorción que presentan en el tracto gastrointestinal.

La biodisponibilidad mineral es modulada por una serie de factores tanto endógenos como exógenos, dotando de gran complejidad a la definición del concepto de biodisponibilidad. Los *factores endógenos* son *dependientes del individuo* (factores

genéticos, edad, sexo, estado nutricional y fisiológico, necesidades individuales, ejercicio, estrés, patologías, etc) [17]. Por su parte, *los factores exógenos* pueden ser *dependientes del entorno* como: el clima, contaminantes, procesado de alimentos (procesado térmico, fermentación microbiana [94]), drogas, modas, o *dependientes del propio nutriente* (matriz alimentaria y la forma fisicoquímica).

Un ejemplo característico de factor endógeno es la adaptación del metabolismo y nutrición extrauterinos de un recién nacido en el momento del nacimiento para el cual su aparato digestivo debe madurar desde una nutrición parenteral a través de la placenta hacia una alimentación enteral fraccionada e intermitente. Asimismo, durante los periodos de gestación, lactancia y crecimiento, las eficacias de la absorción y utilización de los nutrientes también resultan incrementadas. Otro ejemplo son las condiciones de escasez, donde el organismo tiende a incrementar al máximo la biodisponibilidad y a la vez limitar las pérdidas considerablemente.

Dentro de los factores externos, uno de los más importantes es la matriz alimentaria, puesto que los diversos componentes presentes en la muestra pueden interactuar con el elemento una vez ingerido. Las *proteínas* influyen en la absorción mineral, puesto pueden unirse a los iones metálicos formando quelatos que pasen intactos la barrera intestinal [17,94]. Una dieta rica en *grasas* puede interferir negativamente por una malabsorción en el tracto gastrointestinal. Los *hidratos de carbono* en su caso presentan diferente comportamiento dependiendo del elemento considerado. Por ejemplo, la presencia de: lactosa, sacarosa, fructosa y glucosa en leche, influyen de manera positiva en la absorción del hierro, y negativamente en la biodisponibilidad del cobre [17]. Los *ácidos orgánicos* por su parte pueden formar ligandos solubles con algunos elementos traza en el tracto gastrointestinal favoreciendo la absorción del Zn (y probablemente del Fe). El ácido ascórbico procedente de diversas frutas y vegetales reduce el Fe(III) a su forma más soluble como Fe(II), y forma quelatos Fe-ascorbato, produciendo un incremento en la absorción del hierro no-hémico [94]. Los *elementos traza* pueden interactuar entre sí puesto que, por ejemplo, los metales divalentes compiten por los mismos lugares de absorción. Las *vitaminas*, por su parte, pueden modificar la biodisponibilidad de distintos minerales y elementos traza. Por ejemplo, es bien conocido el efecto positivo de la vitamina C en la

biodisponibilidad del hierro [17,94]. Otro factor influyente es la *fibra insoluble* ingerida puesto que tiene la capacidad de captar ciertos metales dificultando su solubilidad y posterior absorción (como es el caso del zinc y el hierro), por su parte, aunque la *fibra soluble* es capaz de fijar iones metálicos, sus repercusiones pueden ser más o menos importantes en función del grado de degradación en el colon y la capacidad de absorción intestinal del mineral. Los *polifenoles* provenientes de ciertos cereales y legumbres forman complejos insolubles con el hierro inhibiendo la absorción del hierro no-hemo [94,97]. Por todo ello, a la hora de diseñar suplementos que contengan varios elementos o en el caso de fortificaciones de alimentos, es de vital importancia tener en cuenta dicha interacción para obtener los resultados deseados. Además, a la hora de desarrollar un nuevo suplemento/ fortificante, existe la posibilidad de que algunas formas fisicoquímicas presenten reacciones adversas en el organismo (como irritación o toxicidad), y es por ello de vital importancia conocer la forma fisicoquímica en la que el nutriente es utilizado con el objetivo de conocer y prever posibles reacciones adversas.

Sin lugar a dudas el principal condicionante de la biodisponibilidad de un elemento va a ser el propio mineral que se considera, tanto su *cantidad* como la *forma fisicoquímica* en la que se presente, las cuales determinarán una mayor o menor utilización en el organismo. Por ejemplo, la utilización del hierro proveniente de una fuente hémica es mayor que la del hierro no hemo [65], y es por ello que las personas que obtienen éste nutriente principalmente desde fuentes vegetales (donde el hierro se presenta exclusivamente como hierro no hemo) tienen una mayor predisposición a tener aportes inadecuados de éste elemento y por tanto a padecer deficiencias [17].

Debido a que aspectos como el estado fisicoquímico de los nutrientes determinan si un nutriente es realmente utilizado, en qué cantidad, además de cuánto es almacenado o excretado, algunas definiciones de biodisponibilidad la restringen únicamente a la fracción de nutriente que es absorbido [102]. En el caso del hierro, el cuerpo no tiene ningún mecanismo activo para excretar hierro y por ello su biodisponibilidad y absorción son sinónimos y varían desde menos de un 1% en las formas menos biodisponibles hasta el 90% para las formas de hierro más biodisponibles [97]. Para el zinc, su biodisponibilidad está afectada por factores que influyen en la absorción, dependiendo de potenciadores e inhibidores de la dieta y factores relacionados con el organismo. La

biodisponibilidad del zinc en la dieta varía entre un 5 y un 50, siendo mayor cuanto más proteína de origen animal y menor contenido de cereales (fitatos) se ingieren en la dieta [97].

A.7.2.1. Métodos para el estudio de la biodisponibilidad mineral

La evaluación de la biodisponibilidad de los nutrientes sigue siendo crítica para nuestra comprensión de cómo los seres humanos utilizan los nutrientes esenciales de los alimentos consumidos y nuestra apreciación de cómo los alimentos satisfacen las necesidades nutricionales del organismo. Diversos autores han utilizado novedosas técnicas analíticas que permiten una identificación más precisa y la medición de los nutrientes en los alimentos y tejidos para mejorar nuestra comprensión de las variaciones observadas en la biodisponibilidad de un nutriente de diferentes alimentos. Dependiendo de la medida que se desee realizar (respuesta a una variable fisiológica, evaluación de la retención corporal, absorción en sangre o tejido, cambios en los tamaños de reservas o la tasa de absorción), se pueden utilizar diferentes técnicas (balances de masa, test de respuesta plasmática, modelo compartimental de absorción, etc.) para la determinación de la biodisponibilidad del Fe o Zn en humanos [91].

Las técnicas para medir los niveles de vitaminas y minerales incluyen: la afinidad y cromatografía líquida de alto rendimiento para separación y aislamiento de nutrientes individuales; espectrometría de masas para separación e identificación con muy alta especificidad; y el uso de nutrientes "marcados" (o isótopos, que pueden ser identificados químicamente) como trazadores que permiten monitorizar los efectos del manejo de nutrientes en cada etapa que pueden afectar la biodisponibilidad. En algunos casos, los alimentos pueden ser intrínsecamente etiquetados con nutrientes marcados cultivando las plantas o animales en presencia de nutrientes marcados [103]. Este enfoque experimental proporciona un modelo más válido o realista para examinar la biodisponibilidad de los nutrientes, que uno que agrega la forma "trazadora" del nutriente a los alimentos que se ingieren.

Los métodos que se pueden emplear para el estudio de la biodisponibilidad mineral pueden clasificarse en: métodos *in vitro* e *in vivo*. Los métodos *in vitro* son aquellos que

se llevan a cabo fuera de un organismo vivo en un ambiente controlado. Ejemplos de ello son: membrana de diálisis, estudios de solubilidad, estudios en intestino aislado o cultivos celulares entre otros. Su función es simular una digestión gástrica mediante la incubación con diversas enzimas para posteriormente difundir el digerido a su través (en el caso de las membranas), o cuánto es incorporado por la célula (en el caso de cultivos celulares). Estos métodos suelen ser económicos y requieren menos medios instrumentales para su realización; no obstante, no tienen en cuenta numerosos procesos que pueden afectar a la absorción de un nutriente determinado.

Por otro lado, están los métodos *in vivo*, los cuales incluyen la experimentación directa con un organismo (animal o humano). Entre estos métodos se encuentra la perfusión del hígado, análisis del intestino *in situ*, técnicas de balance de masas, uso de radioisótopos e isótopos estables.

De entre todas las metodologías disponibles para realizar dichos estudios, la opción utilizada en esta investigación se basó en el uso de unas sustancias químicas que permiten seguir la ruta del elemento ingerido a través del organismo, denominadas isótopos estables, las cuáles serán descritas a continuación.

A.8. Isótopos estables

Los *isótopos* son átomos de un elemento que presentan variaciones en el número de neutrones, los cuales poseen el mismo número atómico (número de protones) que el elemento, pero distinta masa atómica (número de protones + número de neutrones) [104]. Un elemento químico puede poseer uno o varios isótopos, y la masa de un elemento determinado resulta de realizar una suma ponderada de cada uno de los isótopos teniendo en cuenta su masa atómica exacta de cada isótopo individual [105], y su abundancia relativa. Existen dos tipos diferentes de isótopos: los *isótopos estables* y los *isótopos radiactivos* (o inestables) [106].

Los *isótopos radiactivos* o *radioisótopos* pueden presentarse de manera natural en la naturaleza o generarse artificialmente en laboratorios nucleares al bombardear los átomos de un determinado elemento con partículas subatómicas. Debido a su inestabilidad,

el átomo emite partículas o radiación electromagnética de forma espontánea convirtiéndose en un átomo más estable. Es probable que tras una primera descomposición del núcleo el átomo no logre estabilizarse por lo que continúa el proceso hasta que se descompone en un nuevo átomo. Este proceso puede ocurrir varias veces hasta que se logre la estabilidad del átomo, y a los isótopos formados en el proceso se les conoce como “serie o familia radiactiva”. Los isótopos radiactivos más comúnmente utilizados son ^{14}C y ^3H [107].

Los *isótopos estables* no son radiactivos, sino que al contrario de los anteriores son estables y no experimentan un decaimiento radiactivo de manera espontánea. Su utilización como trazadores para estudiar el metabolismo mineral de diversos elementos es ampliamente conocido y utilizado por numerosos autores [108,109,110], siendo los isótopos: ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{25}Mg , ^{26}Mg , ^{42}Ca , ^{46}Ca , ^{48}Ca , ^{57}Fe , ^{58}Fe , ^{67}Zn y ^{70}Zn los más utilizados en estudios del metabolismo mineral [111]. Estos elementos poseen ciertas ventajas frente a los radioisótopos, lo que les permite ser unos candidatos excelentes para ser utilizados en estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre las ventajas que presentan estos isótopos se encuentra su inocuidad en el organismo; la facilidad de preparar un isótopo enriquecido (no radiactivo) de elemento dado (e incluso más de uno); la capacidad de utilizar múltiples isótopos administrados secuencial o simultáneamente para realizar diversos estudios metabólicos; y su detección y cuantificación de manera sencilla mediante el uso de técnicas de espectrometría de masas.

Como inconvenientes a su uso está su alto coste y la elevada sofisticación de las tecnologías necesarias (equipos de espectrometría de masas); la imposibilidad de realizar estos análisis con elementos monoisotópicos y la imposibilidad de adicionar el isótopo estable en condiciones traza en algunos experimentos concretos.

A partir de un isótopo estable de un elemento, pueden prepararse compuestos químicos simples (sales disueltas [112]) o complejos (compuestos orgánicos, marcados en posiciones concretas de su estructura [113], marcajes en ADN [114], derivatizaciones, entre otros) “enriquecidos” en dicho isótopo estable para posteriormente utilizarlos en diversos estudios (metabólicos, ambientales, clínicos, sistemas biológicos [115], etc). Cada uno de estos compuestos recibe el nombre de *trazador* o *spike*. La ventaja de estos

compuestos enriquecidos isotópicamente en un isótopo del elemento, es que su comportamiento es igual al compuesto preparado con el elemento natural. En el caso concreto de los estudios metabólicos, después de la administración intravascular u oral, el trazador (o *spike*) es metabólicamente indistinguible del compuesto de interés no marcado equivalente (trazado). La ruta metabólica del compuesto “artificial” puede evaluarse de manera cualitativa y cuantitativa midiendo la abundancia relativa del trazador y trazado (y sus respectivos metabolitos) con el tiempo [111].

Dependiendo del elemento o compuesto isotópicamente marcado que se haya utilizado como trazador, será necesaria una instrumentación analítica determinada para producir la separación del analito del resto de compuestos presentes en la muestra, pudiendo realizarse separaciones mediante cromatografía de líquidos o gases, entre otras. Posteriormente, para realizar la cuantificación del elemento o compuesto, es necesario utilizar un detector que permita una adecuada separación de los isótopos a utilizar en la cuantificación, así como poseer una herramienta de cálculo que permita no sólo detectar los diferentes isótopos, sino también cuantificarlos. Para ello, se utilizan ciertas metodologías, algunas de las cuales serán descritas a continuación.

A.8.1. Análisis mediante dilución isotópica (IDA)

El *Análisis por Dilución Isotópica (Isotopic Dilution Analysis, IDA)* es una metodología analítica basada en la modificación de la composición isotópica de un elemento o compuesto determinado en la muestra mediante la adición de un elemento o compuesto que ha sido marcado o enriquecido isotópicamente en el mismo elemento o compuesto denominado trazador o *spike*, resultando entonces una mezcla que tendrá una composición isotópica intermedia dependiendo de la cantidad adicionada de muestra y trazador [104].

El IDA puede ser utilizado tanto para isótopos radioactivos como estables. No obstante, el uso de ésta metodología ha sido ampliamente utilizada con isótopos estables tanto para cuantificación total de uno o varios elementos [116,117,118], como para la cuantificación de especies isotópicamente enriquecidas tras separaciones cromatográficas tanto gaseosas [113] como líquidas [114]. La mayor parte de los trabajos que emplean el

análisis mediante dilución isotópica, utilizan la técnica de espectrometría de masas (MS) para llevar a cabo la medida de dichas relaciones isotópicas, por lo que estos análisis son comúnmente designados con las siglas IDMS. En este trabajo, puesto que siempre se trabajará con analizadores de masas, el análisis por dilución isotópica se denominará siempre con las siglas IDA, obviando el término MS.

A.8.2. Análisis mediante deconvolución de perfiles isotópicos (IPD)

El *Análisis por Deconvolución de Perfiles Isotópicos (Isotope Pattern Deconvolution, IPD)* es una metodología que puede ser aplicable a numerosos estudios, como procesos de interconversión de especies, estudios de fragmentación o estudios nutricionales. La herramienta de IPD puede utilizarse con un trazador o más de uno, siempre enriquecido en un isótopo determinado del elemento o compuesto objeto de estudio. Puesto que en los experimentos recogidos en la presente memoria se utilizaron dos trazadores, la explicación de su utilización y la matriz pertinente se realizarán teniendo en cuenta este hecho y se llevarán a cabo en cada capítulo correspondiente.

A.9. Referencias bibliográficas

-
- ¹ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Codex Alimentarius. *Codex Standard for infant formula (special dietary uses)*, (1981), CODEX STAN 72-1981; 4:4; revision 1997.
- ² DI Givens and KE Kliem. *Chapter 7. Improving the nutritional quality of milk*. From: P. Paquin. *Functional and Speciality Beverage Technology (1st ed) Part II. Dairy-based beverages*. CRC Press Taylor & Francis Group, (2009) Pages 135-69. ISBN: 978-1-4200-9987-4.
- ³ RG Jensen. *Chapter 1. Introduction*. From: R. G. Jensen. *Handbook of Milk Composition. A volume in Food Science and Technology*. Academic Press (1995). Pages 1-3. doi:10.1016/B978-012384430-9/50003-2.
- ⁴ M Gallardo. *Alimentación y Composición Química de la Leche*. Sitio Argentino de Producción Animal. (2006) pags 8-10. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/leche_subproductos/12-alimentacion_y_composicion_leche.pdf [Web consultada 26/03/2017]
- ⁵ WL Hurley. *Milk Composition and Synthesis* (2009) University of Illinois, Urbana-Champaign. http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Milkcompsynth/milkcomp_species.html [Web consultada Marzo-Abril 2017]
- ⁶ A Curry. *The milk revolution*. *Nature*, 500 (2013) 20-2. doi:10.1038/500020a.
- ⁷ M Salque, PI Bogucki, J Pyzel, I Sobkowiak-Tabaka, R Grygiel, M Szmyt and RP Evershed. *Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe*. *Nature*, 493 (2013) 522-5. doi:10.1038/nature11698.
- ⁸ MB Heyman. *Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents*. *American Academy of Pediatrics*, 118:3 (2006) 1279-86. doi:10.1542/peds.2006-1721.
- ⁹ YP Mendoza. *Los alimentos lácteos y sus limitaciones*. *Medicina Naturista*, 3 (2001) 137-52. ISSN: 1576-3080.
- ¹⁰ W Lukito, SG Malik, IS Surono and ML Wahlqvist. *From "lactose intolerance" to "lactose nutrition"*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 24(Suppl 1) (2015) S1-8.
- ¹¹ NS Enattah, T Sahi, E Savilahti, JD Terwilliger, L Peltonen and I Järvelä. *Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia*. *Nature Genetics*, 30 (2002) 233-7. doi:10.1038/ng826.
- ¹² Y Itan, A Powell, MA Beaumont, J Burger and MG Thomas. *The Origins of Lactase Persistence in Europe*. *PLoS Comput Biol*, 5 (2009) e1000491 pp.1-13. doi:10.1371/journal.pcbi.1000491.
- ¹³ IH Adell. *La difusión de un nuevo alimento: producción y consumo de leche en España 1865-1936*. Tesis Doctoral. Programa de Doctorat en Història i Institucions Econòmiques. Barcelona, Marzo de 2012.
- ¹⁴ DM Valenze. *Milk: A Local and Global History*. Yale University Press, (2011). ISBN: 978-0-300-11724-0. [Consultado a través de Google Books 03/03/2017]
- ¹⁵ RA Wilbey. *Pasteurization: Principles in Encyclopedia of food science and nutrition*. (2nd ed.) Academic Press, (2003) 4381-6.

- ¹⁶ A Haug, AT Høstmark and OM Harstad. *Bovine milk in human nutrition – a review*. *Lipids Health Dis*, 6:25 (2007) 1-16. doi:10.1186/1476-511X-6-25.
- ¹⁷ A Ballabriga and A Carrascosa. *Nutrición en la infancia y la adolescencia*, Tomo II. (3ª ed.) Ediciones Ergón S. A., Madrid (2001). ISBN: 84-8473-459-5.
- ¹⁸ J Seignalet. *L'Alimentation ou la Troisième Médecine*, (5ª ed.) (1996). ISBN 2-86839-887-1.
- ¹⁹ JR Llorente. *La leche, ese producto pernicioso para los seres humanos*. <http://www.animanaturalis.org/p/1106/la-leche-ese-producto-pernicioso-para-los-seres-humanos>. [Web consultada 14/03/2017]
- ²⁰ SC Larsson, A Crippa, N Orsini, A Wolk and K Michaëlsson. *Milk Consumption and Mortality from All Causes, Cardiovascular Disease, and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Nutrients*, 7:9 (2015) 7749-63. doi:10.3390/nu7095363.
- ²¹ W Stonehouse, T Wycherley, N Luscombe-Marsh, P Taylor, G Brinkworth and M Riley. *Dairy Intake Enhances Body Weight and Composition Changes during Energy Restriction in 18–50-Year-Old Adults—A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. *Nutrients*, 8:7 (2016) 394-421. doi:10.3390/nu8070394.
- ²² A Nyaradi, J Li, JK Foster, S Hickling, A Jacques, TA O'Sullivan and WH Oddy. *Good-quality diet in the early years may have a positive effect on academic achievement*. *Acta Paediatr*, 105:5 (2016) e209-18. doi:10.1111/apa.13324.
- ²³ J Tuokkola, P Luukkainen, J Nevalainen, S Ahonen, J Toppari, J Ilonen, R Veijola, M Knip, SM Virtanen, and M Kaila. *Eliminating cows' milk, but not wheat, barley or rye, increases the risk of growth deceleration and nutritional inadequacies*. *Acta Paediatr*, (2017) In press. doi:10.1111/apa.13846.
- ²⁴ Codex Alimentarius Commission. *Statement on infant feeding, CAC/MISC-2-1976*. (1976). Descargado: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/301/CXA_002e.pdf
- ²⁵ World Health Organization. *Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life*. Geneva: World Health Organization, 2002.
- ²⁶ H Vargas-Leguás, VR Garrido, RL Cuenca, C Pérez-Portabella, SR Ferreiro and MC Martí. *Guía para la elaboración de fórmulas infantiles en polvo en el medio hospitalario. Sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico*. *An Pediatr (Barc)*, 70:6 (2009) 586–93. doi:10.1016/j.anpedi.2009.01.006.
- ²⁷ NF Krebs and KM Hambridge. *Complementary feeding: clinically relevant factors affecting timing and composition*. *Am J Clin Nutr*, 85 (2007) 639S–45S.
- ²⁸ LM Gartner, J Morton, RA Lawrence, AJ Naylor, D O'Hare, RJ Schanler, AI Eidelman and American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. *Breastfeeding and the use of human milk*. *Pediatrics*, 115:2 (2005) 496-506. doi:10.1542/peds.2004-2491.
- ²⁹ <http://www.who.int/topics/breastfeeding/es/> [Web consultada 11/02/2017]
- ³⁰ JMM Villares, MJG Segovia and JD Serra. *Preparación y manejo de las fórmulas infantiles en polvo. Reflexiones en torno a las recomendaciones del Comité de Nutrición de la ESPGHAN*. *Acta Pediatr Esp*, 63 (2005) 279–82.
- ³¹ MS Alles, PAMJ Scholtens and JG Bindels. *Current trends in the composition of infant milk formulas*. *Curr Pediatr*, 14:1 (2004) 51-63. doi: 10.1016/j.cupe.2003.09.007.

- ³² T Hennet and L Borsig. *Breastfed at Tiffany's*. Trends Biochem Sci, 41:6 (2016) 508-18. doi:10.1016/j.tibs.2016.02.008.
- ³³ MB Belfort, PJ Anderson, VA Nowak, KJ Lee, C Molesworth, DK Thompson and LW Doyle. *Breast Milk Feeding, Brain Development, and Neurocognitive Outcomes: A 7-Year Longitudinal Study in Infants Born at Less Than 30 Weeks' Gestation*. J Pediatr, 177 (2016) 133-9e1. doi:10.1016/j.jpeds.2016.06.045.
- ³⁴ JW Sherbon. *Physical Properties of Milk. Chapter 8: Fundamentals of Dairy Chemistry*. N. P. Wong et. al. (eds.) Van Nostrand Reinhold Company Inc, (1988) pp 409-60.
- ³⁵ CJ Piñana, NA Pons, CB Carretero, VA Val. *Nutritional composition of infant milk formulas. Level of compliance in their manufacture and adequacy of nutritional needs* [Article in Spanish] An Pediatr (Barc), 83:6 (2015) 417-29. doi:10.1016/j.anpedi.2015.03.003.
- ³⁶ DI Tudehope. *Human milk and the nutritional needs of preterm infants*. J Pediatr, 162:3 Suppl (2013) S17-25. doi:10.1016/j.jpeds.2012.11.049.
- ³⁷ J Benson, M Neylan, M Masor, C Paule and D O'Connor. *Approaches and Considerations in Determining the Protein and Amino Acid Composition of Term and Preterm Infant Formula*. Int Dairy Journal, 8:5-6 (1998) 405-12. doi:10.1016/S0958-6946(98)00063-6.
- ³⁸ J Bhatia, I Griffin, D Anderson, N Kler and M Domellöf. *Selected macro/micronutrient needs of the routine preterm infant*. J Pediatr, 162:3 Suppl (2013) S48-55. doi:10.1016/j.jpeds.2012.11.053.
- ³⁹ P Walstra, JTM Wouters and TJ Geurts. *Dairy science and technology* (2nd ed.) From Food science and technology. CRC Press Taylor & Francis Group, (2006). ISBN 0-8247-2763-0.
- ⁴⁰ H Vargas-Leguás, VR Garrido, RL Cuenca, C Pérez-Portabella, SR Ferreira and MC Martí. *Guía para la elaboración de fórmulas infantiles en polvo en el medio hospitalario. Sistema de análisis de peligros y puntos de control crítico*. An Pediatr (Barc), 70:6 (2009) 586-93. doi:10.1016/j.anpedi.2009.01.006.
- ⁴¹ JG Bindels. *Artificial feeds for infants - human milk substitutes: current composition and future trends*. Curr Pediatr, 2:3 (1992) 163-7. doi:10.1016/0957-5839(92)90257-R.
- ⁴² <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-home/es/> [Web consultada 03/04/2015]
- ⁴³ G Kent. *The Nutritional Adequacy of Infant Formula*. Clinical Lactation, 3:1 (2012) 21-5.
- ⁴⁴ OMS. Global database on the Implementation of Nutrition Action (GINA). *Policy - Commission Directive 2006/141/EC of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC Text with EEA relevance*. (2006).
- ⁴⁵ Infant Nutrition Council. *Infant formula information*. (2011). <http://www.infantnutritioncouncil.com/resources/formula-information/>. [Web consultada 03/03/2017]
- ⁴⁶ B Lönnnerdal. *Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas*. Am J Clin Nutr, 99:3 (2014) 712S-7S. doi: 10.3945/ajcn.113.071993.
- ⁴⁷ R Chandan. *Properties of Milk and Its Components. Chapter I*. From: *Dairy-based ingredients*. Eagan Press, St Paul, USA (1997) Pages 1-10. ISBN: 0913250945.
- ⁴⁸ OJ McCarthy and H Singh. *Chapter 15. Physico-Chemical Properties of Milk*. From: P. L. H. McSweeney and P. F. Fox. *Advanced Dairy Chemistry, Vol 3: Lactose, Water, Salts and*

Minor Constituents. Springer Science (1997) Pages 469-518. doi:10.1007/978-0-387-84865-5_15.

⁴⁹ E Semo, E Kesselman, D Danino and YD Livney. *Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals*. Food Hydrocoll, 21:5-6 (2007) 936-42. doi:j.foodhyd.2006.09.006.

⁵⁰ YD Livney. *Milk proteins as vehicles for bioactives*. Curr Opin Colloid In, 15:1-2 (2010) 73-83. doi:10.1016/j.cocis.2009.11.002.

⁵¹ <http://www.dummies.com/health/comparing-formula-and-breast-milk/> [Web consultada 04/04/2017]

⁵² X Zou, J Huang, Q Jin, Z Guo, Y Liu, L Cheong, X Xu and X Wang. *Lipid Composition Analysis of Milk Fats from Different Mammalian Species: Potential for Use as Human Milk Fat Substitutes*. J Agric Food Chem, 61:29 (2013) 7070-80. doi:10.1021/jf401452y.

⁵³ XL Qin, YM Wang, YH Wang, HH Huang and B Yang. *Preparation and Characterization of 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol*. J Agric Food Chem, 59:10 (2011) 5714-19. doi:10.1021/jf200398f.

⁵⁴ OK Reiss and JM Barry. *The synthesis of lactose from glucose in the mammary gland*. Biochem J, 55:5 (1953) 783-85. PMID: PMC1269534.

⁵⁵ AC Goedhart and JG Bindels, *The composition of human milk as a model for the design of infant formulas: recent findings and possible applications*, Nutr Res Rev, 7:1 (1994) 1-23. doi:10.1079/NRR19940004.

⁵⁶ LT Weaver, MF Laker and R Nelson. *Neonatal intestinal lactase activity*. Arch Dis Child, 61 (1986) 896-9. doi:10.1136/adc.61.9.896.

⁵⁷ D Rai, AS Adelman, W Zhuang, GP Rai, J Boettcher and B Lönnnerdal. *Longitudinal Changes in Lactoferrin Concentrations in Human Milk: A Global Systematic Review*. Crit Rev Food Sci Nutr, 54(12) (2014) 1539-47. doi:10.1080/10408398.2011.642422.

⁵⁸ G Harzer, M Haug and JG Bindels. *Biochemistry of maternal milk in early lactation*. Hum Nutr Appl Nutr, 40:1 (1986) 11-8.

⁵⁹ I Sélo, G Clément, H Bernard, JM Chatel, C Créminon, G Peltre and JM Wal. *Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides*. Clin Exp Allergy, 29:8 (1999) 1055-63. PubMed PMID: 10457108.

⁶⁰ G Dahlquist, E Savilahti and M Landin-Olsson. *An increased level of antibodies to beta-lactoglobulin is a risk determinant for early-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus independent of islet cell antibodies and early introduction of cow's milk*. Diabetologia, 35:10 (1992) 980-4. PubMed PMID: 1451957.

⁶¹ J Reinheimer and C Zalazar. *Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos (1ª ed.)*. Universidad Nacional del Litoral, (2006) Pags 213-217. ISBN: 987-508-759-9. Consultado a través de Google books. [Acceso 24 Abril 2017]

⁶² P Cava-Montesinos, ML Cervera, A Pastor and M de la Guardia. *Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk*. Anal Chim Acta, 531:1 (2005) 111-23. doi:10.1016/j.aca.2004.09.093.

⁶³ F Fantuz, S Ferraro, L Todini, R Piloni, P Mariani, E Malissiova and E Salimei, *Minor and potentially toxic trace elements in milk and blood serum of dairy donkeys*, J Dairy Sci, 98:1-8 (2015) 5125-32. doi:10.3168/jds.2015-9404.

- ⁶⁴ L Prashanth, KK Kattapagari, RT Chitturi, VRR Baddam and LK Prasad. *A review on role of essential trace elements in health and disease*. J NTR Univ Health Sci, 4:2 (2015) 75-85. doi:10.4103/2277-8632.158577.
- ⁶⁵ A Mas and JM Azcue. *Metales en sistemas biológicos*. Promociones y Publicaciones Universitarias, PPU, Barcelona (1993). ISBN: 84-477-0175-1.
- ⁶⁶ F H Nielsen. *Chapter 2. Possibly Essential Trace Elements*. From: J. C. King. *Clinical Nutrition of the Essential Trace Elements and minerals: The Guide for Health Professionals*. Edited by: J.D. Bogden and L.M. Klevay. Humana Press Inc, (2000). Pages 11-5.
- ⁶⁷ Ponka P (2000) Iron metabolism: physiology and pathophysiology. J Trace Elem Exp Med 13:73–83. doi:10.1002/(SICI)1520-670X(2000)13:1<73::AID-JTRA9>3.0.CO;2-X.
- ⁶⁸ PT Lieu, M Heiskala, PA Peterson and Y Yang. *The roles of iron in health and disease*. Mol Aspects Med, 22:1-2 (2001) 1-87. doi:10.1016/S0098-2997(00)00006-6.
- ⁶⁹ JL Holly. *Your Life Your Health - Nutrition: Essential Trace Elements*. (November 28, 2002). Southeast Texas Medical Associates L.L.P. <http://www.setma.com/your-life-your-health/Nutrion-Essential-Trace-Elements> [Web consultada 06/04/2017]
- ⁷⁰ L Marger, CR Schubert and D Bertrand. *Zinc: An underappreciated modulatory factor of brain function*. Biochem Pharmacol, 91:4 (2014) 426-35. doi:10.1016/j.bcp.2014.08.002.
- ⁷¹ W Maret. *Zinc in the biosciences*. Metallomics, 6:7 (2014) 1174. doi:10.1039/c4mt90021a.
- ⁷² P Bonaventura, G Benedetti, F Albarède and P Miossec. *Zinc and its role in immunity and inflammation*. Autoimmun Rev, 14:4 (2015) 277-85. doi:10.1016/j.autrev.2014.11.008.
- ⁷³ W Maret and HH Sandstead. *Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation*. J Trace Elem Med Biol, 20:1 (2006) 3-18. doi:10.1016/j.jtemb.2006.01.006.
- ⁷⁴ C Folwaczny. *Zinc and diarrhea in infants*. J Trace Elements Med Biol, 11:2 (1997) 116-22. doi:10.1016/S0946-672X(97)80036-3.
- ⁷⁵ C Rubio, DG Weller, RE Martín-Izquierdo, C Revert, I Rodriguez and A Hardisson. *Alimentos funcionales. El Zinc: oligoelemento esencial*. Nutr Hosp, 22:1 (2007) 101-7. ISSN 0212-1611.
- ⁷⁶ G Terrin, RB Canari, MD Chiara, A Pietravalle, V Aleandri, F Conte and MD Curtis. *Zinc in early life: a key element in the fetus and preterm neonate*. Nutrients, 7:12 (2005) 10427–46. doi:10.3390/nu7125542.
- ⁷⁷ ML Ackland and AA Michalczyk. *Zinc and infant nutrition*. Arch Biochem Biophys, 611 (2016) 51-7. doi:10.1016/j.abb.2016.06.011.
- ⁷⁸ AS Prasad. *Discovery of human zinc deficiency: 50 years later*. J Trace Elem Med Biol, 26:2-3 (2012) 66-9. doi:10.1016/j.jtemb.2012.04.004.
- ⁷⁹ C Agostoni et al. for the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Enteral nutrient supply for preterm infants: Commentary from the eEuropean Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Committee on Nutrition*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 50:1 (2010) 85-91. doi:10.1097/MPG.0b013e3181adaee0.
- ⁸⁰ S Khaghani, H Ezzatpanah, N Mazhari, MH Givianrad, H Mirmiranpour and FS Sadrabadi. *Zinc and copper concentrations in human milk and infant formulas*. IranJ Pediatr, 20:1 (2010) 53-7.
- ⁸¹ MA Cook. *Zinc deficiency*. Nutrition, 27:10 (2011) 1085-6. doi:10.1016/j.nut.2011.06.001.

- ⁸² PA Walravens and KM Hambridge. *Growth of infants fed a zinc supplemented formula*. Am J Clin Nutr, 29:10 (1976) 1114-21.
- ⁸³ T Sugiura, K Goto, K Ito, A Ueta, S Fujimoto and H Togari. *Chronic zinc toxicity in an infant who received zinc therapy for atopic dermatitis*. Acta Paediatr, 94:9 (2005) 1333-5. doi:10.1080/08035250510027354.
- ⁸⁴ American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. *Iron Fortification of Infant Formulas*. Pediatrics, 104 (1999) 119-23.
- ⁸⁵ E Hertrampf, M Olivares, F Pizarro and T Walter. *High absorption of fortification iron from current infant formulas*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 27:4 (1998) 425-30.
- ⁸⁶ T Walczyk, S Tuntipopitap, C Zeder, P Sirichakwal, E Wasantwisut and RF Hurrell, *Iron absorption by human subjects from different iron fortification compounds added to Thai fish sauce*. Eur J Clin Nutr, 59:5 (2005) 668-74. doi:10.1038/sj.ejcn.1602125.
- ⁸⁷ S Holton, F Begin, A Greig and A Lakshman. *Micronutrient supplements for child survival (Vitamin A and Zinc)*. Copenhagen Consensus Center, (2009) www.copenhagenconsensus.com.
- ⁸⁸ https://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/supplements_en [Web consultada 10/05/2017]
- ⁸⁹ L Allen, B de Benoist, O Dary and R Hurrell. *Guidelines on food fortification with micronutrients*. Who Library Cataloguing-in-Publication Data, (2006). ISBN 92 4 159401 2.
- ⁹⁰ Directions in Development. *Repositioning Nutrition as Central to Development. A strategy for large-scale action*. The World Bank, (2006) 27-9 and 132-3.
- ⁹¹ JC King, CM Donangelo, LR Woodhouse, SD Mertz, DM Shames, FE Viteri, Z Cheng and RM Welch. *Measuring Iron and Zinc Bioavailability in Humans*. Food Nutr Bull, 21:4 (2000) 434-9. doi:10.1177/156482650002100418.
- ⁹² PJ Aggett. *Population reference intakes and micronutrient bioavailability: a European perspective*. Am J Clin Nutr, 91:5 (2010) 1433S-7S. doi:10.3945/ajcn.2010.28674C.
- ⁹³ R Hurrell and I Egli. *Iron bioavailability and dietary reference values*. Am J Clin Nutr, 91:5 (2010) 1461S-7S. doi:10.3945/ajcn.2010.28674F.
- ⁹⁴ RS Gibson, L Perlas and C Hotz. *Improving the bioavailability of nutrients in plant foods at the household level*. Proc Nutr Soc, 65 (2006) 160-8. doi:10.1079/PNS2006489.
- ⁹⁵ JA Campbell and AB Morrison. *Some Factors Affecting the Absorption of Vitamins*. Am J Clin Nutr, 12:3 (1963) 162-9.
- ⁹⁶ MJ Brown, MG Ferruzzi, ML Nguyen, DA Cooper, AL Eldridge, SJ Schwartz and WS White. *Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection*. Am J Clin Nutr, 80:2 (2004) 396-403.
- ⁹⁷ S Fairweather-Tait and RF Hurrell. *Bioavailability of minerals and trace elements*. Nutr Res Rev, 9:1 (1996) 295-324. doi:10.1079/NRR19960016.
- ⁹⁸ B Lönnnerdal. *Trace element nutrition of infants- Molecular approaches*. J Trace Elem Med Biol, 19:1 (2005) 3-6. doi:10.1016/j.jtemb.2005.03.004.
- ⁹⁹ L Sian, NF Krebs, JE Westcott, L Fengliang, L Tong, LV Miller, B Sonko and M Hambidge. *Zinc homeostasis during lactation in a population with a low zinc intake*. Am J Clin Nutr, 75 (2002) 99-103.

-
- ¹⁰⁰ NF Krebs and KM Hambidge. *Complementary feeding: clinically relevant factors affecting timing and composition*. Am J Clin Nutr, 85:2 (2007) 639S-45S.
- ¹⁰¹ MJ Jackson. *The assessment of bioavailability of micro-nutrients: introduction*. Eur J Clin Nutr, 51 (1997) S1-2.
- ¹⁰² RP Heaney. *Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model*. J Nutr, 131:4 (2001). 1344S-8S.
- ¹⁰³ JIG Alonso, M Moldovan, JA Rodríguez-Castrillón and IC Pasarón. *Método para el marcaje e identificación de objetos manufacturados, sustancias y organismos, y sus usos*. (2010). Número de patente WO2010092202 A1.
- ¹⁰⁴ JIG Alonso and P Rodríguez-González. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. The Royal Society of Chemistry, (2013). ISBN: 978-1-84973-333-5.
- ¹⁰⁵ KJR Rosman and PDP Taylor. *IUPAC Subcommittee for Isotopic Abundance Measurements*. Pure Appl Chem, 71 (1999) 1593-1607.
- ¹⁰⁶ DA Skoog and JJ Leary. *Análisis Instrumental* (4^a ed). McGraw-Hill, Saunders College Publishing, (1994) 491-538. ISBN: 84-481-0191-X.
- ¹⁰⁷ RR Wolfe and DL Chinkes. *Isotope Tracers in Metabolic Research: Principles and Practice of Kinetic Analysis* (2nd Ed) Wiley-Liss, New York (2004) 1-17. ISBN: 978-0-471-46209-5.
- ¹⁰⁸ PV Dael, L Davidsson, R Muñoz-Box, LB Fay and D Barclay. *Selenium absorption and retention from a selenite- or selenate-fortified milk-based formula in men measured by a stable-isotope technique*. Br J Nutr, 85:2 (2001) 157-163. doi:10.1079/BJN2000227.
- ¹⁰⁹ IJ Griffin. *Using stable isotopes and isotope ratio mass spectrometry to study mineral metabolism in humans*. J Anal At Spectrom, 17 (2002) 1186-93. doi:10.1039/b202249b.
- ¹¹⁰ KY Patterson and C Veillon. *Stable Isotopes of Minerals as Metabolic Tracers in Human Nutrition Research*. Exp Biol Med (Maywood), 226:4 (2001) 271-82.
- ¹¹¹ OAF Bodamer and D Halliday. *Uses of stable isotopes in clinical diagnosis and research in the paediatric population*. Arch Dis Child, 84 (2001)444-8. doi:10.1136/adc.84.5.444.
- ¹¹² HG Iglesias, MLF Sánchez, JIG Alonso and A Sanz-Medel. *Use of enriched ⁷⁴Se and ⁷⁷Se in combination with isotope pattern deconvolution to differentiate and determine endogenous and supplemented selenium in lactating rats*. Anal Bioanal Chem, 389:3 (2007) 707-13. doi:10.1007/s00216-007-1499-1.
- ¹¹³ A González-Antuña, P Rodríguez-González, I Lavandera, G Centineo, V Gotor and JIG Alonso. *Development of a routine method for the simultaneous confirmation and determination of clenbuterol in urine by minimal labeling isotope pattern deconvolution and GC-EI-MS*. Anal Bioanal Chem, 402:5(2012) 1879-88. doi:10.1007/s00216-011-5611-1.
- ¹¹⁴ L López-Fernández, E Blanco-González and J Bettmer. *Determination of specific DNA sequences and their hybridisation processes by elemental labelling followed by SEC-ICP-MS detection*. Analyst, 139 (2014) 3423-8. doi:10.1039/C4AN00469H.
- ¹¹⁵ D Schaumlöffel and R Łobiński. *Isotope dilution technique for quantitative analysis of endogenous trace element species in biological systems*. Int J Mass Spectrom, 242:2-3 (2005) 217-23. doi:10.1016/j.ijms.2004.11.020.
- ¹¹⁶ P Rodríguez-González, JM Marchante-Gayón, JIG Alonso and A Sanz-Medel. *Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review*. Spectrochim Acta B, 60:2 (2005) 151-207. doi:10.1016/j.sab.2005.01.005.

¹¹⁷ L Hinojosa Reyes, JM Marchante Gayón, JIG Alonso and A Sanz-Medel. *Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octapole reaction system ICP-MS*. J Anal At Spectrom, 18 (2003) 11-6. doi:10.1039/B209213A.

¹¹⁸ T Catterick, B Fairman and C Harrington. *Structured approach to achieving high accuracy measurements with isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry*. J Anal At Spectrom, 13 (1998) 1009-13. doi:10.1039/A801233D.

***B. OBJETIVOS/
OBJECTIVES***

La leche (materna o fórmula) es principal alimento de neonatos en edad lactante, constituyendo su principal fuente de oligoelementos desde los primeros días de vida. Concretamente el zinc, es de vital importancia para asegurar su adecuado desarrollo psíquico, físico, motor e intelectual. Por ello, es de vital importancia conocer si la leche materna (de madres con partos a término y prematuro) es capaz de proporcionar este elemento en la cantidad adecuada en cada etapa lactante del recién nacido, así como conocer las especies o formas fisicoquímicas de zinc en las cuales está presente dicho elemento en la leche materna. Adicionalmente, el estudio de las leches fórmula actualmente utilizadas (tanto su contenido como las especies presentes) permite elucidar si se adecúan a las necesidades de los recién nacidos.

Por otro lado, con la intención de mejorar las leches fórmula actualmente disponibles, y disminuir la incidencia de enfermedades como la anemia, la búsqueda de nuevas formas fisicoquímicas de hierro para adicionarlas posteriormente a leches fórmula resulta de gran interés. Se busca por tanto realizar una fortificación de un alimento (leche) con un nutriente esencial (hierro). Adicionalmente, se conoce que la absorción y biodisponibilidad del elemento dependen enormemente de la forma fisicoquímica del elemento, y la comparación de ambos parámetros dependiendo del fortificante utilizado resultan de gran interés para poder escoger la(s) forma(s) fisicoquímicas de mayor efectividad. Para llevar a cabo un seguimiento del fortificante ingerido dentro de un organismo vivo y conocer su transporte hacia los tejidos diana, los isótopos estables enriquecidos han mostrado ser una herramienta de gran utilidad durante los últimos años.

En las últimas décadas, la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) ha mostrado ser una herramienta robusta (aportando resultados de gran exactitud y precisión) además de versátil (permitiendo el acoplamiento *online* con otras técnicas de separación de manera sencilla, p.ej. cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC-ICP-MS). Asimismo, la posterior utilización de herramientas matemáticas como la dilución isotópica (IDA) y la deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) resultan de gran utilidad para abordar el propósito que se plantea, de manera sencilla y rápida. Por otro lado, las técnicas de masas moleculares

resultan de gran utilidad para el análisis de moléculas intactas o péptidos digeridos presentes en las muestras biológicas, brindando información que resulta de gran interés para identificación de las mismas.

Por tanto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral consistió en el **Uso de isótopos estables para evaluar los niveles y/o especies de zinc en leche materna y estudiar el metabolismo/biodisponibilidad de nuevas formas fisicoquímicas de hierro para la fortificación de leche fórmula.**

Este objetivo general se ha perseguido abordando los siguientes objetivos específicos:

I) **“Estudio del contenido de zinc y/o especies de zinc en leche materna: variación con el período de lactancia y la edad gestacional”**. Para cumplir éste objetivo parcial se realizaron las siguientes etapas:

- Desarrollo y validación de una metodología analítica de ICP-MS que permita la determinación total de Zn en madres de parto a término y de parto prematuro y su variación con el período de lactancia (durante el primer mes), comparando los resultados obtenidos con los encontrados para las leches fórmula actualmente utilizadas en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) para prematuros y niños a término
- Desarrollo de una metodología cromatográfica mediante HPLC-ICP-MS que permita la separación y cuantificación de las especies de Zn presentes en las muestras de leche anteriormente analizadas.
- Identificación mediante Electrospray-IonTrap-Orbitrap de las especies de zinc (proteínas y péptidos tras su digestión enzimática) presentes en leche humana tras la recolección (purificación y preconcentración) de fracciones cromatográficas a la salida del HPLC.
- Síntesis y estudio de la estabilidad del complejo Zinc- α -Lactoalbúmina mediante EASI-Q-IonTrap para su posterior identificación en leche materna.

II) “Evaluación de la biodisponibilidad/absorción y metabolismo del hierro desde leche fórmula fortificada con un complejo de $^{57}\text{Fe(III)}$ -Lactoferrina y $^{57}\text{Fe(II)}\text{SO}_4$ en presencia de Lactoferrina”. Para ello, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

- Síntesis y caracterización del complejo ^{57}Fe -Lactoferrina.
- Estudio nutricional *in vivo*. Alimentación de ratas wistar con leche fórmula fortificada con el complejo de $^{57}\text{Fe(III)}$ -Lactoferrina o con $^{57}\text{Fe(II)}\text{SO}_4$ (a diferentes dosis) en presencia de Lactoferrina.
- Desarrollo de una metodología analítica mediante ICP-MS e IPD que permita la cuantificación de ^{57}Fe (exógeno) y $^{\text{nat}}\text{Fe}$ (endógeno). Una vez validada la metodología en distintos tipos de matrices, ésta se aplicará posteriormente a la determinación de Fe total endógeno y exógeno presente en orina, heces, sangre (eritrocitos y suero), hígado y riñones de ratas alimentadas con los diferentes fortificantes ensayados.
- Puesta a punto de una metodología basada en HPLC-IPD-ICP-MS para la especiación y cuantificación de las especies que contienen ^{57}Fe (exógeno) y/o $^{\text{nat}}\text{Fe}$ (endógeno) presentes en eritrocitos, suero, e hígado de ratas alimentadas con los diferentes fortificantes ensayados.
- Identificación de las especies mayoritarias presentes en las fracciones cromatográficas recogidas (preconcentradas y purificadas) tras la especiación de eritrocitos, suero, e hígado de rata.

III) “Evaluación de la biodisponibilidad/absorción y metabolismo del hierro desde leche fórmula fortificada con un isótopo estable de hierro (exógeno) en forma de las nanopartículas $^{57}\text{Fe-NPs}$ ”. Para lograr dicho objetivo, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Síntesis y caracterización de las nanopartículas $^{57}\text{Fe-NPs}$ utilizadas como fuente de hierro en la leche fórmula fortificada.

- Aplicación de la metodología analítica previamente desarrollada mediante ICP-MS e IPD para la cuantificación de ^{57}Fe (exógeno) y $^{\text{nat}}\text{Fe}$ (endógeno) en muestras de orina, heces, sangre (eritrocitos y suero), hígado y riñones de rata.
- Aplicación de las metodologías cromatográficas previamente desarrolladas mediante HPLC-ICP-MS e IDA post-columna para la separación de las especies de ^{57}Fe (exógeno) y $^{\text{nat}}\text{Fe}$ (endógeno) presentes en eritrocitos, suero, e hígado de las ratas ensayadas.
- Aplicación de una metodología ELISA comercial al estudio del contenido de ferritina en suero para determinar su relación con el estatus de hierro en los grupos de ratas estudiados.

The milk (maternal or formula) is the main food of infants of infant age, constituting its main source of trace elements from the first days of life. Concretely the zinc, is of vital importance to ensure its adequate psychic, physical, motor and intellectual development. Therefore, it is vital to know if breast milk (from mothers with term and premature deliveries) is able to provide this element in the appropriate amount in each infant stage of the newborn, as well as to know the species or physicochemical forms of zinc In which said element is present in the breast milk. In addition, the study of the milk formula currently used (both its content and the species present) allows to elucidate if they fit the needs of newborns.

On the other hand, with the intention of improving the currently available formula milk, and reducing the incidence of diseases such as anemia, the search for new physicochemical forms of iron to subsequently add them to formula milk is of great interest. It is therefore sought to fortify a food (milk) with an essential nutrient (iron). Additionally, it is known that the absorption and bioavailability of the element depends greatly on the physicochemical form of the element, and the comparison of both parameters depending on the fortificant used are of great interest to be able to choose the most effective physicochemical form (s). In order to carry out a monitoring of the ingested fortifier within a living organism and to know its transport towards the target tissues, the enriched stable isotopes have been shown to be a great tool during the last years.

In the last decades, inductive coupling plasma mass spectrometry (ICP-MS) has been shown to be a robust tool (providing results of high accuracy and precision) as well as versatile (allowing online coupling with other separation techniques in a simple way, i.e. high performance liquid chromatography, HPLC-ICP-MS). Also, the subsequent use of mathematical tools such as isotope dilution (IDA) and deconvolution of isotopic profiles (IPD) are very useful to address the purpose that is posed, simply and quickly. On the other hand, the molecular mass techniques are very useful for the analysis of intact molecules or digested peptides present in the biological samples, providing information that is of great interest for their identification.

Therefore, the general objective of this Doctoral Thesis consisted of the use of stable isotopes to evaluate levels and / or species of zinc in breast milk and to study the metabolism / bioavailability of new physicochemical forms of iron for formula milk fortification.

This general objective has been pursued by addressing the following specific objectives:

I) **"Study of zinc content and / or zinc species in breast milk: variation with breastfeeding period and gestational age"**. In order to fulfill this partial objective, the following steps were performed:

- Development and validation of an analytical methodology of ICP-MS that allows the total determination of Zn in mothers of term delivery and of preterm birth and their variation with the period of lactation (during the first month), comparing the results obtained with the Found for the formula currently used in the Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) for premature infants and children at term

- Development of a chromatographic methodology by HPLC-ICP-MS that allows the separation and quantification of the Zn species present in the milk samples previously analyzed.

- Identification by electrospray-IonTrap-Orbitrap of zinc species (proteins and peptides after their enzymatic digestion) present in human milk after collection (purification and preconcentration) of chromatographic fractions at the exit of the HPLC.

- Synthesis and stability study of the Zinc-Lactalbumin complex by EASI-Q-IonTrap for subsequent identification in breast milk.

II) **"Evaluation of bioavailability / iron uptake and metabolism from milk formula fortified with a complex of ^{57}Fe (III) -Lactoferrin and ^{57}Fe (II) SO_4 in the presence of Lactoferrin"**. To do this, the following steps were carried out:

- Synthesis and characterization of the ^{57}Fe -Lactoferrin complex.

- Nutritional study in vivo. Feeding of wistar rats with formula formula fortified with the ^{57}Fe (III) -Lactoferrin complex or with ^{57}Fe (II) SO_4 (at different doses) in the presence of Lactoferrin.

- Development of an analytical methodology using ICP-MS and IPD that allows the quantification of ^{57}Fe (exogenous) and natFe (endogenous). Once the methodology is validated in different types of matrices, it will be applied later to the determination of total endogenous and exogenous Fe present in urine, feces, blood (erythrocytes and serum), liver and kidneys of rats fed with the different fortificants tested.

- Establishment of a methodology based on HPLC-IPD-ICP-MS for the speciation and quantification of ^{57}Fe (exogenous) and / or natFe (endogenous) species present in erythrocytes, serum, and liver of rats fed with Different fortificants tested.

- Identification of the majority species present in the chromatographic fractions collected (preconcentrated and purified) after the erythrocyte, serum, and rat liver speciation.

III) "Evaluation of the bioavailability / absorption and metabolism of iron from milk formula fortified with a stable iron (exogenous) isotope in the form of ^{57}Fe -NPs nanoparticles". To achieve this goal, the following steps were taken:

- Synthesis and characterization of the ^{57}Fe -NPs nanoparticles used as source of iron in the fortified formula milk.

- Application of the analytical methodology previously developed by ICP-MS and IPD for the quantification of ^{57}Fe (exogenous) and natFe (endogenous) in urine, feces, blood (erythrocytes and serum), liver and rat kidneys.

- Application of chromatographic methodologies previously developed by HPLC-ICP-MS and post-column IDA for the separation of ^{57}Fe (exogenous) and natFe (endogenous) species present in erythrocytes, serum, and liver of rats tested.

B. OBJECTIVES

- Application of a commercial ELISA methodology to the study of serum ferritin content to determine its relationship with iron status in the groups of rats studied.

C. EXPERIMENTAL

C.1. Instrumentación analítica

La espectrometría de masas es una técnica analítica basada en la obtención de iones a partir de moléculas en fase gaseosa. Una vez obtenidos, estos iones se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

Dependiendo del tipo de iones generados en la fuente de ionización, podemos diferenciar dos tipos de espectrometría de masas: *masas elementales*, en los que en la fuente se generan iones elementales; y *masas moleculares*, donde los iones generados pueden ser moléculas, péptidos o proteínas. La presencia y la abundancia de cada uno de los iones generados (identificables a partir de su masa) será función de la estructura química de cada compuesto [1].

En la presente tesis doctoral se ha trabajado tanto con equipos de espectrometría de masas elemental como molecular, dependiendo del objetivo del estudio. En los próximos apartados se describirán dichas técnicas de manera general con los aspectos más relevantes de cada técnica.

C.1.1. Masas elementales

C.1.1.1. ICP-MS con celda de reacción/colisión

Para las medidas de los isótopos de hierro y zinc en la presente tesis doctoral se han utilizado dos ICP-MS de la marca Agilent Technologies (Santa Clara, California, EE.UU.), modelos 7500ce y 7700x. Ambos poseen detector tipo cuadrupolo y están equipados con una celda de colisión/reacción de tipo octapolo (ORS), que es de tercera generación en el caso del modelo más reciente (7700x) trabajando así en modo He de manera eficaz, para conseguir una mayor sencillez de operación, incluso en matrices complejas. El modelo 7700x está dotado además de un Sistema *ShieldTorch* (STS) que proporciona una eficaz conexión a tierra del plasma, reduciendo y estrechando la dispersión de energía de los iones, esencial para una óptima eliminación de interferencias en modo He [2].

De manera general, el principio de funcionamiento de ambos ICP-MS está representado en la Figura C.1. y es el siguiente: La muestra líquida es introducida en el sistema de nebulización mediante succión empleando una bomba peristáltica conectada al equipo. Una vez que el líquido llega a la cámara de nebulización de doble paso (tipo *Scott*, refrigerada por efecto *Peltier* a una temperatura de 2°C), éste pasa a través de un nebulizador tipo *Meinhard*[®] (Golden, Colorado, EE.UU.) formando un fino aerosol líquido, el cual pasa a través del canal central una antorcha en el plasma de Argon (Ar, parcialmente ionizado, con una temperatura entre 6000-8000 Kelvin). La antorcha (tipo *Fassel*), está compuesta por tres tubos concéntricos de cuarzo por los cuales circulan los flujos correspondientes de Ar (el central es denominado “portador” puesto que transporta la muestra; el “intermedio” corresponde al Ar auxiliar y “exterior” se utiliza para el Ar plasmógeno). Dentro del plasma la muestra es desolvatada, vaporizada, atomizada y finalmente ionizada [3].

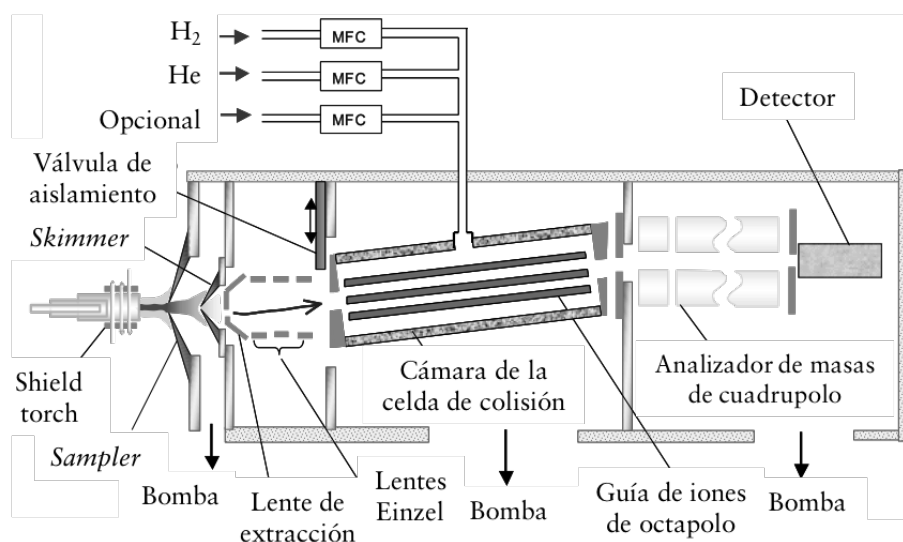


Figura C.1. Esquema de un ICP-MS (Agilent 7500 ce).

Los iones generados, son extraídos a una interfase se encuentra a vacío (aproximadamente 1 Torr) a través del cono de extracción o *sampler* (constituido por una base de cobre y una punta de níquel, con un orificio central de 1 mm de diámetro) produciéndose una expansión adiabática. A continuación, el haz de iones es transmitido a través de un segundo cono metálico o *skimmer* (de níquel, con un

orificio de 0.4 mm). Sólo el 1% de los iones generados en el plasma pasan a través de esta interfase de extracción hacia el sistema electrostático de enfoque que se encuentra sometido a alto vacío (10^{-3} - 10^{-4} Torr) por la acción de una bomba turbomolecular.

El haz de iones es conducido a través del sistema de lentes mediante fuerzas electrostáticas. Primero, los iones son acelerados mediante las lentes de extracción; posteriormente, los iones se encauzan o enfilan para obtener un haz colimado de iones mediante el enfoque iónico de tres lentes *Einzel* con campos electromagnéticos. Por último, un grupo de lentes Omega, eliminan los fotones mediante repulsión.

Después del sistema de lentes de extracción y enfoque iónico se encuentra la celda de colisión (octapolo), la cual actúa como una guía de iones y opera en modo de radiofrecuencia. La cámara del octapolo suele ser presurizada con He, Xe (llamándose entonces *celda de colisión*), H₂ u O₂ (denominándose *celda de reacción*), o mezclas de varios gases. La función de este gas es colisionar y/o reaccionar en la celda con los iones procedentes del plasma rompiendo así los posibles iones interferentes provenientes de la fuente que no han sido eliminados mediante el sistema de lentes. En la presente tesis doctoral, se utilizó He para presurizar la celda en los análisis realizados mediante ICP-MS.

Posteriormente, los iones llegan al analizador de masas donde son separados en función de su relación masa/carga (m/z) en su paso a través del cuadrupolo, constituido por cuatro barras cilíndricas sometidas a corrientes continuas y alternas de radiofrecuencias que actúan como filtro de masas. Las varillas del cuadrupolo están fabricadas típicamente con acero inoxidable o molibdeno (debido a su inherente inercia y falta de actividad) [3,4], a veces con un recubrimiento cerámico para dotarles de resistencia frente a la corrosión. Variar los voltajes aplicados en el cuadrupolo permite que sólo aquellos iones con una relación m/z determinada pasen a su través sin desviar su trayectoria.

Finalmente, solo los iones emergentes son detectados por un multiplicador de electrones secundario (SEM), que funciona en modo digital y en modo analógico dependiendo de la intensidad de los iones [3].

C.1.2. Masas moleculares

C.1.2.1. Fuente de ionización MALDI

A finales de la década de los 80, Koichi Tanaka presentó un método de análisis novedoso llamado *Soft Laser Desorption* por el cual las moléculas de proteína eran cargadas eléctricamente al ser irradiadas con un haz láser. Dicho descubrimiento fue reconocido por la comunidad científica con el Premio Nobel de Química en 2002, junto con John B. Fenn y Kurt Wüthrich, por “el desarrollo de métodos de identificación y de análisis estructural de macromoléculas biológicas” [5].

Inicialmente se encontraron con espectros poco intensos que contenían fragmentos de las moléculas analizadas, hasta que se descubrió que, si estas se mezclaban con una matriz de naturaleza orgánica, la luz del láser era absorbida de forma más eficiente y los espectros tenían una mayor intensidad con apenas fragmentación. Fue entonces cuando esta modificación dio lugar a la técnica analítica actualmente conocida como MALDI.

Ésta matriz sólida (sobre la que se implanta la macromolécula) a menudo consiste en un material orgánico. La función de la matriz es proteger a la biomolécula de ser destruida y para facilitar la vaporización y la ionización (ver Figura C.2., [6] modificada). La composición de la matriz dependerá de la muestra a analizar, usándose generalmente ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico (CHCA) para analizar péptidos y ácido sinapínico (AS) para péptidos y proteínas grandes. En la presente tesis doctoral se estudió también la utilización del 2-nitrofloroglucinol (NPG) como matriz puesto que proporciona abundantes iones intactos múltiplemente cargados que no son metaestables, a diferencia de los obtenidos con otros tipos de matrices comúnmente utilizadas [7].

Uno de los aspectos clave para el análisis por MALDI es la preparación de la muestra. La concentración del analito en la muestra, su proporción con la matriz, la matriz escogida, posibles contaminantes y la temperatura (cambios pueden dar lugar a alteraciones en el crecimiento de los cristales) son sólo algunas variables que pueden influir en la calidad del análisis. La preparación de la muestra requiere la preparación

de una disolución saturada de matriz en una mezcla de agua y disolvente orgánico (normalmente ACN o etanol) que contenga 0.1% de TFA para facilitar la desorción e ionización de los compuestos de la muestra. El péptido o proteína ($\sim 1-10 \mu\text{M}$ en solución acuosa) y la matriz ($\sim 10 \text{ mM}$) se pueden mezclar primero, y posteriormente depositar $1 \mu\text{L}$ de la mezcla sobre la placa de tal forma que ambas co-cristalizan cuando se evapora el solvente (proceso denominado *dried droplet* [7,8]) o bien, aplicar $0.5 \mu\text{L}$ de muestra sobre una cama de matriz previamente evaporada mediante *fast evaporation* [9] y posteriormente añadir de nuevo $0.5 \mu\text{L}$ de matriz, éste procedimiento de preparación de muestra se denomina proceso *sándwich* [10]). Es importante que tanto la matriz como el analito no precipiten cuando se mezclan ambas disoluciones para la formación adecuada de los cristales.

En la presente tesis doctoral se estudiaron tanto el modo *dried droplet* como el *sándwich*. Eligiéndose el primero de éstos como procedimiento estándar para todas las muestras puesto que presentaba los mejores resultados cuando se realizaron las pruebas con los estándares apropiados.

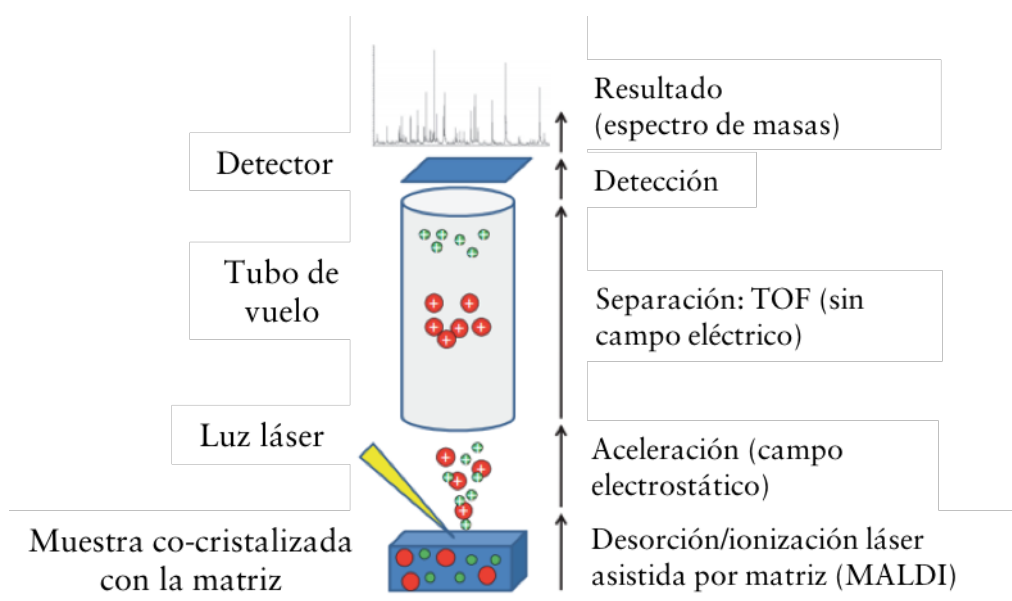


Figura C.2. Esquema de la fuente de ionización MALDI. Imagen modificada de Croxatto et. al. (2012) [6]

Una vez cristalizada, la muestra es sometida a pulsos cortos de láser (p.ej. de nitrógeno a 337 nm, Región UV) en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas. El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa.

El analizador de tiempo de vuelo (TOF) es el que más comúnmente se utiliza con las fuentes de ionización MALDI, aunque también se ha acoplado a otros analizadores de masa como la trampa iónica (IT), resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR), sectores magnéticos o instrumentación híbrida (QqTOF, TOF-TOF) con el fin de aumentar la sensibilidad y resolución en el análisis de péptidos y proteínas [11,12]. Con este analizador, la determinación de la masa/carga de una especie en una región de alto vacío se realiza mediante una medida muy precisa del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente (MALDI) hasta que impactan con el detector.

El hecho de que la ionización por MALDI permita detectar moléculas termolábiles como son las proteínas de forma intacta, la incluye dentro de los métodos de ionización suave (*soft-ionization*) [13], lo cual resulta de gran utilidad para mantener la integridad de las especies objeto de estudio en los experimentos planteados en la presente tesis doctoral. El equipo de MALDI-QTOF empleado en esta tesis fue el modelo Voyager-DETM STR BiospectrometryTM Workstation de Applied biosystems (Langen, Alemania).

C.1.2.2. Fuente de ionización ESI

En 1988, John B. Fenn publicó el método de ESI (*Electro Spray Ionization*), basado en el acoplamiento de una fuente blanda (que permite la ionización de moléculas grandes, péptidos y proteínas de pequeño tamaño) con una detección basada en la espectrometría de masas. Su descubrimiento fue galardonado con el anteriormente mencionado Premio Nobel de Química en 2002 [5]. A diferencia del MALDI, el ESI trabaja con muestras en estado líquido que son ionizadas eficientemente sin necesidad de realizar una co-cristalización con una matriz inerte.

La ionización por electrospray es ampliamente utilizada en laboratorios de proteómica puesto que es una de las fuentes blandas que permiten conservar la integridad de la proteína o molécula durante el proceso de ionización, minimizando la rotura de las mismas.

El proceso que tiene lugar en esta fuente se puede resumir en tres pasos:

- 1) *Creación de un aerosol cargado eléctricamente.* La solución muestras diluidas es forzado por una bomba de jeringa (o bomba de LC) a través de una aguja hipodérmica a una velocidad de 5-20 $\mu\text{L}/\text{min}$. La aguja se mantiene a un potencial 3-4 kV con relación a un electrodo cilíndrico circundante. El campo eléctrico provoca separación de carga en el líquido con la posterior deformación del menisco en un cono (cono *Taylor*).
- 2) *Reducción del tamaño de la gota.* Cuando la carga por unidad de superficie (densidad de carga) aumenta en las gotitas (desolvatación), la repulsión electrostática entre las cargas aumenta enormemente. Cuando ésta supera la tensión superficial (límite de *Rayleigh*), se produce la desintegración de la gotita en sub-unidades más pequeñas. Este proceso ocurre repetidamente para generar microgotas cada vez más pequeñas.
- 3) *Liberación de iones totalmente desolvatado.* Cuando las gotitas son lo suficientemente pequeñas para contener una molécula por gota, las cargas se transfieren entonces en la molécula.

La ionización en la fuente ESI se puede dar tanto en positivo como en negativo. Debido a que la ionización tiene lugar en medio gaseoso a presión atmosférica, se dan un gran número de interacciones entre los iones de los aditivos o moléculas de solvente de la fase móvil, y los iones del analito. En ese sentido, la ionización será positiva cuando la afinidad de las moléculas del analito por el protón sea mayor que la del resto de moléculas presentes en el medio. En modo negativo, las moléculas del analito cederán un protón a la fase gaseosa, si la acidez de ésta es mayor.

En los casos en los que los flujos de introducción de muestra son de nL/min (en vez de los típicamente utilizados de $\mu\text{L}/\text{min}$), la fuente se denomina nESI, o nanoelectrospray.

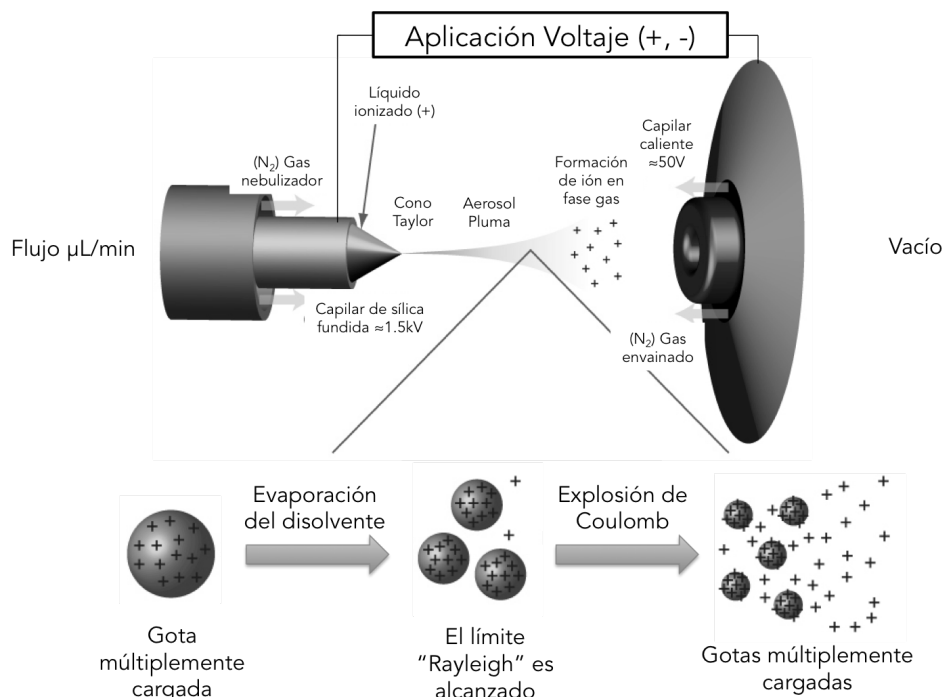


Figura C.3. Esquema de la ionización por electro-spray, ESI

C.1.2.3. Fuente de ionización SSI

En las últimas décadas se ha introducido en el mercado una nueva técnica de ionización a presión atmosférica (API), con un mecanismo de ionización por aerosol-supersónico (SSI o *Sonic Spray Ionization*). A pesar de que dicho modo de ionización fue descrito por primera vez al comienzo de la década de 1990 por Hirabayashi et.al. [14], esta interfaz no estuvo disponible en el mercado hasta el inicio de los años 2000.

El proceso de ionización sónica que tiene lugar en la fuente de SSI es comparable al que tiene lugar en la fuente de ESI (anteriormente mencionada en el apartado C.1.2.2.), con la excepción de que las gotitas se forman sin la aplicación de un campo eléctrico ni calentamiento. La ionización sónica (SSI) utiliza un flujo de

nitrógeno coaxial al capilar de sílice fundida. Debido al esfuerzo cortante del flujo de gas a velocidad sónica, tiene lugar la separación de carga alrededor de la capa superficial de la solución. Las gotas eléctricamente cargadas son transportadas por el aire y finalmente los iones en fase gaseosa son creados a presión atmosférica. La intensidad de iones depende fuertemente de la velocidad del gas y alcanza un máximo a la velocidad sónica del gas. Posteriormente, los iones se introducen a través de un orificio de muestreo en una región de vacío intermedio en el que se realiza análisis de masas (Figura C.4.).

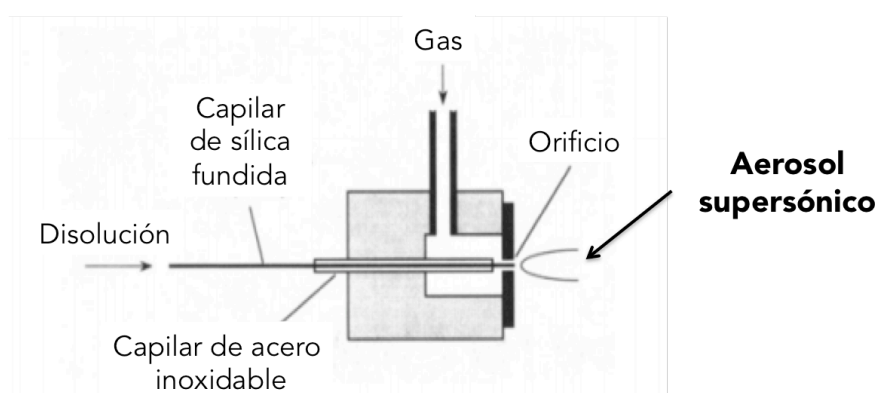


Figura C.4. Vista en sección transversal (esquemática) de la fuente SSI

A la hora de llevar a cabo la formación del aerosol para introducirlo posteriormente en un sistema de detección de masas, se puede realizar un acoplamiento sencillo mediante el uso de un nebulizador tipo Venturi, lo cual permite conseguir una fuente de ionización por aerosol supersónico a presión atmosférica con acoplamiento sencillo con el espectrómetro de masas. El SSI forma entonces una disolución iónica con una densa nube bipolar de gotas con carga neta tanto positiva como negativa. Ésta corriente de gotitas bipolar promueve la desorción e ionización de las moléculas normalmente como iones $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ o como ambos. Esta manera de introducir la muestra proporciona además muy poca energía a los iones gaseosos, causando poca o ninguna fragmentación, lo que hace a éste fuente idónea para el análisis intacto de péptidos y pequeñas proteínas [15]. Ésta característica de la fuente de ionización elimina la necesidad de utilizar un medio ácido para la generación

de protones con el propósito de generar iones cargados positivamente o un aceptor de protones en el caso de querer generar aniones.

Por otro lado, el efecto Venturi se produce cuando un fluido a alta velocidad fluye a través de una sección estrechada del tubo, causando una reducción en la presión de fluido y un efecto de auto-bombeo. Este efecto Venturi puede ser utilizado para crear una fuente SSI que auto-impulse la solución de analito dentro del sistema de manera fácil y económica. Para ello, en esta tesis doctoral se ha utilizado un nebulizador neumático de gas disponible comercialmente (Meindhard[®], Golden, Colorado, EE.UU.) modificado con un capilar de sílica en su interior por donde la disolución se introduce en el sistema.

Las fuentes descritas en los apartados C.1.2.2. (ESI y nESI) y C.1.2.3. (SSI) fueron utilizadas en los experimentos descritos en el Capítulo D.I.3. de la presente tesis doctoral, que fueron acopladas indistintamente a: un equipo Finnigan LCQ Advantage (LC-MSⁿ que consta de una trampa de iones) de Thermo Finnigan (Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Y a un equipo TSQ QuantumTM (triple cuadrupolo) de Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

C.1.3. Cromatografía acoplada a técnicas de masas

Con el objetivo de separar las especies presentes en una muestra compleja, en la presente tesis doctoral se llevaron a cabo separaciones por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) utilizando los equipos y las columnas descritos a continuación. Las columnas cromatográficas utilizadas, así como las condiciones finales de medida se resumen en la Tabla C.1..

Para la eliminación de trazas metálicas se utilizó una columna preparativa (25 x 0.5 mm d.i.) *scavenger* o liberadora de metales. La columna se empaquetó con Chelex-100 (Schering, Alemania) impregnada de sílice con cadenas de C₁₈ (35-55 μm de tamaño de partícula) de la marca Bondapak (Waters Corporation, Mildford, Massachusetts, EE.UU.).

	Leche	α LA y citrato	Suero	Eritrocitos	Hígado
Casa comercial	Agilent		GE Healthcare Sciences (Healthcare, Amersham, UK)		
Columna	BioSec 3	C ₈ , C ₁₈	Mono Q TM 5/50 GL	Mono S TM 4.6/100 PE	Superdex 200 10/300 GL
Mecanismo de separación	Exclusión por tamaños	Interacción polar	Intercambio aniónico	Intercambio catiónico	Exclusión por tamaños
Fase móvil	10 mM NH ₄ NO ₃		A: 50 mM Tris B: 250 mM NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂	A: 50 mM ácido malónico B: 250 mM NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂	50 mM Tris
pH	5.7		7.4	5.7	7.4
Flujo de la fase móvil (mL/min)	0.7		1.0	1.0	0.6
Gradiente	-		Lineal de 0 a 80% de B en 20 min	Lineal de 0 a 100% de B en 25 min	-
Loop	50 μ L		50 μ L	50 μ L	50 μ L

Tabla C.1. Condiciones cromatográficas usadas para la especiación de Zn en leches y de Fe en fluidos y tejidos de rata

Las fases móviles utilizadas en cada una de las cromatografías descritas se desgasificaron diariamente tras su preparación mediante un flujo constante de He durante 5 min.

En el caso de las medidas mediante HPLC-Vis-UV, el equipo utilizado fue un Sistema HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) compuesto por una bomba cuaternaria, un desgasificador, un automuestreador, un sistema de termostatación de las columnas y un detector de diode array (DAD).

Para las diferentes separaciones cromatográficas, con detección elemental o molecular, empleó una unidad de suministro de disolventes de alta resolución Shimadzu LC-20 AD (Kioto, Japón), compuesto por una bomba de alta presión de doble pistón. Las muestras analizadas fueron introducidas en bien mediante la

utilización de jeringas Hamilton[®] de diferente capacidad (Sigma Supelco, San Luis, Misuri, EE.UU.) o bien mediante jeringas de plástico con punta metálica (desechable). La cantidad de muestra introducida en el sistema fue controlada mediante la utilización de bucles o “*loops*” de tipo *peek* de distintos volúmenes según la necesidad (2, 10, 20, 50 y 100 μ L) procedentes de Sigma Supelco (San Luis, Misuri, EE.UU.). Para la inyección de las muestras se empleó una válvula Rheodyne Modelo 9725 (Cotati, California, EE.UU.), con conexiones RheFlex[®] (Sigma Supelco, San Luis, Misuri, EE.UU.).

En las medidas realizadas mediante HPLC-ICP-MS, la especiación cuantitativa se llevó a cabo empleando un flujo post-columna de una disolución enriquecida isotópicamente impulsada por una bomba peristáltica, modelo HP 4 (Scharlau Science Group, Barcelona, España), y conectado al flujo general mediante una pieza en forma de T “*tee peek*” (ver sección C.2.1.).

Para el resto de conexiones se utilizaron preferiblemente conexiones (de tipo *peek*) de una pieza frente a las comúnmente utilizadas de dos piezas consistentes en una “*férrula*” + “*nut*” ambas de Sigma Supelco (San Luis, Misuri, EE.UU.). Con ello se minimiza el riesgo de fugas de los líquidos circulantes y adicionalmente se evita la pérdida de las férrulas (recurso escaso, de alto precio y fácilmente extraviado en el uso y acoplamiento diario). Asimismo, las conexiones utilizadas fueron de unas medidas 10 ft \times 1/16 in. \times 0.010 in., blue que permiten minimizar el ruido y posibilitan trabajar con menores flujos de fase móvil.

Todas las conexiones utilizadas en las separaciones cromatográficas descritas en la presente tesis doctoral son de tipo *peek* (polyetheretherketone), un material inerte, biocompatible y que permite intercambiar conexiones entre columnas de diferentes materiales (vidrio, acero inoxidable) minimizando el volumen muerto ocasionado y las pérdidas por goteo.

C.1.4. Instrumentación para el tratamiento de muestras biológicas

La digestión de las muestras (heces, eritrocitos, hígado, riñones, material de referencia, leche en polvo y leche humana) se llevó a cabo en un horno digestor modelo Ethos-1 (Milestone Inc, Shelton, Connecticut, EE.UU.), con rotor con capacidad para 10 bombas de PTFE (politetrafluoretileno) de media presión y controlador de temperatura mediante sonda.

La centrifugación de las disoluciones se llevó a cabo a 4°C utilizando una centrífuga Biofuge Stratos modelo Heraeus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). En el caso de las muestras de hígado, una segunda centrifugación se llevó a cabo en una centrífuga Optima L-90K (Beckman Coulter, Fullerton, California, EE.UU.).

Para la preconcentración de las fracciones cromatográficas y la purificación de los complejos metálicos descritos en el capítulo D.I.3. se utilizó una centrífuga minispin Eppendorf® (Hamburgo, Alemania).

Para la homogeneización de tejidos y eritrocitos se utilizó una Ultra-turrax T-25 (Ika Labortechnik, Staufen, Alemania).

La preconcentración de muestras se llevó a cabo en un concentrador de vacío SpeedVac Concentrator 5301 Eppendorf® (Hamburgo, Alemania) y/o un liofilizador modelo LYOLAB 3000 de Heto-Holten A/S (Allerød, Dinamarca).

C.1.5. Otra instrumentación utilizada

Las pesadas se realizaron en una balanza (incertidumbre 0.1 mg) modelo AE 163 de Mettler Cambridge (Cambridge, Massachusetts, EE.UU.).

El agua ultrapura (18 MΩcm) utilizada para la preparación de las disoluciones de la presente tesis doctoral se obtuvo mediante un sistema Milli-Q System (Millipore Co, Bedford, Massachusetts, EE.UU.)

Para el ajuste del pH de las fases móviles se empleó un pH-metro modelo micro pH 2000 de Crisol Instruments S.A. (Barcelona, España).

Para la preparación de disoluciones se utilizaron micropipetas de volumen ajustable de Gilson Inc. (Villiers-le-Bel, Francia) y Eppendorf (Hamburgo, Alemania) de 1-10 μL , 2-20 μL , 10-100 μL , 20-200 μL y 100-1000 μL .

Para la completa homogeneización de las muestras y disoluciones, se utilizó un agitador mecánico Vortex Velp (Scientifica, España). La sonicación de las muestras se realizó mediante un baño ultrasónico (JP Selecta, España).

Se empleó una estufa modelo UM/SM 100 (Mettler, Schwabach, Alemania) para el secado del material descontaminado según el protocolo descrito en la sección C.3.1.

La caracterización espectrofotométrica del complejo $^{57}\text{Fe}_2\text{-Lf}$ sintetizado se llevó a cabo en un espectrofotómetro Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Las nanopartículas $^{57}\text{Fe-NPs}$ sintetizadas se caracterizaron: mediante rayos X con un difractorómetro X'Pert (PANalytical, Almelo, Holanda); se midió su dispersión (DLS) con un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), y las imágenes de microscopio fueron tomadas con un microscopio de transmisión electrónica de alta resolución (HR-TEM) modelo JEOL JEM-2100 (JEOL Ltd, Tokio, Japón).

C.2. Materiales y reactivos

C.2.1. Materiales

De forma general, se empleó el siguiente material de laboratorio:

- 1) Puntas para micropipeta de Eppendorf[®] (Hamburgo, Alemania).
- 2) Pipetas Pasteur de 1.5 y 3 mL de (Brand, Alemania).
- 3) Guantes de látex y de nitrilo.
- 4) Tubos estériles Eppendorf[®] (Hamburgo, Alemania).

- 5) Frascos de polietileno (Brand, Alemania), contenedores de polipropileno (Brand, Alemania), y tubos de ensayo de poliestireno cristalino (Dasla, Madrid, España).
- 6) Filtros de centrifuga Amicon[®] (3, 50, 100 kDa) de 0.5, 4 y 50 mL de Sigma Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.).
- 7) Jeringuillas de plástico Plastipak[™] (0.5, 1, 10 mL) con punta de acero inoxidable desechable (Becton Dickinson and Company, España).
- 8) Filtros Millipore[®] 0.22 y 0.45 μm (Bedford, Massachusetts, EE.UU.).
- 9) ZipTip[®] C₁₈ Millipore (Bedford, Massachusetts, EE.UU.).
- 10) Tubo para altas centrifugaciones (Beckmann Counter, Brea, California, EE.UU.).
- 11) Tubos de recolección de sangre de polipropileno transparente libre de heparina, con membrana de separación de suero, tratado en su interior con un aditivo especial (inerte) que hace acelerar la coagulación, obteniéndose una muy rápida retracción del coágulo de BD Vacutainer[®] (Becton Dickinson and Company, Nueva Jersey, EE.UU.).

C.2.2. Reactivos generales utilizados

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Las disoluciones utilizadas de acetonitrilo, metanol, isopropanol (VWR Int, Radnor, Pensilvania, EE.UU.); ácido acético y ácido fórmico (Sigma Adrich, San Luis, Misuri, EE.UU.) fueron de calidad HPLC mientras que el peróxido de hidrógeno, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, amoniaco y ácido nítrico fueron de calidad Suprapur[®] (Millipore Co, Bedford, Massachusetts, EE.UU.)

Los gases Ar, N₂, He y el N₂ líquido (todos con un 99.999% de pureza) fueron suministrados por la casa comercial Air Liquide (Madrid, España).

Los estándares de proteínas utilizados para las optimizaciones y calibraciones en los diferentes apartados de la tesis doctoral (Transferrina, Lactoferrina, Inmunoglobulina G, Hemoglobina, Ferritina, Citocromo C, Albúmina de suero

bovino, α -Lactoalbúmina, β -Lactoglobulina, ceruloplasmina, fueron de Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.)

El cloruro de sodio, hidróxido de sodio fueron comprados a Merck (Darmstadt, Alemania).

El kit ELISA para la detección y cuantificación de ferritina en rata fue proporcionado por Abcam (Cambridge, Reino Unido).

C.2.3. Materiales de referencia

La validación de las metodologías propuestas en cada uno de los capítulos de la presente tesis doctoral fue evaluada para los diferentes tipos de muestras a analizar mediante el empleo de los siguientes materiales de referencia. Estos estándares fueron almacenados y preparados según las instrucciones del fabricante.

- Material de referencia certificado de leche desnatada en polvo (Skim milk powder BCR[®]-063R)” producido por IRMM (Geel, Bélgica) proporcionado por Dicoex (Bilbao, España).
- Seronorm[™] Trace Elements Serum L-1 LOT 0903106 (SERO AS, Billingstad, Noruega).
- Seronorm[™] Trace Elements Whole Blood L-1 LOT MR4206 (SERO AS, Billingstad, Noruega).
- Seronorm[™] Trace Elements Urine LOT 0511545 (SERO AS, Billingstad, Noruega).
- Material de referencia certificado NIST 1577a Bovine Liver (Gaithersburg, Maryland, EE.UU.).
- CRM H-8 Horse Kidney de la IAEA (Viena, Austria).

C.2.4. Isótopos estables

La disolución de hierro y zinc natural (1000mg/L) fueron compradas en Merck (Darmstadt, Alemania). Los isótopos enriquecidos de hierro: ⁵⁷Fe (95.5% de enriquecimiento), ⁵⁴Fe (99.91% de enriquecimiento) y de zinc: ⁶⁷Zn (% de enriquecimiento) se compararon a la compañía Cambridge Isotope Laboratories

(Tewksbury, Massachusetts, EEUU). Y las disoluciones enriquecidas se prepararon disolviendo el metal elemental (comprado en finas láminas o en polvo para favorecer su disolución) en el mínimo volumen de ácido (H_2SO_4 , HCl o HNO_3 según proceda) y diluyendo a volumen con agua ultrapura. En los casos en los que se deseó preservar el estado de oxidación del elemento, dicha disolución se realizó además bajo atmósfera inerte.

El sulfato de hierro (II) enriquecido en ^{57}Fe ($^{57}\text{FeSO}_4$) fue preparado disolviendo el metal en el mínimo volumen de H_2SO_4 96% p/p (grado Suprapur®) bajo atmósfera de N_2 (para preservar el estado de oxidación (II) del metal y evitar su paso a Fe(III)) y posteriormente fue llevado a volumen con agua ultrapura. Las disoluciones $^{54}\text{Fe(III)}$ y $^{57}\text{Fe(III)}$ se prepararon disolviendo el polvo en la mínima cantidad de ácido clorhídrico 30% p/p y llevando a volumen con agua ultrapura. El nitrato de zinc enriquecido en ^{67}Zn fue preparado del mismo modo al anteriormente descrito, pero utilizando HNO_3 69% p/p.

La concentración de las disoluciones enriquecidas se calculó mediante dilución isotópica inversa utilizando un patrón certificado de abundancia natural.

C.3. Protocolos de limpieza de material y columnas

C.3.1. Descontaminación del material utilizado

Con el fin de evitar posibles contaminaciones, problema bien conocido y de gran trascendencia en análisis de trazas metálicas [16], se procedió a la limpieza del material tanto de vidrio como de plástico en ácido nítrico al 10 % (v/v) durante 24 horas. Posteriormente se realizó un lavado exhaustivo del mismo material con abundante agua ultrapura y se secó en estufa a 30°.

C.3.2. Limpieza de columnas cromatográficas

Para un buen mantenimiento de las columnas cromatográficas, es aconsejable limpiar la columna tras finalizar la jornada de medida con una fase móvil de alta

fuerza iónica durante 30 minutos y posteriormente dejar toda la noche bombeando agua ultrapura a flujo bajo (0.1 mL/min). En los casos en los que se haya analizado un gran número de muestras, es recomendable realizar la limpieza generalmente descrita en las instrucciones del propio fabricante.

En el caso de las muestras de leche analizadas con la columna Superdex 200 (descrito en el Capítulo D.I.1 de la presente doctoral), fue preciso realizar 5 inyecciones consecutivas de disolución de (1 mg/mL) de EDTA para reducir los fondos cromatográficos a niveles apropiados para llevar a cabo las medidas.

Cuando la columna no se vaya a utilizar durante un periodo largo de tiempo, se recomienda almacenarla en 20% etanol entre 4-25°C, para evitar el crecimiento de microorganismos.

C.4. Procedimientos experimentales

C.4.1. Procedimiento detallado de la preparación del soporte/material extractante para eliminar trazas metálicas (relleno Chelex 100)

Para la eliminación de metales [17] provenientes de las fases móviles preparadas para las separaciones cromatográficas se empleó una columna liberadora de metales (scavenger) preparada con Chelex 100 inmovilizado por adsorción sobre un soporte sólido de C₁₈ de 20 µm de tamaño de partícula. Para ello, 200 mL de una disolución de Chelex 100 (0.4 g de Chelex 100 en 200 mL de una disolución al 50% de metanol y 10% de ácido clorhídrico) se mezclan con 20 g de sílice C₁₈. El reactivo se reparte entre la fase líquida y la fase sólida según su solubilidad relativa. Después de 24 horas de contacto, se filtró, se lavó con agua ultrapura y se secó a 60°C hasta la obtención de un fino polvo. Este material sólido se empaquetó en una columna de 25 x 0.5 mm d.i. conectada a una bomba de vacío para facilitar el paso del material.

La columna preparada se posicionó siempre a la salida de las bombas de HPLC previa a la válvula de 6 vías utilizada para la inyección de la muestra.

Para asegurar el buen funcionamiento de dicha columna, es necesario realizar lavados regulares con una disolución de HNO₃ al 2% (v/v) que permita eluir los metales previamente retenidos y así regenerar la columna para posteriores usos. En el caso de que la presión sea muy superior a la habitual, será recomendable proceder al vaciado de la columna y rellenarla nuevamente con el material anteriormente preparado.

C.4.2. Estudio de leche materna y fórmula

C.4.2.1. Mineralización de las muestras de leche

Previamente al análisis por ICP-MS, las muestras de leche fueron mineralizadas mediante digestión ácida en horno de microondas. Para ello se pesaron alrededor de 0.5 g de leche materna, de material de referencia o de leche fórmula (reconstituidos atendiendo a las recomendaciones del fabricante) y se depositaron en bombas de digestión de microondas de PTFE. A continuación, se adicionaron 9 mL de ácido nítrico sub-boiling (30%), 1.5 mL de peróxido de hidrógeno calidad Suprapur[®]. Se cerraron las bombas y estas fueron colocadas en el rotor para someterlas al programa de microondas que se muestra en la Tabla C.5.. Tras el ataque, las muestras se extrajeron a tubos descontaminados, se llevaron a volumen (20 mL) con agua ultrapura. Finalmente, para eliminar el efecto de interferentes cuya influencia pasa a ser despreciable a menores concentraciones, las muestras se diluyeron 1:10 y se les adicionó Ga como patrón interno a nivel de 10 ppb. Las muestras se guardaron en nevera hasta su análisis, realizado siempre el mismo día.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	95	3
2	160	10
3	185	3
4	185	15

Tabla C.5.. Programa para la digestión de leche en horno de microondas

C.4.2.2. Obtención del suero de leche

Para el análisis mediante especiación química de cada una de las muestras de leche materna, material de referencia o leche fórmula (estos últimos reconstituidos según las especificaciones del fabricante) fue necesario realizar una centrifugación para obtener el suero lácteo, donde se encuentra la mayor parte de los minerales y proteínas objeto de estudio en la presente tesis doctoral. Para ello, varias alícuotas de cada una de las muestras se homogenizaron mediante Vortex y posteriormente se centrifugaron a 31000g durante 90 min a 4°C. Tras la centrifugación, se observaron tres capas diferenciadas: la superior, de consistencia mantecosa y color amarillento corresponde con las grasas de la leche; la capa intermedia que corresponde al suero lácteo y la inferior que contiene las caseínas de la leche. Mediante el uso de una jeringa aparta la capa superior y se extrajo el suero, para posteriormente almacenarlo a -20°C hasta su análisis.

C.4.2.3. Procedimiento de recolección y purificación de fracciones cromatográficas

Cada una de las fracciones recolectadas individualmente tras la separación cromatográfica, se sometieron de forma individual a un proceso de ultracentrifugación a través de Amicon[®] de 10 kDa (12000 rpm, 11 min). Tras la preconcentración, se añadieron varios volúmenes (5) de agua ultrapura para eliminar el contenido salino procedente de las fases móviles utilizadas en la separación cromatográfica y se centrifugó siguiendo las mismas condiciones de la preconcentración. Finalmente, el filtrado se sometió a una centrifugación para recoger la muestra filtrada (1000 rpm, 2 min) en un Eppendorf[®] previamente descontaminado (ver protocolo de descontaminación en sección C.3.1.) para su posterior utilización.

En el caso de las muestras de menor peso molecular (e.g. sales de citrato) las fracciones recogidas se preconcentraron mediante speedback durante 36h a 45° y vacío.

En ambos casos, si las muestras no se utilizaban en menos de 2 días, se congelaban a -20°C.

C.4.2.4. Digestión triptica de proteínas

La digestión enzimática de cada una de las fracciones recogidas y preconcentradas tras la separación cromatográfica mediante HPLC se realizó en el laboratorio de proteínas de Grecia (ProFI, *Protein Facility* del IMBB) según el protocolo utilizado en dicha organización. Previo a dicho proceso, las muestras fueron tratadas con el protocolo descrito a continuación para eliminar los posibles restos de sales que pudieran quedar tras su recolección, limpieza y preconcentración.

C.4.2.4.1. Limpieza de muestras mediante Zip-Tip o tips de C₁₈

Para la limpieza (desalado) de las muestras mediante el uso de tips Zip-Tip[®] o tips caseros con membranas de C₁₈, se necesitaron dos disoluciones: (A) compuesta por un 90% de acetonitrilo, 5% de agua y 5% de ácido fórmico; y una disolución (B) con un 95% de agua y 5% de ácido fórmico. El proceso de limpieza, carga/descarga de la muestra constó de los siguientes pasos:

Para comenzar, es necesario limpiar el tip (que contiene la membrana de C₁₈ en su interior, o bien un Zip-Tip[®] directamente) con 20 µL de (A) para eliminar posibles contaminaciones. Posteriormente el tip se equilibró con 20 µL de (B). Para cargar la muestra se introdujeron 20 µL de muestra por triplicado (total volumen cargado 60 µL). Con el objetivo de limpiar la muestra de posibles sales solubles con 20 µL de disolución (B). Finalmente, para proceder a la descarga o elución de la muestra, se inyectaron 20 µL de la disolución (A) por triplicado para asegurar la completa elución de los péptidos desde la membrana. Los péptidos eluidos se recogieron en un Eppendorf[®] descontaminado (ver apartado C.3.1.). Posteriormente, las muestras se secaron en SpeedVac[®] y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

C.4.2.4.2. Protocolo de digestión trípica (en disolución)

Según se haya producido la separación previa de las proteínas de una mezcla compleja: mediante cromatografía o mediante electroforesis en gel; el procedimiento realizado para ruptura de cada una de las proteínas (previamente separada) en los subsecuentes péptidos varía ligeramente, realizándose una digestión en disolución o en gel respectivamente. Durante la tesis doctoral las separaciones de proteínas se realizaron preferentemente mediante cromatografía líquida, por lo tanto, la muestra de la que se dispuso siempre fue líquida. Por tanto, el protocolo de digestión trípica

utilizado fue el descrito como “en disolución”. El protocolo de digestión trípica realizado en la presente tesis doctoral se llevó a cabo en dos días consecutivos en los cuales se realizaron la siguiente lista de tareas:

- 1) **Selección de la muestra:** 5-10 μL de la fracción (libres de sales) se diluyeron en una disolución 8M de Urea (volumen final 100 μL). La disolución se incubó durante 5-10 minutos.
- 2) **Reducción:** Posteriormente, se añadió 1 μL de una disolución de 1mM de DTT (1,4-Dithiothreitol, preparada a partir de la disolución stock) a los 100 μL de disolución previa. La disolución se incubó durante 45 min a 56°C.
- 3) **Alquilación:** Para bloquear los puentes disulfuro (S-S) previamente reducidos con el DTT (a SH) se añadió IAA (ácido iodoacético) como agente metilante. Para ello, se añadieron 5 μL de una disolución de 5mM de IAA a la muestra anterior y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente en oscuridad.
- 4) **Digestión:** Se añadieron 300 μL de una disolución de 50 mM ABS (Bicarbonato amónico). Para añadir la cantidad adecuada de tripsina a la disolución, es necesario realizar el cálculo según la cantidad de proteína presente en la muestra, siempre manteniendo la relación enzima:proteína 1:200. Una vez añadida la cantidad necesaria, se incubó a 37°C durante la noche.
- 5) **Liofilización.** Se procedió a secar la muestra en SpeedVac[®] hasta la obtención de un fino polvo completamente seco (la duración de éste proceso depende de la naturaleza de la muestra, que varió entre 3h y 32h). Posteriormente, el polvo obtenido se disolvió en la mínima cantidad de 5% de ácido fórmico (en agua) y se homogeneizó mediante vortex. Se desaló la muestra nuevamente según el protocolo descrito al inicio de este apartado.

Las muestras digeridas mediante el protocolo descrito se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

C.4.2.5. Obtención del complejo Zn- α -LA

El complejo Zn- α -Lactalbúmina (Zn- α -LA) fue sintetizado de manera similar al procedimiento anteriormente descrito [18]. La proteína intacta se incubó con una disolución de ZnCl₂ durante 15 min, 4°C en distintas proporciones Proteína:Zn (1:1, 1:10 y 1:100). Tras la incubación, el complejo de la metalo-proteína fue separado del exceso de metal mediante una ultracentrifugación a través de filtros Amicon[®] de 3kDa a 14000g durante 30min. Posteriormente, el filtrado para cada una de las mezclas se reconstituyó en diferentes mezclas de disolventes obteniendo los resultados descritos y discutidos en el capítulo D.I.3..

C.4.2.6. Preparación de las muestras de leche para el análisis mediante masas moleculares

Para el estudio mediante masas moleculares de las proteínas intactas, proteínas incubadas con el metal y las fracciones recogidas de las muestras de leche, éstas se disolvieron en distintos porcentajes de metanol (0, 2.5 y 50 %) a las cuales se les añadieron diferentes concentraciones (0.01, 0.1 y 0.25 %) de DBU (1,8-Diazabicycloundec-7-eno) en el caso de trabajar con el equipo con detección en modo negativo, y alternativamente con (0.01, 0.1 y 0.25 %) de ácido acético en caso de trabajar en modo positivo. Las muestras fueron homogeneizadas mediante agitación con vortex y almacenadas a 4°C hasta su análisis.

C.4.3. Estudios in vivo

C.4.3.1. Preparación del complejo ⁵⁷Fe₂(III)-Lactoferrina

La Apo-Lf fue preparada según el protocolo de Feng et.al. [19] disolviendo el polvo de Lactoferrina en un buffer de citrato (20mM, pH 4-5, para asegurar la liberación del hierro) y manteniendo dicha disolución 24h con agitación. Posteriormente, la apo-proteína fue separada del hierro liberado mediante filtración a través de filtros Amicon[®] de 50 kDa a 3000g durante 15 min a 4°C. Los filtrados se recogieron, se lavaron con agua ultrapura y se llevaron a volumen.

El complejo $^{57}\text{Fe}_2(\text{III})$ -Lactoferrina se sintetizó tras mezclar la disolución de apo-Lf previamente preparada con NaHCO_3 (100 mM, pH 8.2) y la apropiada cantidad de disolución de $^{57}\text{Fe}(\text{III})$ (5000ppm, pH 2.3). El complejo presenta una constante de afinidad elevada ($>10^{20}$) en presencia del anión sinérgico (HCO_3^-) lo cual produce un rápido cambio de color en la disolución (de salmón claro a rojo intenso) indicando a formación del complejo. El exceso de hierro fue eliminado mediante filtración a través de Amicon[®] de 50 kDa a 3000g durante 15 min a 4°C con una disolución de citrato (20 mM, pH >7). El residuo filtrado fue redisolto en agua a pH 6.8 y mantenido a 4°C.

C.4.3.2. Preparación de las nanopartículas $^{57}\text{Fe}(\text{III})$ -NPs

Las nanopartículas de $^{57}\text{Fe}(\text{III})$ -NPs se sintetizaron según el protocolo descrito por Powell et. al. [20] pero usando un isótopo estable de hierro (^{57}Fe). Brevemente, el polvo de hierro enriquecido ^{57}Fe fue disuelto en HCl concentrado. La disolución resultante se añadió a una disolución conteniendo tartrato de sodio (y 0.9% p/p de NaCl) a una relación Fe:tartrato de 2:1. El pH de la disolución inicial se encuentra por debajo de 2, y se va incrementando mediante la adición controlada de una disolución concentrada de NaOH hasta alcanzar un pH 7.4, momento en el cual se produce la formación de las nanopartículas, que enturbian la disolución. La mezcla resultante se centrifugó a 10000g a 10°C durante 15 min, descartándose la disolución sobrenadante. El pellet fue lavado varias veces con agua ultrapura mediante ultrafiltración usando filtros de centrifugación Amicon[®] 3kDa (10000g a 10°C durante 15 min). Las NPs se secaron durante 24h a 45°C bajo condiciones de vacío mediante SpeedVac[®].

C.4.3.3. Homogeneización y lisado de los tejidos

El hígado y los riñones fueron homogeneizados mediante el empleo de un sistema Ultra-turrax[®] con 4 volúmenes (p/p) de una disolución Tris (50 mM) a pH=7.4 y 4°C, en baño de hielo y bajo condiciones estrictas de atmósfera de nitrógeno para evitar una posible degradación de las especies por oxidación.

C.4.3.4. Mineralización de los tejidos, heces y eritrocitos

Previo al análisis por ICP-MS, las muestras de tejidos fueron mineralizadas mediante digestión ácida en horno de microondas. Para ello se pesaron alrededor de 0.1 g hígado, heces liofilizadas, riñones o 0.05 g de eritrocitos (según procediera) y se depositaron en bombas de digestión de microondas de PTFE. A continuación, se procedió a realizar la mineralización por microondas según el programa de potencias indicado en la Tabla C.6. .

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	20 a 190	0 a 15
2	190	30
3	190 a 20	260

Tabla C.6.. Programa para la digestión de tejidos en horno de microondas

C.4.3.5. Preparación de las muestras para al análisis mediante IPD

A las muestras biológicas debidamente pretratadas se les añadió una cantidad apropiada de trazador de cuantificación con el objetivo de obtener una mezcla cuyas relaciones trazador exógeno/cuantificación ($^{57}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$) y hierro endógeno/trazador de cuantificación ($^{\text{nat}}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$), tuvieran unos valores comprendidos en el rango de menor incertidumbre de la medida, lo cual evita posibles desviaciones entre muestras inherentes a la metodología empleada. De esta manera, se favorece la precisión de las medidas. Una vez llevadas a volumen (para tener una concentración adecuada para su medida mediante ICP-MS), las muestras fueron analizadas. Mediante una hoja de cálculo específica, los valores obtenidos en el equipo (CPS) se transformaron en abundancias, y mediante la aplicación de la matriz de IPD, se obtuvo la concentración del hierro exógeno y endógeno de manera sencilla y con gran precisión y exactitud.

C.4.3.6. Homogeneización y lisado de los eritrocitos

La fracción celular que no se destinó a los análisis totales, fue lisada para proceder al análisis de especiación. Los eritrocitos se lavaron 3 veces con una

disolución de NaCl al 9%, y se diluyeron en 9 volúmenes de agua ultrapura, para favorecer la homogeneización de la mezcla, se realizó una agitación mediante vortex. Para favorecer la ruptura de los eritrocitos se utilizó el sistema Ultra-turrax durante 5 minutos en baño de hielo. Posteriormente la muestra se congeló (-20°C) y tras 24h la muestra se descongeló, se sonicó y se volvió a proceder a la homogeneización mediante Ultra-turrax® durante 5 minutos en baño de hielo. De nuevo, se congeló la muestra (-20°C) y tras 24h se sometió a un centrifugado (3000g, 15 min, 4°C) recuperándose el sobrenadante para su posterior análisis.

C.4.3.7. Fraccionamiento celular del hígado por centrifugación diferencial

Con el objetivo de analizar la muestra mediante cromatografía líquida, el tejido homogeneizado (ver apartado C.6.3.5.) se somete a varias centrifugaciones sucesivas. La primera centrifugación a 20000g, 30 min a 4°C permitió separar el sobrenadante (que se vuelve a centrifugar) del pellet que queda depositado en el fondo. El sobrenadante de la anterior centrifugación se transfirió a un tubo Beckman, (resistente a centrifugaciones de alta velocidad) y se centrifugó a 105000g durante 90 minutos a 4°C. La capa superior contiene posibles restos de grasa del tejido, el pellet del fondo del tubo contiene estructuras celulares separadas de la disolución por su gran tamaño, y la parte intermedia contiene los minerales y las proteínas objeto de estudio. Dicha capa se extrajo con cuidado y se almacenó a -20°C hasta su ulterior análisis.

C.4.3.8. Preparación de las muestras para al análisis mediante IPD post-columna

Las muestras a analizar, conteniendo el hierro exógeno (^{57}Fe) y endógeno ($^{\text{nat}}\text{Fe}$), se filtraron a través de filtros de 0.22 μm . Posteriormente se rellenó el loop del tamaño seleccionado con la muestra filtrada mediante una inyección en la válvula de 6 vías. La elección de la concentración del flujo del trazador de cuantificación (o *spike*) post-columna se realizó teniendo en cuenta que, tanto los fondos como el máximo de intensidad de la muestra, estuvieran dentro del rango óptimo (de menor error

experimental) de la función de magnificación del error de cada hierro analizado (exógeno y endógeno) en relación con el trazador de cuantificación utilizado a un flujo constante. El flujo de dicha disolución se midió diariamente por triplicado para una correcta cuantificación.

A partir de las medidas experimentales, se obtuvo el cromatograma de CPS (cuentas por segundo) frente al tiempo de duración de la cromatografía utilizada. Mediante el empleo de la matriz de IPD punto a punto en cada dato recogido del ICP-MS se transformó el cromatograma en una representación del flujo másico frente al tiempo (ng/min o µg/min frente a min). Integrando el área bajo la curva se obtuvo la masa (en ng o µg), y dividiendo entre el volumen inyectado se calculó la concentración de hierro (exógeno y/o endógeno) para cada pico cromatográfico.

C.4.3.9. Procedimiento de recolección y purificación de fracciones cromatográficas

Cada una de las fracciones recolectadas individualmente tras la separación cromatográfica, se sometieron de forma individual a un proceso de ultracentrifugación.

C.4.3.10. Preparación de la placa MALDI

En Eppendorfs® de 0.5 mL, se mezcló la misma proporción de muestra, fracción recolectada o patrón con la matriz escogida (NPG o ácido sinapínico) conteniendo un 0.1% de TFA. La mezcla se homogeneizó con vortex durante 30 segundos. De cada disolución preparada se tomó 1 µL para posteriormente depositarlo sobre un pocillo de la placa MALDI. Dicho proceso se realizó por triplicado, dejando siempre un pocillo libre entre disoluciones de diferente composición, para evitar posible contaminación entre muestras. Tras esperar un tiempo a que co-cristalicen el analito y la matriz, se insertó la placa en el equipo, arrancando el láser y cargando el método utilizado para el análisis.

C.5. Referencias bibliográficas

- ¹ Repositorio del MNCN, Catálogo Bibliográfico CSIC [Web consultada 17/03/2017]
- ² Agilent web. <http://www.agilent.com/home> [Web consultada 19/01/2017]
- ³ R Thomas. *Practical guide to ICP-MS: A tutorial for beginners*. CRC Press, Taylor & Francis (2003). ISBN: 0-8247-5319-4.
- ⁴ LCGC Editors. *Quadrupole Mass Analysers: An Introduction*. LCGC Europe, 25:11(2012) 640. <http://www.chromatographyonline.com/quadrupole-mass-analysers-introduction>. [Web consultada 25/02/2017]
- ⁵ *The 2002 Nobel Prize in Chemistry - Popular Information*. www.nobelprize.org. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/popular.html. [Web consultado el 07/03/2017]
- ⁶ A Croxatto, G Prod'hom and G Greub. *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiol Rev, 36:2 (2012) 380-407. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
- ⁷ S Trimpin, Y Ren, B Wang, CB Lietz, AL Richards, DD Marshall and ED Inutan. *Extending the Laserspray Ionization Concept to Produce Highly Charged Ions at High Vacuum on a Time-of-Flight Mass Analyzer*. Anal Chem, 83:14 (2011) 5469-75. doi:10.1021/ac2007976.
- ⁸ SL Cohen and BT Chait. *Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins*. Anal Chem, 68(1996) 31-7.
- ⁹ O Vorm, P Roepstorff and M Mann. *Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation*. Anal Chem, 66 (1994) 3281-7.
- ¹⁰ Y Dai, RM Whittall, L Li. *Two-layer sample preparation: a method for MALDI-MS analysis of complex peptide and protein mixtures*. Anal Chem, 71 (1999) 1087-91.
- ¹¹ R Aebersold, M Mann. *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 422(2003) 198-207.
- ¹² PR Graves and TAJ Haystead. *Molecular biologist's guide to proteomics*. Microbiol Mol Biol Rev, 66:1 (2002) 39-63.
- ¹³ JH Gross. *Mass Spectrometry. A textbook*. Springer, (2004). ISBN 978-3-540-36756-7.
- ¹⁴ A Hirabayashi, M Sakairi and H Koizumi. *Sonic Spray Ionization Method for Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry*. Anal Chem, 66:24 (1994) 4557-9. doi:10.1021/ac00096a025.
- ¹⁵ VG Santos, T Regiani, FFG Dias, W Romão, JLP Jara, CF Klitzke, F Coelho, and MN Eberlin. *Venturi Easy Ambient Sonic-Spray Ionization*. Anal Chem, 83:4 (2011) 1375-80. doi:10.1021/ac102765z.
- ¹⁶ I Rodushkin, E Engström, DC Baxter. *Sources of contamination and remedial strategies in the multi-elemental trace analysis laboratory*. Anal Bioanal Chem, 396 (2010) 365-77. doi:10.1007/s00216-009-3087-z.
- ¹⁷ Bio-Rad Laboratories. *Chelex 100 Chelating Ion Exchange Resin for Analysis, Removal, or Recovery of Trace Metals*. Bulletin No. 2020 (1981).

¹⁸ AC Schmidt, J Koppelt, M Neustadt and M Otto. *Mass spectrometric evidence for different complexes of peptides and proteins with arsenic(III), arsenic(V), copper(II), and zinc(II) species*. Rapid Commun Mass Spectrom, 21:2 (2007) 153–63. doi:10.1002/rcm.2823.

¹⁹ M Feng, L Van der Does, A Bantjes. *Preparation of apolactoferrin with a very low iron saturation*. J Dairy Sci, 78:11 (1995) 2352-7. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76862-X.

²⁰ JJ Powell, SF Bruggraber, N Faria, LK Poots, N Hondow, TJ Pennycook, GO Latunde-Dada, RJ Simpson, AP Brown and DI Pereira. *A nano-disperse ferritin-core mimetic that efficiently corrects anemia without luminal iron redox activity*. Nanomed, 10:7 (2014) 1529–38. doi:10.1016/j.nano.2013.12.011.

D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*D.I. DETERMINACIÓN
TOTAL Y ESPECIACIÓN
INTEGRADA DE ZINC EN
LECHE HUMANA Y
FÓRMULA*

DI.1. CUANTIFICACIÓN TOTAL DE ZINC EN LECHE HUMANA Y FÓRMULA MEDIANTE ICP-MS

DI.1.1. Introducción

A pesar de que en 1869 se observó la esencialidad del zinc para el crecimiento de *Aspergillus niger* [1], y en 1933 su carácter esencial en el crecimiento de las ratas [2], no fue hasta el inicio de los años 70 cuando se reconocieron los primeros casos de deficiencia de Zn en humanos [3,4]. En 1974, el *National Research Council* de la Academia Nacional de Ciencias de los EEUU declaró el zinc como esencial para los humanos, estableciendo además la dosis diaria de zinc recomendada [5]. A lo largo de los últimos 50 años el conocimiento del metabolismo del zinc en humanos ha avanzado enormemente, y, atendiendo a los resultados obtenidos en los diferentes estudios empíricos llevados a cabo en numerosas poblaciones a lo largo del mundo, pudo darse a este elemento la importancia nutricional que merece, sobre todo en etapas tempranas del crecimiento. Precisamente durante los primeros meses de vida, resulta necesario asegurar un aporte adecuado de zinc para promover un correcto desarrollo físico y psicomotor, lo cual se consigue mediante la combinación de una ingesta relativamente alta de zinc (para lo cual es altamente recomendada la lactancia materna [6]), y la disponibilidad de algunos almacenes hepáticos de zinc [7]. Como se comentó anteriormente, el requerimiento de zinc en niños prematuros oscila entre 1.1-2.0 mg/kg/día [8], mientras que en el caso de los niños a término (de 0 a 6 meses) es de alrededor de 2 mg/día [9,10].

Generalmente, la dieta de la madre no tiene especial influencia en el contenido mineral de la leche materna [11], si bien la suplementación con zinc durante el embarazo y su implicación en el desarrollo fetal han sido ampliamente estudiados [12]. No obstante, se conoce que el contenido mineral de la leche materna cambia a lo largo

del período de lactancia, variando más durante el primer mes: Calostro, 7°, 14° y 28° día, además de presentar ligeras diferencias dependiendo de la edad gestacional.

Por su parte, la leche fórmula, tiene generalmente un contenido mucho más alto de zinc que la leche materna para compensar su menor eficiencia de absorción, probablemente debido a la estrecha unión del zinc a la caseína en la leche de vaca [13]. Diversos estudios establecen cómo en prematuros de bajo peso (VLBW, *very low-birthweigh*, <1500g) la absorción de zinc desde leche humana pretérmino es superior (65%) a la de fórmulas para pretérminos (15%) [14]. A pesar de que generalmente las fórmulas poseen mayor cantidad de zinc, la absorción sigue siendo mayor desde la leche materna.

Por la implicación del zinc en numerosos procesos de vital importancia para un buen funcionamiento del organismo los neonatos, y debido a su presencia en la leche, resulta razonable el interés de los científicos en conocer el contenido de éste elemento en los distintos tipos de leche anteriormente mencionados. Una digestión de la muestra mediante microondas y su posterior análisis mediante ICP-MS podrían revelar las variaciones en el contenido total de zinc entre las diferentes muestras a analizar, dando una visión completa de la calidad nutricional de cada tipo de leche. Dicha información puede ser empleada para prevenir estados carenciales de zinc en los neonatos tanto a término como prematuros. Además, la comparación con los resultados obtenidos en leches fórmula comerciales (preparadas con base de leche de vaca) puede dar una idea acerca de su idoneidad para una correcta nutrición de los neonatos.

DI.1.2. Métodos de determinación de Zn en leche

En la actualidad, está disponible una amplia variedad de métodos analíticos para el análisis de minerales y elementos traza en leche. Las técnicas espectroscópicas ópticas atómicas son las técnicas más frecuentemente utilizadas para el análisis elemental de muestras lácteas. Dependiendo de la concentración en que se encuentre el elemento de interés, la precisión y exactitud requeridas o el número de elementos a determinar, la elección de una técnica u otra resultará más acertada. La espectrometría

de absorción atómica de llama (FAAS) es comúnmente utilizada para aquellos elementos presentes en concentraciones relativamente altas (mg/mL), mientras que la absorción atómica en horno de grafito (ETAAS) se suele utilizar cuando se precisan menores límites de detección. En el caso del análisis multielemental, tanto de elementos mayoritarios, minoritarios como traza, las fuentes de ionización de plasma por acoplamiento inductivo (ICP) con detección mediante emisión óptica (OES) o espectrometría de masas (MS) son las más recomendadas [15].

Concretamente, para la cuantificación de zinc en leche, existen numerosas metodologías disponibles, mediante FAAS [16,17], espectrometría de absorción atómica de llama de fuente continua de alta resolución (HR-CS FAAS) [18] ETAAS [19,20], ICP-OES [21] las cuales están siendo poco a poco relegadas a un segundo plano a causa del auge del ICP-MS [22,15]. Con el paso de los años, esta técnica ha demostrado su extraordinaria capacidad para realizar determinaciones elementales de numerosos elementos químicos presentes en diferentes tipos de muestra con gran precisión y exactitud [15,23,24,25].

Por otro lado, el análisis de un fluido biológico como la leche mediante ICP-MS está limitado en parte por la complejidad de la matriz [15]. Para eliminar o minimizar el efecto de la matriz en los análisis se requiere realizar un tratamiento previo de la muestra. Este tratamiento puede ser una dilución de la muestra con agua desionizada, con ácido nítrico diluido o mediante la adición de un tensoactivo como el Tritón X-100, con el fin de disminuir la tensión superficial y favorecer una adecuada mezcla de los componentes.

No obstante, el tratamiento más adecuado para la determinación de elementos traza en leche mediante ICP-MS consiste en una mineralización de la muestra para remover la materia orgánica. El método más frecuentemente utilizado para la mineralización de las muestras de alimentos es la calcinación ya sea por vía seca o vía húmeda con agentes oxidantes. La vía húmeda puede realizarse en vasos abiertos o en sistemas cerrados bajo presión. En la actualidad, se recomienda la mineralización en sistemas que utilizan bombas de PTFE (politetrafluoroetileno) calentadas con

microondas, las cuales permiten una rápida digestión (1-20 min) de la mayoría de los alimentos usando sólo HNO_3 y H_2O_2 . Este método presenta la ventaja de que, al realizarse en bombas herméticas con control de presión y temperatura, se evitan las pérdidas de elementos volátiles y/o contaminantes.

DI.1.3. Objetivo parcial

El objetivo parcial consistió en determinar el contenido de Zn en la leche de madres asturianas, y evaluar si existe variación en dicho contenido durante el primer mes de lactancia (calostro, transición y leche madura) y/o con la edad gestacional.

A modo comparativo, se escogieron varias leches fórmula, actualmente utilizadas por el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) para la alimentación de niños prematuros y a término, para su estudio simultáneo con las muestras anteriormente mencionadas para comprobar si éstas cubren los requerimientos de los neonatos alimentados de esta manera asegurando un aporte adecuado para su correcto desarrollo.

Las *etapas* llevadas a cabo en el presente capítulo fueron:

- Desarrollo de una metodología analítica mediante masas elementales (ICP-MS) para la determinación total de zinc en leche.
- Validación de la metodología con un material de referencia certificado de leche, y medida de las muestras de leche materna y leche fórmula.
- Comparación de los resultados obtenidos en leche materna comparando sus variaciones a lo largo del período de lactancia y dependiendo de la edad gestacional.
- Comparación de los resultados obtenidos tras el análisis de las leches fórmula (AT y PT) con los resultados obtenidos para las madres (AT y PT).

DI.1.4. Optimización de las condiciones de ICP-MS

Como se comentó anteriormente, el análisis de un fluido biológico como la leche mediante ICP-MS está limitado en parte por la complejidad de la matriz y los numerosos elementos que la componen, lo que le predispone a formar interferencias poliatómicas en el plasma. En la **Tabla DI.1** se indican las interferencias poliatómicas que presentan los distintos isótopos del Zn [26]. Con el fin de eliminar dichas interferencias se utilizó un ICP-MS (modelo 7500ce) de tipo cuadrupolo equipado con celda de colisión/reacción y se optimizó el tipo de gas (He o H₂) y el flujo de gas en la celda.

	⁶⁴ Zn	⁶⁶ Zn	⁶⁷ Zn	⁶⁸ Zn	⁷⁰ Zn
<i>Abundancia isotópica</i>	48.89	27.81	4.11	18.57	0.62
<i>Interferencia isobárica</i>	⁶⁴ Ni ⁺	-	-	-	⁷⁰ Ge ⁺
<i>Interferencia poliatómica</i>	³² S ¹⁶ O ₂ ⁺ ⁴⁸ Ti ¹⁶ O ⁺ ³¹ P ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ ⁴⁸ Ca ¹⁶ O ⁺ ³² S ₂ ⁺ ³¹ P ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ ³⁶ Ar ¹⁴ N ₂ ⁺	⁵⁰ Ti ¹⁶ O ⁺ ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ ³³ S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ ³² S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ ³² S ¹⁷ O ₂ ⁺ ³³ S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ ³² S ³⁴ S ⁺ ³³ S ₂ ⁺	³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ ⁺ ³³ S ³⁴ S ⁺ ³⁴ S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ ³² S ¹⁶ O ¹⁸ O ¹ H ⁺ ³³ S ³⁴ S ⁺ ³⁴ S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ ³³ S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ ³² S ¹⁷ O ¹⁸ O ⁺ ³³ S ¹⁷ O ₂ ⁺ ³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ ⁺	³⁶ S ¹⁶ O ₂ ⁺ ³⁴ S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ₂ ⁺ ³⁵ Cl ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ ³⁴ S ₂ ⁺ ³⁶ Ar ³² S ⁺ ³⁴ S ¹⁷ O ₂ ⁺ ³³ S ¹⁷ O ¹⁸ O ⁺ ³² S ¹⁸ O ₂ ⁺ ³² S ³⁶ S ⁺	³⁵ Cl ³⁵ Cl ⁺ ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ¹⁶ O ⁺ ³⁵ Cl ¹⁷ O ¹⁸ O ⁺ ³⁷ Cl ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ ³⁴ S ¹⁸ O ₂ ⁺ ³⁶ S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ ³⁶ S ¹⁷ O ₂ ⁺ ³⁴ S ³⁶ S ⁺ ³⁶ Ar ³⁴ S ⁺ ³⁸ Ar ³² S ⁺

Tabla DI.1. Tabla de interferencias poliatómicas en ICP-MS para todos los isótopos del Zn

En primer lugar, con el objetivo de escoger el mejor gas para llevar a cabo la presurización de la celda, se midieron las señales de diferentes isótopos de zinc (64, 66, 67, 68 y 70) para un blanco y para una disolución conteniendo 10 ppb de Zn, con He y H₂ como gases de celda a diferentes flujos de gas (variando entre 0 y 5 mL/min en pasos de 0.5 mL/min). Para cada condición experimental se calculó la concentración equivalente del blanco (BEC, *Background Equivalent Concentration*). Dicho parámetro se define como BEC= Concentración del analito x señal del blanco

/ señal neta del analito, y corresponde a la señal de analito que da una señal igual a la señal del blanco. Finalmente se seleccionó el gas y el flujo óptimos para los resultados experimentales que presentaron menor BEC. En nuestro caso, al presurizar la celda con helio se produjo una disminución de la señal neta mayor que cuando se presurizó con hidrógeno. Se encontró que las mejores condiciones se obtuvieron con hidrógeno a un flujo de 4 mL/min como gas de celda.

Con objeto de comprobar la eficiencia de la eliminación de las interferencias poliatómicas en la celda de colisión, se preparó una matriz sintética de suero lácteo que fue diluida 1:10 para que las interferencias fueran aún más severas que las presentes en los líquidos resultantes del ataque. Dicha matriz sintética de suero consistió en una disolución de Ca, K, Na, Mg y Br de 200, 400, 100, 30 y 3 mg/L respectivamente, con β -lactoglobulina (3 g/L), α -lactalbúmina (1.5 g/L) y albúmina (0.3 g/L). Esta matriz fue empleada como blanco, mientras que como patrón se utilizó dicha matriz a la que se le añadió una concentración de 10 ppb de Zn.

Parámetros del ICP-MS

<i>Parámetros del plasma</i>	
<i>Potencia de radiofrecuencia</i>	1500 W
<i>Flujo del gas plasmógeno</i>	15 L /min
<i>Flujo del gas portador</i>	1.12 L /min
<i>Parámetros de la celda de reacción/colisión</i>	
<i>Flujo del gas H₂</i>	4 mL/min
<i>Potencial del octapolo (Oct bias)</i>	-13 V
<i>Potencial del cuadrupolo (QP bias)</i>	-11.5 V
<i>Parámetros de adquisición de datos</i>	
<i>Modo de adquisición</i>	Time resolved analysis
<i>Isótopos monitorizados</i>	^{64,66,67,68,70} Zn, ^{69,71} Ga
<i>Puntos por pico</i>	3
<i>Tiempo de adquisición por punto</i>	3s
<i>Réplicas</i>	5

Tabla DI.2. Condiciones experimentales utilizadas para la determinación de Zn en leche

De nuevo, los mejores resultados se obtuvieron con hidrógeno como gas de colisión, y se tomó como valor óptimo un valor de compromiso de 4 mL/min de H₂

para llevar a cabo el análisis de Zn en muestras de leche libre de interferencias poliatómicas.

Las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de Zn en leche mediante ICP-MS se encuentran descritas en la **Tabla DI.2**.

La posición de las lentes iónicas fue diariamente optimizada para obtener las mejores condiciones para el análisis. Del mismo modo, se comprobaron diariamente los fondos y la sensibilidad del equipo mediante la medida de varios blancos y de una disolución de patrón de zinc de abundancia natural.

DI.1.5. Estrategia analítica de cuantificación empleada

Para la cuantificación del zinc en leche mediante ICP-MS, se ensayaron dos estrategias de medida ampliamente conocidas: el calibrado acuoso y las adiciones estándar. Para ello, se utilizó la matriz sintética anteriormente ensayada a la que se le añadió Zn, (además de Cu y Fe a modo comparativo). Adicionalmente, con el objetivo de compensar posibles efectos de matriz, deriva instrumental y otros factores, se realizaron las calibraciones en presencia y ausencia de diferentes patrones internos (Ga, Y, Rh). Al utilizar patrón interno, tanto la señal del analito (I_A) como la del patrón interno (I_{PI}) en cuentas por segundo, pueden ser relacionadas con la concentración del analito (C_A) mediante la **Ecuación DI.1**, donde C_{PI} corresponde a la concentración de patrón interno añadida, m es la pendiente de la recta y b la ordenada en el origen.

$$\left(\frac{I_A}{I_{PI}} \cdot C_{PI}\right) = mC_A + b \text{ [Ecuación DI. 1.]}$$

Con el objeto de comprobar la posibilidad de llevar a cabo el análisis de las muestras sin interferencias de matriz y, a la vez, seleccionar el patrón interno más adecuado para cada elemento, se llevó a cabo la comparación de las pendientes de adiciones estándar (AE) y calibrado acuoso (CA) obtenidas ambas con y sin corrección con los patrones internos ensayados. Los resultados obtenidos se recogen en la **Figura DI.1**. Como se observa en las masas 64 y 66 (correspondientes al zinc), la relación de

pendientes sin uso de patrones internos difiere mucho de la unidad, lo que indica la presencia de interferencias de matriz. Por el contrario, cuando se emplean patrones internos dicha relación se aproxima más a la unidad, obteniéndose los mejores valores para ^{71}Ga , el cual se utilizó como patrón interno para las medidas de Zn en leche.

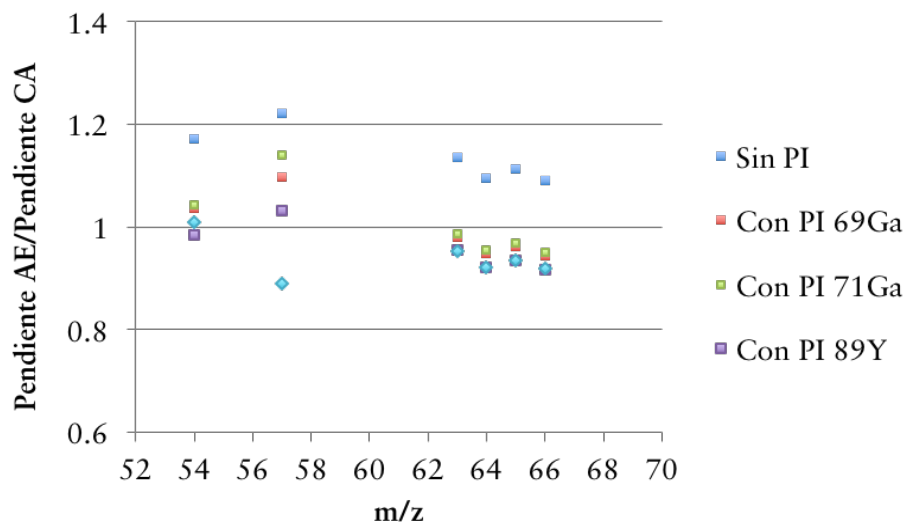


Figura DI.1. Relación de pendientes de adiciones estándar (AE) y calibrado acuoso (CA) en ausencia (Sin PI) o en presencia (Con PI) de diferentes patrones internos (Ga, Y, Rh) para diferentes elementos químicos

Como se comentó anteriormente, el análisis de un fluido biológico como la leche mediante ICP-MS está limitado en parte por la complejidad de la matriz. Uno de los principales problemas que se plantean con las muestras de leche, es que la grasa presente no es tolerada por el sistema de introducción de muestras en el ICP-MS, y en numerosas ocasiones produce la obturación del nebulizador, conos, etc. Para evitar este problema, se procedió a la mineralización de muestras lácteas empleando ácidos inorgánicos con digestiones en recipientes cerrados de PTFE con la ayuda de radiación por microondas siguiendo el protocolo para digestión de muestras de leche descrito en el apartado XXX.

Para la validación de la metodología se utilizó un material de referencia de leche en polvo certificado (BCR Natural Skim Powder, BCR 063R). El resultado de dicha validación se encuentra recogido en la **Tabla DI.3**.

Zn certificado $\mu\text{g/g}$	Zn encontrado $\mu\text{g/g}$
49 \pm 1	49.9 \pm 0.1

Tabla DI.3. Validación de la metodología para la determinación total de Zn en leche

Para algunas de las muestras, se llevó a cabo a modo comparativo, un análisis por calibrado externo mediante *matrix matching*, utilizando una matriz similar a la de la muestra. Para ello, a alícuotas del material certificado utilizado para la validación (BCR 063R) previamente digerido, se le añadió Ga como patrón interno y concentraciones crecientes de Zn que se utilizaron para el calibrado.

Los resultados del análisis mediante esta metodología mejoraban la precisión y la exactitud para la medida de los isótopos minoritarios del Zn (67 y 70) que, inicialmente con el calibrado acuoso reportaban resultados inexactos y poco precisos.

DI.1.6. Muestras de leche objeto de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en colaboración con el Departamento de Neonatología del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, España). Las muestras de leche materna analizadas fueron proporcionadas por dicho servicio gracias a la participación de madres voluntarias en el estudio clínico realizado con su *consentimiento informado* y la aprobación del estudio por el *Comité de Ética Local*.

Las madres voluntarias fueron separadas en dos grupos: las denominadas *a término* o *full term*, que han dado a luz superadas las 36 semanas de gestación; y las denominadas *pretérmino* o *preterm*, en el caso de las madres cuyo parto tuvo lugar de forma prematura (23-36 semanas de gestación). Para ambos grupos, se recogieron 4 muestras de leche, comprendiendo el primer mes de lactancia con una muestra semanal: la primera muestra corresponde al calostro, que aparece en los primeros días tras el parto, y las siguientes muestras se recogieron los días 7, 14 (leche de transición) y 28 tras el parto (leche madura) para cada una de las madres anteriormente mencionadas.

Dichas muestras fueron tomadas mediante presión manual y recogidas en tubos de polipropileno estéril previamente descontaminados mediante el protocolo descrito en el apartado C.3.1. y posteriormente se mantuvieron a -80°C para preservar la integridad de las especies químicas presentes.

El Servicio de Neonatología del mismo Hospital proporcionó también muestras de leche fórmula comercial utilizadas para la alimentación de niños pre-término y a término para su estudio. Dichas leches fórmula fueron reconstituidas el día del análisis con agua ultrapura hasta alcanzar el 87% (v/v) de agua sugerido por el fabricante, que corresponde con el nivel de agua esperado en leche.

DI.1.7. Niveles de Zn encontrados en leche materna y fórmula

Una vez validada la metodología de análisis, ésta se aplicó al estudio del contenido en dichos elementos en los diferentes tipos de leche en estudio (n=124 humana y n=16 fórmula).

Se comparó el contenido total de Zn entre la leche de madres de neonatos prematuros (PT, n=60) y de recién nacidos a término (AT, n=64), en relación con el tiempo postparto o de lactancia. Además, se compararon los resultados obtenidos para las madres de neonatos con las correspondientes leches de fórmula. Los datos se expresan como la mediana y el intervalo intercuartil (25 a 75). La prueba U de Mann-Whitney se utilizó para la comparación de dos muestras independientes y la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de múltiples muestras independientes. La significación estadística se estableció en $P < 0.05$.

Los resultados obtenidos tras la cuantificación del contenido total de zinc en muestras de leche humana de madres de recién nacidos de madres con parto pretérmino y a término, expresadas como la mediana (25°-75° intercuartil) están recogidos en la **Tabla DI.4**. Asimismo, las variaciones observadas a lo largo del período de lactancia y con el periodo gestacional de la madre se encuentran representadas en la **Figura DI.2**.

Día de lactancia	Madres pretérmino (PT)		Madres a término (AT)		Valor P
	No.	Zn total, mg/dL mediana (rango)	No.	Zn total, mg/dL mediana (rango)	
2°	n = 15	0.47 (0.24–0.61)	n = 16	0.61 (0.44–1.05)	0.210
7°	n = 15	0.41 (0.20–0.56)	n = 16	0.39 (0.32–0.51)	0.98
14°	n = 15	0.23 (0.17–0.31)	n = 16	0.30 (0.24–0.35)	0.661
28°	n = 15	0.15 (0.11–0.29)	n = 16	0.24 (0.11–0.30)	0.885
Valor P		0.007		<0.001	

Tabla DI.4. Contenido de Zn encontrado en leche materna

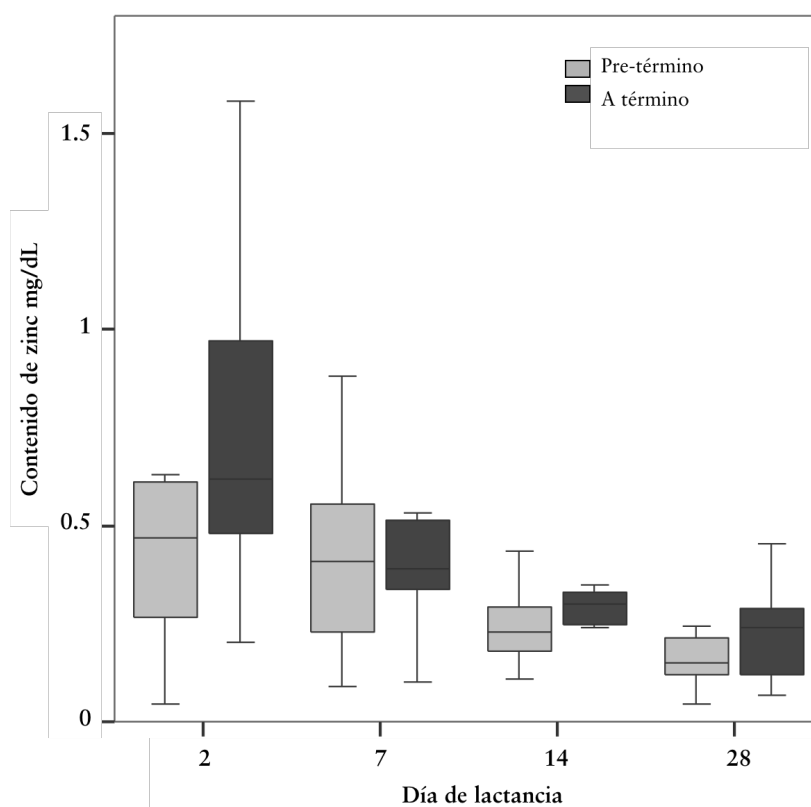


Figura DI.2. Variación con el período de lactancia del contenido de zinc en mg/dL para madres a término (AT) y pretérmino (PT)

El contenido mediano de zinc total en relación con los días de lactancia osciló entre 0.47 mg/dL en calostro y 0.15 mg/dL en leche madura en muestras de madres

PT y entre 0.61 mg/dL (calostro) y 0.24 mg/dL en leche madura para madres AT. Se observó una disminución significativa en los niveles de contenido de zinc (tanto en muestras de leche materna pretérmino como a término) al comparar las diferencias intragrupo en función del número de días de lactancia (2°, 7°, 14° y 28° días). Esta disminución fue particularmente significativa para las muestras madre a término ($P < 0.001$). Sin embargo, las diferencias generales entre grupos no fueron significativas.

Las leches fórmula destinadas a la alimentación de niños PT analizadas en el presente trabajo ($n = 8$) mostraron un contenido mediano de zinc total de 0.54 (0.49-0.70) mg/dL, un valor significativamente superior al obtenido para madres al 14° día ($P = 0.001$) y 28° día ($P < 0.001$) día de lactancia. (Ver **Figura DI.3**). De hecho, la mayor parte de las fórmulas PT analizadas mostraron un contenido de Zn superior a 0.5 mg/dL (el valor recomendado para la fortificación de Zn).

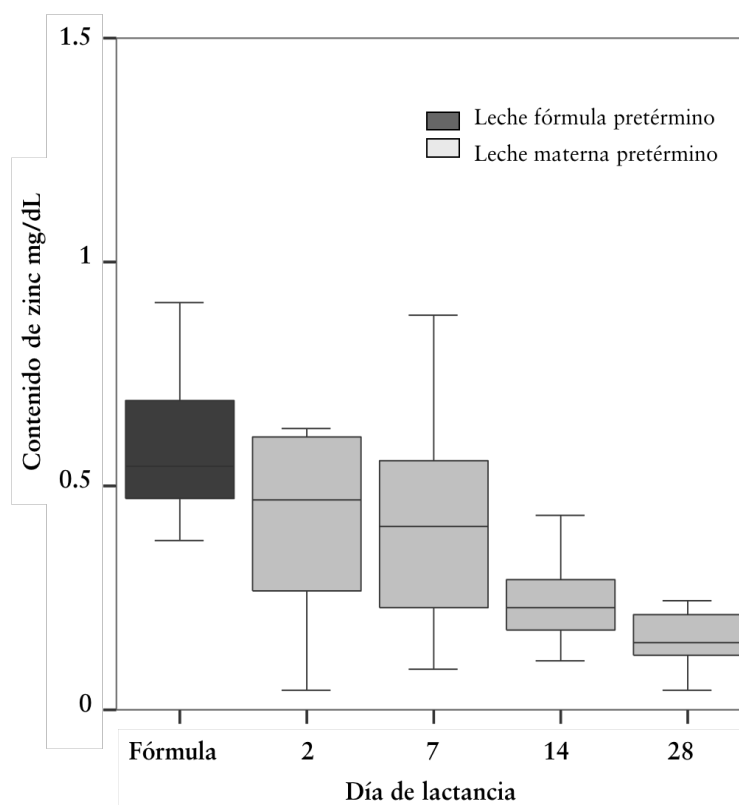


Figura DI.3. Variación con el período de lactancia del contenido de zinc en mg/dL para madres pretérmino (PT) y comparación con la leche fórmula pretérmino

En el caso de las fórmulas AT ($n=8$), el valor mediano de Zn observado fue de 0.49 (0.38-0.56) mg/dL un valor muy superior a 0.24 (0.11-0.30) mg/dL obtenido

para leche humana AT al 28° día de lactancia (siete de las ocho leches fórmula AT presentaron contenidos ≥ 0.3 mg/dL, el mínimo recomendado para la fortificación de Zn (ver Figura DI.4).

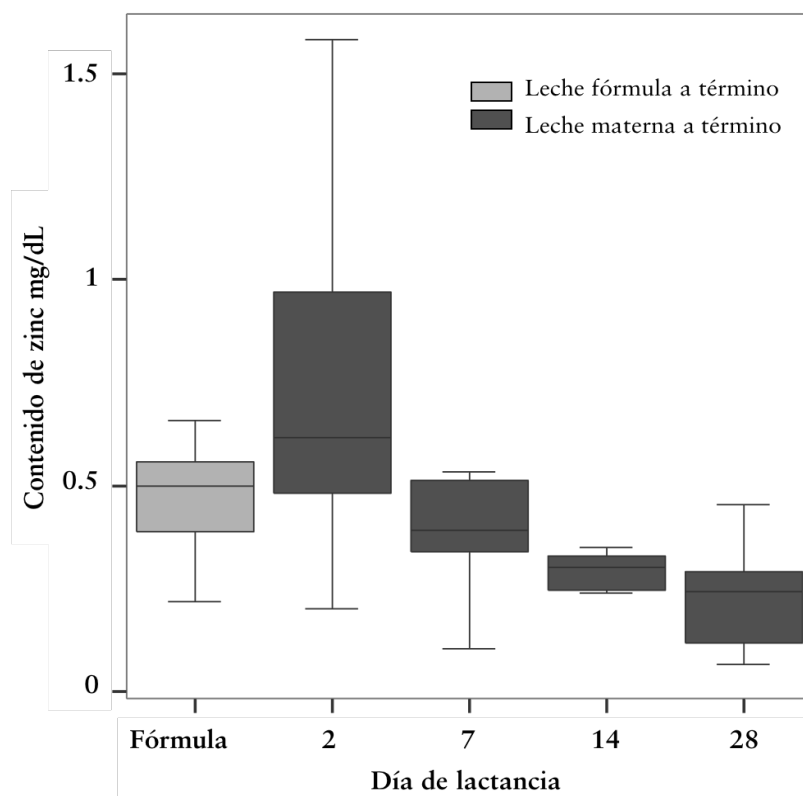


Figura DI.4. Variación con el período de lactancia del contenido de zinc en mg/dL para madres a término (AT) y comparación con la leche fórmula a término

DI.1.8. Discusión de los resultados obtenidos

El contenido total de zinc en el cuerpo de los neonatos a término (AT) es de aproximadamente 60 mg, y se encuentra principalmente en el tejido esquelético y en el hígado donde el zinc se encuentra unido a las metalotioneínas, mientras que sólo se detecta una pequeña fracción de Zn en el plasma infantil. Se conoce que los requisitos de zinc aumentan durante el embarazo [27] a tal punto que la deficiencia de zinc puede causar alteraciones del crecimiento embrionario y fetal o incluso producir un mayor riesgo de parto prematuro (demostrado en estudios en animales [28]). Hasta el momento, los estudios sobre el embarazo humano y los efectos de la suplementación

de zinc han fallado a la hora de demostrar efectos beneficiosos en el desarrollo y crecimiento fetal, la duración de la gestación y/o la supervivencia neonatal temprana. Sin embargo, conoce el efecto beneficioso de la suplementación materna de zinc en el estado inmune del neonato y en la disminución de la morbilidad infantil por enfermedades infecciosas [29].

Las necesidades de zinc en la dieta en neonatos a término (AT) varía entre 0.3-0.5 mg/kg/día, con un mínimo de 2.6 mg/día durante el primer año de vida [30,31,32]. Es importante señalar que la deficiencia de zinc durante los primeros meses de vida es muy infrecuente en los niños alimentados con leche materna, puesto que esta le proporciona una excelente fuente de zinc con alta biodisponibilidad. Sin embargo, después de 6 meses se cree que la leche humana es insuficiente para proporcionar un suministro adecuado de zinc porque se ha observado que su contenido disminuye de 0.30-0.5 mg/dL en el calostro a menos de 0.15 mg/dL a los 9 meses [33,34,35]. De acuerdo con nuestros datos, también se observó una tendencia decreciente significativa del contenido de zinc en la leche humana (0.61 a 0.24 mg/dL), con valores de concentración de zinc en la leche madura similares a los reportados por la Academia Americana de Pediatría [36]. La concentración de zinc en leches fórmula preparadas a partir de leche de vaca es generalmente <0.2 mg/dL, por tanto, se recomienda fortificarla con sales de zinc para alcanzar un contenido total de 0.4-1.0 mg/100Kcal (\pm 0.3-0.6 mg/dL) [32,37]. En quince de las dieciséis fórmulas analizadas en nuestro estudio, la concentración de zinc fue superior a 0.3 mg/dL, superior al mínimo recomendado. Por otro lado, los alimentos complementarios tempranos tradicionales, como los cereales, las frutas y las verduras, proporcionan cantidades muy modestas de zinc [38] y, para aquellos que contienen altos niveles en ácido fítico, la biodisponibilidad puede ser baja [39]. La introducción de productos de origen animal o de suplementos de zinc puede ser importante para satisfacer los requerimientos de zinc del niño según vaya creciendo [38,40].

Los balances de zinc en los lactantes prematuros y de bajo peso al nacer (LBW, *low-birth-weight*) son altamente variables y generalmente negativos [41,42]. En estos casos, la deficiencia de zinc es el resultado de diferentes circunstancias, incluyendo: a)

la disminución natural del contenido de zinc en la leche materna (2 dL/kg/día de leche madura de mujeres prematuras proporcionan $\pm 0,30$ mg/kg/día, que resulta inferior a los requerimientos teóricos de 0.5-1.0 mg/kg/día); b) el hecho de que el recién nacido prematuro tarda de 4 a 8 semanas en tolerar 2 dL/kg/día de leche (por lo tanto, durante este período la ingesta de zinc es aún más deficiente) y c) el uso frecuente de la alimentación intravenosa prolongada. Por otro lado, la baja biodisponibilidad de zinc ha sido reportada debido a diferentes circunstancias posibles, incluyendo la inmadurez de proteína intestinal rica en cisteína implicada en el mecanismo de absorción de zinc [43], la composición real y la especiación de Zn de la fórmula comercial usada (p.ej. cuando la proporción de hierro/zinc es superior a 3), y/o el hecho de que las fórmulas comerciales contienen una concentración comparativamente muy baja de ácido picolínico (un potenciador de la absorción de zinc que en la leche materna humana es 300 $\mu\text{mol/L}$ comparado con los 20 $\mu\text{mol/L}$ encontrados en leche materna). Por ello, la deficiencia de zinc puede ser frecuente en bebés prematuros. Por lo tanto, hoy en día es importante detectar cualquier deficiencia de zinc y, a continuación, proporcionar una adecuada suplementación de zinc [44]. Se ha demostrado que la administración de suplementos de zinc durante los primeros meses de vida se asocia con efectos significativos sobre el crecimiento, el aumento de peso, el desarrollo motor y la prevención de la diarrea en lactantes prematuros y con bajo peso (LBW) [45,46]. El empleo de suplementos dietéticos de zinc durante la lactancia, mediante fortificantes de leche humana en caso de lactancia materna (que contienen sales de zinc como: sulfato, gluconato de estearato u óxido) [42] o suplementos de zinc de las fórmulas pretérmino hasta 1.1 mg / 100Kcal (± 0.9 mg / dL) [32] parece ser recomendado para asegurar una ingesta adecuada de zinc en dichos bebés prematuros y LBW en edad lactante (0.5-1.0 mg/kg/día). Sin embargo, se desconoce si una suplementación por encima de las necesidades produce efectos beneficiosos, así como si existe una posible interacción entre la absorción de otros oligoelementos, como el hierro y el cobre.

Paralelamente a los estudios realizados con madres asturianas recogidos en la presente Tesis Doctoral, se inició una colaboración con el laboratorio del profesor

Ricardo E. Santelli, de la Universidad Federal de Río de Janeiro. De este modo, se realizó una comparación de los resultados preliminares allí encontrados para madres a término. Los resultados obtenidos están recogidos en el artículo: “J Chrom A 1428 (2016) 246-254”, recogido al final de la presente memoria. Al igual que sucede con las muestras asturianas, se observó un notable descenso del contenido total de zinc a lo largo del periodo de lactancia. Curiosamente, el contenido total encontrado en madres brasileñas resultó superior al encontrado en madres asturianas incluso en leche madura. Por otro lado, las leches fórmulas analizadas mostraron valores superiores a los encontrados en fórmulas españolas a término, siendo similares a las fórmulas pretérmino. En cualquier caso, los valores fueron igualmente superiores al valor mínimo de zinc recomendado para la fortificación de leche fórmula.

DI.1.9. Conclusiones del trabajo

Los resultados de este estudio han demostrado que los niveles totales de Zn encontrados en la leche humana de madres con parto prematuro (PT) y madres con parto a término (AT) son muy similares. Asimismo, se observó que en ambos grupos se produce una disminución significativa del contenido de Zn en leche durante el primer mes de lactancia (calostro a leche madura), y sus cubren los requerimientos diarios de Zn (aprox. 0.256 mg/dL). En el caso de niños pretérmino, existe el riesgo de que la leche madura no cubra las necesidades de Zn y sea necesario recurrir a la fortificación de leche materna con dicho elemento.

Los niveles de Zn en las 16 fórmulas analizadas variaban en función del fabricante (como era de esperar), pero en todos los casos fueron similares a los observados en el calostro y superiores a los encontrados en leche materna madura. Los valores encontrados mostraron que las fórmulas son adecuadas para cubrir los requerimientos de Zn de los recién nacidos prematuros y a término.

DI.1.10. Referencias bibliográficas

- ¹ J Raulin. *Chemical studies on vegetation* [in French]. *Ann Sci Nat*, 11 (1869) 93-9.
- ² WR Todd, CA Elvehjem and EB Hart. *Zinc in the nutrition of the rat*. *Am J Physiol*, 107 (1933) 146-56.
- ³ V Caggiano, R Schnitzler, W Strauss, RK Baker, AC Carter, AS Josephson and S Wallach. *Zinc deficiency in a patient with retarded growth, hypogonadism, hypogammaglobulinemia, and chronic infection*. *Am J Med Sci*, 257 (1969) 305-19.
- ⁴ KM Hambidge, C Hambidge, M Jacobs and JD Baum. *Low levels of zinc in hair, anorexia, poor growth and hypogeusia in children*. *Pediatr Res*, 6:12 (1972) 868-74. doi:10.1203/00006450-197212000-00003.
- ⁵ AS Prasad. *Impact of the Discovery of human zinc deficiency on health*. *J Am Coll Nutr*, 28:3 (2009) 257-65. doi:10.1016/j.jtemb.2014.09.002.
- ⁶ LM Gartner, J Morton, RA Lawrence, AJ Naylor, D O'Hare, RJ Schanler, AI Eidelman and American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding. *Breastfeeding and the use of human milk*. *Pediatrics*, 115:2 (2005) 496-506. doi:10.1542/peds.2004-2491.
- ⁷ NF Krebs and KM Hambidge. *Complementary feeding: clinically relevant factors affecting timing and composition*. *Am J Clin Nutr*, 85:2 (2007) 639S-45S.
- ⁸ C Agostoni et al. for the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Enteral nutrient supply for preterm infants: Commentary from the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Committee on Nutrition*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 50:1 (2010) 85-91. doi:10.1097/MPG.0b013e3181adaee0.
- ⁹ C Rubio, DG Weller, RE Martín-Izquierdo, C Revert, I Rodriguez and A Hardisson. *Alimentos funcionales. El zinc: oligoelemento esencial*. *Nutr Hosp*, 22:1 (2007) 101-7. ISSN 0212-1611.
- ¹⁰ S Khaghani, H Ezzatpanah, N Mazhari, MH Givianrad, H Mirmiranpour and FS Sadrabadi. *Zinc and copper concentrations in human milk and infant formulas*. *IranJ Pediatr*, 20:1 (2010) 53-7.
- ¹¹ NF Krebs, CJ Reidinger, S Hartley, AD Robertson and KM Hambridge. *Zinc supplementation during lactation: effects on maternal status and milk zinc concentrations*. *Am J Clin Nutr*, 61:5 (1995) 1030-66.
- ¹² BW Chaffee and JC King. *Effect of zinc supplementation on pregnancy and infant outcomes: A systematic review*. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 26:1 (2012) 118-37. doi:10.1111/j.1365-3016.2012.01289.x.
- ¹³ B Sandström, A Cederblad and B Lönnerdal. *Zinc absorption from human milk, cow's milk, and infant formulas*. *Am J Dis Child*, 137:8 (1983) 726-9.
- ¹⁴ E Giles and LW Doyle. *Zinc in extremely low-birthweight or very preterm infants*. *NeoReviews*, 8:4 (2007) e165-72. doi:10.1542/neo.8-4-e165.
- ¹⁵ RRF St Remy, ML Fernández-Sánchez and A Sanz-Medel. *Chapter 13. Total analysis and distribution of trace elements in human, cow and formula milk*. From: *The determination of chemical elements in food: applications for atomic and mass spectrometry*. Ed. By S. Caroli. John Wiley & Sons, Inc. (2007) Pages: 401-36. ISBN-13: 978-0-471-68784-9.

- ¹⁶ T Dağbaşı, S Saçmacı, N Çankaya and C Soykan. *Synthesis, characterization and application of a new chelating resin for solid phase extraction, preconcentration and determination of trace metals in some dairy samples by flame atomic absorption spectrometry*. Food Chem, 211 (2016) 68-73. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.037.
- ¹⁷ I Machado, G Bergmann and M Pistón. *A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant formulas using flame atomic absorption spectrometry (FAAS)*. Food Chem, 194 (2016) 373-6. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.027.
- ¹⁸ K Miranda, AL Vieira, MA Bechlin, FM Fortunato, A Virgilio, EC Ferreira and JAG Neto. *Determination of Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Se, and Zn in foodstuffs by atomic spectrometry after sample preparation using a low-cost closed-vessel conductively heated digestion system*. Food Anal Meth, 9:7 (2016) 1887-94. doi:10.1007/s12161-015-0371-8.
- ¹⁹ A Hejtmánková, J Kučerová, D Miholová, D Koliňová and M Orsák. *Levels of selected macro- and microelements in goat milk from farms in the Czech Republic*. Czech J Anim Sci, 47:6 (2002) 253-60.
- ²⁰ EM García, ML Lorenzo, C Cabrera and MC López. *Trace element determination in different milk slurries*. J Dairy Res, 66:4 (1999) 569-78.
- ²¹ A Ikem, A Nwankwoala, S Oduyungbo, K Nyavor and N Egiebor. *Levels of 26 elements in infant formula from USA, UK, and Nigeria by microwave digestion and ICP-OES*. Food Chem, 77:4 (2002) 439-47. doi:10.1016/S0308-8146(01)00378-8.
- ²² N Mohd-Taufek, D Cartwright, M Davies, AK Hewavitharana, P Koorts, PN Shaw, R Sumner, E Lee and K Whitfield. *The simultaneous analysis of eight essential trace elements in human milk by ICP-MS*. Food Anal Meth, 9:7 (2016) 2068-75.
- ²³ S Stürup. *Application of HR-ICP-MS for the simultaneous measurement of zinc isotope ratios and total zinc content in human samples*. J Anal At Spectrom, 15 (2000) 315-21. doi:10.1039/a906207f.
- ²⁴ CN Maréchal, P Télouk and F Albarède. *Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry*. Chem Geol, 156:1-4 (1999) 251-73. doi:10.1016/S0009-2541(98)00191-0.
- ²⁵ RE Wolf, AS Todd, S Brinkman, PJ Lamothe, KS Smith and JF Ranville. *Measurement of total Zn and Zn isotope ratios by quadrupole ICP-MS for evaluation of Zn uptake in gills of brown trout (Salmo trutta) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Talanta, 80:2 (2009) 676-84. doi:10.1016/j.talanta.2009.07.048.
- ²⁶ TW May and RH Wiedmeyer. *A table of polyatomic interferences in ICP-MS*. At Spectrosc, 19:5 (1998) 150-5.
- ²⁷ M Favier and I Hininger-Favier. *Zinc and pregnancy* [Article in French]. Gynecol Obstet Fertil, 33:4 (2005) 253-8.
- ²⁸ D Shah and HP Sachdev. *Effect of gestational zinc deficiency on pregnancy outcomes: summary of observation studies and zinc supplementation trials*. Br J Nutr, 85: 2 (2001) S101-8.
- ²⁹ D Shah and HP Sachdev. *Zinc deficiency in pregnancy and fetal outcome*. Nutr Rev, 64 (2006) 15-30.
- ³⁰ National Research Council Food and Nutrition Board, Recommended Dietary Allowances, tenth ed., National Academy Press, Washington D.C., 1989.

- ³¹ E Sievers, HD Oldigs, K Dörner and J Schaub. *Longitudinal zinc balances in breast-fed and formula-fed infants*. Acta Paediatrica, 81:1 (1992) 1-6.
- ³² CJ Klei. *Nutrient requirements for preterm infant formulas*. J Nutr, 132:6 Suppl 1 (2002) 1395S-77S.
- ³³ JG Dórea. *Zinc deficiency in nursing infants*. J Am Coll Nutr, 21:2 (2002) 84-7.
- ³⁴ L Perrone, L Di Palma, R Di Toro, G Gialanella and R Moro. *Interaction of trace elements in a longitudinal study of human milk from full-term and preterm mothers*. Biol Trace Elem Res, 41 (1994) 321-30.
- ³⁵ NF Krebs, CJ Reidinger, LV Miller and KM Hambidge. *Zinc homeostasis in breast-fed infants*. Pediatr Res, 39 (1996) 661-5.
- ³⁶ American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. *Nutritional needs of low-birth-weight infants*. Pediatrics, 75:5 (1985) 976-86.
- ³⁷ L Salmenperä, J Perheentupa, P Pakarinen and MA Siimes. *Zinc supplementation of infant formula*. Am. J. Clin. Nutr. 59:5 (1994) 985-9.
- ³⁸ NF Krebs. *Dietary zinc and iron sources, physical growth and cognitive development of breastfed infants*. J. Nutr, 130:2S Suppl (2000) 358S-60S.
- ³⁹ NF Krebs and J Westcott. *Zinc and breastfed infants: if and when is there a risk of deficiency?*. Avd Exp Med Biol, 503 (2002) 69-75.
- ⁴⁰ KM Hambidge and NF Krebs. *Zinc, low birth weight, and breastfeeding*. Pediatrics, 112:6 (2003) 1419-20.
- ⁴¹ A Loui, A Raab, M Obladen and P Brätter. *Nutritional zinc balance in extremely low-birth-weight infants*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 32:4 (2001) 438-42.
- ⁴² S Jalla, NF Krebs, D Rodden and KM Hambidge. *Zinc homeostasis in premature infants does not differ between those fed preterm formula or fortified human milk*. Pediatr Res, 56:4 (2004) 615-20.
- ⁴³ JM Hempe and RJ Cousins. *Cysteine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport*. Proc Natl Acad Sci, 88:21 (1991) 9671-4.
- ⁴⁴ SJ Osendarp, CE West and RE Black. *The need for maternal zinc supplementation in developing countries: an unresolved issue*. J Nutr, 133:3 (2003) 817-27.
- ⁴⁵ PI Lira, A Ashworth and SS Morris. *Effect of zinc supplementation on the morbidity, immune function, and growth of low-birth-weight, full-term infants in northeast Brazil*. Am J Clin Nutr, 68:2 Suppl (1998) 418S-24S.
- ⁴⁶ NM Díaz-Gómez, E Doménech, F Barroso, S Castells, C Cortabarría and A Jiménez. *The effect of zinc supplementation on linear growth, body composition, and growth factors in preterm infants*. Pediatrics, 111:5 Pt 1 (2003) 1002-9.

DI.2. ESPECIACIÓN DE ZINC EN LECHE HUMANA Y FÓRMULA

DI.2.1. Introducción

Como se comprobó empíricamente al inicio del presente capítulo para el caso concreto del Zn, la leche materna posee una composición ideal para el recién nacido durante los primeros meses de vida, adaptándose a sus necesidades nutricionales en esta etapa de rápido desarrollo [1,2]. La gran mayoría de las leches fórmula actuales contienen nutrientes similares a los que aporta la leche materna a los bebés, que les ayudan a reforzar su sistema inmune y defensas, mejoran la digestión, etc. Estas leches contienen probióticos, prebióticos, aminoácidos, minerales, vitaminas, etc [3,4]. A pesar de los esfuerzos para conseguir que los resultados nutricionales de los lactantes alimentados con leches fórmula sean más similares a los de los lactantes amamantados, ha habido un progreso limitado con respecto a las proteínas y los componentes bioactivos que pueden afectar a los resultados nutricionales de los neonatos a corto y largo plazo [5]. La comparación de las proteínas y especies presentes en la leche materna con las presentes en leches fórmula actualmente utilizadas (tanto la calidad como la cantidad), desvela información clave para conocer la establecer el valor nutricional de las fórmulas [6]. De hecho, varias proteínas presentes en la leche bovina (base de la mayoría de las leches fórmula) son similares a sus homólogos de la leche humana, pudiendo estar presente en concentraciones más bajas (p. ej. lactoferrina) o más elevadas (p. ej. caseínas), o estar presentes en la leche de vaca (p. e.j. lactoglobulina) y no en la humana.

Adicionalmente se conoce que en leche materna, el Zn (al igual que otros elementos traza esenciales) se encuentra asociado a diferentes proteínas o especies (p.ej.

formando sales inorgánicas o unido a proteínas de alto o bajo peso molecular [7,8]) cada una con unas características químicas diferentes (p.ej. solubilidad, labilidad del zinc, entre otras) las cuales dotan a la leche materna de una complejidad única [5]. Dichas formas fisicoquímicas de un elemento son comúnmente denominadas *especie(s) química(s)*, las cuales están caracterizadas por su composición isotópica, su estado electrónico o de oxidación y/o su estructura compleja o molecular. Según esto, la especiación de un elemento (p.ej. zinc) corresponde a su distribución entre las especies químicas definidas en un sistema (p.ej. leche materna o fórmula), y, por ende, el *análisis de especiación* consiste en el conjunto de actividades analíticas enfocadas a la identificación y/o determinación de una o más especies químicas en una muestra concreta [9].

Es importante destacar que una de las características inherentes a toda forma fisicoquímica, es la biodisponibilidad que presenta el elemento (p. ej. Zn) desde dicha especie. La diferente biodisponibilidad del zinc desde una forma fisicoquímica u otra influye enormemente tanto su toxicidad como su actividad biológica o estatus en el organismo, puesto que condiciona en gran medida su absorción y posterior distribución en el organismo para realizar diversas funciones vitales [10]. Actualmente, se conoce que la absorción real de zinc por los niños alimentados con fórmula es diferente de la de los niños amamantados [5]. Este hecho explica la necesidad actual de llevar a cabo estudios basados en el análisis de especiación en muestras de leche, en lugar de sólo las determinaciones totales más comúnmente utilizadas [10,11].

Tal y como se comentó anteriormente, la leche posee una matriz química de elevada complejidad, con numerosas especies que interaccionan entre sí para mantener la estabilidad estructural en dicho fluido biológico. Por ello, la especiación de este tipo de muestra es desafiante, puesto que existen numerosas proteínas y especies diferentes. La separación de proteínas en leche materna se realiza generalmente mediante geles de poliacrilamida [12 , 13], o separaciones cromatográficas utilizando fase reversa (*reverse phase*, RP) para separar eficazmente los diferentes tipos de caseína en leche, atendiendo a sus diferencias de polaridad [14 , 15] o utilizando cromatografía de exclusión por tamaños (*size exclusion*

chromatography, SEC) para separar las proteínas y especies presentes en el suero lácteo atendiendo a su peso molecular [7]. La detección posterior mediante UV-Vis permite conocer el perfil proteico de la muestra [16].

La proteómica cuantitativa y la determinación absoluta de proteínas son temas de creciente interés, ya que sólo la cantidad de proteínas o los cambios en su abundancia reflejan el estado y la extensión de los cambios de un sistema biológico dado. En las últimas décadas, el ICP-MS ha mostrado una capacidad extraordinaria para abordar el problema de la cuantificación absoluta de proteínas, a través de determinaciones de los heteroátomos asociados a las proteínas [17], principalmente utilizando isótopos enriquecidos del elemento, mediante la denominada dilución isotópica. Dependiendo del tipo de trazador utilizado y el momento en el que se adicione a la muestra, se puede distinguir entre el modo específico (*species-specific*) y el inespecífico (*species-unespecific*). En ambos casos, la medida de las relaciones isotópicas se puede llevar a cabo mediante fuentes de ionización elementales y moleculares dependiendo de la información que se desee obtener.

En el *modo específico (species-specific)*, el trazador posee la misma estructura química que el analito, pero contiene uno de sus heteroátomos enriquecido isotópicamente. Dicho compuesto se añade al comienzo del análisis y de este modo permite corregir todos los errores derivados de la preparación de muestra y la detección [18,19]. Por otro lado, en el *modo inespecífico (species-unespecific o IDA post-columna)*, el trazador se añade en continuo mezclándose con la muestra tras la separación cromatográfica y antes de que los analitos alcancen la fuente de ionización. En este modo de análisis, el trazador isotópico puede presentar una estructura química distinta a la del analito. Esta modalidad se aplica cuando no se disponen de patrones del analito o cuando se desconoce su estructura química, pero solo corrige los errores derivados de la detección.

En el caso concreto de la leche, existen numerosos estudios cualitativos que realizan la especiación de diversos elementos esenciales asociados a las diversas proteínas presentes en leche materna y fórmula [20]. No obstante, la cuantificación

de los elementos asociados a proteínas no ha sido estudiada en profundidad debido a la dificultad del análisis, la necesidad de utilizar patrones específicos para cada proteína y la estabilidad de las metaloespecies en el suero lácteo. Concretamente, la cuantificación de zinc asociado a distintas proteínas de leche resulta una tarea compleja, debido a la gran labilidad de las especies de zinc y a la ausencia de patrones específicos. Debido a los buenos resultados que la metodología de *species-unespecific* (o IDA post-columna) proporcionó para la cuantificación de metales asociados a proteínas en otras muestras biológicas, se decidió utilizar dicha metodología para la cuantificación de especies de zinc presentes en leche materna.

Finalmente, resulta de gran interés conocer la identidad de las especies presentes en cada pico cromatográfico derivado de la separación mediante cromatografía de exclusión por tamaños, donde en cada pico pueden encontrarse diferentes proteínas con un peso molecular similar, e incluso algunas de ellas pueden no ligar el zinc. Para ello, el uso de cromatografías ortogonales (2^a dimensión) y/o el uso de técnicas de espectrometría de masas moleculares, resultan de gran interés para confirmar la identidad de las proteínas o especies presentes.

La combinación de los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas moleculares y espectrometría de masas elementales para la detección de metaloespecies, permite obtener la especiación integrada basada en la identificación y cuantificación de las proteínas.

DI.2.2. Objetivo parcial

En este apartado del capítulo se estudió la variación de la especiación de las biomoléculas (asociadas al Zn) presentes en la leche de madres asturianas durante el primer mes de lactancia (calostro, leche de transición y leche madura) y dependiendo de la edad gestacional (parto a término y prematuro), comparando los resultados de especiación con los obtenidos en leches fórmula actualmente utilizadas para la alimentación de recién nacidos.

La especiación cuantitativa de Zn en el suero de leche se estudió mediante HPLC-ICP-MS utilizando IDA post-columna.

Las *etapas* llevadas a cabo en el presente capítulo fueron:

- Desarrollo de una metodología analítica para la separación de proteínas mediante cromatografía de exclusión por tamaños y detección mediante UV-Vis, y posterior detección de Zn (asociado a proteínas) mediante ICP-MS.
- Cálculo de las recuperaciones obtenidas tras la separación cromatográfica para cada muestra analizada y desarrollo de una metodología de HPLC-ICP-MS IDA post-columna con el fin de obtener una cuantificación exacta del contenido de Zn asociado a las proteínas y especies en leche.
- Comparación de los resultados obtenidos en leche materna atendiendo a posibles variaciones a lo largo del período de lactancia, dependiendo de la edad gestacional y comparación con los análisis de leches fórmula.
- Desarrollo de una metodología de masas moleculares para la identificación de metaloespecies de Zn presentes en las diversas fracciones de leche materna obtenidas tras la separación cromatográfica mediante exclusión por tamaños.

DI.2.3. Especiación de leche mediante cromatografía líquida

En el presente capítulo se llevó a cabo la especiación de zinc en leche materna y leche fórmula empleadas comúnmente en la alimentación de neonatos. Tal y como se puede observar en la **Figura DI.5**, la separación de biomoléculas presentes en la leche conteniendo Zn se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con una columna cromatográfica de exclusión por tamaños (SEC) y detección mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Para la obtención del perfil proteico se utilizó la detección mediante espectrofotometría visible ultravioleta (UV-Vis).

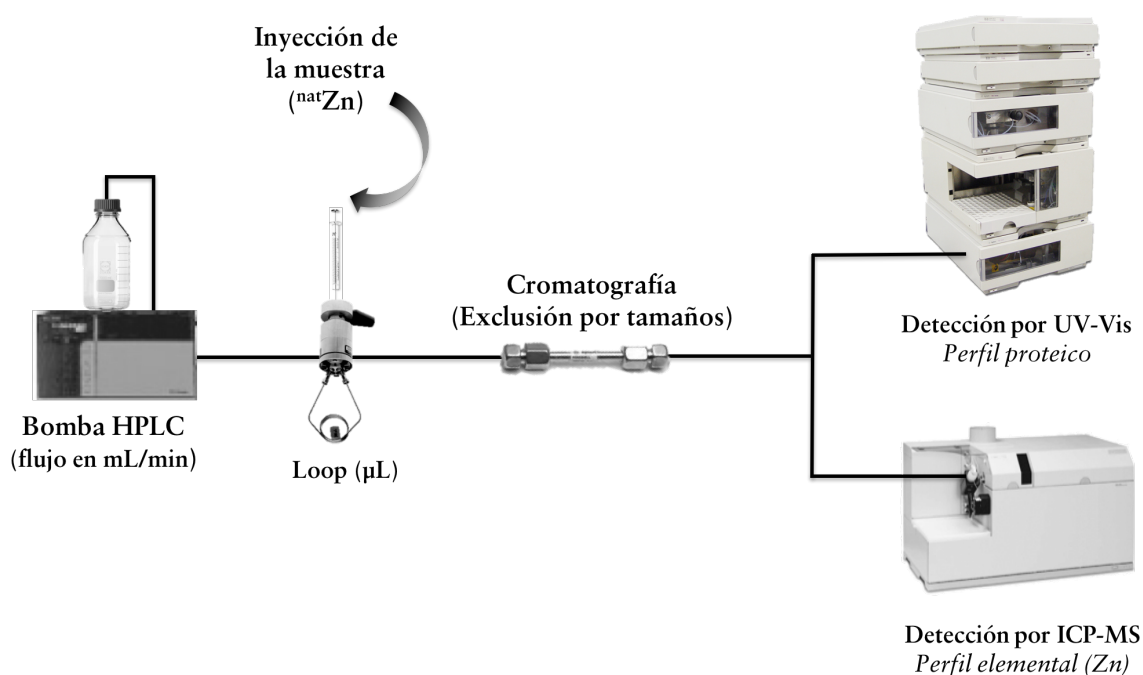


Figura DI.5. Descripción gráfica de los experimentos de especiación llevados a cabo

DI.2.3.1. Perfil proteico de leche mediante HPLC-(SEC)-UV-Vis

El perfil proteico del suero de leche (ver preparación en sección XXXX de Experimental), se obtuvo mediante HPLC-(SEC)-UV-Vis midiendo la absorbancia a 280 nm.

La calibración de la columna se llevó a cabo con estándares de proteína con pesos moleculares que abarcan el intervalo de separación de la columna. En nuestro caso, las proteínas utilizadas para la calibración de la columna de separación por tamaños fueron: Tiroglobulina (669kDa), Ferritina (450 kDa), Inmunoglobulina (160 kDa), Lactoferrina (78kDa), Transferrina (76 kDa), Albúmina (67 kDa), β -lactoglobulina (36.6 kDa), α -lactoalbúmina (14.2 kDa) y Ribonucleasa (13.7 kDa). Cada uno de los patrones se inyectaron individualmente en la columna de exclusión por tamaños utilizando 0.1 M (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol o Tris) : HCl (pH 7) a un flujo de 0.5 mL/min.

La recta de calibración relaciona el logaritmo del peso molecular (PM) de una especie con el tiempo de permanencia dentro en la columna (tiempo de retención). La recta obtenida fue $\log(\text{PM}) = 6.43 - 0.07 \cdot t_{\text{retención}} \text{ (min)}$. Con esta ecuación seremos capaces estimar el peso molecular aproximado de las proteínas desconocidas que eluyen a un tiempo determinado.

Posteriormente se obtuvo el perfil proteico de las muestras de suero de leche para cada una de las madres tomadas en diferentes etapas de lactancia (2°, 7°, 14° y 28° días) utilizando HPLC-(SEC) con un detector Vis-UV a la longitud de onda seleccionada: 280 nm (región de emisión de las proteínas). Como se muestra en la **Figura DI.6**, los cromatogramas A y B obtenidos proporcionaron perfiles proteicos cualitativos muy similares (absorbancia recogida a 280 nm) para el calostro, la leche de transición y madura, definiéndose claramente al menos cinco especies en el rango de exclusión de la columna.

El uso de la recta de calibración permitió deducir los pesos moleculares aproximados que poseen las proteínas que eluyen en cada uno de los picos cromatográficos, los cuales están expuestos sobre cada pico cromatográfico en cada uno de los cromatogramas recogidos en las **Figuras DI.16**.

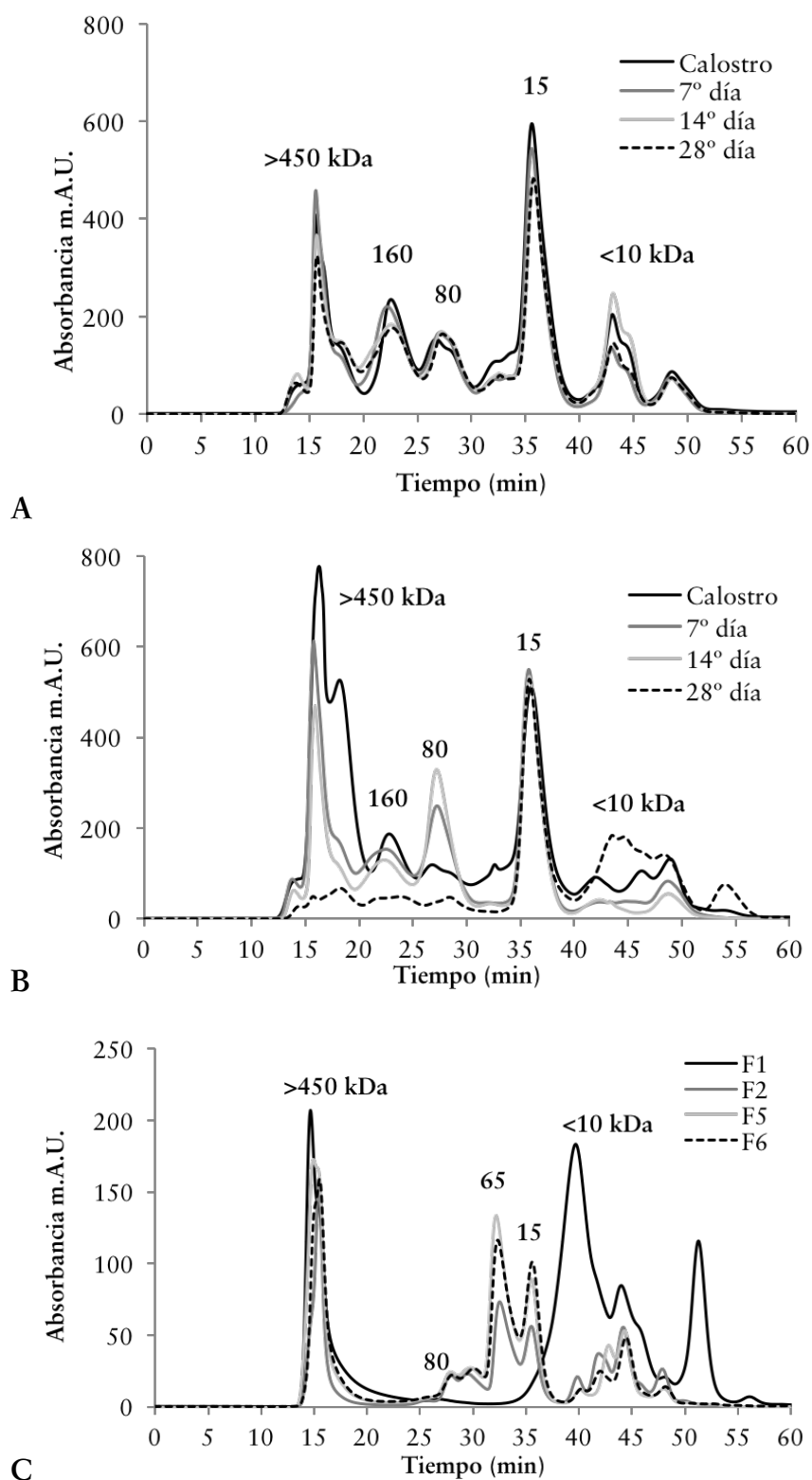


Figura DI.6. Perfil proteico obtenido mediante HPLC-(SEC)-VisUV para leche de madres (A) pretérmino, (B) a término, a lo largo del período de lactancia y (C) para diferentes leches fórmula.

Los primeros dos picos observados (entre 12 y 25 min) están relacionados con pesos moleculares elevados, como las inmunoglobulinas en la leche (IgA 430 kDa e IgG 160 kDa), mientras que el tercer pico (entre 25 y 30 min) debe corresponder a la lactoferrina no resuelta 78 kDa), transferrina (76 kDa) y/o albúmina de suero de leche (66 kDa). El cuarto pico observado (entre 30 y 40 min) debería estar relacionado con la α -lactalbúmina (14 kDa), mientras que el quinto pico (más de 40 min, <10 kDa) podría corresponder a compuestos de bajo peso molecular presentes de la leche (como diferentes péptidos, peptonas, aminoácidos, ácido orótico, lactosa, enzimas, vitaminas y sales minerales).

Comparando el perfil proteico obtenido para una misma madre pretérmino (Figura DI.6A) no se observaron diferencias significativas a lo largo del periodo de lactancia, encontrándose las mismas especies y aproximadamente el mismo contenido a lo largo del periodo de lactancia, siendo en leche madura ligeramente inferior al encontrado en el calostro. Por el contrario, en el caso de la leche materna a término (Figura DI.6B) se encontró mayor variación en el contenido proteico. En este caso, el contenido en proteínas de elevado peso molecular (>450kDa) es muy superior en los primeros días de lactancia (calostro y leche de transición) comparado con el que presenta al mes de haberse iniciado la lactancia (leche madura).

Comparando los perfiles proteicos encontrados para madres a término y pretérmino, se observa que las especies que eluyen en ambos casos corresponden a pesos moleculares similares, si bien el contenido de cada una de estas proteínas es diferente entre ambos grupos. Cabe resaltar que, a pesar de esta variación, se observó que el pico cromatográfico que eluye aproximadamente a 35min, correspondiente con un tamaño molecular de 15 kDa no presentó variación a lo largo del periodo de lactancia y que su contenido (intensidad de absorbancia), fue muy parecido si se compara entre madres (AT y PT). En estudios previos [21] la proteína contenida en dicho pico cromatográfico se identificó como la α -lactalbúmina, una proteína que se conoce que puede ligar al Zn. La invariabilidad del contenido de esta especie independientemente de la edad gestacional y su permanencia a lo largo del periodo de lactancia en los mismos niveles sugiere una singular función en el organismo, y por

ello se realizaron más estudios a cerca de esta proteína los cuales están recogidos en el apartado III del presente capítulo.

En el caso de las leches fórmulas analizadas, el perfil proteico obtenido difiere enormemente de los obtenidos para la leche humana. Por lo general, el lactosuero de leche fórmula presentó un contenido de proteínas mucho menor (comprobar escalas de la **Figura DI.6** para **A, B** y **C**), mientras que los niveles reales variaron con el fabricante. Como era de esperar se encontraron proteínas en la región de altos pesos moleculares (>450 kDa) debidos probablemente a las inmunoglobulinas añadidas a las fórmulas con el objetivo de ayudar al sistema inmune de los neonatos. Al contrario de lo que sucedió con la leche materna, no se encontraron proteínas en la región entre 20 y 30 minutos, pero existen especies de menores pesos moleculares alrededor de los 65 y 15 kDa e incluso inferiores.

DI.2.3.2. Perfil elemental de Zn en leche mediante HPLC-(SEC)-ICP-MS

Optimización de los parámetros del ICP-MS

Como se comentó anteriormente, el análisis de un fluido biológico como la leche mediante ICP-MS está limitado en parte por la complejidad de la matriz y los numerosos elementos que la componen, lo que le predispone a formar interferencias poliatómicas en el plasma (**Tabla DI.1**). Con el fin de eliminar dichas interferencias se utilizó un ICP-MS (modelo 7500ce) de tipo cuadrupolo equipado con celda de colisión/reacción en el cual se utilizó un flujo de 4 mL H₂/min para la presurización de la celda en las medidas de Zn mediante HPLC-ICP-MS. El resto de las condiciones experimentales utilizadas fueron iguales a las utilizadas en el capítulo anterior (recogidas en la **Tabla DI.2**), con excepción de los parámetros de adquisición de datos en los cromatogramas, donde se utilizó 1 punto por pico y un tiempo de adquisición de 0.3 s.

Niveles de Zn encontrados en la especiación de leche materna y fórmula

Tras la optimización de las condiciones en el ICP-MS, se llevó a cabo la medida de las muestras de leche materna (a término y pretérmino) a lo largo del periodo de lactancia, así como de las leches fórmula. Para ello, se analizó el suero de leche preparado diariamente para cada una de las muestras siguiendo el procedimiento descrito en el apartado XXX de la sección experimental. La detección mediante ICP-MS permitió obtener el perfil elemental del zinc para cada una de las muestras analizadas. Los cromatogramas de especiación de zinc a término completo, prematuros y fórmulas se muestran en la **Figura DI.7**.

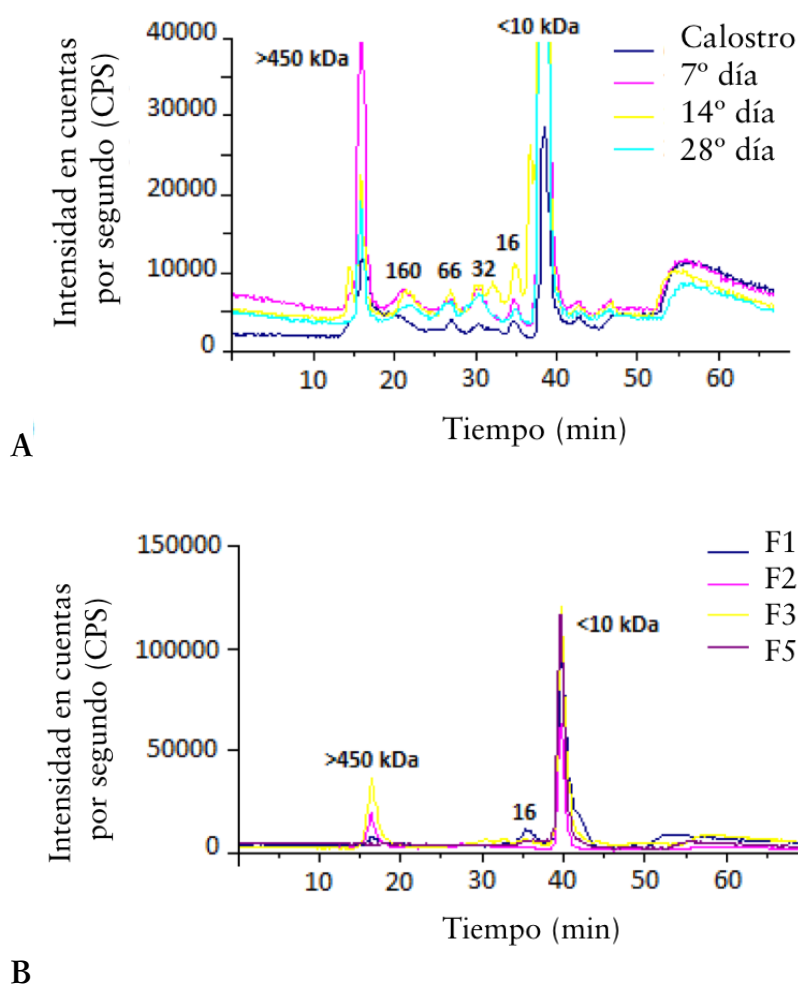


Figura DI.7. Variación del contenido de Zn obtenido mediante HPLC-(SEC)-ICPMS para (A) leche materna pretérmino a lo largo del período de lactancia y (B) diferentes leches fórmula.

A partir de los cromatogramas obtenidos para las distintas madres (AT y PT) analizadas a lo largo del periodo de lactancia, se calculó el contenido relativo de Zn en las fracciones observadas para la leche materna expresado como porcentaje del contenido total de Zn encontrado en el análisis mediante HPLC-(SEC)-ICP-MS. Los resultados obtenidos se compararon atendiendo al período de lactancia, así como su variación con la edad gestacional (AT y PT). Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la **Tabla DI.5**. Cada valor se expresa como la mediana (intercuartil 25-75).

Rango de pesos moleculares

	>600–160 kDa	90–70 kDa	40–30 kDa	20–10 kDa	< 10 kDa
Madres	30.2	11.4	7.4	0.0	47.1
A término	(19.8–39.6)*	(4.7–26.7) †	(5.2–16.3) ‡	(0.0–2.8) §	(25.0–52.2) ¶
2° día	32.8 (14.8–43.9)	29.9 (4.5–47.2)	5.2 (0.0–20.1)	20.1 (0.0–29.5)	6.0 (0.0–46.0)
7° día	17.7 (14.9–38.7)	5.5 (0.0–25.9)	8.1 (5.0–24.4)	0.0 (0.0–2.6)	48.3 (37.0–72.0)
14° día	26.8 (25.9–39.9)	11.5 (7.8–26.9)	5.7 (5.2–18.1)	0.0 (0.0–2.9)	48.2 (28.0–53.1)
28° día	30.5 (29.9–48.1)	11.3 (3.4–17.9)	10.1 (6.7–11.0)	0.0 (0.0–2.6)	49.5 (23.9–55.1)
Valor P	0.668	0.506	0.863	0.483	0.264
Madres	41.6	11.8	9.5	3.4	31.8
pretérmino	(28.2–46.6)*	(7.8–15.2) †	(6.6–13.4) ‡	(0.0–5.7) §	(24.4–41.2) ¶
2° día	47.7 (33.1–55.2)	13.4 (5.5–26.0)	6.6 (2.6–8.0)	2.7 (0.0–5.9)	31.5 (18.7–44.1)
7° día	42.9 (33.7–45.1)	9.0 (3.9–17.0)	9.4 (5.3–16.4)	2.9 (0.0–6.2)	33.8 (21.2–40.6)
14° día	41.6 (29.8–45.5)	13.3 (10.2–15.3)	10.8 (6.8–14.3)	3.8 (0.3–5.4)	28.9 (24.2–41.1)
28° día	32.5 (25.2–49.1)	11.6 (10.2–14.7)	11.6 (7.5–13.5)	3.3 (0.4–5.8)	34.9 (24.7–51.1)
Valor P	0.454	0.590	0.191	0.981	0.835

* P = 0.059. † P = 0.790. ‡ P = 0.545. § P = 0.157. ** P = 0.288.

Tabla DI.5. Porcentaje de contenido de zinc en las diferentes zonas observadas tras el análisis de la leche humana. Comparación entre los días de lactancia y la edad gestacional

Como se muestra en la **Figura DI.7A**, se observó que, en el caso de leche materna, la mayor parte del zinc eluyó principalmente asociado bien a proteínas de altos o a bajos pesos moleculares. El porcentaje de zinc eluido asociado a proteínas de alto peso molecular (por ejemplo, inmunoglobulinas) ascendió al 18-32% en muestras a término y a 32-47% en leche materna prematura (véase la **Tabla DI.5**).

Por otro lado, los compuestos de bajo peso molecular que contienen Zn ascendieron al 48% en muestras a término y a 32% en muestras de leche pretérmino. No se observaron diferencias significativas (*P value*) en el contenido de Zn (%) encontrado en cada una de las zonas estudiadas (>600–160 kDa, 90–70 kDa, 40–30 kDa, 20–10 kDa, < 10 kDa) dependiendo del período de lactancia (calostro, leche de transición o leche madura) en muestras de madres a término. Tampoco se encontraron diferencias significativas a lo largo del período de lactancia en el caso de madres con parto prematuro, ni tampoco al comparar los resultados obtenidos en ambos grupos (AT y PT. **Tabla DI.5**).

Por otro lado, la distribución del zinc en las fórmulas se encontró principalmente (60%) eluyendo a pesos moleculares muy bajos (<10 kDa) y las diferencias fueron estadísticamente significativas (ver **Figura DI.7B** y **Tabla DI.5**).

DI.2.3.3. Especiación cuantitativa de Zn en leche mediante HPLC-(SEC)-ICP-MS e IDA post-columna

Descripción de la metodología HPLC-(SEC)-ICP-MS e IDA post-columna

La **Figura DI.8** representa el esquema del sistema utilizado para la especiación cuantitativa de Zn mediante HPLC-(SEC)-ICP-MS e IDA post-columna para las muestras de suero lácteo obtenidas según el procedimiento descrito en el apartado XXX de la sección experimental. Las muestras de suero, conteniendo el zinc endógeno (^{nat}Zn) se inyectan en la columna cromatográfica por medio de una válvula de 6 vías. Las biomoléculas presentes se separan de acuerdo con su tamaño a través de la columna de exclusión por tamaños (SEC). El eluyente de la columna se mezcla con un flujo constante de trazador de cuantificación enriquecido isotópicamente (⁶⁷Zn). La mezcla resultante es introducida en el ICP-MS donde se monitorizan los isótopos del zinc seleccionados. El cromatograma obtenido representa la intensidad de la señal expresada en cuentas por segundo (CPS) para cada isótopo en función del tiempo (min).

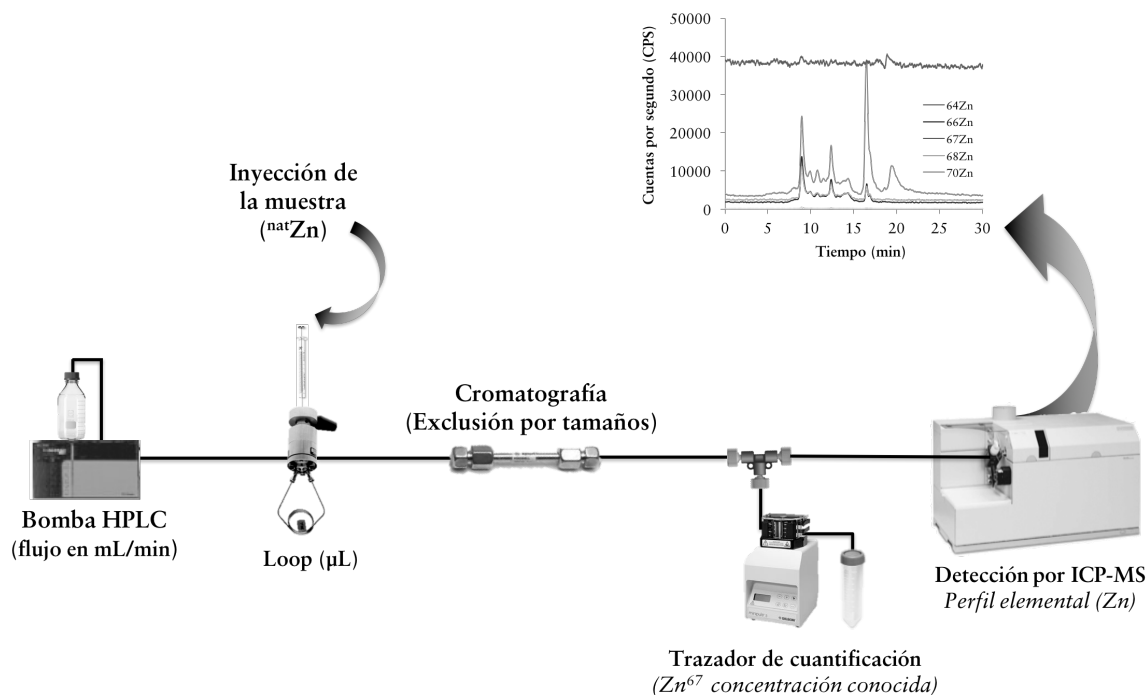


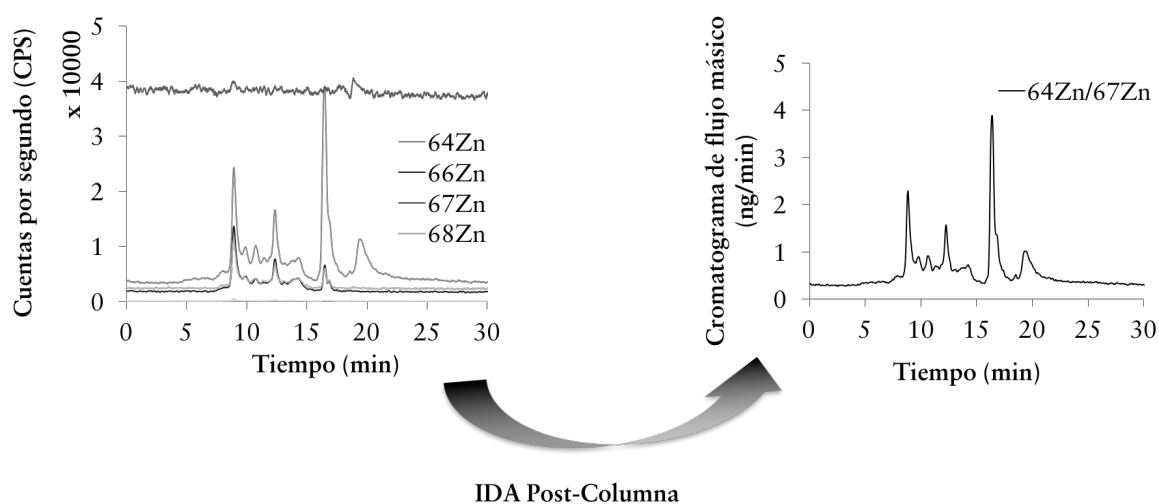
Figura DI.8. Esquema del sistema HPLC-ICP-MS IDA post-columna

El empleo de la ecuación de la dilución isotópica post-columna (ver Figura DI.9), en cada punto del cromatograma, permite calcular la concentración original del elemento en dicha muestra (^{nat}Zn) a partir de la medida de la relación isotópica en la mezcla. Donde: C_t es la concentración del trazador, d_t y f_t son la densidad de la disolución del trazador y el flujo post-columna de introducción del trazador de cuantificación, respectivamente. M_t corresponde a la masa atómica del trazador y M_s a la masa atómica de la muestra. A_t^b es la abundancia del isótopo más abundante en el trazador y A_s^a la abundancia del isótopo más abundante en la muestra conteniendo Zn endógeno. $R_t = a/b$ es la relación de ambos isótopos en el trazador, y $R_s = b/a$ en la muestra. El R_m es la relación en la mezcla, cuyo valor se obtiene experimentalmente en cada punto del cromatograma.

Con excepción de la relación isotópica R_m (relación de intensidades de un isótopo frente a la intensidad del isótopo del trazador de cuantificación), todos los

parámetros son conocidos y por tanto la cantidad de masa de un isótopo que eluye en cada punto (denominado flujo másico) se obtiene con la simple medida de R_m mediante espectrometría de masas a partir de las intensidades de los isótopos correspondientes en cada punto del cromatograma.

Es decir, mediante el empleo de IDA post-columna es posible transformar el cromatograma obtenido (señal frente a tiempo) en una representación del flujo másico (masa/tiempo) frente al tiempo.



$$\text{Flujo másico}_s = C_t \cdot f_t \cdot d_t \cdot \frac{M_s}{M_t} \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m R_s} \right)$$

Figura DI.9. Descripción gráfica del acoplamiento HPLC-ICP-MS para la detección cuantitativa de un elemento

Como se puede observar en la ecuación de la **Figura DI.9**, y, contrariamente a lo que ocurre con otras técnicas de cuantificación (p.ej. las adiciones estándar o la calibración externa), no existe ningún parámetro relativo a la sensibilidad instrumental. Por tanto, la primera ventaja del análisis por dilución isotópica es que cualquier variación de este parámetro debida a inestabilidades instrumentales como la deriva de la señal o los efectos de matriz no tendrá ninguna influencia en el valor final del flujo másico del isótopo en la muestra (flujo másico_s) puesto que afectará a ambos isótopos por igual, manteniendo la relación R_m inalterada. Además, cuando se aplican otros métodos analíticos u otras técnicas de calibración es necesario

determinar de una manera muy precisa la cantidad total de analito que ha sido aislada para su detección, así como el rendimiento de cada paso analítico, lo cual no siempre es una tarea fácil. En IDA post-columna, la medida de la relación R_m en cada punto del cromatograma proporciona directamente la cantidad del isótopo en la muestra que está eluyendo de la columna en cada punto, y no es necesario recurrir a la calibración externa instrumental ni a métodos de adiciones estándar, con lo que se consigue un ahorro considerable en el tiempo de análisis respecto a los métodos analíticos convencionales [22].

La elección del trazador de cuantificación (o *spike*) post-columna, así como de su concentración se realizó teniendo en cuenta que tanto los fondos como el máximo de intensidad de la muestra estén dentro del rango óptimo (de menor error experimental) de la función de magnificación del error del elemento analizado en relación con el trazador de cuantificación utilizado a un flujo constante [22] (**Figura DI.10**). El flujo de dicha disolución se midió diariamente por triplicado para una correcta cuantificación.

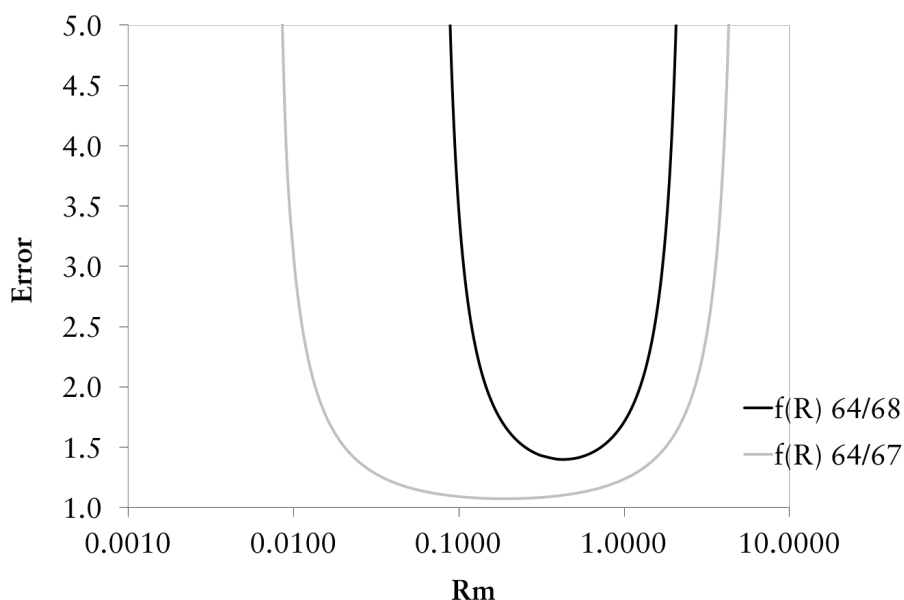


Figura DI.10. Factor de magnificación del error para el isótopo ^{64}Zn (más abundante) y dos *spikes* de Zn (^{67}Zn y ^{68}Zn)

Por lo tanto, integrando el área bajo cada pico cromatográfico observado en el cromatograma de flujo másico obtenido, es posible obtener la masa de Zn (en ng o μg) eluida en cada pico cromatográfico, y, dividiendo entre el volumen inyectado se puede calcular la concentración de zinc (endógeno) para cada pico cromatográfico **Figura DI.9.**

Con el objetivo conseguir en cada sesión las mejores condiciones de medida, se comprobaron diariamente los fondos y la sensibilidad del equipo mediante la medida de varios blancos y de una disolución de patrón de zinc de abundancia natural. Además, el análisis mediante IDA post-columna requiere la optimización del tiempo muerto de detector, la correcta eliminación de interferencias y la discriminación de masas, puesto que son parámetros que afectan a la exactitud en la medida de las relaciones isotópicas. Dichos parámetros fueron optimizados para el presente estudio y serán explicados con mayor detalle en el Capítulo DII. de la presente Tesis Doctoral.

Optimización de las condiciones cromatográficas para el análisis de Zn mediante HPLC-(SEC)-ICP-MS IDA post-columna

A pesar de que el análisis total de leche es ampliamente estudiado y existen numerosos estudios al respecto con diversas técnicas de detección, la especiación de Zn en leche no está tan ampliamente estudiada y, en concreto, los estudios cuantitativos son muy escasos debido a la dificultad del análisis por la labilidad de las especies de Zn, la estabilidad de la muestra, entre otros factores. Generalmente, los estudios realizados cuantifican el Zn de manera relativa como un porcentaje frente al Zn total eluido [7], o asociado a una determinada fracción [8]. Los autores que han logrado llevar a cabo la cuantificación de Zn en leche se centran en la cuantificación del Zn unido a proteínas (elevados pesos moleculares) o, si no, al Zn unido a especies de bajo peso molecular [23,24].

El primer paso para llevar a cabo la especiación cuantitativa mediante IDA post-columna fue comprobar si las recuperaciones (la relación entre la cantidad de

analito inyectado y la cantidad encontrada tras la separación cromatográfica) obtenidas eran adecuadas.

La influencia de la fase móvil en los fondos de Zn y la variable reproducibilidad de los resultados obtenidos en el análisis de muestras de leche tras la cromatografía de exclusión por tamaños, ha sido descrita con anterioridad por otros autores, donde ponen de manifiesto la dificultad de llevar a cabo una correcta especiación cuantitativa de Zinc. Ciertos autores informaron de bajos fondos y buena reproducibilidad en las proteínas que contienen Zinc cuando se utilizaba agua como fase móvil, pero altos blancos de Zn y pobre reproducibilidad de las proteínas de Zn cuando se utilizaban disoluciones reguladoras de entre pH 5.5 y 8.5 como fase móvil [25]. La naturaleza de la fase móvil (fuerza iónica, pH), la composición de la fase estacionaria, el flujo de la fase móvil y el volumen de inyección son parámetros que tienen gran influencia en la separación de proteínas por SEC. Por lo tanto, los resultados cuantitativos pueden variar considerablemente, siendo estos efectos más notorios en la cuantificación de proteínas que contienen Zn [26].

Como se puede observar en la **Figura DI.7A**, el uso de HCl generaba una “joroba o cola” al final del cromatograma que prolongaba el tiempo de análisis hasta los 70-80min. La finalización del cromatograma en 80 min resultaba imprescindible puesto que el fondo de Zn permanecía en valores elevados, inadecuados para la inyección de la siguiente muestra. Además, Las recuperaciones obtenidas utilizando agua o 0.1M de Tris : HCl (pH 7) como fase móvil siempre fueron menores del 50%, y por ello, se decidió estudiar con mayor detenimiento el efecto de la fase móvil en la recuperación de la columna. Inicialmente se comprobó la influencia del ácido utilizado para el ajuste del pH en la fase móvil utilizada. La “joroba o cola” detectada con HCl no se observó cuando se utilizó HNO₃ como ácido para el ajuste del pH en la fase móvil utilizada (**Figura DI.11A**), y por tanto los estudios posteriores utilizaron este ácido para el ajuste del pH.

Posteriormente, se intentó dar un paso más en la disminución de la duración de la cromatografía y por ello se llevó a cabo la inyección de una muestra con un flujo

de fase móvil de 0.5 mL/min (Figura DI.11A) y de 0.7 mL/min (Figura DI.11B). Como se puede observar en ambas figuras, el tiempo de análisis disminuyó de 45 min a 30 y la separación de especies no se vio comprometida. Por ello, se utilizó dicho flujo para las siguientes optimizaciones.

En el caso de la fase móvil de Tris : HNO₃ (pH 7, 0.7 mL/min), se estudió el efecto de la fuerza iónica, encontrando recuperaciones que variaron desde un <20% (0.1M) , <30% (0.050M) hasta un 72-86% (0.01M), poniendo de manifiesto una vez más que, para el analito a analizar (Zn) en la muestra utilizada (suero de leche), la elección de la fase móvil (su concentración molar o fuerza iónica) resulta de gran importancia, tanto en la separación observada como en la recuperación del Zn obtenida.

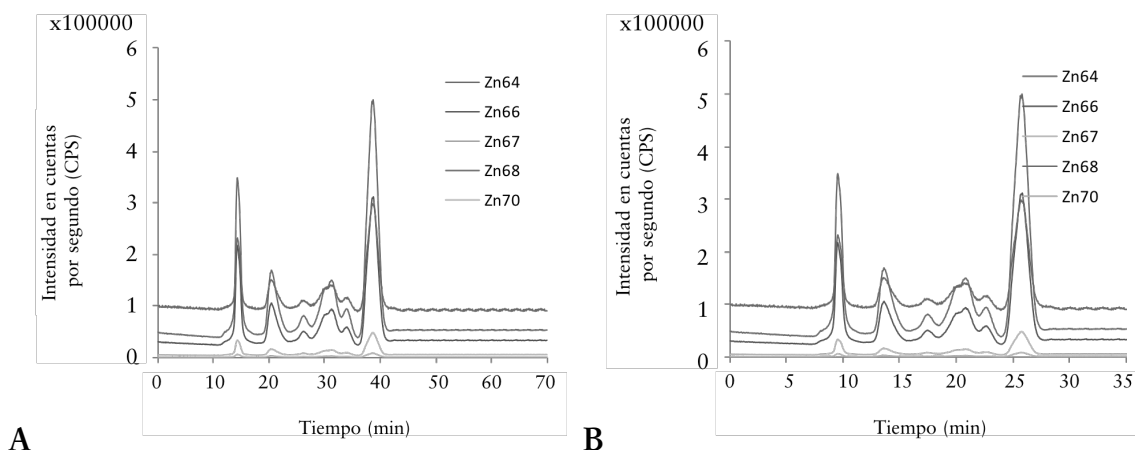


Figura DI.11. Variación del perfil elemental de Zinc al cambiar el flujo de la fase móvil utilizada (0.1M de Tris : HNO₃ pH 7) de (A) 0.5mL/min a (B) 0.7mL/min.

No obstante, a pesar de que las mejores recuperaciones se obtuvieron con la concentración de 0.01M de Tris : HNO₃ (pH 7, 0.7 mL/min), los resultados obtenidos eran irreproducibles y no eran consistentes entre réplicas de la misma muestra, obteniéndose valores muy dispares entre éstas. Además, al comparar los cromatogramas obtenidos con las diferentes fases móviles se observó que las mayores

diferencias en las señales del ICP-MS correspondían siempre a la fracción de bajo peso molecular (<10 kDa, ver zona 23-25 min en Figura DI.12).

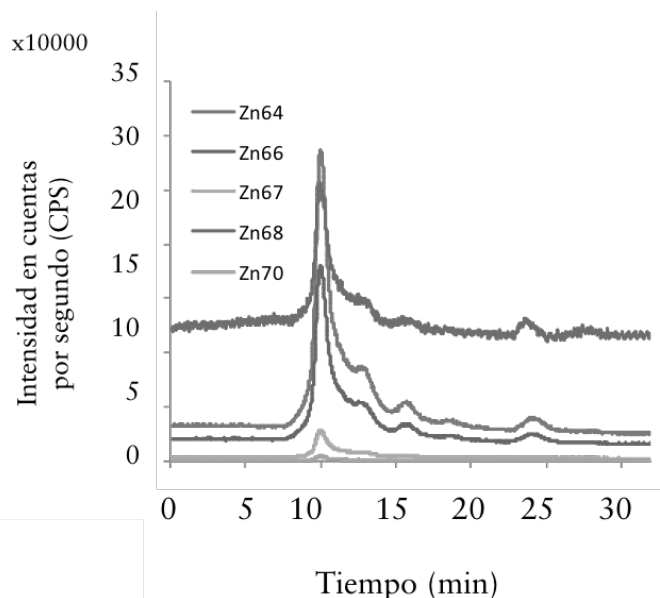


Figura DI.12. Perfil de Zinc observado para una muestra en concreto en la que la fracción a $t=25\text{min}$ desaparece.

Por otra parte, para llevar a cabo el análisis mediante IDA post-columna, es necesario mezclar el eluyente de la columna con el trazador de Zn. En los casos en los que se añadió una disolución de Zn en forma iónica, se obtuvieron bajas recuperaciones y se desvirtuaban los cromatogramas [27]. Para evitar posibles uniones indeseadas con apo-proteínas, se introdujo el Zn ligado a una especie.

Por este motivo, se estudió el uso de diferentes concentraciones de citrato y AEDT adicionados a la disolución de trazador de ^{67}Zn utilizado para la cuantificación. En la Figura DI.13 se muestran a modo de ejemplo los resultados obtenidos con 0.01M citrato (DI.13A, recuperación del 67%) y con 0.01M AEDT (DI.13B, recuperación del 85%). Se puede observar que para ambas disoluciones de trazador de cuantificación (^{67}Zn + citrato o ^{67}Zn con AEDT) el perfil de azufre se mantuvo invariable en ambos estudios. De las diferentes concentraciones ensayadas para ambos compuestos, los mejores resultados se obtuvieron cuando se añadió 0.01M de AEDT

a la disolución de trazador enriquecido utilizado para la cuantificación y por ello, se utilizó dicho compuesto para las determinaciones de Zn en muestras de leche.

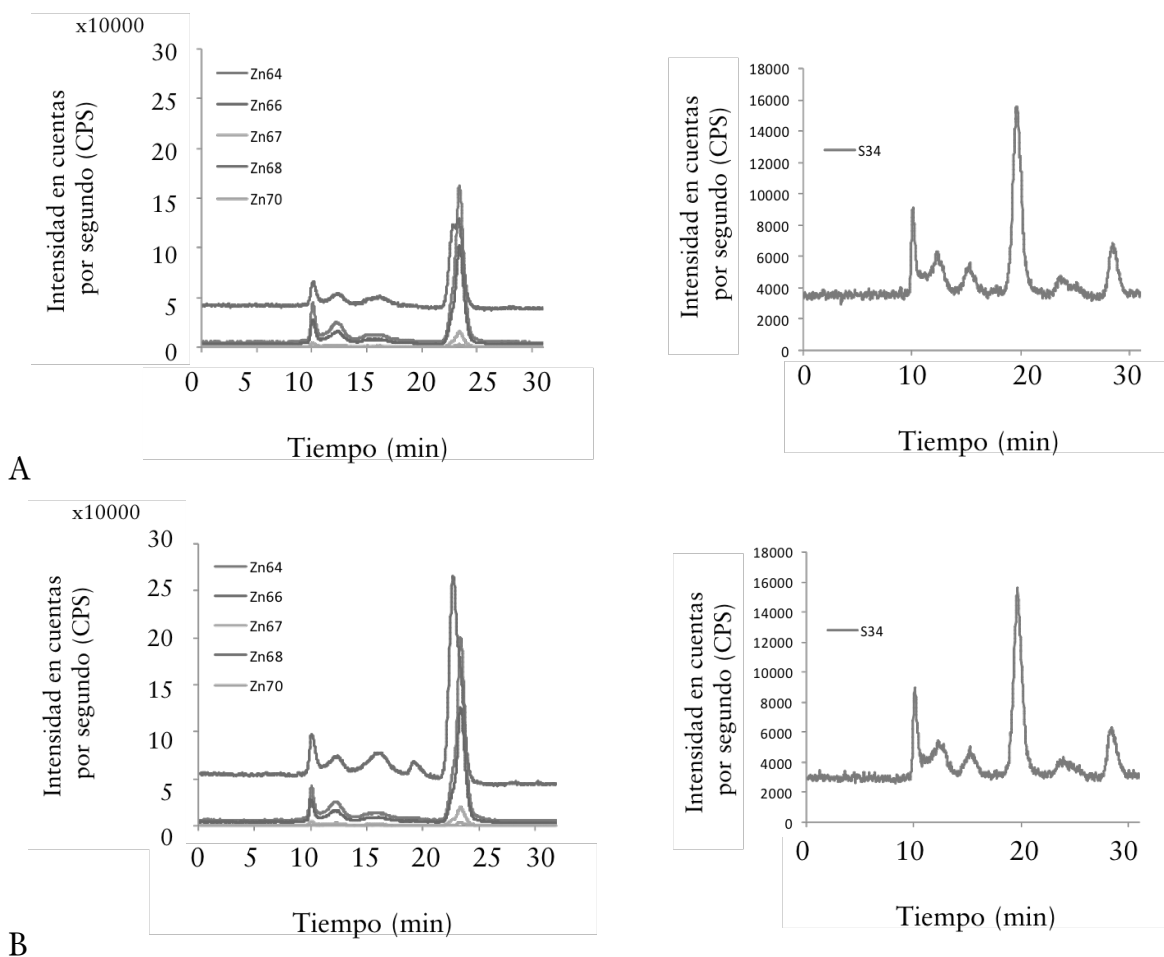


Figura DI.13. Perfil de Zinc observado para una muestra de leche con disolución de trazador enriquecido ^{67}Zn con (A) 0.01M citrato (B) 0.01M AEDT.

Se estudió además el efecto del relleno de la columna de exclusión en la separación de las metaloproteínas de leche. Los problemas asociados en el uso de la cromatografía de exclusión por tamaños en la separación de ligandos de zinc en leche humana han sido ampliamente por Arnaud et. al. [26], donde observaron grandes diferencias de separación de dichos ligandos utilizando la misma fase móvil en diferentes columnas: Sephadex G10 y G15 (gel de dextrano), Trisacyl GF05 (gel de

N^oacrilóil-2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) y Biogel P2 (gel de poliacrilamida). En nuestros experimentos iniciales utilizamos una columna Superdex 200 (gel de agarosa y dextrano entrecruzados), y, debido a la reproducibilidad y recuperación observados, se decidió elegir una columna de separación por tamaños con una fase estacionaria diferente: la columna BioSec3, con un relleno de esferas porosas de sílice de alta pureza con un recubrimiento polimérico hidrófilo (ver comparación en **Figura DI.14**).

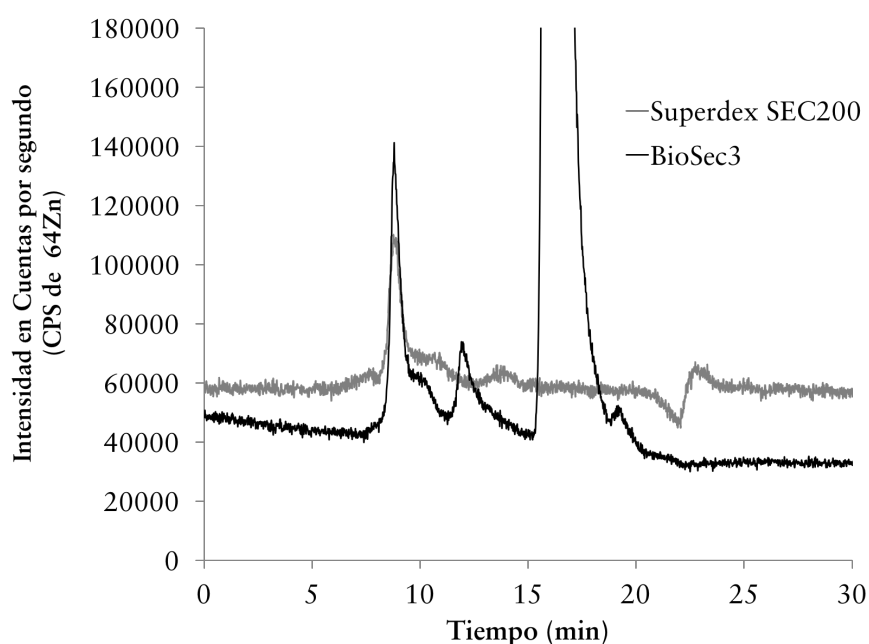


Figura DI.14. Comparación del perfil elemental del ⁶⁴Zn encontrado para una muestra de leche materna separada mediante dos columnas diferentes de cromatografía de exclusión por tamaños.

Las condiciones iniciales de dicha columna indicaban que la fase móvil recomendada eran disoluciones reguladoras de fosfato. A tales efectos, se escogió el NaH₂PO₃ y los resultados se compararon con los obtenidos para la fase móvil en las condiciones anteriormente optimizadas. Para ello, se inyectó una muestra de leche materna en la columna BioSec3 y se detectó el perfil proteico mediante VisUV. Los resultados obtenidos para ambas medidas están recogidos en la **Figura DI.15**. Como

puede observarse, con la fase móvil de NaH_2PO_3 se observó una mejor separación de las proteínas presentes.

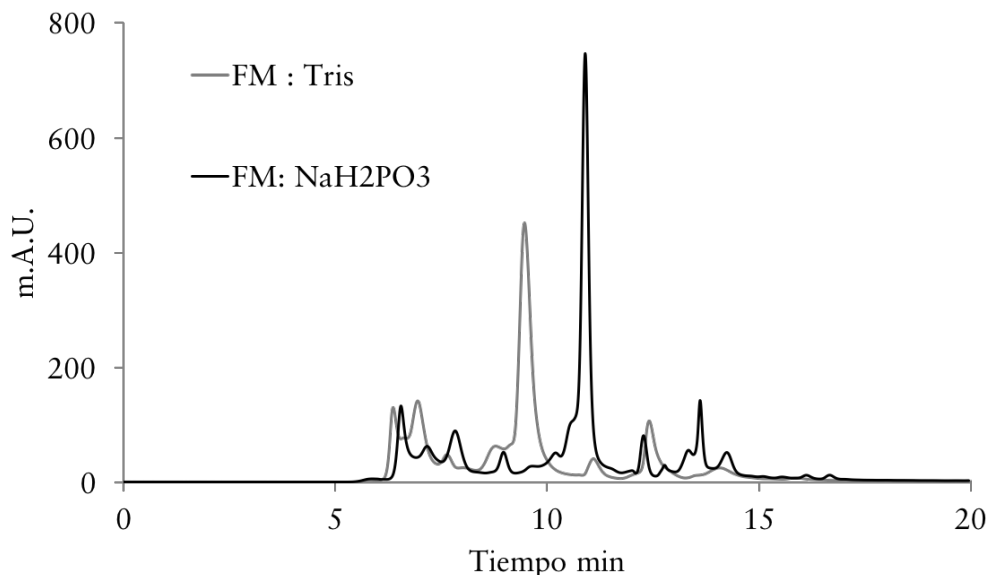


Figura DI.15. Perfil VisUV observado para una muestra de leche materna analizada mediante HPLC con la columna BioSec3 con diferentes fases móviles: 0.1M Tris y 0.1M NaH_2PO_3 .

Por otro lado, se encontró un trabajo donde el uso de la fase móvil 0.2M NH_4NO_3 : NH_3 , pH 6.7 generó buenos resultados en la especiación cuantitativa de Zn en muestras de leche mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaños y posterior detección mediante espectroscopia de absorción atómica de llama (FAAS) [7]. Para estudiar la influencia de dicha fase móvil en nuestra columna cromatográfica con detección por ICP-MS y comprobar las recuperaciones y las reproducibilidades obtenidas, se realizaron estudios análogos a los realizados anteriormente con la fase móvil de Tris : HNO_3 . Para ello se prepararon fases móviles con diferente concentración (0.2, 0.1, 0.05, 0.02 y 0.01M), diferente pH (7.4, 7.0, 6.3 y 5.6) y se utilizaron diferentes flujos de fase móvil (0.5, 0.7 y 0.9 mL/min). Los mejores resultados se encontraron con 0.01M NH_4NO_3 : NH_3 , pH 5.6 a 0.7 mL/min.

Para comprobar la recuperación de la columna con estas nuevas condiciones, se llevó a cabo la detección de Zn mediante ICP-MS con IDA post-columna con la

disolución de trazador enriquecido ($^{67}\text{Zn} + 0.01\text{M AEDT}$). Los resultados obtenidos con las condiciones seleccionadas no mostraron cambios en el perfil proteico y se obtuvieron las mejores recuperaciones con la mejor reproducibilidad y precisión.

Una vez optimizada la metodología, se procedió al análisis de las muestras de leche materna y fórmula y los resultados obtenidos para cada una de las muestras estudiadas mostraron recuperaciones entre 72-110%, con una mejorada reproducibilidad entre réplicas de la misma muestra y con una mejor resolución entre especies y menor tiempo de análisis.

Niveles de Zn encontrados en la especiación de leche materna y fórmula mediante IDA post-columna

En primer lugar, se procedió a realizar la calibración de la columna mediante HPLC-UV-Vis, la cual generó la siguiente recta de calibración que relaciona el peso molecular con el volumen de elución necesario para eluir la especie de la columna: $\log(\text{PM}) = -0.43147 \cdot V_{\text{elución}} (\text{mL}) + 8.6774$. Esta ecuación es, por tanto, aplicable a diferentes flujos de fase móvil, y permite conocer el peso molecular aproximado de una especie conociendo el volumen de elución ($V_{\text{elución}} = t_{\text{retención}} \cdot \text{flujo de fase móvil}$).

Para la especiación cuantitativa de Zn en leche mediante HPCL-(SEC)-ICP-MS se utilizó la columna BioSec3 y como fase móvil un flujo de 0.7 mL/min de 0.01M $\text{NH}_4\text{NO}_3 : \text{NH}_3$ a pH 5.6. Dicha metodología se aplicó al análisis de muestras de leche materna de madres a término y pretérmino a lo largo del período de lactancia y los resultados obtenidos se compararon con los encontrados para leche fórmula.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando 1-10 ppb $^{67}\text{Zn} + 0.01\text{M AEDT}$ como disolución del trazador con la finalidad de aplicar la metodología de IDA post-columna para realizar la cuantificación.

En los cromatogramas obtenidos se observaron 6 zonas diferenciadas (ver **Figura DI.16**), que se utilizaron como soporte para la cuantificación posterior.

Los cromatogramas que representan la señal (CPS) frente al tiempo (minuto) obtenidas en el equipo de ICP-MS se transformaron en cromatogramas de flujo másico (ver **Figura DI.9**) y se procedió a la cuantificación del contenido de zinc en cada una de las zonas diferenciadas del cromatograma (**Figura DI.16**). Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de Zn encontrado en cada una de las zonas (**Figura DI.18**) y en ppb de Zn encontrado en cada una de las zonas diferenciadas (**Figura DI.19**).

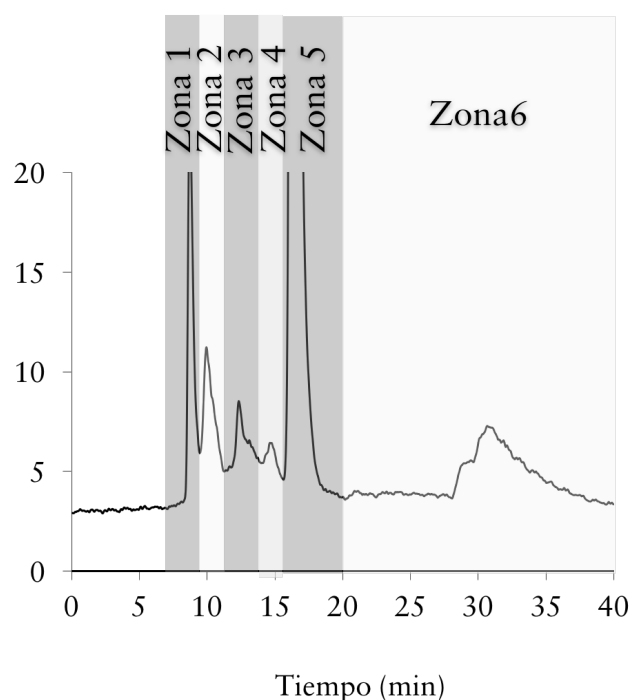


Figura DI.16. Zonas diferenciadas que se encontraron en los cromatogramas de flujo másico para el Zn endógeno tras el análisis mediante HPLC-(SEC)-ICPMS

Los resultados obtenidos en suero de leche materna mostraron que un $90\pm 5\%$ ($n=7$) del Zn encontrado mediante el análisis total, estaba presente en el suero de leche. En el caso de las fórmulas ese valor fue ligeramente inferior 79 ± 3 ($n=6$). Este hecho revela la importancia de la especiación de Zn en suero (y no en la parte de caseínas o grasas), puesto que es donde este elemento se encuentra principalmente.

La especiación cuantitativa de Zn en muestras de leche materna mostró que entre un 60-80% del Zn eluído de la columna se encontró en la zona 5, identificada como citratos. Dicho resultado es coherente con la bibliografía puesto que se conoce que la mayor parte del Zn presente en leche se encuentra asociado a especies no proteicas de bajo peso molecular. El contenido de Zn encontrado en esta zona fue de entre 1700-2250 ppb de Zn en el caso de muestras pretérmino y de 1000-1500 ppb de Zn en muestras a término. Como se observa, se observaron diferencias entre las muestras dependiendo de la edad gestacional, siendo menores los valores encontrados para madres a término. Teniendo en cuenta el período de lactancia, las mayores diferencias se encontraron en el caso de madres a término, en todas las zonas diferenciadas en los cromatogramas, donde en algunas ocasiones, el valor encontrado en leche madura está por debajo de la mitad del valor encontrado en el calostro.

El contenido total de Zn del resto de fracciones mostró la misma tendencia, si bien el contenido presente en el resto de las fracciones tomadas en conjunto, no supone en ningún caso más de un 40% del total encontrado.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las fórmulas se observa claramente cómo el 90% del Zn encontrado se encuentra asociado a especies de bajo peso molecular (zona 6), al contrario de lo que ocurre en leche materna. El contenido de Zn en leche fórmula varió dependiendo del producto, y por lo general los niveles encontrados fueron similares a los obtenidos para leche madura, lo cual concuerda con los resultados de totales realizados en la primera parte de este capítulo.

Esta diferencia de especiación del zinc hace palpable la diferencia de absorción del zinc desde leches formula frente al observado comúnmente para la leche materna. Un estudio acerca de formas fisicoquímicas de zinc más parecidas a las encontradas en leche materna (p. ej. Citrato de zinc) podría revelar una forma más eficiente de fortificación de leches fórmula.

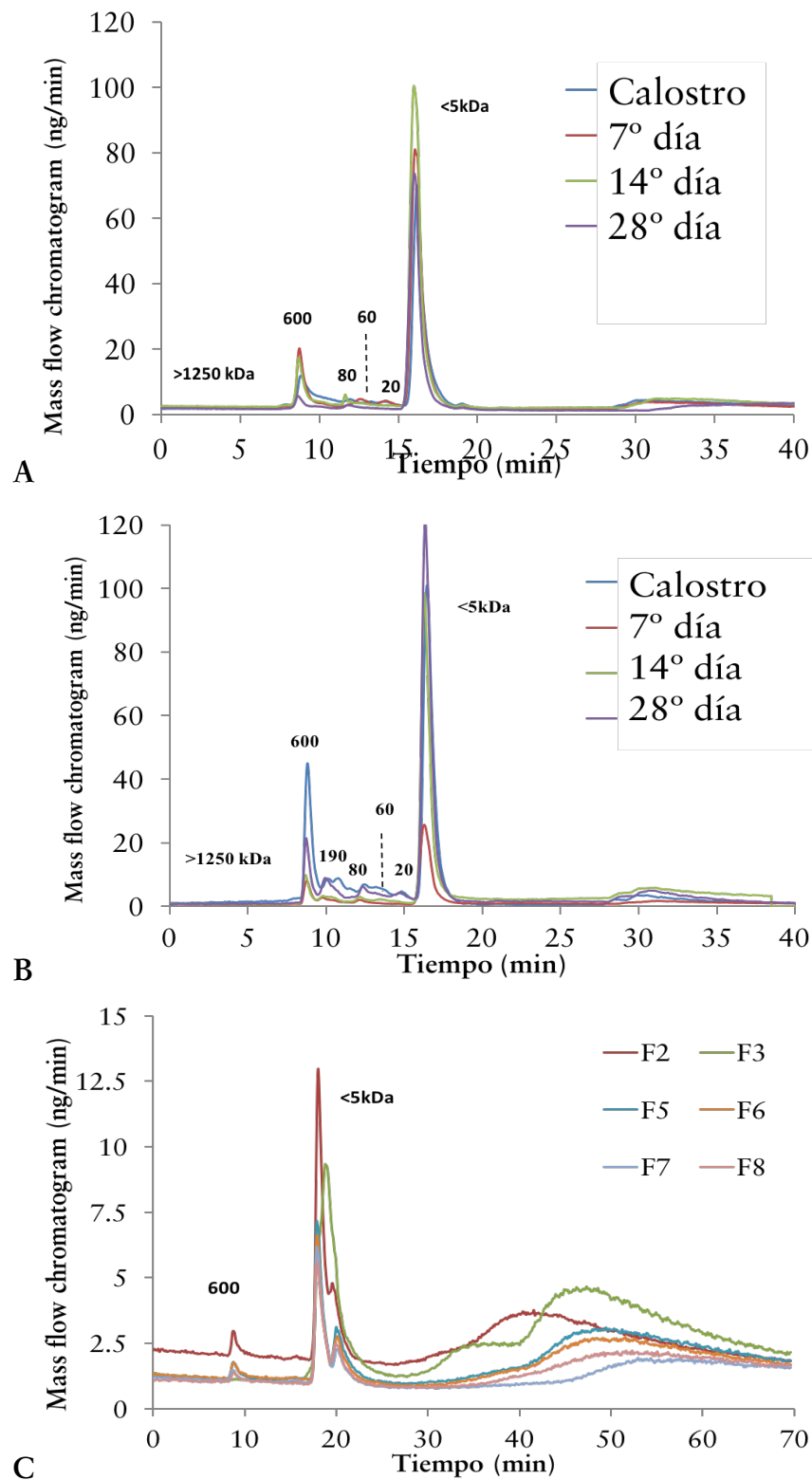


Figura DI.17. Cromatogramas de flujo másico para el Zn endógeno tras el análisis mediante HPLC-(SEC)-ICPMS para (A) leche materna pretérmino a lo largo del período de lactancia, (B) leche materna a término a lo largo del período de lactancia y (C) diferentes leches fórmula.

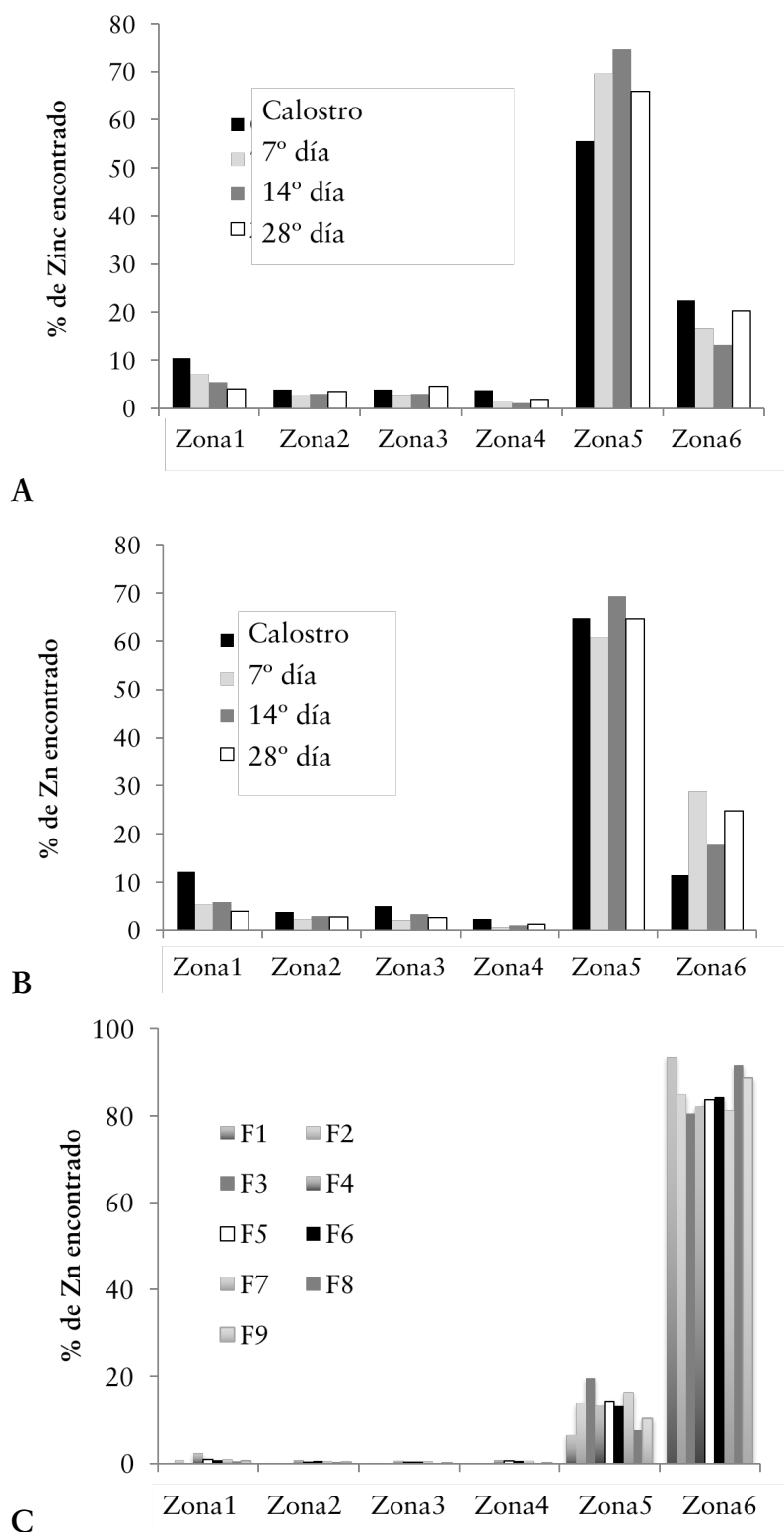


Figura DI.18. % de Zn encontrado en cada una de las zonas diferenciadas en los cromatogramas para (A) leche materna pretérmino a lo largo del período de lactancia, (B) leche materna a término a lo largo del período de lactancia y (C) diferentes leches fórmula.

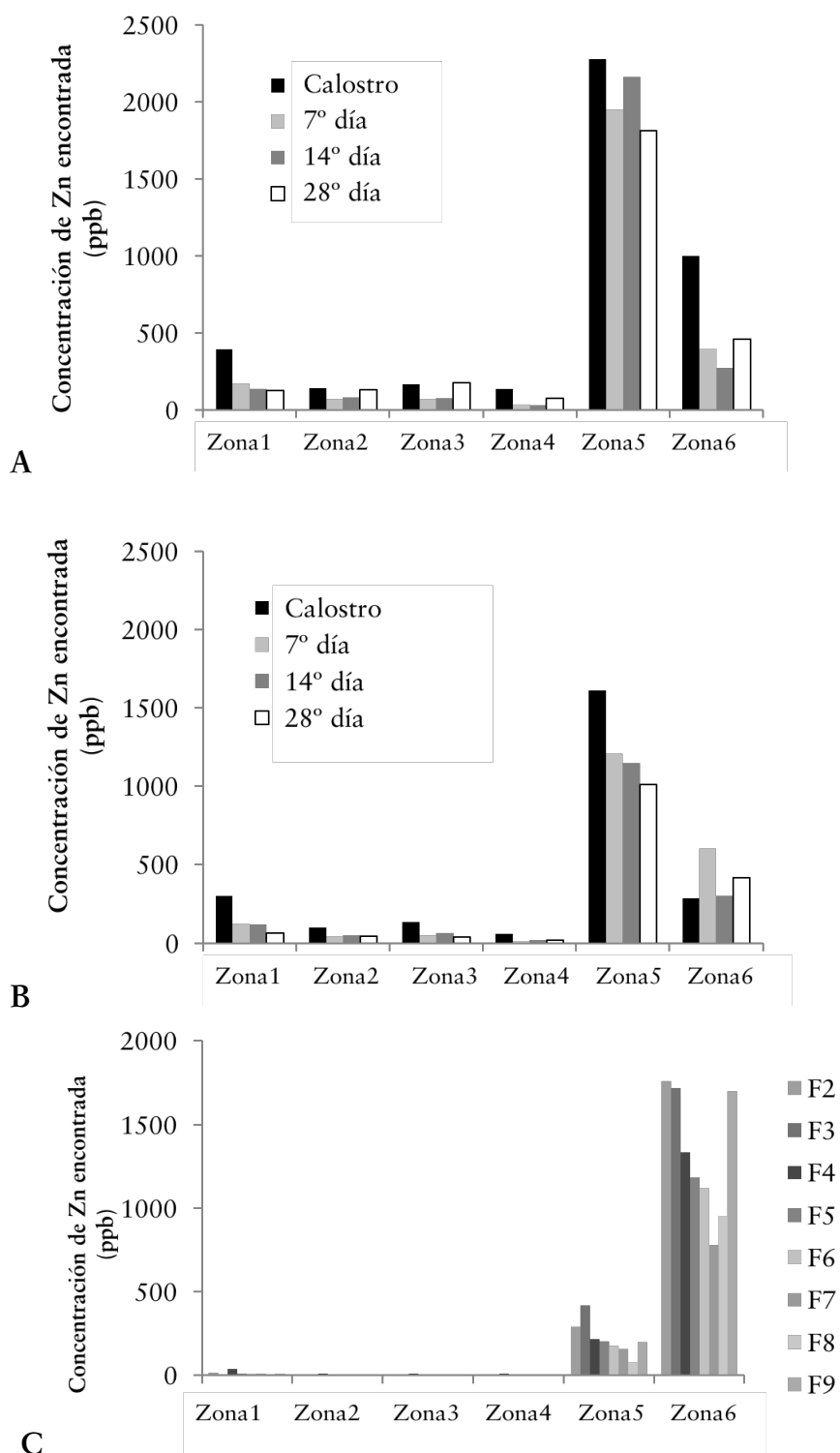


Figura DI.19. ppb de Zn encontradas en cada una de las zonas diferenciadas en los cromatogramas para (A) leche materna pretérmino a lo largo del período de lactancia, (B) leche materna a término a lo largo del período de lactancia y (C) diferentes leches fórmula.

DI.2.4. Conclusiones

Los resultados de este estudio han demostrado que el contenido proteico encontrado en la leche humana de madres con parto prematuro (PT) no varía significativamente durante el primer mes de lactancia (calostro, leche de transición y leche madura), aunque en madres con parto a término (AT) el contenido proteico disminuyó ligeramente. Comparando los perfiles proteicos encontrados para ambos grupos se encontraron las mismas especies, aunque su concentración fue menor en el caso de leche pretérmino. En el caso de las fórmulas el contenido proteico fue diferente al encontrado en leche materna.

Curiosamente, una de las especies presentes, la α -lactalbúmina, mantuvo su contenido inalterado a lo largo del periodo de lactancia y se observó la misma concentración independientemente de la edad gestacional, sugiriendo una implicación en el metabolismo de los neonatos con potencial interés, puesto que dicha proteína se conoce que liga al Zn. Estudios posteriores podrían brindar información acerca de la importancia de la presencia de esta proteína en la leche materna.

Los estudios correspondientes a la cuantificación relativa de Zn en leche materna y fórmula revelaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas. En el caso de la leche materna el Zn eluyó principalmente asociado a proteínas de altos y de bajos pesos moleculares, mientras que en fórmulas la mayor parte del Zn se encontró asociado a bajos pesos moleculares.

En la leche humana Zn^{2+} está unido a proteínas específicas de alto peso molecular y también a ligandos de bajo peso molecular (p. ej., citrato, uno de los componentes de unión al zinc más importantes en la leche). Los perfiles de elución de zinc de HPLC-(SEC) no muestran cambios significativos en las especies encontradas, pero sí en el contenido de zinc encontrado, especialmente con respecto al período gestacional. Además, se observó una ligera disminución del contenido de Zn a lo largo del período de lactancia.

Por el contrario, el Zn^{2+} en las leches fórmula se asoció principalmente a especies de bajo peso molecular. Este hecho apunta a una biodisponibilidad diferente del elemento de la leche materna y de las leches de fórmula infantil estudiadas.

El aumento del conocimiento sobre la naturaleza y biodisponibilidad de estas biomoléculas de metal ayudará a mejorar la eficacia del suministro de elementos traza esenciales en la primera infancia. Esto es particularmente importante para la alimentación de bebés prematuros y de muy bajo peso al nacer, donde la cantidad de fortificantes requeridos sería menor y, por lo tanto, una mayor biodisponibilidad de las especies de Zn utilizadas para la fortificación puede ser crucial.

DI.2.5. Referencias bibliográficas

- ¹ EE Ziegler. *Breast-milk fortification*. Acta Paediatr, 90:7 (2001) 720-3.
- ² Z Zhang, AS Adelman, D Rai, J Boettcher and B Lönnerdal. *Amino acid profiles in term and preterm human milk through lactation: A systematic review*. Nutrients, 5:12 (2013) 4800-21. doi:10.3390/nu5124800.
- ³ O Ballard and AL Morrow. *Human milk composition: nutrients and bioactive factors*. Pediatr Clin North Am, 60:1 (2013) 49-74. doi:10.1016/j.pcl.2012.10.002.
- ⁴ B Lönnerdal. *Bioactive proteins in breast milk*. J Paediatr Child Health, 49: Suppl 1 (2013) 1-7. doi: 10.1111/jpc.12104.
- ⁵ A Ballabriga and A Carrascosa. *Nutrición en la infancia y la adolescencia*, Tomo II. (3ª ed.) Ediciones Ergón S. A., Madrid (2001). ISBN: 84-8473-459-5.
- ⁶ B Lönnerdal. *Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas*. Am J Clin Nutr, 99:3 (2014) 712S-7S. doi: 10.3945/ajcn.113.071993.
- ⁷ RR de la Flor St. Remy, ML Fernández Sánchez, JB López Sastre and A SanzMedel. *Multielemental distribution patterns in premature human milk whey and perterm formula milk by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled mass spectrometry with octopole reaction cell*. J Anal At Spectrom, 19 (2004a) 1104-1110. doi:10.1039/B401527D.
- ⁸ P Bermejo, EM Peña, D Fompedriña, R Dominguez, A Bermejo, JA Cocho, JR Fernández and JM Fraga. *Speciation of zinc in low molecular weight proteins of breast milk and infant formulas by size exclusion chromatography/flame atomic absorption spectroscopy*. J AOAC Int, 84:3 (2001) 847-52.
- ⁹ P Apostoli, JD Cornelis, P Hoet, D Lison and D Templeton. *Elemental speciation in human health risk assessment*. World Health Organization. Dept. of Protection of the Human Environment International Programme on Chemical Safety, (2006). ISBN: 9789241572347.
- ¹⁰ A Sanz-Medel, M Montes-Bayón and ML Fernández Sánchez. *Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics*. Anal Bioanal Chem, 377 (2003) 236-247. doi:10.1007/s00216-003-2082-z.
- ¹¹ DM Templeton, F Ariese, R Cornelis, LG Danielsson, H Muntau, HP Van Leeuwen and R Lobinski. *IUPAC guidelines for terms related to speciation of trace elements*. Pure Appl Chem, 72:8 (2000) 1453-1470.
- ¹² P Blakeborough, DN Salter and MI Gurr. *Zinc binding in cow's milk and human milk*. Biochem J, 209:2 (1983) 505-12.
- ¹³ V Neuhoff, R Stamm and H Eibl. *Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis*. Electrophoresis, 6:9 (1985) 427-48. doi:10.1002/elps.1150060905.
- ¹⁴ AC Veloso, N Teixeira and IM Ferreira. *Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis. Detection of milk adulterations*. J Chromatogr A, 967:2 (2002) 209-18. doi:10.1016/S0021-9673(02)00787-2.

- ¹⁵ Z Yüksel and YK Erdem. *Detection of the milk proteins by RP-HPLC*. GIDA / J Food, 35:1 (2010) 5-11.
- ¹⁶ JE Noble and MJA Bailey. *Chapter 8. Quantitation of proteins*. From: *Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification*. 2nd Ed. 463 (2009) 73-95. doi:10.1016/S0076-6879(09)63008-1.
- ¹⁷ J Bettmer, M Montes-Bayón, J Ruiz-Encinar, ML Fernández-Sánchez, MRF de la Campa and A Sanz-Medel. *The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis*. J Proteomics, 72:6 (2009) 989-1005. doi: 10.1016/j.jprot.2009.05.003.
- ¹⁸ K Inagaki, A Takasu, T Watanabe, Y Aoyagi and K Okamoto. *Species-specific isotope dilution analysis of mono-, di, and tri-butyltin compounds in sediment using gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with synthesized 118Sn-enriched butyltins*. Analyst, 128:3 (2003) 265-72. doi:10.1039/B210719H.
- ¹⁹ P Rodríguez-González, A Rodríguez-Cea, JIG Alonso and A Sanz-Medel. *Species-specific isotope dilution analysis and isotope pattern deconvolution for butyltin compounds metabolism investigations*. Anal Chem, 77:23 (2005) 7724-34. doi:10.1021/ac051091r.
- ²⁰ RRF St Remy, ML Fernández-Sánchez and A Sanz-Medel. *Chapter 13. Total analysis and distribution of trace elements in human, cow and formula milk*. From: *The determination of chemical elements in food: applications for atomic and mass spectrometry*. Ed. By S. Caroli. John Wiley & Sons, Inc. (2007) Pages: 401-36. ISBN-13: 978-0-471-68784-9.
- ²¹ ML Fernández-Sánchez, RRF St. Remy, H González-Iglesias, JB López Sastre, B Fernández-Colomer, D Pérez-Solís and A Sanz-Medel. *Iron content and its speciation in human milk from mothers of preterm and full-term infants at early stages of lactation: A comparison with commercial infant milk formulas*. Microchem J, 105 (2012) 108-14. doi:10.1016/j.microc.2012.03.016.
- ²² JIG Alonso and P Rodriguez-González. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. The Royal Society of Chemistry, (2013). ISBN: 978-1-84973-333-5.
- ²³ B Lonnerdal, AG Stanislawski and LS Hurley. *Isolation of a low molecular weight zinc binding ligand from human milk*. J Inorg Biochem, 12 (1980)71-8.
- ²⁴ R Milačič, D Ajlec , T Zuliani , D Žigon , J Ščančar. *Determination of Zn-Citrate in human milk by CIM monolithic chromatography with atomic and mass spectrometry detection*. Talanta, 101 (2012) 203-10. doi:10.1016/j.talanta.2012.09.002.
- ²⁵ B Michalke, DC Münch and P Schramel. *Advanced quality control for zinc speciation investigations in human breast milk*. Fresenius J Anal Chem, 344:7-8 (1992) 306-10. doi:10.1007/BF00321837.
- ²⁶ J Arnaud, D Andre, MC Bouillet, D Kia and A Favier. *Problems associated with the use of exclusion-diffusion chromatography for identification of zinc ligands in human milk*. J Trace Elem Electrolytes Health Dis, 6:2 (1992) 81-90.
- ²⁷ RB Martin. *pH as a variable in free zinc ion concentration from zinc-containing lozenges*. Antimicrob Agents Chemother, 32:4 (1988) 608-9.

DI.3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE ZINC EN LECHE HUMANA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MOLECULARES

DI.3.1. Introducción

La leche contiene una amplia gama de proteínas que participan en diferentes actividades biológicas dentro del organismo de los neonatos. El profundo conocimiento de la proteómica de la leche podría ser útil para responder al creciente interés de la industria láctea en la aplicación de proteínas alimentarias funcionales. Además, el estudio del proteoma de la leche puede contribuir al bienestar humano, proporcionando elementos importantes para mejorar las fórmulas lácteas utilizadas actualmente en nutrición de neonatos no amamantados [1]. La identificación / cuantificación de las proteínas y especies de Zn presentes en leche resulta por tanto de gran interés para entender la mayor biodisponibilidad y absorción que el Zn posee en la leche materna cuando se compara con a las fórmulas típicamente utilizadas.

Para alcanzar dicho propósito mediante espectrometría de masas, se pueden seguir dos vías, según la información que queramos obtener (ver **Figura DI.20**). En las secciones anteriores de este capítulo (**DI.1** y **DI.2**) se llevó a cabo el estudio del contenido total de Zn (mediante ICP-MS), se detectó el perfil proteico (mediante HPLC-UV-Vis) y se llevó a cabo la especiación elemental de Zn (mediante HPLC-ICP-MS). Gracias al análisis mediante dilución isotópica (IDA) post-columna, se pudo cuantificar las especies de Zn presentes. A pesar de que el ICP-MS es una excelente herramienta de detección elemental, no es apropiada para la detección específica de moléculas debido a que el ICP es una fuente de ionización dura (que destruye la información molecular). Para los casos en los que desea obtener información

molecular, es preciso utilizar entonces fuentes de ionización más blandas. El peso molecular de la proteína y la identificación de los péptidos que contiene (análisis de la huella peptídica de todos los péptidos obtenidos tras una digestión trípica) permiten la identificación inequívoca de la proteína estudiada. La combinación de la información obtenida por ambas proporciona información completa de la especiación de un determinado elemento traza, y se denomina *especiación integrada*. Para utilizar las técnicas de espectrometría de masas moleculares, es necesario llevar a cabo: la optimización de los procesos de purificación, separación y preconcentración de las especies de interés y posteriormente la optimización de la metodología del espectrómetro de masas molecular para la identificación de dichas especies.

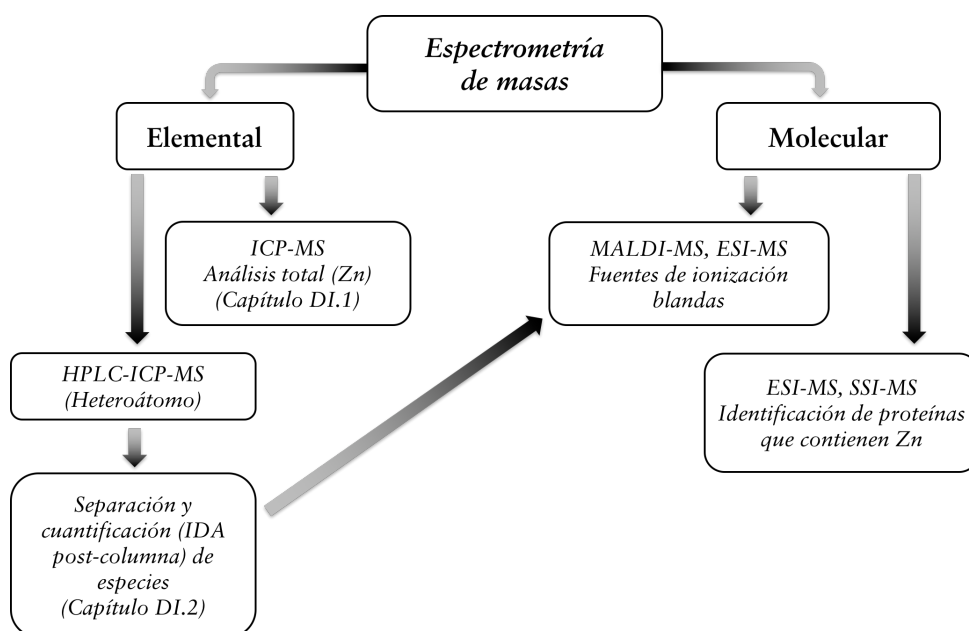


Figura DI.20. Espectrometría de masas elemental y molecular para llevar a cabo la especiación integrada

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio [2] basados en cromatografías ortogonales (primera cromatografía de exclusión por tamaños y segunda cromatografía de intercambio iónico) y posterior análisis mediante MALDI-TOF e identificación de la huella peptídica tras la digestión trípica de la muestra, confirmaron la existencia de α -Lactalbúmina en la Zona 4 del cromatograma inicial

de exclusión por tamaños (**Figura DI.21**). Como se vio en el capítulo anterior, la concentración de esta especie casi no varió con el periodo de lactancia y su concentración fue similar independientemente de la edad gestacional de la madre (a término y pretérmino). Se conoce además que esta proteína es capaz de ligar Zn, un elemento traza esencial de vital importancia en el organismo.

El principal problema de los análisis de masas moleculares llevados a cabo hasta el momento reside en que, a pesar de que la fuente de ionización es blanda y no genera prácticamente rupturas o fragmentaciones en la proteína, el metal asociado a ésta suele ser liberado y no es detectado posteriormente en el analizador de masas. Es por ello que la modificación de las fuentes de ionización blandas con el fin de que se promueva el menor impacto o ruptura sobre la muestra presentan un reto que permitiría analizar metaloproteínas en sus diferentes grados de saturación con el metal que estén presentes de forma nativa en la muestra (forma holo-, parcialmente saturada y apo-).

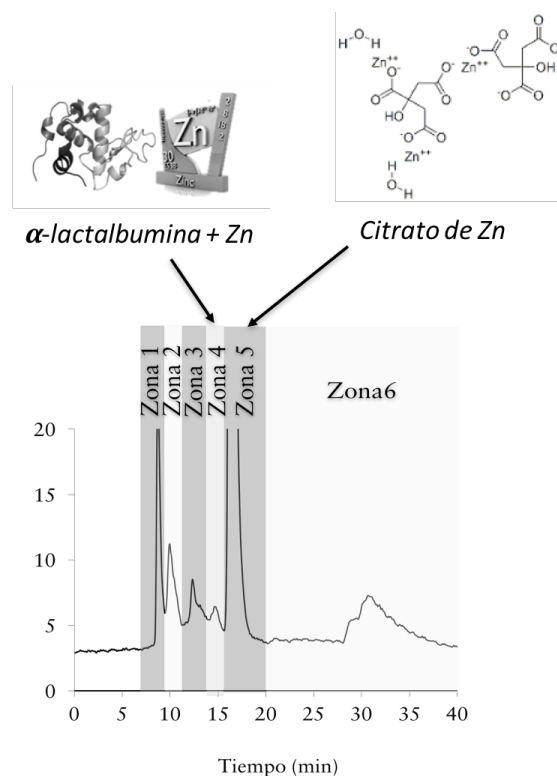


Figura DI.21. Especies presentes en las fracciones de Zn identificadas en el capítulo anterior tras su separación mediante HPLC-(SEC)-ICP-MS

Además, las proteínas (purificadas, separadas y preconcentradas) que se identifican en las fracciones escogidas para su estudio tras monitorizar la señal del zinc, pueden coeluir con otras que contengan otro metal unido. Por ello, para identificar inequívocamente a las proteínas o especies que específicamente unen zinc y, llegar incluso a determinar su estequiometría, el uso de técnicas moleculares que permitan mantener el metal unido resulta de gran interés.

Por otro lado, estudios previos sugirieron la presencia de citrato de zinc en la zona 5 (Figura DI.22) mediante el uso de patrones, lo que está de acuerdo con resultados de otros autores, donde se observó que el Zn está ligado principalmente a una especie no proteica de bajo peso molecular, identificada como citrato [3]. Esta especie capaz de ligar Zn se conoce que es la forma fisicoquímica que mayor aporte de Zn transfiere al organismo a través de la leche materna. Del mismo modo, un análisis que no separare al Zn de la especie química podría dar información inequívoca de la identidad de la especie.

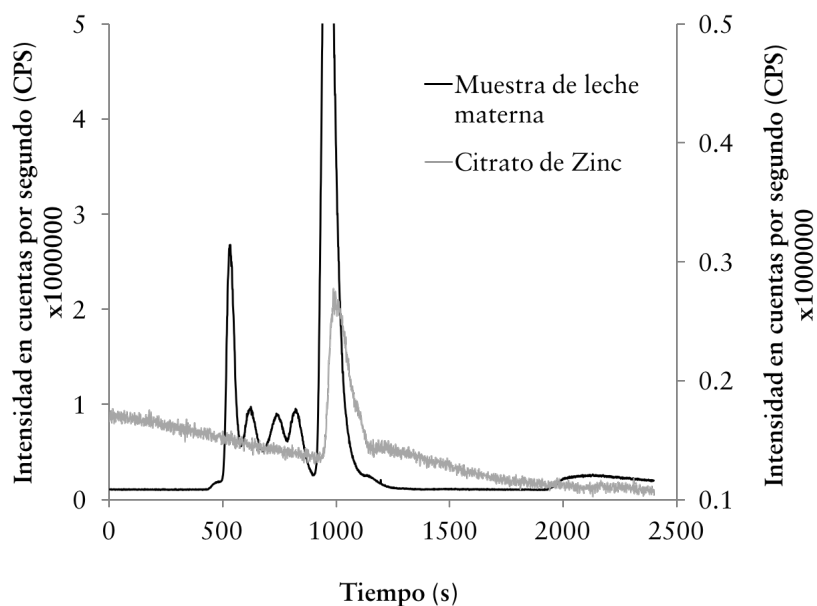


Figura DI.22. Señal de ^{64}Zn encontrado para una muestra de leche materna y un patrón de citrato de Zn

Recientemente, una nueva fuente de ionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure ionization*, API) ha comenzado a ser utilizada para analizar la coordinación de compuestos lábiles o compuestos inorgánicos activos redox, la *ionización por pulverización sónica* (SSI, *Sonic spray ionization*). A pesar de que fue descrito por primera vez en el comienzo de la década de 1990 [4], la disponibilidad de esta interfaz para uso comercial no se produjo hasta hace una década. El proceso de ionización de SSI es comparable a la de electrospray (ESI), con la excepción de que los iones en fase gaseosa se originan sin la aplicación de un campo eléctrico, lo que elimina la posibilidad de transformaciones redox indeseadas.

Un flujo de muestra introducido mediante un capilar de sílice fundida se encuentra a presión atmosférica y temperatura ambiente con un flujo coaxial de gas a velocidad sónica (donde se produce la mayor generación de iones) produciendo la pulverización del líquido para formar pequeñas gotas gaseosas cargadas.

La SSI también se conoce por el nombre de *Easy ambient sonic-spray ionization* (EASI). Una modificación de esta técnica de ionización utiliza la ventaja que supone el paso de un flujo de gas a velocidad sónica a través del fin del capilar de introducción de la muestra para producir la auto-aspiración de la misma. Esta técnica es denominada por algunos autores como VEASI (*Venturi easy ambient sonic-spray ionization* [5]).

Las ventajas del V-EASI-MS o SSI frente al convencional análisis mediante ESI-MS son varias:

a) V-EASI-MS ofrece gran simplicidad operacional puesto que para la ionización del analito y la aspiración de la muestra únicamente es necesario el uso de un flujo de nitrógeno o aire en combinación con un nebulizador neumático.

b) En V-EASI-MS, la baja concentración de iones en las gotas parece reducir el ruido producido por el disolvente, favoreciendo la transmisión de iones del analito y disminuyendo de este modo la relación señal/ruido para un gran número de analitos [6].

c) V-EASI-MS conlleva un proceso de ionización extremadamente blando, sin degradación térmica y que tiene lugar a temperatura ambiente [7].

d) En V-EASI-MS no se producen interferencias por reacciones redox indeseadas, por descarga o electroquímicas, las cuales suelen suceder en ESI donde suelen producirse debido a que es una técnica de ionización donde las reacciones electroquímicas con reacciones redox pueden tener lugar durante la formación de iones.

e) Una simple modificación de un nebulizador neumático comercialmente disponible (Meinhard[®], [8]) permite la instalación de la fuente V-EASI en prácticamente cualquier espectrómetro de masas con fuente de ionización a presión atmosférica (API).

DI.3.2. Objetivo parcial

El objetivo de esta parte fue llevar a cabo la identificación de las proteínas y/o especies presentes en las zonas de mayor interés zona 4 y 5, puesto que se sugiere que pueden corresponder a α -Lactalbúmina y de citrato de zinc, respectivamente. Debido a la posible importancia de ambas especies en la nutrición de los neonatos y a su capacidad de ligar Zn, se planteó el uso de fuentes de ionización molecular de menor fuerza con el objetivo de mantener al Zn unido a la proteína/especie. Esta tarea presenta una elevada dificultad debido a la labilidad del enlace Zn-proteína o Zn-especie, por ello, y debido a la versatilidad de la fuente V-EASI (en adelante SSI) para el análisis de compuestos lábiles se decidió comparar los resultados de esta fuente con los obtenidos con ESI.

Dicho objetivo fue el desarrollo de metodologías para la identificación sensible y selectiva de ambos compuestos mediante espectrometría de masas con fuentes de pulverización (ESI y SSI). Para ello, en los casos en los que fuera necesario, se utilizaría también un acoplamiento con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Por lo tanto, las tareas individuales propuestas fueron:

- Optimización de la metodología MS/MS para la identificación de Zn- α -Lactalbúmina y Zn-citrato, comparando las fuentes de SSI y ESI.
- Optimización del procedimiento de aislamiento, purificación y preconcentración de las proteínas o especies que contienen zinc separadas previamente mediante HPLC-(SEC).
- Aplicación de la metodología optimizada al análisis de muestras de leche reales (fracciones recogidas tras HPLC-(SEC)).

El trabajo recogido en esta sección se desarrolló íntegramente en el grupo de investigación liderado por el Dr. Spiros A. Pergantis, de la Universidad de Creta, Heraklion (Grecia), bajo su supervisión.

DI.3.3. Optimización de condiciones experimentales

El análisis mediante SSI/ESI-MS está condicionado por una serie de parámetros que es necesario controlar puntual o diariamente. En el caso concreto del SSI, los parámetros más importantes están descritos en la **Tabla DI.6**. Adicionalmente, y al igual que sucede en ESI, es de gran importancia controlar: el voltaje de las lentes; la energía SID (*source-induced dissociation*) que controla la disociación de los analitos en el capilar metálico; la temperatura del capilar; el porcentaje de energía de colisión elegida (normalizada, expresada como %); el voltaje utilizado en la celda de colisión (CID); el disolvente utilizado en la muestra y el modo de detección (positivo/negativo). Los parámetros críticos utilizados que afectan en gran medida a los análisis llevados a cabo están indicados en los resultados correspondientes para una mejor comparación.

Condiciones experimentales de la fuente SSI	
<i>Gas del dispositivo Venturi</i>	N ₂
<i>Presión del gas del dispositivo Venturi</i>	70 bar
<i>Posición del nebulizador (x,y,z)</i>	Comprobada diariamente para tener la mayor intensidad de señal de los iones del calibrante utilizado
<i>Posición del capilar dentro del nebulizador (x)</i>	Comprobada diariamente para tener la mayor intensidad de señal de los iones del calibrante utilizado
<i>Energía SID utilizada</i>	20 eV

Tabla DI.6. Condiciones experimentales de la fuente SSI utilizadas

Dependiendo del modo de detección utilizado, en algunas ocasiones (dependiendo de la muestra a analizar) se puede precisar de un agente ácido/base que promueva el intercambio de protones. En este trabajo se ensayó el uso del ácido acético (AA, 60.05 g/mol) en las medidas en modo positivo, y el 1,8-diazabicycloundec-7-ano (DBU, 152.24 g/mol) para las medidas en modo negativo,

además de comprobar si la ausencia de éstos era válida para llevar a cabo las determinaciones deseadas.

Cuando el objetivo es la detección de proteínas, se utiliza como calibrante una disolución de STFA (trifluoroacetato de sodio). Los iones obtenidos en el espectro de STFA generado, se comparan siempre con los descritos en la bibliografía [9] tanto en modo positivo como en modo negativo, y se busca siempre obtener el mayor número de iones con la mayor intensidad y con la menor relación señal/ruido. Para optimizar las condiciones experimentales específicas de un analito, una disolución de éste es utilizado en optimizaciones posteriores.

DI.3.4. Identificación de Zn- α -Lactalbúmina

Inicialmente, se utilizó un patrón de α -Lactalbúmina (α -LA) para optimizar las condiciones experimentales comentadas en el apartado anterior. Para ello, el patrón de proteína se disolvió en diferentes mezclas de disolvente a) agua, b) 2% metanol, c) 50% metanol, d) 50% acetonitrilo, 48% agua, 2% ácido acético(v/v/v).

Del mismo modo, se estudió la adición de (0.01, 0.1, 0.25, 0.5 %) de AA para las disoluciones a analizar en modo positivo y (0.01, 0.1, 0.25, 0.5 %) de DBU para modo negativo. Los resultados más significativos se encuentran comparados gráficamente en la **Figura DI.23**. En ella se compararon las intensidades netas obtenidas en cada una de las condiciones ensayadas. Y se observó que sistemáticamente la señal obtenida mediante ESI-MS era superior a la encontrada mediante SSI-MS para una misma muestra.

Las mejores intensidades de los iones observados en SSI-MS se obtuvieron con el patrón disuelto en agua (**Figura DI.24**), no obstante, la relación señal/ruido (S/R) encontrada en los otros disolventes fue considerablemente inferior.

La deconvolución del espectro obtenido proporcionó una masa experimental de la proteína de 14165 Da, lo cual está en concordancia con la masa teórica proporcionada por la casa comercial (14175 Da).

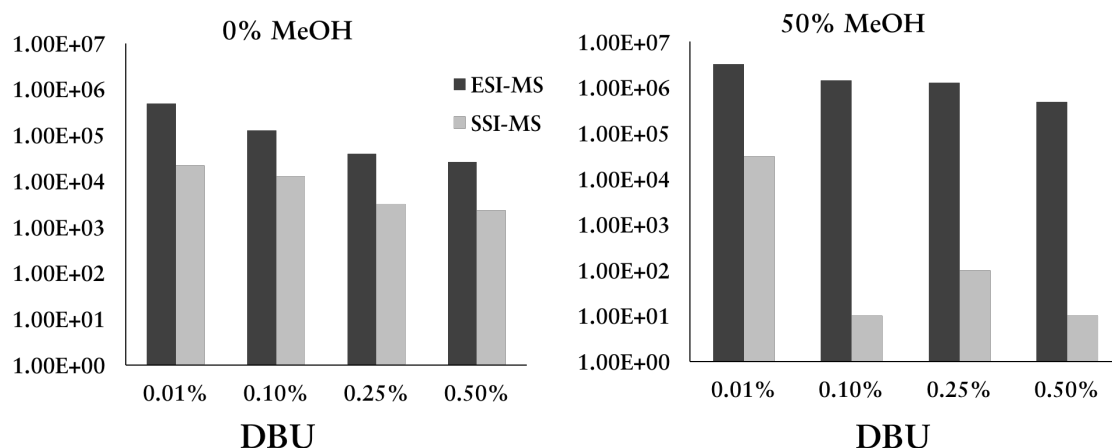


Figura DI.23. Intensidades observadas para distintos % de DBU y de metanol en muestras de α -LA mediante ESI-MS y SSI-MS.

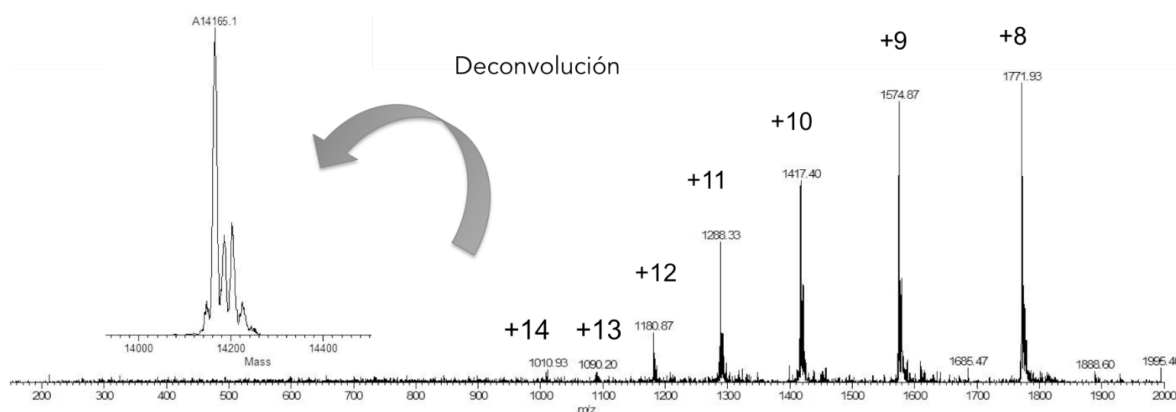


Figura DI.24. Full scan obtenido en SSI-MS para la α -LA disuelta en agua. Intensidad: $1.4e4$. Relación S/R: 197. Modo positivo. SID:20 eV.

El análisis mediante ESI-MS mostró resultados similares con la proteína disuelta en agua. No obstante, si se comparan con los resultados obtenidos mediante SSI-MS, aquí se encontraron un menor número de iones (hasta $[M+11H]^{11+}$), el ion de mayor intensidad ($[M+8H]^{8+}$) mostró una señal superior ($2.3e7$), y el espectro presentó menor señal S/R (39).

Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis del complejo Zn- α -Lactalbúmina siguiendo el protocolo descrito en la sección Experimental. Se comprobó que, al

realizar la deconvolución del espectro obtenido, la relación 1:100 (Proteína:zinc) producía la mayor intensidad de picos adyacentes a los encontrados en la proteína (correspondientes al complejo Zn- α -LA). Al igual que en el caso anterior, se estudió la adición de (0.01, 0.1, 0.25, 0.5 %) de AA para las disoluciones a analizar en modo positivo y (0.01, 0.1, 0.25, 0.5 %) de DBU para modo negativo. Los resultados más significativos se encuentran recogidos en la **Figura DI.25**. Como se puede observar, se obtuvieron sistemáticamente mejores señales con el ESI-MS frente al SSI a las diferentes concentraciones de metanol ensayadas, tanto en modo positivo como en modo negativo con diferentes porcentajes de AA o DBU, respectivamente.

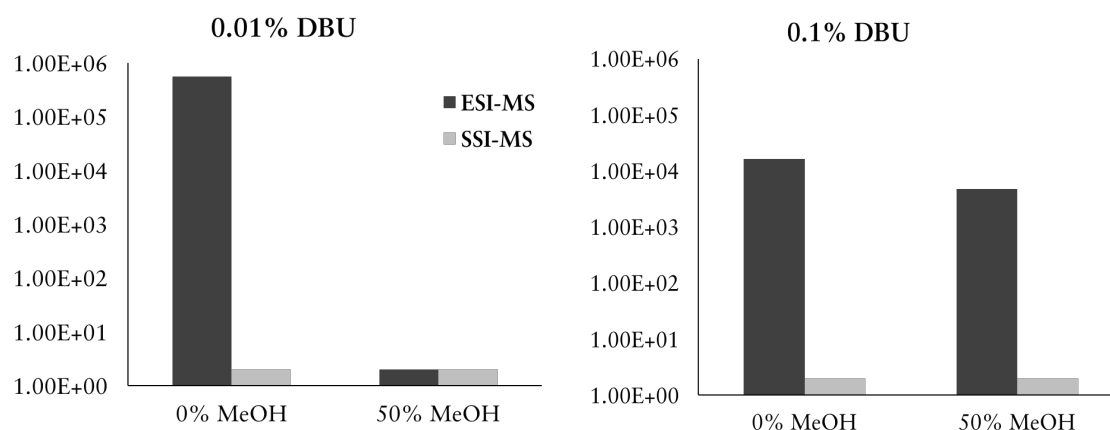


Figura DI.25. Intensidades observadas para distintos % de DBU y de metanol en muestras del complejo Zn- α -LA mediante ESI-MS y SSI-MS.

No obstante, en las medidas con SSI-MS, sorprendentemente en el caso del complejo de Zn- α -LA disuelto en agua sin ningún tipo de sustancia adicional (0% AA, DBU o MeOH), se observó una buena intensidad de señal y una baja relación S/R (**Figura DI.26**). La deconvolución del espectro obtenido proporcionó una masa experimental de la proteína de 14184 Da, lo cual está en concordancia con la masa teórica proporcionada por la casa comercial (14175 Da) y diversos picos que podrían estar asociados a la presencia de Zn unido a la proteína, encontrándose hasta 5 Zn unidos a una unidad de α -Lactalbúmina.

Estos resultados recuerdan la idea básica de la técnica de SSI o VEASI, la cual, gracias al efecto del gas supersónico, no necesita la adición de ningún componente para genera los iones deseados. En nuestro caso, debido a la labilidad del Zn sería interesante buscar una manera de introducir la muestra en el sistema que fuera lo más suave posible y con la menor cantidad posible de compuestos que puedan interaccionar con la proteína comprometiendo el enlace metal-proteína.

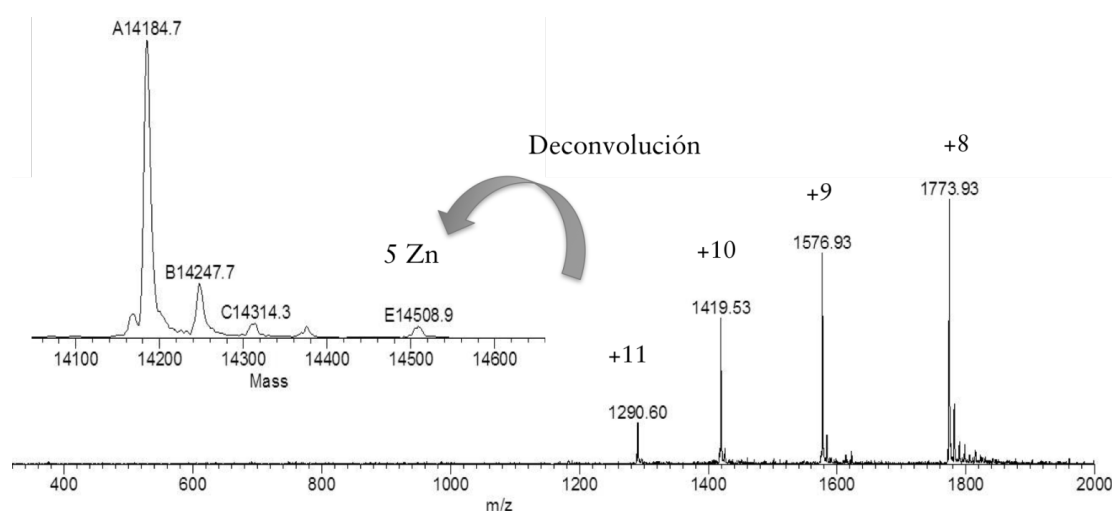


Figura DI.26. Full scan obtenido en SSI-MS para el complejo Zn- α -LA disuelto en agua. Intensidad: $2.5e5$. Relación señal/ruido: 5. Modo positivo. SID:20 eV.

Una vez optimizadas las condiciones con el complejo Zn- α -LA, se procedió a optimizar la cromatografía de fase reversa (*reverse phase*, RP) para la introducción de la fracción previamente preconcentrada a la salida de la cromatografía de exclusión por tamaños HPLC-(SEC) desarrollada en la sección anterior de este capítulo.

Para la optimización de las condiciones cromatográficas de la segunda cromatografía se probaron diferentes fases móviles, gradientes y columnas (Tabla DI.7) las cuales se conectaron tanto a SSI-MS como a ESI-MS.

Los mejores resultados se obtuvieron con la columna Hypersil C18, utilizando las fases móviles descritas en la tabla (utilizando acetonitrilo) y un gradiente lineal de 7min hasta el 100%B. Desafortunadamente, los resultados obtenidos en especiación mostraban una menor sensibilidad (Figura DI.27), con señales muy inferiores. La

deconvolución del espectro observado mostró una única proteína de 14867 Da, por lo que, a pesar de la baja intensidad, somos capaces de identificar la proteína.

Casa comercial	Núm.	Columna utilizada	Dimensiones
Shimadzu LC Column	#1	(Shim-pack XR-ODS C18	(30 x 2.0 mm; 2.2 μ m)
	#2	Shim-pack XR-ODS C18	(100 x 2.0 mm; 2.2 μ m)
Thermo Scientific	#3	BDS Hypersil C18	(150 x 2.1 mm; 5 μ m)
	#4	ProSwift C4 RP-5H	(500 μ m x 25 cm)

Fases móviles utilizadas

X= Metanol o Acetonitrilo

Fase móvil A: X : H₂O (10:90) + 0.1% HCOOH

Fase móvil: X : H₂O (90:10) + 0.1% HCOOH

Tabla DI.7. Columnas de cromatografía de fase reversa utilizadas y fases móviles ensayadas para la purificación de la fracción 4 (zona 5) recogida tras la separación cromatográfica mediante HPLC(SEC) de una muestra de leche materna

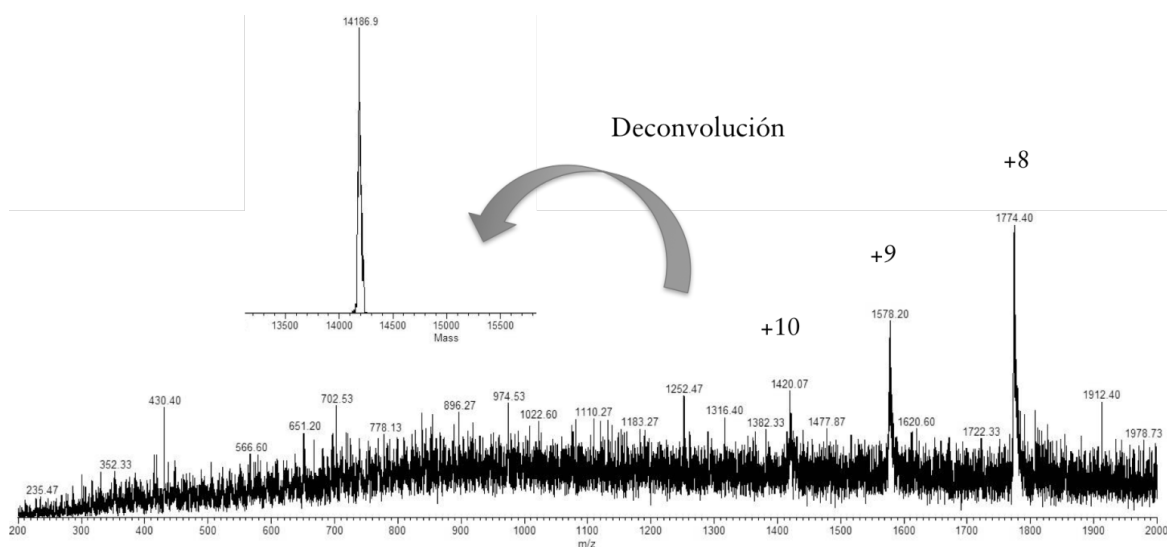


Figura DI.27. Full scan obtenido mediante HPLC-(RP)-SSI-MS para la α -LA disuelta en agua. Intensidad:3.5e4. Relación señal/ruido: 9. Modo positivo. SID:20eV

A pesar de la calidad de los resultados anteriores, al inyectar la muestra (fracción recogida tras HPLC-(SEC)), no se obtuvieron resultados provechosos para un posterior análisis de las muestras de leche materna. Por ello, se decidió proseguir con la siguiente fracción objeto de interés.

DI.3.5. Identificación y cuantificación de Zn-citrato

La optimización de las condiciones experimentales se realizó con una disolución de citrato:Zn (1:10) introducida en el sistema ESI-MS mediante infusión directa por inyección continua con una jeringa impulsada por una bomba de $\mu\text{L}/\text{min}$.

La energía SID utilizada en la fuente fue de 10 eV en todas las medidas, realizadas en modo positivo. En esta parte del trabajo se llevó a cabo un *full scan* entre m/z 100-1000 para seleccionar el ion precursor. Se observó una señal de elevada intensidad relativa a m/z 447. Dicho ion fue considerado como ion precursor y posteriormente se procedió a optimizar la energía a utilizar en la celda de colisión (CID) para tener la mayor intensidad de los iones producto seleccionados (Ver Figura DI.28).

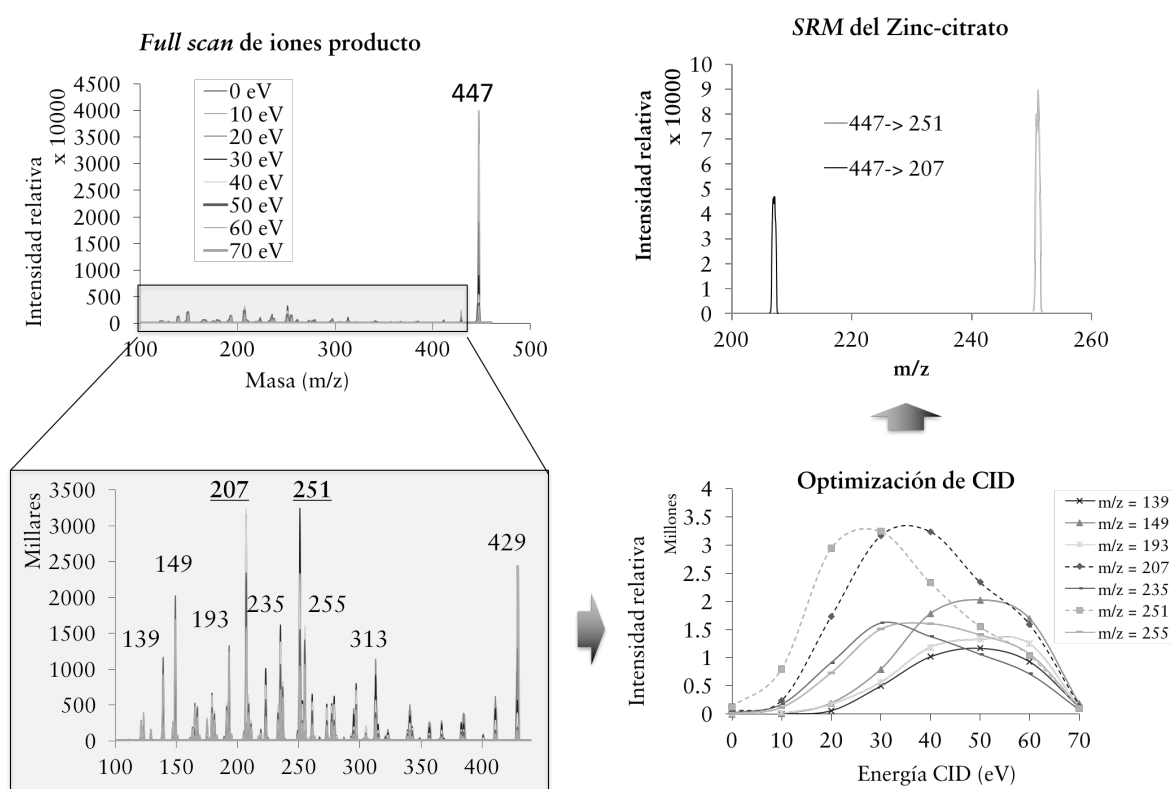


Figura DI.28. Optimización de las condiciones experimentales para la determinación de Zn-citrato mediante ESI-MS

Las mayores intensidades relativas para las transiciones seleccionadas se encontraron a 30 eV. Los iones producto generados mayoritariamente fueron a m/z 207 y 251. Por lo tanto, las transiciones seleccionadas para el estudio mediante SRM fueron: $m/z=447 \rightarrow m/z=207$ y $m/z=447 \rightarrow m/z=251$. Estos resultados coinciden con trabajos previos realizados para el análisis del Zn-citrato mediante ESI-MS [10].

Una vez optimizadas las condiciones, se procedió al análisis de la fracción 5, correspondiente a la zona 5 integrada del cromatograma descrito en la Figura DI.21 obtenido tras la separación mediante HPLC-(SEC). Como se puede observar en la Figura DI.29, tras seleccionar las transiciones $m/z=447 \rightarrow m/z=207$ y $m/z=447 \rightarrow m/z=251$, se observó señal para ambos iones producto. Dependiendo de la fase móvil en la que se diluyó la muestra, la señal de este ion varió considerablemente.

Con los resultados obtenidos, queda confirmada la presencia de dicha especie de Zn-citrato en la fracción escogida.

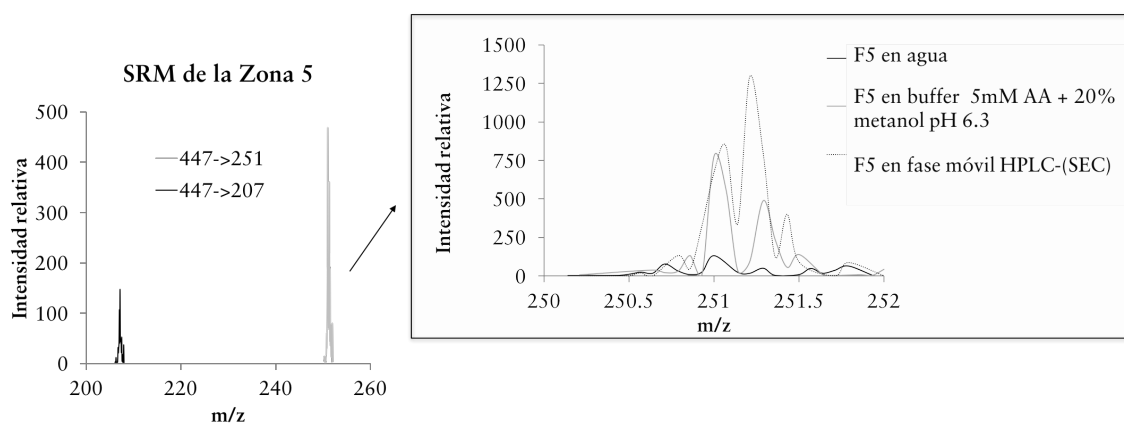


Figura DI.29. Resultados obtenidos en ESI-MS para la identificación del compuesto Zn-citrato en la fracción F5 (Zona 5) recogida tras la separación HPLC-(SEC). SID: 10 eV. CID: 30 eV. Modo positivo.

A modo comparativo con los estudios de ESI-MS (QqQ) se quisieron realizar los estudios con el equipo de SSI-MS (Qq-Trampa Iónica), y para ello se procedió a realizar el mismo proceso de optimización. Sorprendentemente, con este equipo, al realizar un *full scan* (tras seleccionar la m/z 447 como ion precursor) fuimos capaces

de observar una transición no descrita con anterioridad en la bibliografía ni encontrada con el equipo de ESI-MS (ver **Figura DI.30**), $m/z=447 \rightarrow m/z=313$. La señal a $m/z=313$ tras realizar la fragmentación era mucho más intensa que la encontrada para las masas anteriormente utilizadas (207 y 251).

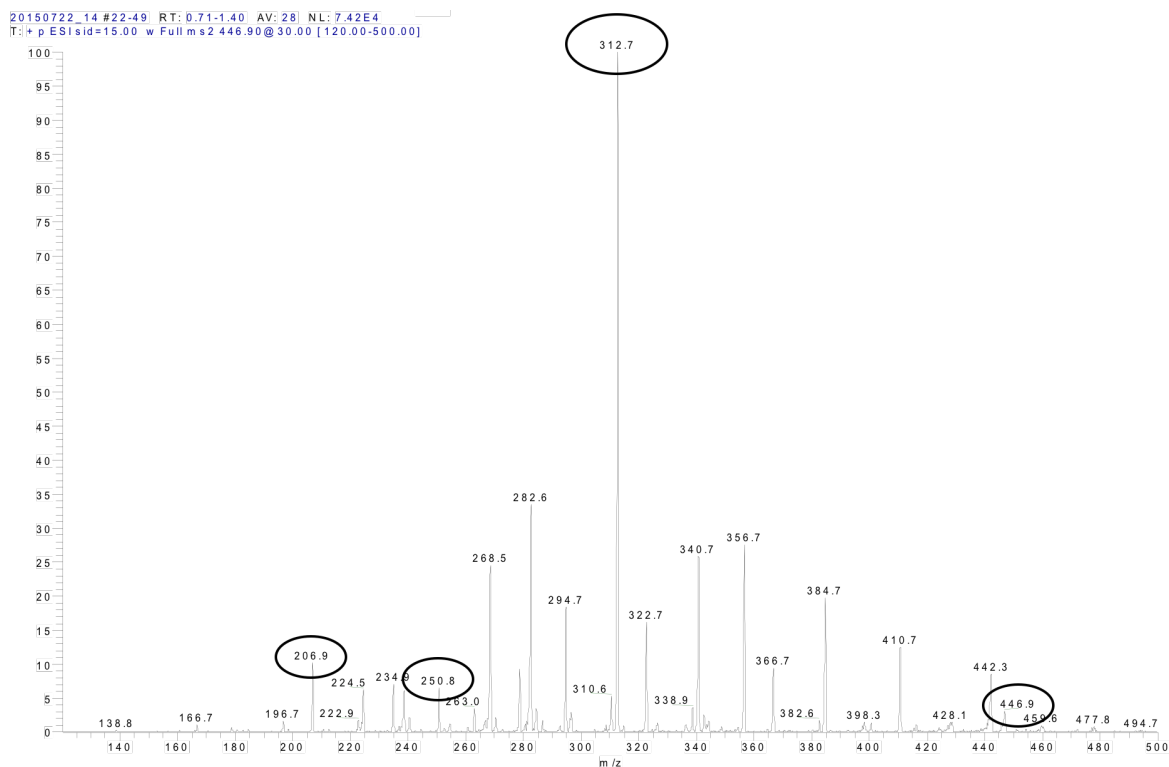


Figura DI.30. Resultados obtenidos en ESI-MS para la identificación del compuesto Zn-citrato en la fracción F5 (Zona 5) recogida tras la separación HPLC-(SEC). SID: 10 eV. CID: 30 eV. Modo positivo.

Por este motivo, se decidió proseguir con dicha transición e intentar llevar a cabo la cuantificación del Zn-citrato mediante la preparación de un calibrado. Los resultados obtenidos están representados en la **Figura DI.31**. El límite de detección obtenido fue LOD= 18.5 ($\mu\text{g/L}$ o ppb) y el de cuantificación fue 61.8 $\mu\text{g/L}$. Dichos resultados compiten con los reportados en la bibliografía por Nischwitz y Michalke [10], donde el límite de detección encontrado para la cuantificación de citrato a través de la transición $m/z=447 \rightarrow m/z=207$ es de 794 $\mu\text{g/L}$ y para la transición $m/z=639 \rightarrow m/z=447$ es de 886 $\mu\text{g/L}$.

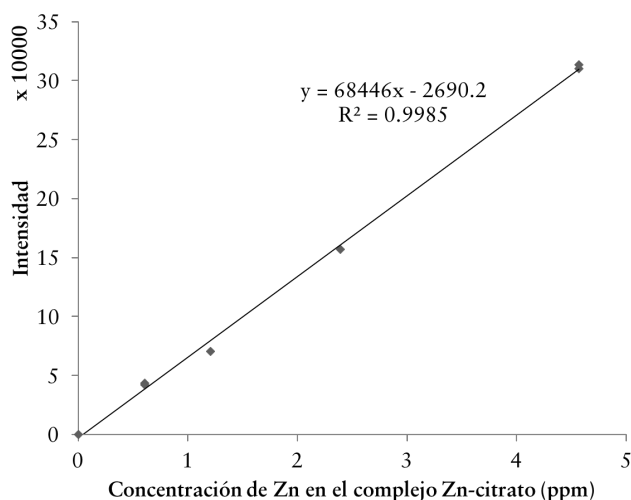


Figura DI.31. Calibración de Zn utilizando el patrón de Zn-citrato utilizando la transición 447→313. CID 30 eV. Modo positivo.

Dicha transición se utilizó para la medida de las muestras de leche materna. En todos los casos se procedió a analizar la fracción independiente y la misma fracción dopada con patrón de Zn-citrato para observar si existe coincidencia en los tiempos de retención observados tras la separación cromatográfica, pero dependiendo de la columna de fase reversa utilizada, los resultados variaban considerablemente. Algunas veces la adición del patrón no produce modificación en el cromatograma observado (ver **Figura DI.32**) o lo hace llegando incluso a modificar la posición inicial de las especies de la muestra (ver **Figura DI.33**).

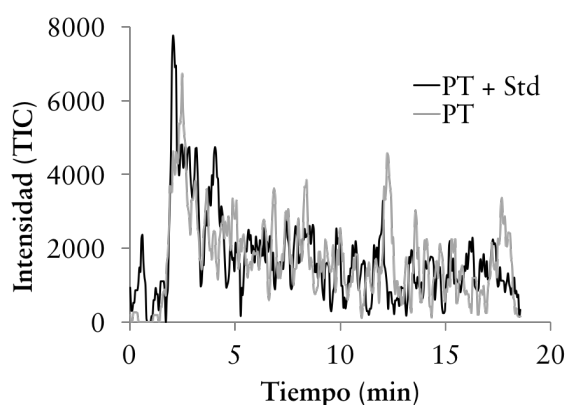


Figura DI.32. Cromatograma registrado mediante SRM con detección a m/z 313 para una muestra de leche materna pretérmino (PT) y la misma muestra dopada con Zn-citrato. Resultados obtenidos para la columna (#4)

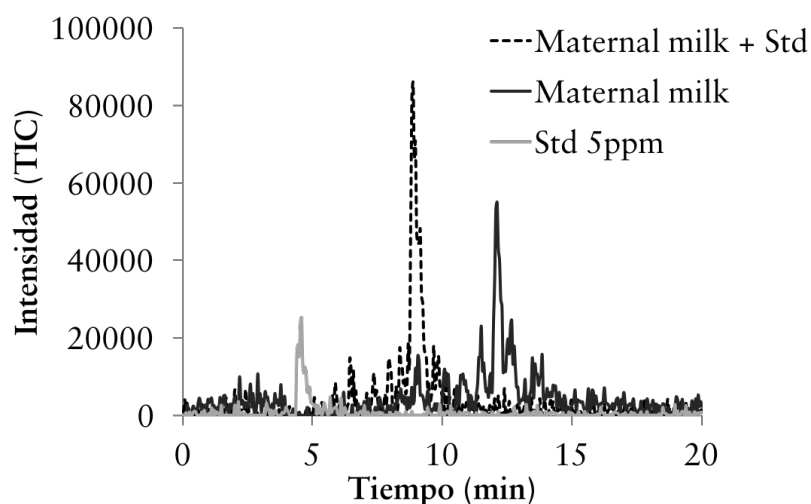


Figura DI.33. Cromatograma registrado mediante SRM con detección a m/z 313 para un patrón de Zn-citrato, una muestra de leche materna pretérmino (PT) y la misma muestra dopada con Zn-citrato (línea de puntos). Resultados obtenidos para la columna (#1)

DI.3.6. Conclusiones del trabajo

El análisis de metaloproteínas intactas mediante técnicas de masas moleculares sigue siendo un reto desafiante, especialmente en muestras con compuestos de elevada labilidad como es el caso de la leche materna. Existen numerosos factores que pueden modificar la ionización de la proteína y que pueden eliminar el metal unido. Por ello, el control los mismos resulta de vital importancia para lograr un análisis de calidad.

En los estudios realizados con α -LA y el complejo Zn- α -LA, las señales netas obtenidas fueron sistemáticamente menores en la fuente de ionización SSI (o VEASI), en comparación con la obtenida con ESI, en todas las condiciones ensayadas.

Los mejores resultados para el análisis de α -LA se encontraron en ESI-MS en modo negativo (0% MeOH, 0.01% DBU). El complejo Zn- α -LA fue detectado mediante ESI-MS en la mayoría de las concentraciones ensayadas para el modo negativo. No obstante, el análisis mediante SSI del complejo (Zn- α -LA) disuelto en agua generó un espectro de mediana intensidad y una adecuada relación señal/ruido,

cuya deconvolución mostró el complejo intacto, llegándose a encontrar hasta 5 átomos de Zn enlazados a la proteína.

La sensibilidad se redujo ligeramente con el estándar cuando se acopló la cromatografía de fase reversa (RP) al sistema SSI (QQIonTrap). No se obtuvieron resultados para la fracción de leche previamente separada por SEC (F4). Se requieren pasos alternativos de aislamiento y purificación para eliminar o disminuir posibles efectos de matriz. Más estudios deberían enfocarse en solucionar este problema, puesto que se comprobó la capacidad de ambas fuentes de ionización (ESI y SSI) para llevar a cabo el análisis de metaloproteínas intactas.

En el caso de los estudios con el Zn-citrato en el ESI-MS, se identificaron dos transiciones intensas ($m/z=447 \rightarrow m/z=207$ y $m/z=447 \rightarrow m/z=251$) que permitieron la identificación del compuesto en la fracción 5 previamente aislado.

Estudios con el estándar de Zn-citrato en el equipo de SSI-MS mostraron una transición que generaba una gran intensidad de iones producto ($m/z=447 \rightarrow m/z=313$). De este modo, se pudo llevar a cabo una calibración relacionando la intensidad observada con la concentración de Zn, obteniéndose un límite de detección inferior al reportado con anterioridad en la bibliografía [10].

El análisis mediante HPLC-(RP) de la fracción previamente identificada no proporcionó datos inconclusos sobre el tiempo de retención de la especie, pudiendo sugerir que se producen interacciones debido a cambios de pH al añadir el patrón a la muestra. Para elucidar la causa de dicho movimiento, más estudios han de ser enfocados hacia éste objetivo.

DI.3.7. Referencias bibliográficas

- ¹ P Roncada, C Piras, A Soggiu, R Turk, A Urbani and L Bonizzi. *Farm animal milk proteomics*. J Proteomics, 75:14 (2012) 4259-74. doi:10.1016/j.jprot.2012.05.028.
- ² ML Fernández-Sánchez, RRF St. Remy, H González Iglesias, JB López-Sastre, B Fernández-Colomer, D. and A Sanz-Medel. *Iron content and its speciation in human milk from mothers of preterm and full-term infants at early stages of lactation: A comparison with commercial infant milk formulas*. Microchem J, 105 (2012) 108-14. doi:10.1016/j.microc.2012.03.016.
- ³ R Milačič, D Ajlec , T Zuliani , D Žigon , J Ščančar. *Determination of Zn-Citrate in human milk by CIM monolithic chromatography with atomic and mass spectrometry detection*. Talanta, 101 (2012) 203-10. doi:10.1016/j.talanta.2012.09.002.
- ⁴ A Hirabayashi, M Sakairi, and H Koizumi. *Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry*. Anal Chem, 66:24 (1994) 4557-9. doi:10.1021/ac00096a025.
- ⁵ VG Santos, T Regiani, FF Dias, W Romão, JL Jara, CF Klitzke, F Coelho and MN Eberlin. *Venturi easy ambient sonic-spray ionization*. Anal Chem, 83:4 (2011) 1375-80. doi:10.1021/ac102765z.
- ⁶ R Haddad, R Sparrapan and MN Eberlin. *Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 20:19 (2006) 2901-5. doi:10.1002/rcm.2680.
- ⁷ Z Takats, SC Nanita, RG Cooks, G Schlosser and K Vekey. *Amino acid clusters formed by sonic spray ionization*. Anal Chem, 75:6 (2003) 1514-23. doi:10.1021/ac0260793.
- ⁸ <https://www.meinhard.com/index.cfm/category/1/nebulizers.cfm>.
- ⁹ M Moini, BL Jones, RM Rogers and L Jiang. *Sodium trifluoroacetate as a tune/calibration compound for positive- and negative-ion electrospray ionization mass spectrometry in the mass range of 100–4000 Da*. J Am Soc Mass Spectrom, 9:9 (1998) 977-80.
- ¹⁰ V Nischwitz and B Michalke. *Electrospray ionisation with selected reaction monitoring (SRM) for the determination of Mn-citrate, Fe-citrate, Cu-citrate and Zn-citrate*. Rapid Commun Mass Spectrom, 23:15 (2009) 2338-46. doi:10.1002/rcm.4156

*D.II. ABSORCIÓN /
BIODISPONIBILIDAD Y
METABOLISMO DEL
HIERRO DESDE LECHE
FÓRMULA FORTIFICADAS:
EL EFECTO DE LA
LACTOFERRINA*



DII.1. ABSORCIÓN/BIODISPONIBILIDAD DEL HIERRO DESDE LECHES FÓRMULA FORTIFICADAS: EFECTO DE LA LACTOFERRINA

DII.1.1. Introducción

A pesar de que la leche materna posee un contenido de hierro relativamente bajo, (0.2-0.4 mg/L) [1], los lactantes amamantados presentan menor incidencia de anemia (considerada por la OMS el primer trastorno nutricional del mundo [2]) y un adecuado estatus de hierro hasta los 12 meses de edad. Esto puede ser debido a la biodisponibilidad relativamente alta del hierro desde la leche humana, la cual se estima que es de aproximadamente el 50% del hierro disponible [1,3].

Para prevenir estados carenciales, se recomienda a los recién nacidos que no reciben alimentación materna, utilizar como alimento fórmulas fortificadas con hierro (conteniendo 4-12 mg/L de hierro), las cuales han demostrado empíricamente durante los últimos 25 años que ayudan a disminuir drásticamente la tasa de anemia durante la infancia [1,4]. Concretamente, los neonatos a término y los pretérmino (>1000g) que son alimentados con dichas fórmulas fortificadas en hierro, son capaces de mantener una suficiencia de hierro sin necesidad de ningún otro tipo de suplementación adicional [5]. No obstante, se estima que la absorción de hierro desde estas leches fórmula fortificadas con este elemento es del 19% de la dosis administrada [6], bastante inferior a la encontrada en leche materna. Por otro lado, las fórmulas bajas en hierro (< 4 mg/L) ponen a los neonatos en un estado de riesgo de deficiencia de este elemento, y no ofrecen ninguna ventaja en los efectos gastrointestinales secundarios cuando se compara con las fórmulas fortificadas en hierro [1,5]. Además, aparte de evaluar la eficacia de los fortificantes de hierro para mejorar el estatus de

hierro, no ha de ignorarse la posibilidad de efectos negativos por un exceso de hierro recorriendo el lumen, (p. ej. por una incrementada peroxidación de lípidos) [1,7]. Y es por todo ello que, para realizar una fortificación efectiva, es necesario alcanzar un compromiso entre la dosis administrada, los efectos que produce/evita y la absorción/biodisponibilidad que presenta el elemento desde el fortificante.

DII.1.2. Absorción del hierro en el organismo

La absorción del hierro parece ser el principal factor controlador de la cantidad de hierro en el organismo, y su posterior biodisponibilidad, es decir, su reparto a lo largo de los diferentes compartimentos en los que se encuentra (funcional, transporte y depósito, ver **Figura DII.1**). Se conoce que dicha absorción está regulada por las células mucosas del duodeno y yeyuno, y que la proteína transportadora de metales divalentes (DMT-1, la cual se expresa principalmente en la parte proximal del duodeno) es un factor mediador clave en la absorción intestinal del hierro [8].

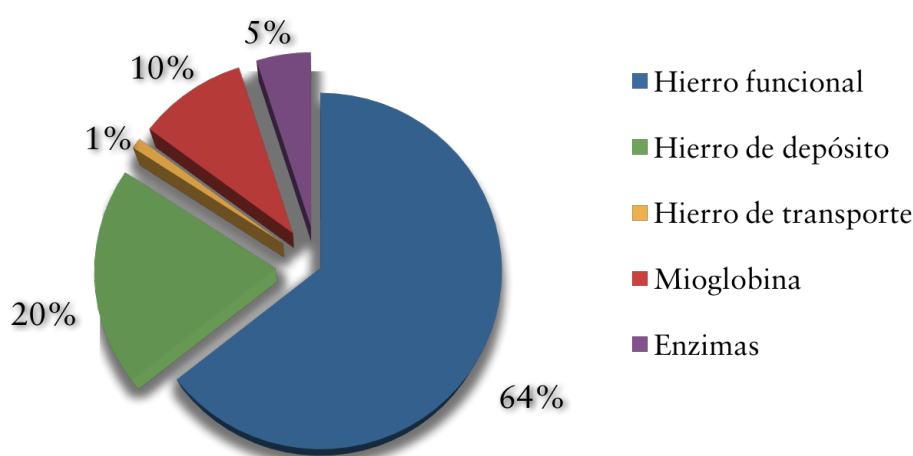


Figura DII.1. Representación esquemática de la distribución del hierro en el organismo

El metabolismo del hierro es el conjunto de reacciones químicas que mantienen la homeostasis del hierro tanto a nivel sistémico como celular. Se conoce que, en el estómago, parte de las sales férricas ingeridas se reducen a ferrosas en el estómago por la acción del bajo pH gástrico (quien además extrae al hierro de la matriz alimenticia)

[9], por el ácido ascórbico en el lumen o por la membrana de las ferrireductasas, que incluyen el citocromo B duodenal (DCYTB) (Ver **Figura DII.2**).

El hierro ingerido, pasa del estómago al duodeno donde las sales férricas restantes son transformadas en sales ferrosas por las enzimas feroreductasas (Duodenal cytochrome B, DcytB). En la membrana apical, el microclima ácido proporciona un gradiente electroquímico de protones que impulsa el transporte de Fe(II) hacia el enterocito a través del transportador divalente de iones metálicos (DMT1). En la membrana basolateral, el transporte de hierro a la transferrina en la circulación está mediado por la ferroportina 1 (Fpn), en asociación con la proteína de membrana hefaestina, que junto con la ceruloplasmina plasmática promueven la oxidación del hierro facilitando de esta manera su incorporación a la apo-transferrina circulante. Debido a que no existe una vía fisiológica para la excreción de este metal esencial, su absorción a nivel duodenal está cuidadosamente regulada para mantener un equilibrio entre la incorporación y la pérdida corporal de dicho elemento.

Como se comentó, la homeostasis del hierro se regula por los niveles sistémicos e intracelulares de hierro. El suministro de hierro sistémico y la homeostasis se basa en el hierro plasmático, que debe mantenerse a niveles suficientes para estar disponible para su uso (p.ej. para eritropoyesis). A nivel sistémico, se mantiene el equilibrio a través de la regulación de la captación de hierro del aparato intestinal, el reciclado de hierro de los macrófagos y el intercambio con los depósitos de hierro en el hígado. El principal regulador de estos mecanismos es la hormona hepcidina un pequeño péptido antimicrobiano producido por el hígado. De acuerdo con este modelo, la producción hepática de hepcidina estaría regulada por el grado de saturación de la transferrina (Tf) y el nivel de receptores para esta proteína a nivel hepático (RTf y RTf2), de modo que cuando la relación Tf-diférrica/RTf aumenta, se induce la secreción de hepcidina. La unión de esta hormona proteica a la Fpn induce la internalización y posterior degradación de la proteína transportadora. Como consecuencia de la disminución de la exportación de hierro, se produce la inhibición de su adquisición por parte de la Tf plasmática y el aumento de la concentración del metal en el enterocito que, a su vez, conduciría a una inhibición de su transporte apical. Por el contrario, cuando la

relación Tf-diférrica/ RTf disminuye, cesa la producción hepática de hepcidina y se restaura la absorción de hierro. La regulación post-traducciona de la Fpn por hepcidina completa un círculo homeostático: el hierro regula la secreción de hepcidina, la cual a su vez, controla la concentración de Fpn en la superficie basolateral de los enterocitos [10]. La hepcidina, producida por el hígado, se une a la ferroportina 1, causando su internalización y degradación y disminuyendo la transferencia de hierro a la sangre [11,12]. Aunque existe un pequeño número de receptores de Fe(III) en la membrana del enterocito, por lo general, si el hierro se encuentra en su forma férrica Fe(III), no será absorbido puesto que es una forma no biodisponible de hierro y, en principio, no existe una vía establecida que regule su absorción intestinal [11]. Resumiendo, todo el hierro inorgánico ingerido ha de ser convertido en Fe(II) puesto que el intestino delgado únicamente es capaz de absorber las sales ferrosas, pero no las férricas.

El hierro orgánico presente en la dieta se encuentra dentro del grupo hemo, el cual es incorporado en el interior celular mediante endocitosis a través de una proteína transportadora (HCP, haem iron transporter). Dentro del enterocito, una oxigenasa destruye el grupo hemo y libera al Fe(II) contenido en su interior [11] (ver **Figura DII.2**).

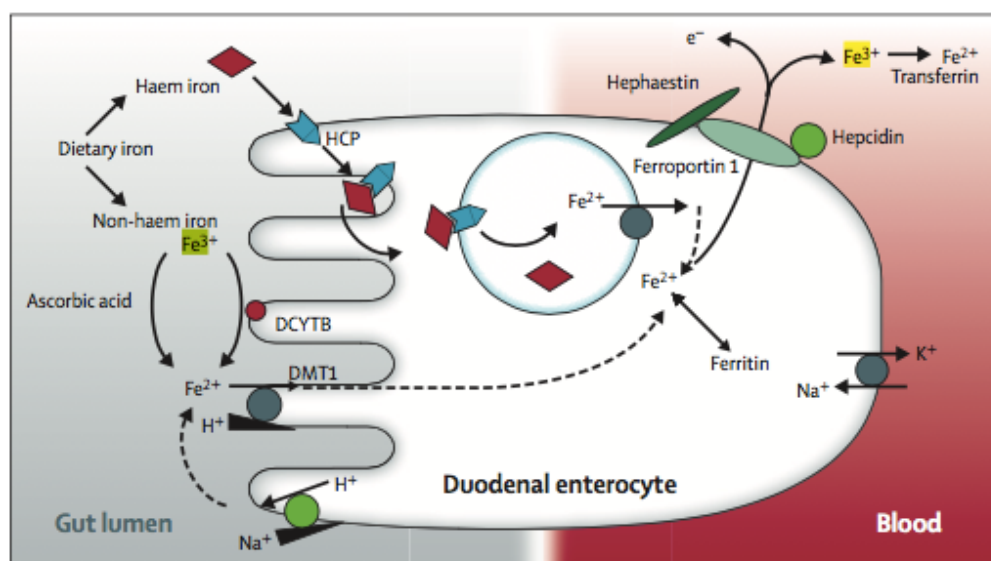


Figura DII.2. Regulación de la absorción intestinal de hierro [11]

DII.1.3. Papel de la lactoferrina en la absorción del hierro

En la actualidad es bien conocido que tanto la absorción como la biodisponibilidad de un bioelemento dependen enormemente de la forma físicoquímica (especie química) en la que dicho elemento esté presente en el alimento, fortificante o suplemento considerado [13]. Esto se observa claramente al comparar la absorción/ biodisponibilidad de diferentes especies de hierro utilizadas actualmente para la fortificación de hierro [7], las cuales son absorbidas en menor proporción que el comúnmente utilizado sulfato ferroso (FeSO_4). Es por todo ello, que los estudios enfocados a encontrar formas físicoquímicas que presenten mejor absorción/biodisponibilidad del hierro incluso a menores dosis, constituyen actualmente una tendencia creciente en el campo de la nutrición. No obstante, se ha observado que la adición conjunta de ciertos compuestos o vitaminas (p. ej. Vitamina C) junto con el hierro, mejoran su biodisponibilidad incluso al disminuir la dosis de hierro utilizada en el fortificante [7]. Actualmente, se realizan muchos esfuerzos en buscar suplementos de hierro que presenten mayor eficiencia, pero no tantos estudios son enfocados a la fortificación de un alimento en concreto. Por ello, la búsqueda de nuevos fortificantes de hierro y de co-fortificantes que puedan mejorar la biodisponibilidad del FeSO_4 actualmente utilizado como fortificante resulta, del mismo modo, de gran interés para mejorar la calidad de las leches fórmula.

Estudios previos de especiación de hierro han demostrado que una gran parte del hierro presente en la leche humana está ligado a la lactoferrina (Lf) [14,15,16], una glicoproteína de la familia de las proteínas no hémicas ligadoras de hierro, capaz de ligar dos átomos de hierro férrico de forma reversible, en presencia de iones carbonato o bicarbonato [17]. Esta glicoproteína posee un punto isoeléctrico de 8.4-9.0 y en presencia del ion citrato, puede retener al hierro en su estructura a pH inferiores a 2 [17]. Su actividad de defensa frente a enfermedades infecciosas (causadas por bacterias, hongos, protozoos y virus) [18], su capacidad osteogénica (preservando la masa ósea y mejorando la microarquitectura ósea) [19], y su acción reguladora del metabolismo del hierro (demostrado en estudios con ratas anémicas [20]), confirman su utilidad como un ingrediente en diversos productos alimenticios. Concretamente,

se recomienda añadir lactoferrina a las leches fórmula destinadas a recién nacidos con objeto de proteger de infecciones al recién nacido [17], y pudiendo mejorar la absorción del hierro en el intestino delgado en lactantes [21], puesto que, al no ser digerida [22], es posible que sea transportada a la circulación sanguínea a través del intestino mediante la vía linfática [23]. A pesar de estos hechos reconocidos, hasta el momento existen muy pocos estudios sobre la influencia de la lactoferrina en la absorción de hierro en los seres humanos [24].

En la última década, se ha observado el aumento del número de estudios nutricionales (de absorción, distribución, cinética y biodisponibilidad) que emplean isótopos minerales estables como trazadores [25] en combinación con técnicas analíticas como la espectrometría de masas, concretamente, destaca la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) que permite obtener medidas de relaciones isotópicas precisas y exactas.

Sin embargo, en los estudios nutricionales empleando isótopos estables como trazadores es importante tener en cuenta que el elemento estudiado ya se encuentra presente en el organismo con una distribución isotópica natural (endógeno) y que el trazador enriquecido añadido (exógeno) también se encuentra presente en menor proporción (dependiendo de sus abundancias isotópicas). Para superar esa limitación, se ha desarrollado una herramienta matemática, basada en la deconvolución de perfiles isotópicos (IPD), la cual permite aislar perfiles isotópicos distintos en mezclas de abundancia natural y trazadores enriquecidos [26,27]. Esta metodología fue aplicada con anterioridad al estudio de la absorción y biodisponibilidad del hierro desde $^{57}\text{FeSO}_4$ [25].

DII.1.4. Objetivo parcial

Debido a la importancia de asegurar un apropiado estatus de hierro en los recién nacidos alimentados con fórmulas lácteas, y debido las propiedades antibacterianas de la lactoferrina y su capacidad de ligar al hierro, se planteó el desarrollo de nuevas formas fisicoquímicas para la fortificación de hierro en leche fórmula, y con objeto de conocer la eficiencia de dichos fortificantes, se realizó el estudio *in vivo* con ratas lactantes.

El objetivo del presente Capítulo es el empleo de isótopos estables de Fe en combinación con la herramienta matemática IPD e ICP-MS para estudiar la influencia de la lactoferrina en la absorción, biodisponibilidad y/o distribución del hierro en ratas lactantes alimentadas con leche fortificada con hierro en formas fisicoquímicas diferentes. Los fortificantes ensayados en este capítulo fueron dos formas fisicoquímicas de hierro diferentes: como un complejo $^{57}\text{Fe(III)}$ -lactoferrina ($^{57}\text{Fe(III)}$ -Lf) y como sulfato ferroso ($^{57}\text{Fe(II)}\text{SO}_4$) a diferentes dosis y en presencia de lactoferrina (Lf). Con el objetivo de seguir el camino del hierro dentro del organismo vivo, las formas fisicoquímicas ensayadas se prepararon con un isótopo estable de hierro (exógeno, ^{57}Fe).

Las *etapas* llevadas a cabo en el presente capítulo fueron:

- Síntesis y caracterización de los fortificantes ensayados y posterior alimentación de las ratas lactantes con las leches fórmulas enriquecidas y toma de muestra tras el período de alimentación.
- Desarrollo y validación de una metodología analítica mediante masas elementales (ICP-MS) para la determinación total de hierro endógeno ($^{\text{nat}}\text{Fe}$) y exógeno (^{57}Fe) en diferentes tejidos y fluidos biológicos, mediante el uso de una aproximación matemática denominada deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) y posterior aplicación en muestras reales.
- Comparación de los resultados obtenidos dependiendo de la dosis y la forma fisicoquímica de hierro administrada y con los obtenidos en el grupo control.

DII.1.5. Aplicación del IPD-ICP-MS en el estudio de la absorción/ distribución del hierro

En el caso de los estudios nutricionales *in vivo*, la herramienta de IPD resulta muy valiosa puesto que un trazador enriquecido isotópicamente en un isótopo del elemento (denominado *trazador exógeno*) se utiliza como alimento para el organismo vivo. Dado que su estructura química es idéntica a la del elemento/compuesto de abundancia natural, la ruta metabólica que seguirá será la misma que la seguida por el mismo elemento/compuesto no modificado isotópicamente. En el caso de estudios nutricionales, el trazador exógeno (*t1*) presentará una absorción y biodisponibilidad idénticas al elemento/compuesto no marcado. Una vez finalizado el experimento, el fluido o tejido tomados presentará una contribución debida a la muestra (contenido inicial), y otra correspondiente a la incorporación del trazador *t1* utilizado). El segundo trazador (denominado *trazador de cuantificación, t2*) se utiliza en la medida analítica como herramienta para realizar la cuantificación.

El estudio de la biodisponibilidad y/o absorción del hierro en leches fórmula empleada en la alimentación de ratas lactantes mediante la utilización de la metodología de deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) en combinación con la detección mediante ICP-MS implica por tanto el uso de dos isótopos de hierro: uno administrado de forma oral (^{57}Fe , en la forma fisicoquímica objeto de estudio) y otro utilizado para la cuantificación (^{54}Fe).

Para ello, ratas lactantes que poseen hierro en su organismo (endógeno) con abundancia isotópica natural (representado en la **Figura DII.3** como $^{\text{nat}}\text{Fe}$, color azul), fueron alimentadas *ad libitum* con leche fórmula fortificada en el isótopo enriquecido ^{57}Fe (exógeno, color verde en **Figura DII.3**). A lo largo del período de suplementación (14 días) se recogieron las muestras de orina y heces. Tras el periodo de suplementación las ratas fueron sacrificadas y se tomaron las muestras de sangre y tejidos para su análisis. Las muestras conteniendo Fe natural y exógeno se mezclan con una cantidad conocida de un segundo isótopo enriquecido de Fe (^{54}Fe , color rojo en **Figura DII.3**) previa a su cuantificación mediante ICP-MS por IPD.

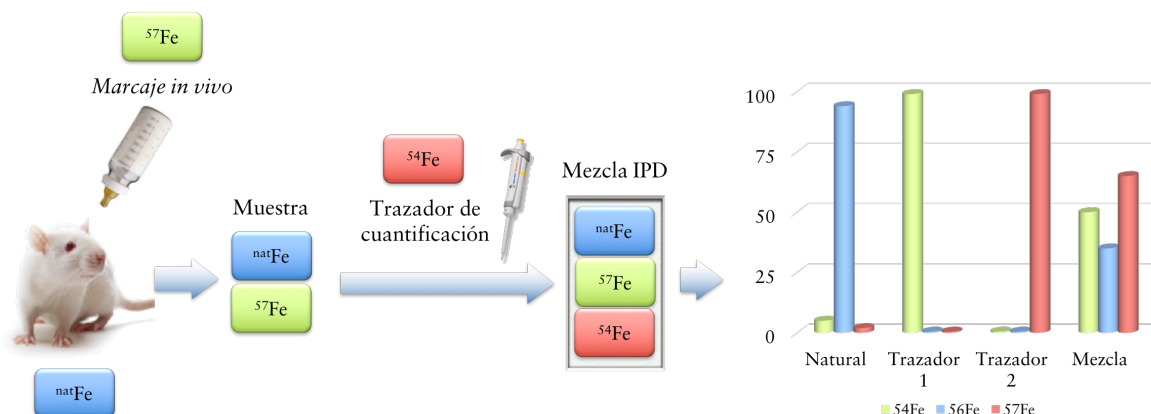


Figura DII.3. Representación esquemática de la metodología de IPD para estudios nutricionales

Las abundancias de los cuatro isótopos de Fe en la muestra ($^{xx}A_M$), calculadas mediante la medida de las intensidades isotópicas obtenidas mediante ICP-MS, están relacionadas con las abundancias conocidas del hierro natural ($^{xx}A_{nat}$) y de los isótopos enriquecidos ($^{xx}A_{57}$, $^{xx}A_{54}$), y con las fracciones molares del hierro natural y enriquecido ($x_{Fe_{nat}}$, $x_{Fe_{57}}$, $x_{Fe_{54}}$) según la notación matricial de la **Figura DII.4**. Puesto que tenemos más ecuaciones que incógnitas, los valores para las variables $x_{Fe_{nat}}$, $x_{Fe_{57}}$ y $x_{Fe_{54}}$ son calculados por mínimos cuadrados (mediante la minimización de la suma cuadrática de los errores). El vector de error “e” contiene todas las desviaciones entre las abundancias isotópicas experimentales y las calculadas en la muestra.

$$\begin{bmatrix} {}^{54}A_b \\ {}^{56}A_b \\ {}^{57}A_b \\ {}^{58}A_b \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} {}^{54}A_{nat} & {}^{54}A_{57} & {}^{54}A_{54} \\ {}^{56}A_{nat} & {}^{56}A_{57} & {}^{56}A_{54} \\ {}^{57}A_{nat} & {}^{57}A_{57} & {}^{57}A_{54} \\ {}^{58}A_{nat} & {}^{58}A_{57} & {}^{58}A_{54} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_{Fe_{nat}} \\ x_{Fe_{57}} \\ x_{Fe_{54}} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} {}^{54}e \\ {}^{56}e \\ {}^{57}e \\ {}^{58}e \end{bmatrix}$$

Figura DII.4. Matriz de IPD utilizada para la determinación de hierro endógeno (^{nat}Fe) y del trazador exógeno (^{57}Fe) mediante la utilización de un trazador de cuantificación (^{54}Fe).

A partir de las fracciones molares calculadas: $x_{\text{Fe}^{\text{nat}}} = N_{\text{nat}} / (N_{\text{nat}} + N_{57} + N_{54})$; $x_{\text{Fe}^{57}} = N_{57} / (N_{\text{nat}} + N_{57} + N_{54})$ y $x_{\text{Fe}^{54}} = N_{54} / (N_{\text{nat}} + N_{57} + N_{54})$, la cantidad de Fe trazador metabólico (^{57}Fe) y natural ($^{\text{nat}}\text{Fe}$) pueden calcularse, dado que la cantidad de trazador de cuantificación (^{54}Fe) añadida es conocida.

De este modo, con una sencilla medida, es posible conocer en cada fluido o tejido estudiado, la cantidad de hierro endógeno ($^{\text{nat}}\text{Fe}$) que aún permanece, y cuánto hierro exógeno (^{57}Fe , administrado como alimento) se ha incorporado en dicho fluido o tejido.

La elección de ambos trazadores se realiza atendiendo al mayor rango de relaciones (R_m) posibles donde el factor de magnificación del error sea mínimo. (ver sección DII.1.7).

DII.1.6. Exactitud en las medidas de las relaciones isotópicas del hierro

El análisis por deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) proporciona una serie de ventajas respecto a otras técnicas analíticas que utilizan calibrados metodológicos, además de permitir seguir la “pista” al elemento de interés una vez ha sido ingerido, absorbido y transportado a los diferentes tejidos diana. No obstante, este tipo de análisis requiere el cumplimiento de una serie de condiciones: i) no debe haber pérdidas de analito o de trazador antes de que se produzca el equilibrio isotópico, ii) ambos isótopos del elemento se deben medir en ausencia de interferencias espectrales mediante Espectrometría de Masas, iii) se debe corregir el tiempo muerto del detector y el factor de discriminación de masas ya que ambos parámetros afectan a la exactitud en la medida de las relaciones isotópicas, iv) se deben controlar rigurosamente los valores del blanco ya que cualquier contaminación en la mezcla afectará al valor de R_m y por tanto a la exactitud del resultado final.

DII.1.6.1. Interferencias espectrales

Concretamente, en el caso del hierro, su determinación mediante ICP-MS está condicionada enormemente por la presencia de diferentes elementos químicos presentes en la matriz de la muestra, los cuales pueden generar interferencias espectrales que dificulten la determinación de hierro.

	^{54}Fe	^{56}Fe	^{57}Fe	^{58}Fe
<i>Abundancia isotópica</i>	5.82	91.66	2.19	0.33
<i>Interferencia isobárica</i>	^{54}Cr	-	-	^{58}Ni
<i>Interferencia poliatómica</i>	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}$ $^{38}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$ $^{36}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$ $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ $^{36}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$ $^{36}\text{S}^{18}\text{O}^+$ $^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$ $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}$	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$ $^{38}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$ $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$ $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ $^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$ $^{38}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$ $^{38}\text{Ar}^{19}\text{F}^+$	$^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$ $^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$

Tabla DII.1. Tabla de interferencias espectrales en ICP-MS para los isótopos del Fe

Éstas pueden ser producidas por iones atómicos de la misma masa (interferencias isobáricas) o iones moleculares (interferencias poliatómicas, formadas a partir del Ar, el disolvente, la matriz de la muestra, así como por la entrada de gases atmosféricos en la región de la interfase del ICP-MS) que tienen la misma relación masa/carga que el analito de interés, lo que ocasiona que a la señal del analito se sume la señal del ion interferente. En la **Tabla DII.1** pueden observarse las principales interferencias espectrales que pueden afectar a los isótopos del hierro en la medida mediante ICP-MS [28].

La magnitud de las interferencias generadas dependerá de la concentración de analito y/o interferentes presentes en la muestra objeto de análisis. Teniendo en cuenta el contenido en distintos elementos químicos (p.ej. Fe, Cr, Ni, Na) de los fluidos

biológicos objeto de estudio (ver **Tabla DII.2**) [29] podemos tener una primera aproximación del tipo de interferencias espectrales esperadas que pueden presentarse en la medida de los distintos isótopos del hierro en las muestras de interés.

Elemento	Sangre	Orina	Hígado
	Suero(s); Plasma(p)		
Fe	1.1-1.3 mg/L (p)	0.17 mg/L	46-307 µg/g
Ca	91-106 mg/L (s)	120 mg/L	-----
Cr	0.04-0.43 µg/L (s,p)	0.04-50 µg/L	8-160 ng/g
Na	2500-3560 mL/L (s)	2200 mg/L	-----
Ni	0.05-1.3 µg/L (s,p)	0.06-8 µg/L	9-380 ng/g

Tabla DII.2. Tabla de Fe, Ca, Cr, Na y Ni en fluidos y tejidos biológicos

El estudio de las posibles interferencias espectrales causadas por los elementos de la matriz se realizó teniendo en cuenta la relación de concentraciones entre analito e interferente presentes en las muestras objeto de estudio, considerando la misma dilución que la utilizada en las muestras. (1:10 para orina, 1:30 para hígado; 1:20 para suero y eritrocitos).

Interferencias isobáricas del hierro

La interferencia que causa la presencia de níquel es la más problemática porque, aunque su presencia en orina y sangre es baja [29], la interfase del instrumento ICP-MS está compuesta de aleaciones de níquel. Este último hecho hace que el nivel del fondo de níquel sea elevado en el ICP-MS por lo que la precisión y reproducibilidad en las medidas se verá deteriorada [30,31,32].

La mejor forma de evitar las interferencias isobáricas producidas por el Ni a la masa 58 del Fe, es el empleo de correcciones matemáticas. Para ello, a partir de una disolución estándar de Ni con abundancias naturales y concentración de 10 ppb, se miden las intensidades a las masas 58 y 60 del Ni ($^{58}\text{I}_{\text{Ni}}$, $^{60}\text{I}_{\text{Ni}}$) obteniéndose un factor

de corrección f_{Ni} definido como la relación de intensidades $^{58}I_{Ni}/^{60}I_{Ni}$. Normalmente dicha relación toma un valor entre 2,30 y 2,40. De este modo, en la muestra biológica de interés, además de la medida de la intensidad a la masa 58 (^{58}I), se mide a la masa 60 correspondiente al del isótopo ^{60}Ni . Para calcular en la muestra la intensidad del ^{58}Fe corregida ($^{58}I_{Fe}$) se emplea la siguiente ecuación:

$$^{58}I_{Fe} = ^{58}I - f_{Ni} \cdot (^{60}I_{Ni}) \quad [DII.1]$$

donde ^{58}I y $^{60}I_{Ni}$ son las intensidades medidas a la masa 58 y a la 60 en la muestra.

Por el contrario, la concentración de Cr presente en la sangre, orina y heces está por debajo del $\mu g/L$ en la mayor parte de los casos, y por ello, dicho elemento no causa interferencia en la determinación del Fe. Por lo tanto, no se tuvo en cuenta esta interferencia a la hora de corregir las señales medidas.

Interferencias poliatómicas del hierro

En lo que se refiere a las interferencias poliatómicas que afectan la determinación de Fe, las más problemáticas son las derivadas del Ar (como ArO^+ , $ArOH^+$ y ArN^+ , ver **Tabla DII.1**) las cuales son inherentes al gas plasmógeno y la entrada de gases atmosféricos en la región de la interfase del equipo, así como el ácido nítrico utilizado como estabilizador de las disoluciones. Estas interferencias pueden ser minimizadas mediante el uso de un ICP-MS con celda de colisión/reacción y el empleo de H_2 o He como gases de colisión/reacción [33,34,35].

Para la elección del mejor gas se utilizaron dos disoluciones se representaron las señales de los distintos isótopos del elemento de interés (Fe) frente al cambio del flujo de gas portador en mL/min (de 0 a 5, en intervalos de 0.5), para una disolución "blanco" de 50 $\mu g/L$ de hierro y para una disolución de la misma concentración de analito a la que se le ha añadido 500 $\mu g/L$ de calcio y, del mismo modo que se realizó en el Capítulo I, se representó el BEC (*Background equivalent concentration*). Se observó que el gas que mejores resultados produjo en la determinación de hierro por ICP-MS fue el He, puesto que redujo parcial o totalmente dichas interferencias. El

flujo de gas óptimo observado fue de 4 mL/min. Dichas condiciones concuerdan con los resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio para la determinación de hierro mediante ICP-MS [25], y el resto de condiciones experimentales optimizadas están recogidas en la **Tabla DII.3**.

Parámetros del ICP-MS

<i>Parámetros del plasma</i>	
<i>Potencia de radiofrecuencia</i>	1500 W
<i>Flujo del gas plasmógeno</i>	15 L /min
<i>Flujo del gas portador</i>	1.12 L /min
<i>Parámetros de la celda de reacción/colisión</i>	
<i>Flujo del gas He</i>	4 mL/min
<i>Potencial del octapolo (Oct bias)</i>	-18 V
<i>Potencial del cuadrupolo (QP bias)</i>	-16 V
<i>Parámetros de adquisición de datos</i>	
<i>Modo de adquisición</i>	Time resolved analysis
<i>Isótopos monitorizados</i>	^{42,43,44} Ca, ^{54,56,57,58} Fe, ⁶⁰ Ni
<i>Puntos por pico</i>	3
<i>Tiempo de adquisición por punto</i>	3 s
<i>Réplicas</i>	5

Tabla DII.3. Condiciones experimentales utilizadas para la determinación de Fe en fluidos y tejidos biológicos mediante ICP-MS

Estudio de interferencias de calcio y sodio

Para conocer si la concentración de sodio y calcio en las muestras puede interferir con la medida del hierro mediante ICP-MS, se estudió el cambio de señal producido en una disolución de 50 ppb de Fe a la que se le añadieron concentraciones crecientes de Ca y Na. Los resultados obtenidos mostraron para el caso de la interferencia del Na mostraron que, para las concentraciones esperadas en las muestras a analizar, no se produce una interferencia en los isótopos de Fe.

En el caso del calcio, se observó que las interferencias poliatómicas generadas podían eliminarse mediante el uso de He en la celda de colisión para relaciones analito : interferente (1:1000), para relaciones mayores la interferencia causada por el Ca no se eliminaba en la celda, dando lugar a errores en las medidas de los isótopos del

hierro. Dado que en algunos fluidos corporales objeto de análisis el Ca está presente a niveles elevados, muy superiores a los del Fe, es necesario utilizar correcciones matemáticas para poder eliminar dichas interferencias.

Las ecuaciones matemáticas necesarias para calcular las intensidades corregidas del Fe ($^{xx}I_{Fe}$) en la muestra son las siguientes:

- **Corrección para el ^{56}Fe :** Para corregir la intensidad de hierro en el isótopo 56 debido a una interferencia de calcio ($^{40}Ca^{16}O^+$), se utiliza la ecuación:

$$^{56}I_{Fe} = ^{56}I - f_{Ca(I)} \cdot (^{40}I_{Ca}) \quad [DII.2]$$

donde ^{56}I y $^{40}I_{Ca}$ corresponden a las intensidades medidas a las masas 56 y 40 en la muestra y $f_{Ca(I)}$ es el factor de corrección del Ca a la masa 56 obtenida a partir de la medida de la relación intensidades $^{56}I_{Ca}/^{40}I_{Ca}$ en la disolución estándar de calcio (10 $\mu g/g$). Ante la imposibilidad de medir la señal $^{40}I_{Ca}$ (debido a la interferencia $^{40}Ar^+$), ésta se calcula a partir de las relaciones isotópicas $^{40}I_{Ca}/^{42}I_{Ca}$, $^{40}I_{Ca}/^{43}I_{Ca}$ y $^{40}I_{Ca}/^{44}I_{Ca}$, y la relación entre sus abundancias naturales conocidas (A_{Ca}) según las siguientes ecuaciones [36]:

$$^{40}I_{Ca} = ^{42}I_{Ca} \cdot (^{40}A_{Ca}/^{42}A_{Ca}) \quad [DII.3]$$

$$^{40}I_{Ca} = ^{43}I_{Ca} \cdot (^{40}A_{Ca}/^{43}A_{Ca}) \quad [DII.4]$$

$$^{40}I_{Ca} = ^{44}I_{Ca} \cdot (^{40}A_{Ca}/^{44}A_{Ca}) \quad [DII.5]$$

El valor correspondiente a la intensidad de $^{40}I_{Ca}$ se promedia para todos los valores obtenidos mediante las ecuaciones [D.3.], [D.4.] y [D.5.] para la disolución estándar de calcio medida diariamente. El valor del $f_{Ca(I)}$ calculado oscila entre 0,0001 y 0,0003).

- **Corrección para el ^{57}Fe :** Para la corrección de la intensidad del isótopo 57 del hierro mediante la interferencia de calcio generada ($^{40}Ca^{17}O^+$), se utiliza la ecuación:

$$^{57}I_{Fe} = ^{57}I - f_{Ca(II)} \cdot (^{40}I_{Ca}) \quad [DII.6]$$

donde ^{57}I y $^{40}\text{I}_{\text{Ca}}$ son las intensidades medidas a las masas 57 y 40 en la muestra y $f_{\text{Ca(II)}}$ es la relación de intensidades $^{57}\text{I}_{\text{Ca}}/^{40}\text{I}_{\text{Ca}}$ en las disoluciones estándar de calcio promediadas. La intensidad debida a $^{40}\text{I}_{\text{Ca}}$ tanto en las disoluciones estándar de calcio, como en las muestras, se obtienen según se aplicando las ecuaciones descritas anteriormente [D.3., D.4. y D.5.].

- **Corrección para el ^{58}Fe :** Para la corrección de la intensidad del isótopo 58 del hierro mediante la interferencia de calcio generada ($^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$), se utiliza la ecuación:

$$^{58}\text{I}_{\text{Fe}} = ^{58}\text{I} - f_{\text{Ca(III)}} \cdot (^{42}\text{I}_{\text{Ca}}) \quad [\text{DII.7}]$$

donde ^{58}I y $^{42}\text{I}_{\text{Ca}}$ corresponden con el valor de la intensidad a la masa 58 y a la masa 42 de calcio ($^{42}\text{I}_{\text{Ca}}$) medidas en la muestra y $f_{\text{Ca(III)}}$ es la relación de intensidades $^{58}\text{I}_{\text{Ca}}/^{42}\text{I}_{\text{Ca}}$ en las disoluciones estándar de calcio.

DII.1.6.2. Tiempo muerto del detector

El *tiempo muerto* es una limitación inherente a todo sistema de detección que incluya una electrónica de conteo, la cual puede definirse como el tiempo que necesita el detector del ICP-MS para contabilizar la llegada de dos iones como dos eventos diferentes. Dicha pérdida de tiempo puede afectar a la medida de los isótopos y por ello ha de ser evaluado para corregir las intensidades y por consiguiente las relaciones isotópicas. Existen diversos métodos para llevar a cabo la corrección del tiempo muerto [37,38]. En nuestro caso dicho cálculo se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Vanheaecke y col [39], midiendo la relación isotópica $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ para disoluciones de hierro de concentración creciente y variando el tiempo muerto entre 0 y 100 ns (en pasos de 10 ns). Los resultados obtenidos están recogidos en la **Figura DII.5**.

Para cada disolución de hierro de una concentración dada se obtuvo la variación de la relación comentada con el tiempo. La intersección de todas ellas dio como resultado un tiempo muerto de 49 ns que fue introducido en el software del equipo para llevar a cabo la corrección de intensidades automáticamente.

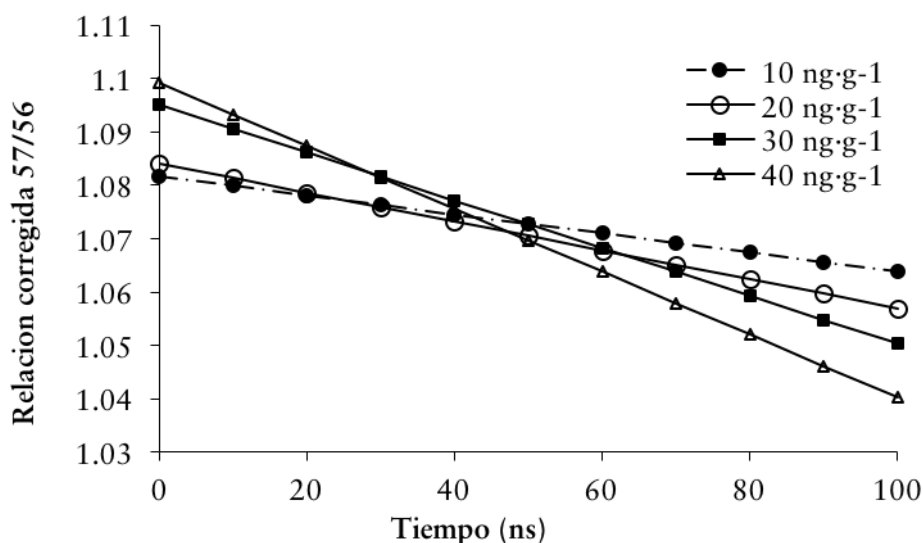


Figura DII.5. Tiempo muerto del detector para el equipo ICP-MS (7500).

DII.1.6.3. Factor de discriminación de masas

El haz de iones que sale por la apertura del cono separador o *skimmer*, es eléctricamente neutro y todas las entidades (átomos, iones, electrones) del haz se mueven con la misma velocidad [40]. Mediante lentes de extracción cargadas negativamente, es posible atraer a los iones positivos y repeler las entidades negativas (electrones e iones), de modo que los iones positivos que constituyen el haz se repelerán entre sí y darán lugar, no sólo a un desenfoque del mismo, sino también a un cambio en su composición [41]. Dado que los iones ligeros y pesados se mueven con la misma velocidad, su energía cinética dependerá únicamente de su masa. Como resultado, la probabilidad de que un ion positivo sea eliminado del haz como consecuencia de una repulsión mutua, será mucho mayor para un ion ligero que para uno pesado, es decir, los iones pesados se transmiten preferentemente con respecto a los más ligeros [41]. Este fenómeno recibe el nombre de efecto “espacio-carga” y es causante de la *discriminación de masas* y como consecuencia de este hecho, las relaciones isotópicas medidas estarán siempre desviadas hacia los isótopos más pesados y llevarán asociadas un error respecto a la relación isotópica real, que es necesario corregir [42]. Además del efecto “espacio-carga”, también el efecto “orificio”

produce un enriquecimiento del haz en iones pesados, contribuyendo igualmente a la discriminación de masas. En la región situada en la interfase, entre el cono de muestreo (“sampler”) y el cono separador (“skimmer”), se produce un chorro supersónico de iones, átomos y moléculas que se expande en función de su energía cinética. Los iones más ligeros, con menor energía cinética, se expanden en mayor proporción que los más pesados, por lo que serán absorbidos preferentemente por el sistema de vacío [43].

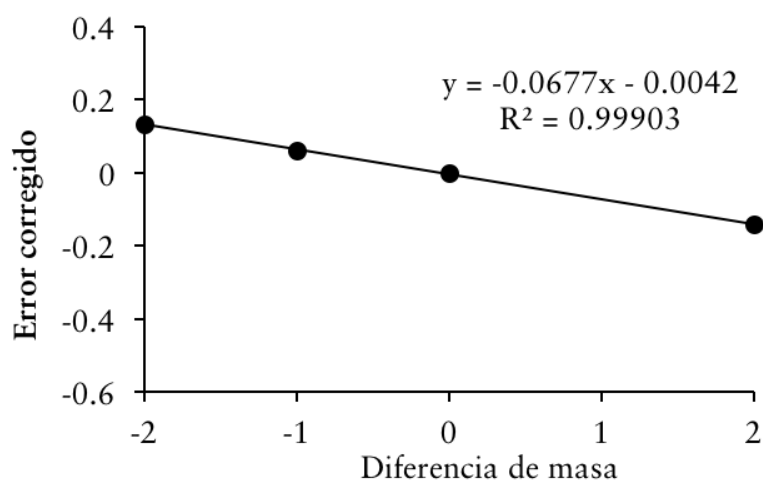


Figura DII.6. Factor de discriminación de masas para el Fe en el equipo ICP-MS (7500).

El factor de discriminación de masas (factor K) fue calculado diariamente empleando una disolución de hierro de 50 ng/g de composición natural, bajo las mismas condiciones instrumentales en las que se midieron las relaciones isotópicas de las muestras. Dicho factor se calculó utilizando el modelo exponencial, en el que se representa el logaritmo neperiano de las relaciones isotópicas corregidas y teóricas ($\ln (R_{\text{corregida}}/R_{\text{teórica}})$) frente a la diferencia de masa (Δm) de los isótopos medidos (2, 0, -1 y -2) para las relaciones 54/56, 56/56, 57/56 y 58/56, respectivamente. La pendiente de la recta obtenida experimentalmente (K) es el factor de discriminación de masas (ver Figura DII.6).

$$\ln \left(\frac{R_{\text{corregida}}}{R_{\text{medida}}} \right) = K \cdot \Delta m \quad [\text{DII.8}]$$

Todas las relaciones experimentales ($R_{\text{experimental}}$) obtenidas se corrigieron con dicho factor según la ecuación DII.9, para obtener la relación isotópica corregida ($R_{\text{corregida}}$) por el factor de discriminación de masas (K) dependiendo de la diferencia de masa entre los isótopos considerados.

$$R_{\text{corregida}} = R_{\text{experimental}} \cdot e^{K \cdot \Delta m} \quad \text{[DII.9]}$$

Un ejemplo de los resultados obtenidos está recogido en la Figura DII.6, donde se observa que el factor de discriminación de masas es la pendiente de la recta obtenida tras representar el error corregido frente a la diferencia de masa para todos los isótopos del hierro.

Las abundancias isotópicas de la muestra se calculan a partir de dichas relaciones isotópicas corregidas empleando la siguiente ecuación:

$$A_b^i = \frac{R_{\text{cor}}^i}{\sum_{i=1}^n R_{\text{cor}}^i} \quad \text{[DII.10]}$$

DII.1.7. Precisión en las medidas de las relaciones isotópicas del hierro

Un parámetro que puede tener gran influencia en la precisión de las medidas por dilución isotópica es la cantidad de trazador para la cuantificación (disolución enriquecida isotópicamente, trazador (t) o spike (sp)) añadida a la muestra. Dicha cantidad se puede optimizarse calculando el rango óptimo de la relación entre muestra y trazador de que los errores aleatorios se minimicen.

Aplicando la teoría de propagación de errores a la ecuación de la dilución isotópica se puede demostrar que la incertidumbre asociada al cálculo de la concentración está directamente relacionada con la incertidumbre de las medidas de

las relaciones isotópicas en la mezcla (muestra con el trazador) multiplicada por el factor de magnificación del error [26,27], denominado $f(R)$ según la ecuación:

$$f(R) = \left[\frac{R_m (1 - R_{sp} \cdot R_s)}{(R_m - R_{sp}) \cdot (1 - R_m \cdot R_s)} \right] \quad [D.11]$$

Donde R_m , R_{sp} y R_s son las relaciones isotópicas en la mezcla, trazador (o spike), y muestra respectivamente. Puesto que R_{sp} y R_s , son conocidos, se pueden representar los valores de $f(R)$ frente a valores consecutivos de R_m para obtener el intervalo de relaciones en la mezcla donde el factor de magnificación sea mínimo. Una vez conocido el intervalo, la cantidad de trazador a añadir a la muestra puede ser fácilmente estimado. En la **Figura DII.7** se muestra como ejemplo la variación del factor de magnificación del error $f(R)$ para las relaciones de isótopos $^{56}\text{I}/^{54}\text{I}$, $^{56}\text{I}/^{57}\text{I}$ y $^{57}\text{I}/^{54}\text{I}$. Donde R_m para cada uno se calcula: $R_m(\text{negro}) = ^{56}\text{I}/^{54}\text{I}$; $R_m(\text{rojo}) = ^{56}\text{I}/^{57}\text{I}$ y $R_m(\text{azul}) = ^{57}\text{I}/^{54}\text{I}$. De este modo, se puede elegir el trazador más adecuado en cada caso.

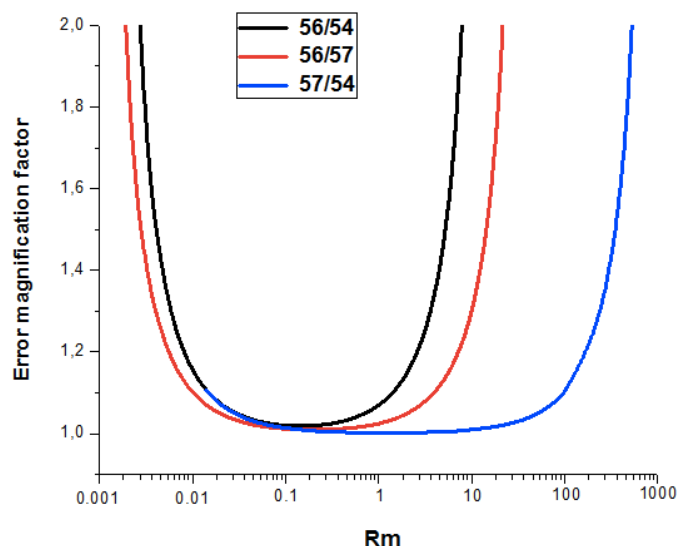


Figura DII.7. Factor de magnificación del error para distintos isótopos del hierro

Como se puede observar, siempre que la relación R_m se mantenga dentro del intervalo del mínimo error, la incertidumbre asociada a la medida de R_m es mínima. Por tanto, la cantidad de trazador añadida a la muestra se realiza siempre de manera que la R_m este dentro del intervalo, tanto en los análisis totales mediante ICP-MS (IDA o IPD), como en los análisis de especiación metálica mediante ICP-MS (IDA o IPD post-columna)

DII.1.8. Validación de la metodología IPD

Una vez optimizadas las condiciones de medida, se procedió a la validación de la metodología analizando diferentes materiales biológicos de referencia (suero, sangre entera, orina, hígado bovino, riñón equino y leche en polvo desnatada). Para ello, a las muestras de referencia (suero y orina reconstituidas según especificaciones del fabricante, hígado bovino y riñón equino digeridos como se indicó en el procedimiento experimental de la sección (XXX), conteniendo una cantidad certificada de Fe con abundancia isotópica natural (^{nat}Fe), se les añadieron cantidades conocidas de dos isótopos de Fe enriquecidos (^{57}Fe y ^{54}Fe) y finalmente se diluyeron convenientemente previo a su análisis mediante ICP-MS. Se consideró que la cantidad de ^{57}Fe añadida (exógeno) y la ^{nat}Fe certificada eran desconocidas, mientras que la ^{54}Fe añadida se utilizó para la cuantificación.

A partir de los tres patrones de isótopos medidos (^{54}Fe , ^{nat}Fe , ^{57}Fe) del material de referencia “*spikado*”, y las abundancias correspondientes (para todos los isótopos del hierro en cada uno de los casos), se pueden calcular las fracciones molares correspondientes a cada contribución y posteriormente determinar la concentración de hierro natural (valor certificado) y el trazador ^{57}Fe (añadido). Los resultados obtenidos están recogidos en la **Tabla DII.4**. Como puede verse, los valores obtenidos para ^{nat}Fe y ^{57}Fe están de acuerdo con el valor certificado y el trazador ^{57}Fe añadido, respectivamente.

Material de referencia	Unid	Hierro endógeno (^{nat}Fe)		Hierro exógeno (^{57}Fe)	
		Certificado	Encontrado	Añadido	Encontrado
Seronorm TM TraceElements <i>Suero</i> LOT 0903106	µg/L	1390±160	1333±6	1100	1142±4
Seronorm TM Trace Elements	µg/L	12.3±1	12.2±0.4	11.00	10.4±0.6
<i>Orina</i> LOT N°0511545 NIST SRM 1577a <i>Hígado bovino</i>	µg/g	194±20	183±10	10.32	10.23±0.76
IAEA CRM H-8 <i>Riñón equino</i>	µg/g	262±6	269±9	265	265.0±0.5
BCR-063R <i>Leche en polvo desnatada</i>	µg/g	2.32±0.23	2.3±0.2	2.20	2.3±0.2

Tabla DII.4. Análisis de los materiales de referencia certificados para la validación de la metodología de IPD para la determinación total de Fe en tejidos y fluidos (n=3)

DII.1.9. Síntesis y caracterización de los fortificantes ensayados

Síntesis del sulfato ferroso enriquecido ($^{57}\text{FeSO}_4$)

El sulfato de hierro enriquecido isotópicamente ($^{57}\text{FeSO}_4$) se preparó a partir de hierro elemental disolviendo el metal en un volumen mínimo de H_2SO_4 de calidad suprapur, y luego se diluyó con agua ultrapura. Para asegurar el estado de oxidación del hierro $^{57}\text{Fe}(\text{II})$, se empleó atmósfera inerte de N_2 durante el procedimiento de disolución y se aseguró un almacenamiento especial evitando la entrada de oxígeno (mediante atmósfera interna de nitrógeno y aislamiento con Teflón). La concentración de ^{57}Fe en el fortificante fue analizada mediante dilución isotópica inversa y se determinó la relación de abundancias de todos los isótopos del hierro.

Síntesis del complejo $^{57}\text{Fe}_2(\text{III})$ -Lactoferrina

La Apo-Lactoferrina (Apo-Lf, libre de hierro) y el complejo $^{57}\text{Fe}_2(\text{III})$ -Lactoferrina (saturado con el hierro isotópicamente marcado) se prepararon utilizando el protocolo descrito por Feng et.al. [44], recogido en la sección **Experimental**. El complejo $^{57}\text{Fe}_2(\text{III})$ -Lactoferrina se sintetizó tras mezclar la

disolución de apo-Lf previamente preparada con la apropiada cantidad de disolución de $^{57}\text{Fe(III)}$ en presencia del ion sinérgico (NaHCO_3). Inicialmente se probaron las relaciones proteína:hierro (1:0, 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4), ver **Figura DII.8**. Los mejores resultados se obtuvieron con la relación 1:2. Posteriormente se filtró y preconcentró y la disolución madre obtenida fue caracterizada en términos de concentración de ^{57}Fe y relación de abundancias de los isótopos de hierro.

Caracterización del complejo $^{57}\text{Fe}_2(\text{III})$ -Lactoferrina

El complejo $^{57}\text{Fe}_2(\text{III})$ -Lactoferrina fue caracterizado espectrofotométricamente para comprobar la cinética de formación del complejo, su estabilidad con el tiempo (ver **Figura DII.8**). Para ello, una alícuota de la mezcla de proteína y metal fue depositada en el interior de una cubeta de vidrio e introducida en el espectrofotómetro para monitorizar el incremento de absorbancia observado durante la formación del complejo a las longitudes de onda de 280 y 465 nm. La estabilidad con el tiempo fue estudiada mediante la medida de alícuotas del complejo a tiempo (0, 15, 30, 2h, 8h, 1 día, 7 días, 30 días y 1 mes).

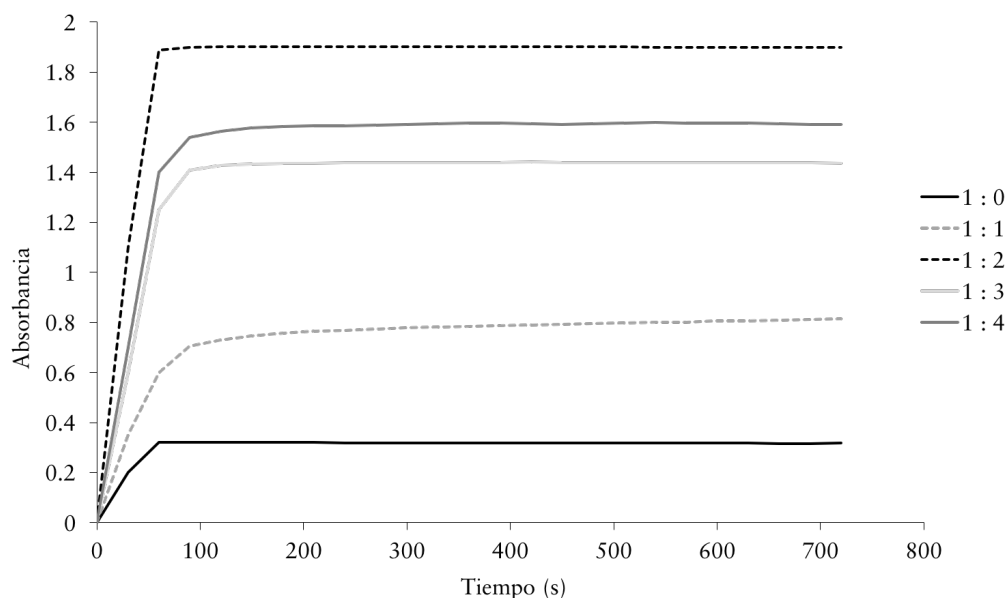


Figura DII.8. Cinética de formación del complejo Fe-Lf a diferentes relaciones proteína:Fe

DII.1.10. Grupos de animales ensayados

En el presente Capítulo, se ensayaron distintos fortificantes *in vivo* con ratas wistar de dos semanas de edad. Los grupos utilizados fueron los siguientes:

- Grupo 1 (G1): se alimentó con leche fórmula fortificada con lactoferrina a una concentración de 11 mg Lf / g de leche en polvo.
- Grupo 2 (G2): se alimentó con leche de fórmula fortificada con lactoferrina y baja concentración de ^{57}Fe (III) como complejo $^{57}\text{Fe-Lf}$ [(11 mg Lf: 16 μg Fe) / g de leche en polvo] previamente sintetizado (ver apartado XXX de la sección **Experimental**).
- Grupo 3 (G3): se alimentó con leche de fórmula fortificada con lactoferrina (11 mg Lf / g de leche en polvo) y ^{57}Fe (II) como $^{57}\text{FeSO}_4$ (16 μg Fe / g de leche en polvo).
- Grupo 4 (G4): fue alimentado con leche de fórmula fortificada con lactoferrina (11 mg Lf / g de leche en polvo) y una concentración más alta de ^{57}Fe (II) como $^{57}\text{FeSO}_4$ (60 μg Fe / g de leche en polvo), que corresponde a la dosis recomendada [45].
- Por último, se consideró como grupo de referencia un grupo que recibía alimentación materna (AM).

Dichos grupos están recogidos en la **Tabla DII.5** de manera esquemática.

Todos los grupos de ratas estudiados recibieron alimentación *ad libitum* (libre acceso de un animal a agua o alimento siendo sus necesidades biológicas las que regulan dicho consumo) durante un período de 15 días en el cual éstas fueron mantenidas en jaulas metabólicas [46] a una temperatura estable de 22°C con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas.



Figura DII.9. Estudio nutricional in vivo con ratas lactantes

Código de grupo	Nombre del grupo	Fortificación con Lf*	Forma fisicoquímica de Fe	Dosis de Fe administrada**	Código de la dosis administrada
AM/MF	Alimentación materna (control)	NO	-	0	-
G1	Grupo 1	SI	-	-	-
G2	Grupo 2	SI	$^{57}\text{Fe}_2\text{-Lf}$ (Fe^{3+})	16	BAJA
G3	Grupo 3	SI	$^{57}\text{FeSO}_4$ (Fe^{2+})	16	BAJA
G4	Grupo 4	SI	$^{57}\text{FeSO}_4$ (Fe^{2+})	60	ALTA (recomendada)

* Fortificación con lactoferrina: 11 mg Lf/g leche en polvo.

** Dosis de hierro administrada expresada en $\mu\text{g Fe/g}$ leche en polvo.

Tabla DII.5. Grupos estudiados y alimentación suministrada

DII.1.11. Resultados del estudio nutricional

La metodología analítica IPD-ICP-MS propuesta se utilizó para estudiar la distribución del hierro natural y/o hierro fortificado en las heces, la orina, el suero, los glóbulos rojos, el hígado y los riñones de las ratas. Los resultados obtenidos se muestran en detalle en la **Tabla DII.6**, recogidos al final de la sección de resultados. A partir de estos datos experimentales, se evaluó la *absorción aparente* y *retención aparente* del hierro desde los diferentes fortificantes ensayados y su distribución entre los compartimentos *funcional*, de *transporte* y de *almacenamiento*. Estos resultados se discutirán para cada tipo de muestra (compartimento) investigado.

Hierro excretado en orina y heces

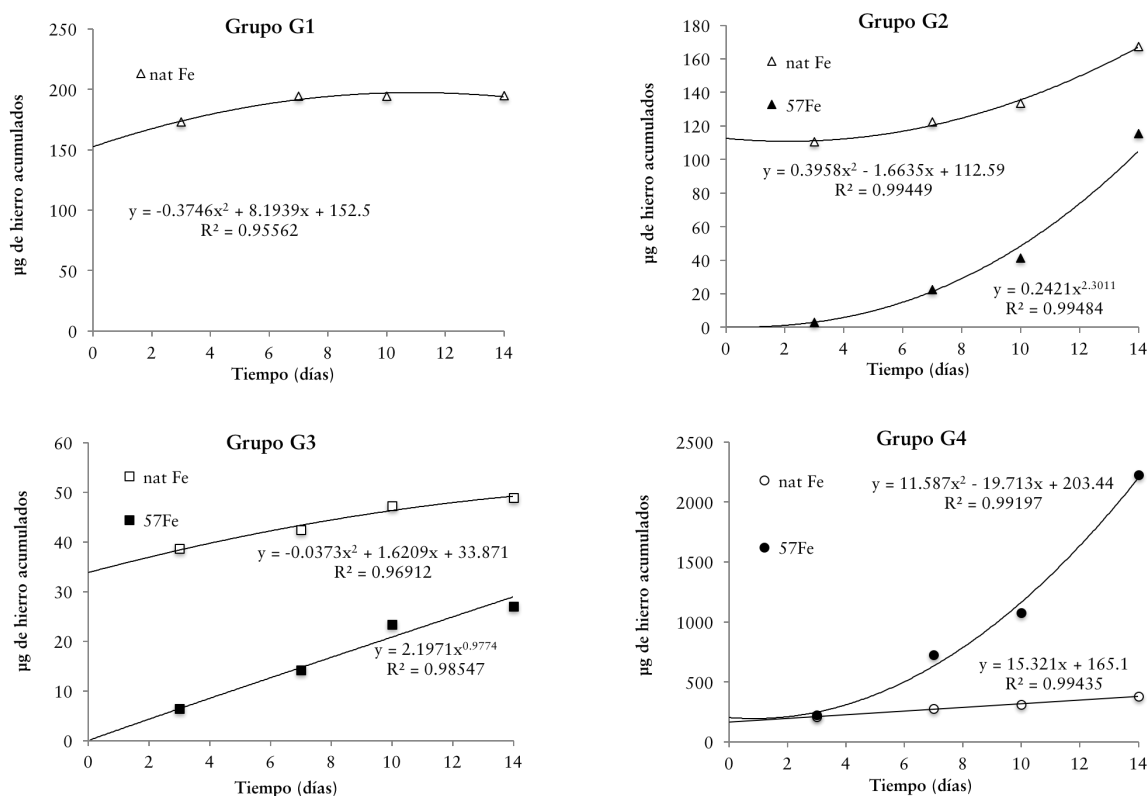


Figura DII.10. Excreción fecal acumulada de hierro natural y / o exógeno durante el período de lactancia para cada grupo fortificado con hierro. Las formas vacías corresponden a formas naturales y las llenas a hierro exógeno, ⁵⁷Fe.

En la **Figura DII.10** se representa gráficamente el hierro excretado acumulado (natural y/o exógeno) a través de las heces durante todo el período de fortificación, para los grupos (G1, G2, G3 y G4).

Los puntos de datos trazados corresponden al promedio calculado de hierro excretado "por grupo" (tres ratas) a lo largo de los 14 días.

El hierro excretado acumulado observado en orina para los mismos grupos, frente a la ingesta de hierro se representa en la **Figura DII.11**.

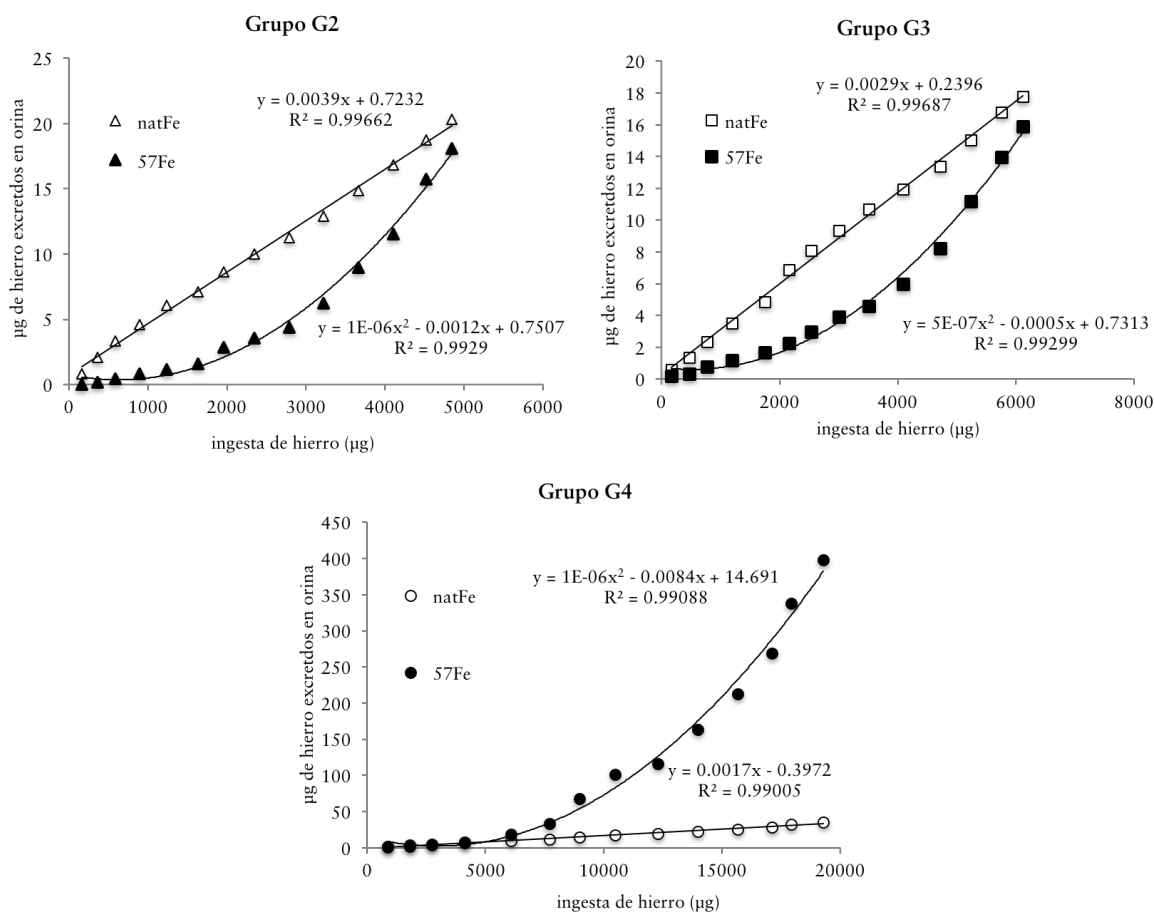


Figura DII.11. Cantidad de hierro excretado en la orina relacionada con la cantidad total de hierro, para cada uno de los grupos fortificados con hierro. Las formas vacías corresponden a formas naturales y las llenas a hierro exógeno, ^{57}Fe .

Adicionalmente, se representaron las fracciones molares de hierro natural ($^{nat}\text{Fe}/^{Total}\text{Fe}$) y hierro exógeno ($^{57}\text{Fe}/^{Total}\text{Fe}$) encontrados en orina a lo largo del experimento, para los tres grupos de ratas fortificados con hierro exógeno (^{57}Fe) en función del tiempo de alimentación (ver Figura DII.12).

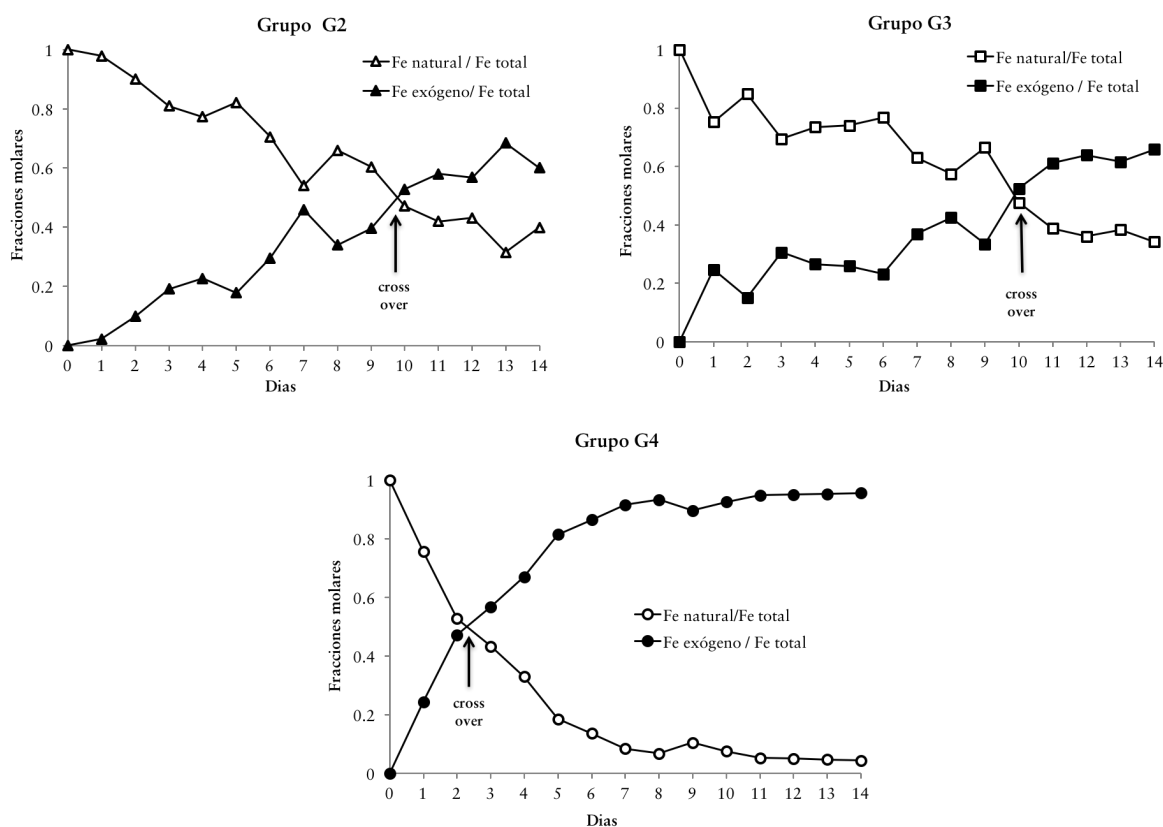


Figura DII.12. Fracción molar de $^{nat}\text{Fe}/^{Total}\text{Fe}$ (formas vacías) y trazador exógeno $^{57}\text{Fe}/^{Total}\text{Fe}$ (formas rellenas) en muestras de orina durante el período de fortificación con hierro para cada grupo ensayado.

Distribución de hierro en el compartimiento funcional

Los resultados experimentales para el hierro total, natural y exógeno en los glóbulos rojos, para todos los grupos de ratas estudiados, se representan en la Figura DII.13A, y todos los datos experimentales se recogen igualmente en la Tabla DII.6.

El promedio de hierro total medido en los glóbulos rojos del grupo de ratas de alimentación materna (AM: $1103 \pm 61 \mu\text{g Fe/g}$) podía considerarse ligeramente superior al observado en el grupo no fortificado con hierro (G1: $1.032 \pm 108 \mu\text{g Fe/g}$). Sin embargo, ese valor medio siempre fue inferior al observado en los grupos fortificados con hierro (G2: $1365 \pm 149 \mu\text{g/g}$, G3: $1230 \pm 241 \mu\text{g/g}$ y G4: $1235 \pm 128 \mu\text{g/g}$).

Hierro en el compartimento de transporte

Los resultados obtenidos en suero (Fig. DII.13B y Tabla DII.5) mostraron que los niveles de hierro hallados están relacionados con la biodisponibilidad de las especies de hierro y con la cantidad ingerida: las ratas que recibieron alimentación materna resultaron tener cantidades siempre mayores ($5.0 \pm 0.6 \mu\text{g Fe/g}$) que los valores encontrados en ratas alimentadas con fórmula y fortificadas con hierro exógeno (G2: $1.5 \pm 0.2 \mu\text{g Fe/g}$, G3: $2.1 \pm 0.5 \mu\text{g Fe/g}$ y G4: $4.2 \pm 0.8 \mu\text{g Fe/g}$).

Hierro en el compartimento de almacenamiento

Los niveles de hierro encontrados en el hígado de ratas de nuestros experimentos se resumen en la Fig DII.13C y Tabla DII.5. Los niveles de Fe en el hígado de las ratas que recibieron alimentación materna ($299 \pm 53 \mu\text{g/g}$) resultaron ser más altos que los encontrados en los grupos suplementados con baja concentración de hierro G2 ($168 \pm 30 \mu\text{g/g}$) y G3 ($133 \pm 12 \mu\text{g/g}$), pero inferior a G4 ($380 \pm 28 \mu\text{g/g}$). Como puede observarse a partir de los resultados trazados en la Figura DII.13D y en la Tabla DII.5, la cantidad de hierro presente en los riñones es mucho menor que en el hígado, estando siempre presente en concentraciones por debajo de $60 \mu\text{g/g}$. Este valor es más alto sólo en el caso de la alimentación materna hasta $132 \mu\text{g/g}$. En todos los grupos suplementados, la cantidad de hierro exógeno es inferior al 10%.

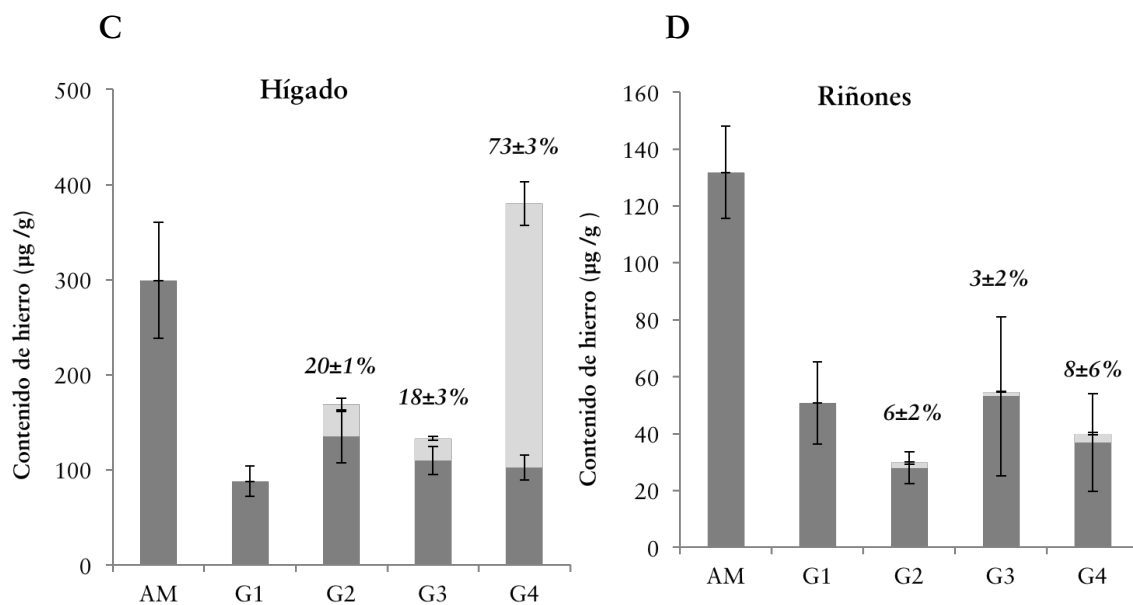
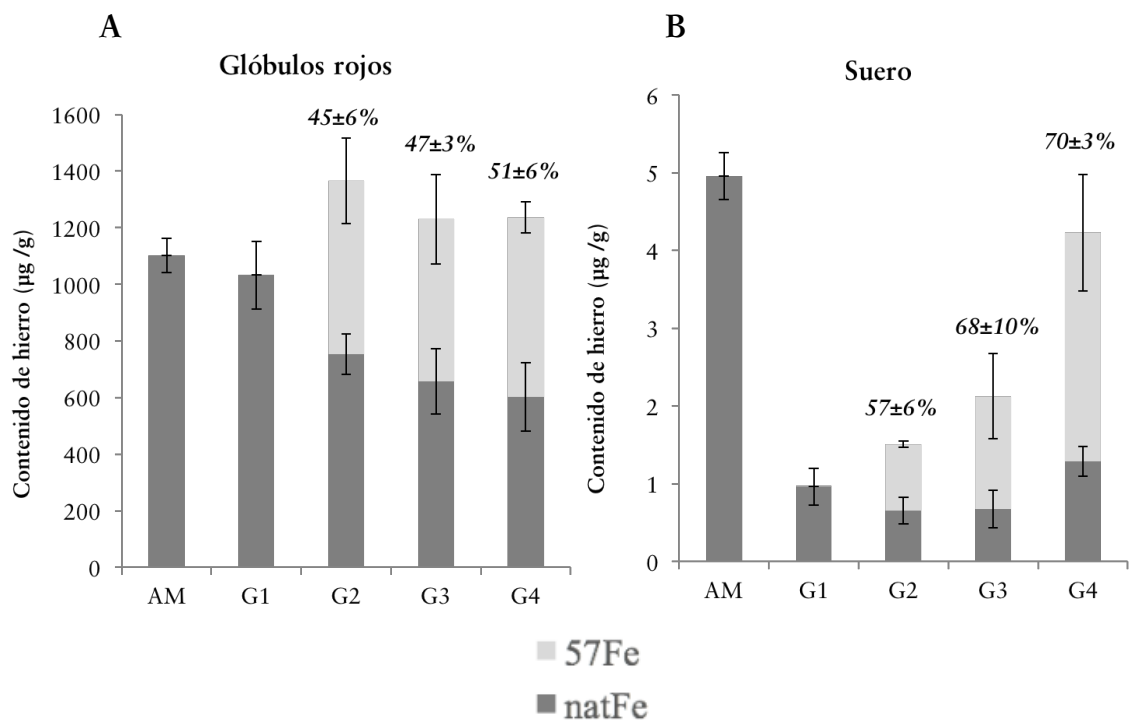


Figura DII.13. Fe natural (formas vacías) y trazador exógeno ⁵⁷Fe (expresados en µg/g) encontrado en fluidos y diferentes tejidos de grupos: AM, G1, G2, G3 y G4 [el porcentaje de ⁵⁷Fe obtenido para cada grupo se muestra encima de cada columna (n = 3)].

	Alimentación materna	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
		^{nat} Fe	^{nat} Fe	^{nat} Fe	⁵⁷ Fe	TotalFe	^{nat} Fe	⁵⁷ Fe	TotalFe	^{nat} Fe	⁵⁷ Fe	TotalFe	
Suero (µg/g)	Rata 1	4.7 ± 0.1	0.972 ± 0.008	0.852 ± 0.004	0.866 ± 0.004	1.718 ± 0.008	0.55 ± 0.02	2.01 ± 0.03	2.56 ± 0.04	1.27 ± 0.02	2.46 ± 0.03	3.73 ± 0.02	
	Rata 2	5.3 ± 0.8	1.195 ± 0.004	0.600 ± 0.004	0.89 ± 0.01	1.49 ± 0.01	0.536 ± 0.002	0.918 ± 0.004	1.455 ± 0.006	1.49 ± 0.06	3.81 ± 0.07	5.3 ± 0.1	
	Rata 3	4.9 ± 0.7	0.727 ± 0.006	0.519 ± 0.003	0.810 ± 0.005	1.329 ± 0.008	0.95 ± 0.04	1.42 ± 0.03	2.37 ± 0.07	1.11 ± 0.05	2.56 ± 0.04	3.67 ± 0.09	
	Promedio	5.0 ± 0.6	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.85 ± 0.03	1.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.5	2.1 ± 0.5	1.3 ± 0.2	2.9 ± 0.7	4.2 ± 0.8	
Glóbulos rojos (µg/g)	Rata 1	1034 ± 2	1043 ± 4	808 ± 6	479 ± 1	1287 ± 7	544 ± 1	420 ± 3	964 ± 2	647 ± 5	571 ± 2	1218 ± 6	
	Rata 2	1147 ± 4	909 ± 5	781.3 ± 0.4	776 ± 1	1557 ± 1	652 ± 1	563 ± 4	1215 ± 4	695 ± 8	673 ± 2	1368 ± 9	
	Rata 3	1129 ± 1	1145 ± 4	673 ± 2	578 ± 6	1251 ± 7	776 ± 7	736 ± 8	1512 ± 7	465 ± 5	655 ± 3	1120 ± 8	
	Promedio	1103 ± 61	1032 ± 108	754 ± 62	611 ± 134	1365 ± 149	657 ± 107	573 ± 145	1230 ± 241	602 ± 116	633 ± 6	1235 ± 128	
Hígado (µg/g)	Rata 1	248 ± 3	75 ± 1	165.8 ± 0.5	40.5 ± 0.4	206.2 ± 0.6	115 ± 3	22.0 ± 0.3	137 ± 3	102 ± 3	303 ± 2	405 ± 3	
	Rata 2	283 ± 3	83 ± 4	112 ± 5	26.1 ± 0.2	138 ± 5	93 ± 7	25.6 ± 0.5	118 ± 7	116 ± 2	272 ± 8	387 ± 1	
	Rata 3	367 ± 2	106 ± 2	128 ± 2	33 ± 3	161 ± 2	121 ± 6	23.2 ± 0.7	144 ± 6	89 ± 3	258 ± 2	347 ± 1	
	Promedio	299 ± 53	88 ± 15	135 ± 24	33 ± 6	168 ± 30	110 ± 14	24 ± 2	133 ± 12	102 ± 12	277 ± 23	380 ± 28	
Riñones (µg/g)	Rata 1	117 ± 8	35 ± 6	31 ± 4	2.0 ± 0.2	33 ± 4	76 ± 3	1.72 ± 0.02	78 ± 3	19 ± 2	3.51 ± 0.05	23 ± 2	
	Rata 2	129 ± 5	64 ± 5	31.2 ± 0.7	1.41 ± 0.01	32.6 ± 0.7	61 ± 2	1.74 ± 0.08	63 ± 2	54 ± 4	2.9 ± 0.2	56 ± 4	
	Rata 3	149 ± 7	54 ± 4	21.6 ± 0.2	1.70 ± 0.08	23.30 ± 0.09	22 ± 2	1.4 ± 0.3	23 ± 2	38 ± 4	2.7 ± 0.2	40 ± 4	
	Promedio	132 ± 15	51 ± 13	28 ± 5	1.7 ± 0.3	30 ± 5	53 ± 24	1.6 ± 0.2	55 ± 24	37 ± 15	3.0 ± 0.4	40 ± 15	

Tabla DII.6. Niveles de Fe (µg/g) en suero, glóbulos rojos, hígado y riñones, al final del estudio. Se tomaron muestras individuales y se analizaron para cada rata (datos expresados como media ± desviación estándar, n = 3 ratas por grupo).

DII.1.8. Discusión de los resultados obtenidos

Hierro excretado en orina y heces

Se encontraron diferencias significativas en hierro natural y exógeno entre los grupos fortificados estudiados (ver Fig. DII.10). Para el grupo no fortificado con hierro (G1), el 80% de hierro presente en las heces se excretó a lo largo de los tres primeros días.

En los grupos con baja fortificación de hierro (G2 y G3), la mayor parte del hierro presente en las heces resultó ser hierro natural (endógeno), que debería provenir principalmente de enterocitos descamados, que contienen hierro predominantemente en forma de ferritina (proteína presente en heces) y de hemoglobina. Al final del estudio, la cantidad acumulada de ^{nat}Fe excretada en las heces fue aproximadamente 3.5 veces mayor en el grupo $^{57}\text{Fe-Lf}$ (G2) que en el grupo alimentado con $^{57}\text{FeSO}_4 + \text{Lf}$ (G3). También menos cantidad de hierro exógeno (^{57}Fe) fue excretada por las heces cuando se administró como Fe^{2+} en presencia de lactoferrina que como Fe^{3+} como el complejo Fe-Lf . En el caso del grupo con elevada fortificación de hierro (G4), la situación cambió dramáticamente: la excreción fecal de ^{57}Fe aumentó rápidamente (véase la Fig. DII.10), para llegar a ser significativamente más alta que la cantidad excretada después de 4 días de fortificación.

El hierro natural excretado acumulado observado en la orina (ver Fig. DII.11) de los dos grupos con bajo contenido de hierro (G2 y G3) fue mayor que el hierro exógeno. Además, los procesos de excreción de orina de hierro para los grupos suplementados con hierro bajo (G2, G3) y alto (G4) fueron, de nuevo, claramente diferentes: las ratas que recibieron mayores dosis de FeSO_4 (G4) mostraron que la eliminación renal de ^{57}Fe tuvo lugar como ^{57}Fe (398 μg), y dicha eliminación fue dramáticamente superior a la observada en los otros grupos [G2 (18 μg) y G3 (16 μg)]. Es decir, como se observa para las heces, dosis demasiado altas de hierro fortificado parecen ser eficientemente liberadas o eliminadas del cuerpo.

Cuando se representan gráficamente las fracciones molares de hierro natural y hierro exógeno excretado por orina, en función del tiempo de alimentación (Figura DII.12), se observa que el punto de "cruce" o *crossover* (cuando la excreción de ^{57}Fe alcanza la del $^{\text{nat}}\text{Fe}$) tiene lugar alrededor del 10° día en los grupos que reciben dosis bajas de hierro (G2 y G3). Por el contrario, el grupo fortificado con mayor concentración de hierro (G4) mostró de nuevo un comportamiento bastante diferente, ya que el cruce ocurrió justo después de 2 días de fortificación. Curiosamente, resultados similares se encontraron [25] para las ratas que reciben suplementos de hierro con las mismas dosis de hierro (60 μg de Fe como $^{57}\text{FeSO}_4$), pero sin lactoferrina. Al final del estudio, las proporciones de hierro molar en heces ($^{57}\text{Fe}_{\text{heces}}/\text{TotalFe}_{\text{heces}}$) fueron similares para los grupos G2 y G3 (0.68 y 0.69, respectivamente), mientras que para el grupo G4 el parámetro se aproximó a 1 (0.94). De nuevo, estos valores fueron similares a los observados para la orina al final del experimento (0.60 para G2, 0.65 para G3 y 0.95 para G4). Como en el caso de las heces, se observó que la absorción y / o la renovación del hierro en ratas que recibían dietas bajas en fortificantes de hierro era muy diferente a la observada en ratas alimentadas con una dieta con alto contenido de hierro. En otras palabras, parece que la eventual rotación o intercambio de hierro en el organismo está más relacionada con la cantidad total de Fe utilizada para la fortificación, que con el efecto de la presencia de lactoferrina o de la forma química administrada ($^{57}\text{Fe(II)SO}_4$, $^{57}\text{Fe(III)-Lf}$).

Absorción y retención aparentes del hierro ^{57}Fe

La gran mayoría del hierro absorbido de los alimentos digeridos, o de los fortificantes, es absorbido en el duodeno por los enterocitos. Estas células en particular tienen moléculas especiales para iniciar un movimiento del hierro hacia el cuerpo cuando sea necesario.

La "absorción aparente" del ^{57}Fe utilizado en el alimento puede calcularse como: $[(\text{Ingesta de } ^{57}\text{Fe} - (\text{excreción fecal de } ^{57}\text{Fe}) \times 100 / \text{Ingesta } ^{57}\text{Fe})$. Ésta se ve significativamente afectada por la cantidad de hierro ingerido o por la forma fisicoquímica de hierro utilizada para la fortificación de la leche utilizada como

alimento. Los resultados de absorción aparente y retención aparente obtenidos para los diferentes grupos alimentados con el hierro exógeno (^{57}Fe) están recogidos en la Tabla DII.7 y en la Figura DII.14.

Periodo (días)	Absorción Aparente (% ^{57}Fe)			Retención aparente (% ^{57}Fe)		
	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1 a 3	99.5 ± 0.2	99.3 ± 0.7	91 ± 1	99.5 ± 0.3	99.2 ± 0.7	91 ± 1
4 a 7	98.61 ± 0.01	99.44 ± 0.01	91.4 ± 0.9	98.46 ± 0.01	99.28 ± 0.01	90.3 ± 0.9
8 a 10	98.43 ± 0.03	99.25 ± 0.01	92.43 ± 0.02	98.18 ± 0.03	98.99 ± 0.01	90.37 ± 0.02
11 a 14	95.31 ± 0.04	99.76 ± 0.01	76.6 ± 0.6	94.68 ± 0.04	99.13 ± 0.01	71.8 ± 0.6
Promedio	98.0 ± 0.2	99.4 ± 0.7	88 ± 3	97.7 ± 0.4	99.2 ± 0.7	86 ± 3

Tabla DII.7. Absorción y retención aparente calculadas para cada grupo suplementado ($n = 3$, datos expresados como media ± desviación estándar).

La absorción aparente de G2 disminuyó lentamente a lo largo de las dos semanas del experimento (mientras que para G3 permaneció prácticamente constante a lo largo de los 14 días de suplementación). La ligera diferencia en el perfil de absorción entre ambos, no puede ser atribuida a la diferencia en la ingesta de hierro por ratas entre los grupos, porque el ^{57}Fe acumulado ingerido fue de 4195 μg para G2 y 4801 μg G3, respectivamente. Esta diferencia puede deberse a la forma química utilizada para la fortificación de la leche fórmula. Así, parece que las dosis bajas de hierro en presencia de Lf ofrecen una absorción más efectiva a lo largo del período de suplementación estudiado. En ratas alimentadas con dosis de hierro más altas (G4), la absorción aparente disminuyó drásticamente al décimo día del período de suplementación (probablemente debido a la saturación de las células mucosas: la absorción adicional debe ser "bloqueada" por el exceso acumulado de hierro).

Los valores de absorción elevados encontrados coinciden con estudios previos que muestran una absorción intestinal de hierro muy alta en mamíferos neonatales [47], en contraste con la menor absorción observada en adultos. También se calculó la "retención aparente de hierro" definida como la $[(\text{Ingesta de } ^{57}\text{Fe} - (\text{excreción de } ^{57}\text{Fe en heces} + \text{excreción de } ^{57}\text{Fe en orina})) \times 100 / \text{Ingesta } ^{57}\text{Fe}]$. Como se esperaba por los bajos niveles de Fe en la orina (<2%), la retención aparente mostró tendencias

similares a las descritas para la absorción aparente. En cualquier caso, el hierro como Fe(II)SO_4 en exceso (alta dosis) en presencia de Lf parece ser absorbido y retenido más eficientemente que solo el complejo Fe(III)-Lf . En otras palabras, mediante la adición de lactoferrina bovina a la fórmula infantil fortificada con Fe(II) , la absorción de Fe desde las leches fórmula fortificadas podría mejorarse.

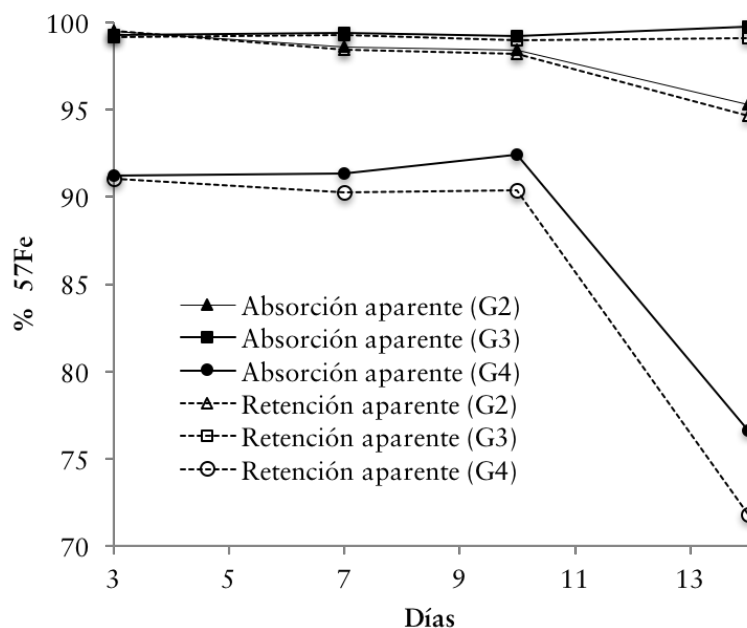


Figura DII.14. Absorción aparente (formas rellenas) y retención aparente (vacías) calculadas para cada grupo alimentado con leche fórmula fortificada con ^{57}Fe : G2, G3 y G4.

Distribución de hierro en el compartimiento funcional

Se conoce que aproximadamente el 70-90% del hierro absorbido es incorporado en la hemoglobina, dentro de los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos viejos se destruyen en el bazo, y el hierro liberado se une a la transferrina para proceder a la recirculación en el cuerpo. De hecho, alrededor del 80% de ese Fe se reutiliza [12].

También se calculó el enriquecimiento isotópico de hierro en los eritrocitos derivados de diferentes formas y dosis de hierro: los resultados mostraron que el 45-51% del hierro endógeno había sido intercambiado por ^{57}Fe después de 14 días de suplementación (ver Figura DII.13A). A pesar del hecho conocido de que la mayor

parte del hierro en el cuerpo se recicla cuando los glóbulos rojos viejos salen de la circulación, posteriormente se destruyen y luego se devuelven al grupo de almacenamiento para su reutilización, parece que cuanto mayor sea la dosis de Fe (por ejemplo, FeSO₄ + Lf en el fortificante), más Fe exógeno se puede encontrar finalmente en los glóbulos rojos.

La "absorción fraccionada de hierro" (FIA), generalmente estimada en los estudios nutricionales, es un parámetro de gran utilidad calculado a partir del volumen sanguíneo, la concentración de hemoglobina medida y el conocimiento de que el 80% del hierro absorbido se incorpore a los glóbulos rojos [48]. Por lo tanto, suponiendo que la sangre total fue de 67 g/kg de peso corporal, que 1 g de sangre contiene 0.35 g de hematíes [49] y que el hierro está presente como 3.47 mg Fe / g de hemoglobina; el correspondiente parámetro FIA se puede calcular para los grupos de nuestro estudio, conociendo el peso promedio de cada grupo de ratas fortificado (X) y los niveles observados de ⁵⁷Fe en glóbulos rojos (Y): $[X \text{ g cuerpo wt rata} \times (0.067 \text{ g sangre} / \text{g peso de rata}) \times (0.35 \text{ g de glóbulos rojos} / 1 \text{ g de sangre}) \times (Y \text{ mg } (^{57}\text{Fe-glóbulos rojos}) / 1 \text{ g de glóbulos rojos}) = Z \text{ mg } ^{57}\text{Fe incorporado en los glóbulos rojos}$. Después de dichos cálculos, los resultados encontrados en los diferentes grupos para los mg de ⁵⁷Fe incorporados en los glóbulos rojos (1.2 ± 0.1 para G2, 1.1 ± 0.3 para G3 y 1.2 ± 0.3 para G4) no fueron estadísticamente diferentes, es decir, los niveles de hierro hematocrítico en los diferentes grupos resultaron ser similares.

Hierro en el compartimento de transporte

El hierro sérico compone el grupo metabólico central de este elemento esencial, el cual es transportado preferentemente unido a la proteína transferrina. Se sabe que aproximadamente 80% de dicha transferrina (capaz de ligar al hierro) se suministra a la médula ósea para permitir la producción de glóbulos rojos y asciende a menos del 0.1% del hierro corporal total. Los niveles séricos de hierro encontrados en este estudio (véase la **Tabla DII.6**) están en buen acuerdo con los recogidos hasta ahora en la literatura [50,51] que van desde 1.13 a 4.64 µg Fe/g. Curiosamente, la cantidad de hierro circulante en el grupo no fortificado con hierro (G1), resultó ser cinco veces

menor ($1.0 \pm 0.2 \mu\text{g Fe/g}$) que el valor medido en el grupo de alimentación materna (AM). Además, la cantidad neta de hierro circulante exógeno ^{57}Fe utilizado como fortificante en el resto de los grupos, estaba relacionado tanto con la forma química o la especie de hierro utilizada como con la dosis empleada. En los grupos alimentados con una dosis baja de Fe, la cantidad de hierro exógeno hallada en el suero se relacionó significativamente con la forma química del hierro añadida (véase la **Figura DII.13B**): 57% para $\text{Fe}_2\text{-Lf}$ (G2) y 68% para FeSO_4 (G3). Además, se encontró más hierro exógeno en el suero cuando la leche fórmula se fortificó con una fórmula de dosis elevada de FeSO_4 en presencia de lactoferrina ($69 \pm 3\%$), frente a cuando no se utilizó lactoferrina ($57 \pm 6\%$) sin lactoferrina [25]. Estos resultados mostraron que, aunque la cantidad relativa de hierro en el suero es pequeña, las mayores tasas de intercambio de hierro parecen ocurrir en este compartimento.

Hierro en el compartimento de almacenamiento

Como se comentó anteriormente, hasta el 30% del hierro corporal total se almacena en la proteína intracelular ferritina (de la que se puede liberar el hierro a la circulación) y en la hemosiderina. Además, se pueden encontrar pequeñas cantidades de ferritina en el suero y estos valores se correlacionan con la cantidad total de ferritina hepática, lo que a su vez da una buena indicación de las reservas de hierro en el organismo [52]. Los niveles de hierro encontrados en el hígado de ratas (**Figura DII.13C** y **Tabla DII.6**) coinciden con los reportados en la literatura [53,54]. La dieta con alto contenido de hierro (G4) produjo un aumento en el contenido de ^{57}Fe (73%) superior a los valores encontrados en el grupo G2 (20%) y G3 (18%). Como era de esperar, los niveles de hierro hepático en el grupo no suplementado con hierro (G1) fueron significativamente más bajos que los encontrados en los otros grupos estudiados. A pesar de ello, no se observaron diferencias significativas en los niveles de Fe en los glóbulos rojos en comparación con el grupo materno (a pesar de sus depósitos comparativamente bajos). Este hecho podría racionalizarse si las crías de rata nacen con suficientes reservas de hierro para sobrellevar la necesidad de hierro durante su vida postnatal temprana.

La influencia más significativa en la absorción eventual del hierro es la cantidad total de hierro anteriormente almacenado en el cuerpo: a medida que las reservas de hierro aumentan en el hígado, se libera la hepcidina hepática y ello disminuye la liberación de la ferroportina en la mucosa intestinal, y por ello, los enterocitos retienen cualquier hierro absorbido, el cual es separado en pocos días [55]. Si las reservas de hierro en el hígado son altas, el cuerpo absorbe menos hierro de los alimentos, de acuerdo con la gran disminución de la absorción observada para el G4 después de 10 días de suplementación (ver **Figura DII.14**). Por el contrario, bajas reservas de hierro favorecen la capacidad del organismo para absorber el hierro de los fortificantes administrados en el alimento.

Se sabe además, que el riñón también requiere hierro para sus procesos metabólicos y es probable que la deficiencia de hierro o exceso puede causar la función perturbada de las células renales [12]. Los estudios del metabolismo del hierro son escasos en las células renales, pero lo más probable es que obtienen su hierro de la transferrina sérica y recientemente se ha descubierto que la proteína IRP-1 potencialmente regula el tráfico de hierro en el riñón [56]. Los resultados de los grupos de ratas alimentados con leche de fórmula dan lugar a aumentos mucho menores en las concentraciones de hierro en el riñón, en particular en comparación con los valores observados para el grupo de alimentación materna (véase AM, en la **Figura DII.13D** y **Tabla DII.6**). Además, el hierro exógeno (^{57}Fe) relativo detectado en el riñón, especialmente al final del decimocuarto día experimental, también fue muy bajo (7%).

DII.1.13. Conclusiones del trabajo

Los estudios de absorción de hierro llevados a cabo han demostrado que hasta el 91-99% del hierro proveniente de la dieta (^{57}Fe) se absorbe durante los primeros 10 días de suplementación. Posteriormente, la absorción medida decae abruptamente para las ratas fortificadas con dosis de hierro más altas, probablemente como una respuesta a las reservas mejoradas de hierro (saturación de los depósitos) durante la alimentación continuada con una fortificación del elemento.

La capacidad del cuerpo para la excreción urinaria de hierro es muy baja y su excreción a través de la orina corresponde a menos del 2% del total ingerido.

Los resultados de absorción y/o retención aparentes observados en este trabajo indican que los principales factores que influyen a ambos parámetros son la dosis y la forma química del hierro (por ejemplo $^{57}\text{Fe}(\text{II})\text{SO}_4 + \text{Lf}$ es claramente preferible al complejo $^{57}\text{Fe}(\text{III})\text{-Lf}$ para aumentar la absorción del Fe).

Curiosamente, el punto de "cross-over" observado en el hierro excretado de la orina (es decir, cuando ambas fracciones molares de Fe natural y ^{57}Fe utilizado para la fortificación, son iguales) tuvo lugar después de 10 días para los grupos alimentados con bajas dosis de hierro (G2 y G3). Por el contrario, la fracción molar del trazador exógeno (fortificante) ^{57}Fe cuando se utiliza una dosis elevada (G4) fue igual a la fracción molar del $^{\text{nat}}\text{Fe}$ (0.5), sólo 2.5 días después de comenzar la fortificación con hierro.

En cuanto al reemplazo o intercambio de hierro exógeno en los glóbulos rojos durante el periodo de alimentación con leche fórmula fortificada, casi el 50% del total de hierro encontrado fue de ^{57}Fe después de 14 días. En el suero, sin embargo, fue cercano al 70%, lo que apunta a una rotación o intercambio más rápido del hierro exógeno (^{57}Fe) en el suero que en los glóbulos rojos. Curiosamente, el reemplazo de hierro en el hígado fue bastante peculiar: los niveles de $^{\text{nat}}\text{Fe}$ observados fueron similares para todos los grupos con fortificados de hierro y esto podría indicar un mecanismo de reserva de hierro en el hígado durante el embarazo. En cualquier caso, los niveles más altos de hierro total en el hígado podrían observarse en ratas alimentadas con altos niveles de ^{57}Fe administrado como $^{57}\text{Fe}(\text{II})\text{SO}_4$ en presencia de lactoferrina (el Fe exógeno alcanzó hasta el 73% del $^{\text{total}}\text{Fe}$ en este órgano). Se encontraron bajos niveles de Fe en el riñón de ratas alimentadas con leche de fórmula fortificada. Por otra parte, el Fe exógeno encontrado en éste tejido fue inferior al 8%, lo que indica una bajas tasa de intercambio de hierro en este órgano.

Por último, conviene señalar que la alimentación de ratas con leche fórmula no fortificada en hierro causó una "deficiencia de hierro latente", es decir, las reservas

de hierro se redujeron ligeramente mientras que el nivel sérico de hierro disminuyó (incluso si, como se comentó previamente, no se observó cambio en la concentración de hierro en los glóbulos rojos).

Es importante señalar que la distribución de peso de los animales entre los grupos es diferente, a pesar de que fueron distribuidos en grupos al azar. Las diferencias en el peso / desarrollo de las crías de rata podrían dar lugar a diferencias en las demandas y / o biodisponibilidad del hierro (es decir, los valores observados en todos los tejidos y líquidos analizados podían no representar con exactitud la biodisponibilidad real del hierro desde el alimento fortificado). Para realizar un análisis estadístico detallado, se necesitarían estudios adicionales con mayor número de individuos.

DII.1.14. Referencias bibliográficas

-
- ¹ Committee of Nutrition. *Iron fortification of infant formulas*. Pediatrics, 104:1 (1999) 119-23.
- ² E McLean, M Cogswell, I Egli, D Wojdyla and B de Benoist. *Worldwide prevalence of anaemia, WHO vitamin and mineral nutrition information system, 1993–2005*. Public Health Nutr, 12:4 (2009) 444-54. doi:10.1017/S1368980008002401.
- ³ W Mertz and EJ Underwood. *Trace elements in human and animal nutrition*. Academic Press Inc, Nueva York, EEUU (1986). ISBN 0-1249-1252-4.
- ⁴ American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. *Iron-fortified infant formulas*. Pediatrics, 104:1 (1999) 119-23.
- ⁵ LA Kazal. *Prevention of iron deficiency in infants and toddlers*. Am Fam Physician, 66:7 (2002) 1217-24.
- ⁶ RJD Moy. *Iron fortification of infant formula*. Nutr Res Rev, 13:2 (2000) 215-27. doi:10.1079/095442200108729070.
- ⁷ M Hoppe, L Hulthén and, L Hallberg. *The relative bioavailability in humans of elemental iron powders for use in food fortification*. Eur J Nutr, 45:1 (2006) 37-44. doi:10.1007/s00394-005-0560-0.
- ⁸ ER Monsen. *The ironies of iron*. Am J Clin Nutr, 69 (1999) 831-2.
- ⁹ Y García and J Díaz-Castro. *Advantages and disadvantages of the animal models v. in vitro studies in iron metabolism: a review*. Animal, 7:10 (2013) 1651-8. doi:10.1017/S1751731113001134.
- ¹⁰ PT Lieu, M Heiskala, PA Peterson and Y Yang. *The roles of iron in health and disease*. Mol Aspects Med, 22:1-2 (2001) 1-87.
- ¹¹ MB Zimmermann and RF Hurrell. *Nutritional iron deficiency*. Lancet, 370 (2007) 511-20.
- ¹² JP Gisbert and F Gomollón. *An update on iron physiology*. World J Gastroenterol, 15:37 (2009) 4617-26.
- ¹³ P Brätter, IN Blasco, VE Negretti de Brätter and A Raab. *Speciation as an analytical aid in trace element research in infant nutrition*. Analyst, 123:5 (1998) 821-26.
- ¹⁴ ML Fernández-Sánchez, RRF St. Remy, H González-Iglesias, JB López-Sastre, B Fernández-Colomer, D Pérez-Solís and A Sanz-Medel. *Iron content and its speciation in human milk from mothers of preterm and full-term infants at early stages of lactation: a comparison with commercial infant milk formulas*. Microchem J, 105 (2012) 108-14. doi:10.1016/j.microc.2012.03.016.
- ¹⁵ FA Rivero-Martino, ML Fernández-Sánchez and A Sanz-Medel. *Multielemental fractionation in milk whey by size exclusion chromatography coupled on line to ICP-MS*. J Anal At Spectrom, 17 (2002) 1271-7.
- ¹⁶ RRF St. Remy, ML Fernández-Sánchez, JB López-Sastre and A Sanz-Medel. *Multielemental distribution patterns by size exclusion chromatography mass spectrometry with octapole reaction cell*. J Anal At Spectrom, 19 (2004) 1104-10.

- ¹⁷ C Conesa, M Calvo and L Sánchez. *Recombinant human lactoferrin: A valuable protein for pharmaceutical products and functional foods*. *Biotechnol Adv*, 28 (2010) 831-8. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.002.
- ¹⁸ SA González-Chávez, S Arévalo-Gallegos and Q Rascón-Cruz. *Lactoferrin: structure, function and applications*. In *J Antimicrob Ag*, 33 (2009) 301-8. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020.
- ¹⁹ HY Guo, L Jiang, SA Ibrahim, L Zhang, H Zhang, M Zhang and FZ Ren. *Orally Administered Lactoferrin Preserves Bone Mass and Microarchitecture in Ovariectomized Rats*. *J Nutr*, 139:5 (2009) 958-64. doi:10.3945/jn.108.100586.
- ²⁰ MO Pulina, AV Sokolow, ET Zakharova, VA Kostevich and VB Vasilyev. *Effect of Lactoferrin on Consequences of Acute Experimental Hemorrhagic Anemia in Rats*. *Bull Exp Biol Med*, 149:2 (2010) 219-22.
- ²¹ L Davidsson, P Kastenmayer, M Yuen, B Lonnerdal and RF Huirrell. *Influence of lactoferrin on iron absorption from human milk in infants*. *Pediatr Res*, 35 (1994) 117-24.
- ²² JH Brock. *Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant*. *Arch Dis Child*, 55 (1980) 417-21.
- ²³ T Takeuchi, H Kitagawa and E Harada. *Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats*. *Exp Physiol*, 89:3 (2004) 263-70. doi:10.1113/expphysiol.2003.026633.
- ²⁴ B Lönnerdal and A Bryant. *Absorption of iron from recombinant human lactoferrin in young US women*. *Am J Clin Nutr*, 83 (2006) 305-9.
- ²⁵ H González-Iglesias, ML Fernández-Sánchez, JB López-Sastre and A Sanz-Medel. *Nutritional iron supplementation studies based on enriched ⁵⁷Fe, added to milk in rats, and isotope pattern deconvolution-ICP-MS analysis*. *Electrophoresis*, 33 (2012) 2407-15. doi:10.1002/elps.201100334.
- ²⁶ JIG Alonso and P Rodríguez-González. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. The Royal Society of Chemistry, (2013). ISBN: 978-1-84973-333-5.
- ²⁷ P Rodríguez-González, JM Marchante-Gayón, JIG Alonso and A Sanz-Medel. *Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review*. *Spectrochimica Acta Part B*, 60 (2005) 151-207.
- ²⁸ TW May and RH Wiedmeyer. *A table of polyatomic interferences in ICP-MS*. *At Spectrosc*, 19:5 (1998) 150-5.
- ²⁹ S Caroli, A Alimonti, E Coni, F Petrucci, O Senofonte, and N Violante. *The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: a systematic review*. *Crit Rev Anal Chem*, 24:5-6 (1994) 363-98.
- ³⁰ Z Chen, IJ Griffin, LM Plumlee and SA Abrams. *High resolution inductively coupled plasma mass spectrometry allows rapid assessment of iron absorption in infants and children*. *J Nutr*, 135:7 (2005) 1790-5.
- ³¹ CS Muñiz, JMM Gayón, JIG Alonso and A Sanz-Medel. *Speciation of essential elements in human serum using anion exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS*. *J Anal At Spectrom*, 16 (2001) 587-92.
- ³² C Ingle, N Langford, L Harvey, JR Dainty, C Armah, S Fairweather-Tait, B Sharp, H Crews, M Rose, and J Lewis. *Development of a high-resolution ICP-MS method, suitable for the*

measurement of iron and iron isotope ratios in acid digests of faecal samples from a human nutrition study. J Anal At Spectrom, 17 (2002) 1498-1501.

³³ F Vanhaecke, L Balcaen, G de Wannemacker and L Moens. *Capabilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for the measurement of Fe isotope ratios.* J Anal At Spectrom, 17 (2002) 933-43.

³⁴ JA Rodríguez-Castrillón, M Moldovan, JIG Alonso, JJ Lucena, ML García-Tomé and L Hernández-Apaolaza. *Isotope pattern deconvolution as a tool to study iron metabolism in plants.* Anal Bioanal Chem, 390 (2008) 579-90.

³⁵ J Vogl, P Klingbeil, W Pritzkow and G Riebe. *High accuracy measurements of Fe isotopes using hexapole collision cell MC-ICP-MS and isotope dilution for certification of reference materials.* J Anal At Spectrom, 18 (2003) 1125-32.

³⁶ JK Böhlke, JR de Laeter, P de Brièvre, H Hidaka, HS Peiser, KJR Rosman and PDP Taylor. *Isotopic Compositions of the Elements 2001.* J Phys Chem Ref Data, 34:1 (2005) 57-67.

³⁷ SM Nelms, CR Quétel, T Prohaska, J Vogl and PDP Taylor. *Evaluation of detector dead time calculation models for ICP-MS.* J Anal At Spectrom, 16 (2001) 333-8. doi:10.1039/b007913h.

³⁸ CS Muñiz, JMM Gayón, JIG Alonso and A Sanz-Medel. *Accurate determination of iron, copper and zinc in human serum by isotope dilution analysis using double focusing ICP-MS.* J Anal At Spectrom, 14 (1999) 1505-10.

³⁹ F Vanhaecke, G de Wannemacker, L Moens, R Dams, C Latkoczy, T Prohaska and D Stingeder. *Dependence of detector dead time on analyte mass number in inductively coupled plasma mass spectrometry.* J Anal At Spectrom, 13 (1998) 567-71.

⁴⁰ H Niu and RS Houk. *Fundamental aspects of ion extraction in inductively coupled plasma mass spectrometry.* Spectrochimica Acta Part B, 51 (1996) 779-815.

⁴¹ SD Tanner. *Space-charge in ICP-MS: calculation and implications.* Spectrochimica Acta Part B, 47 (1992) 809-23.

⁴² IS Begley and Sharp BL. *Characterization and correction of instrumental bias in inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry for accurate measurement of lead isotope ratios.* J Anal At Spectrom, 12 (1997) 395-402.

⁴³ KG Heumann, SM Gallus, G Rädlinger and J Vogl. *Precision and accuracy in isotope ratio measurements by plasma source mass spectrometry.* J Anal At Spectrom, 13 (1998) 1001-8.

⁴⁴ M Feng, L Van der Does, A Bantjes. *Preparation of apolactoferrin with a very low iron saturation.* J Dairy Sci, 78:11 (1995) 2352-7. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76862-X.

⁴⁵ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Codex Alimentarius. *Codex Standard for infant formula (special dietary uses)*, (1981), CODEX STAN 72-1981; 4:4; revision 1997.

⁴⁶ EO Avila. *Jaula metabólica para pequeños animales de laboratorio.* Patente 0257849. <http://www.espatentes.com/A01/0257849.html> [Consultado 2017-03-07]

⁴⁷ DM Frazer, SJ Wilkins and GJ Anderson. *Elevated iron absorption in the neonatal rat reflects high expression of iron transport genes in the distal alimentary tract.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 293(2007) 525-31.

- ⁴⁸ M Domellöf, B Lönnnerdal, SA Abrams and O Hernell. *Iron absorption in breast-fed infants: effects of age, iron status, iron supplements, and complementary foods*. Am J Clin Nutr, 76 (2002) 198-204.
- ⁴⁹ HB Lee HB and MD Balaufox. *Blood volume in the rat*. J Nucl Med, 26 (1985) 72-6.
- ⁵⁰ BJ Scott BJ and AR Bradwell. *Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium*. Clin Chem, 29 (1983) 629-33.
- ⁵¹ FE Gürsel, A Ates, T Bilal and A Altiner. *Effect of dietary garcinia cambogia extract on serum essential minerals (calcium, phosphorus, magnesium and trace elements (iron, copper, zinc) in rats fed with high-lipid diet*. Biol Trace Elem Res, 148 (2012) 378-82. doi:10.1007/s12011-012-9385-x.
- ⁵² RR Crichton and MC Charlotteaux-Wauters. *Iron transport and storage*. Eur J Biochem, 164 (1987) 485-506.
- ⁵³ S Takahashi, I Takahashi, H Sato, Y Kubota, S Yoshida and Y Mura-matsu. *Determination of major and trace elements in the liver of wistar rats by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry and mass spectrometry*. Lab Anim, 34 (2000) 97-105.
- ⁵⁴ AR Sherman and NT Tissue. *Tissue iron, copper and zinc levels in offspring of iron-sufficient and iron-deficient rats*. J Nutr, 111 (1981) 266-75.
- ⁵⁵ T Konz, M Montes-Bayón, J Bettmer and A Sanz-Medel. *Analysis of hepcidin, a key peptide for Fe homeostasis, via sulfur detection by capillary liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. J Anal At Spectrom, 26 (2011) 334-40. doi:10.1039/C0JA00053A.
- ⁵⁶ Y Liu and DM Templeton. *Iron-dependent turnover of IRP- 1/c-acotinase in kidney cells*. Metallomics, 7 (2015) 766-75.

DII.2. ESPECIACIÓN CUANTITATIVA DE HIERRO EN TEJIDOS Y FLUIDOS DE RATA ALIMENTADAS CON LECHES FÓRMULA FORTIFICADAS: EL EFECTO DE LA LACTOFERRINA

DII.2.1. Introducción

Como se comentó anteriormente, el hierro es el elemento traza esencial más abundante en el cuerpo humano, donde se distribuye en tres compartimentos: a) *funcional*, presente en las hemoproteínas, como la hemoglobina y la mioglobina que son proteínas que se unen al oxígeno; b) el *transporte*, constituido por proteínas para el transporte de hierro como la transferrina; y c) el *almacenamiento*, que consiste en ferritina y hemosiderina, que son las reservas del cuerpo de este metal [1]. Su deficiencia es un problema de salud importante en todo el mundo, la cual puede ser causada principalmente por absorción inadecuada o pérdidas de sangre [2]. Sólo aproximadamente 1-2 mg del hierro ingerido diariamente de los alimentos se absorbe finalmente a través del intestino y se sabe que varios factores pueden afectar su absorción como el pH, la forma fisicoquímica del hierro o la composición de la dieta.

Como se comentó anteriormente, se conoce que la lactoferrina (Lf), una proteína importante en la leche humana, podría mejorar la absorción de hierro en el intestino delgado de los lactantes, debido a su capacidad para ligar hierro y a su poca digestibilidad [3,4,5]. Estudios en leche humana han demostrado que el hierro se une a la lactoferrina (aparte de otras proteínas) [6]. A pesar de ello, hasta el momento se han realizado muy pocos estudios sobre la influencia de la lactoferrina en la absorción

de hierro real en los seres humanos [7]. De hecho, aún existen vías o rutas del metabolismo de este elemento que siguen sin ser bien entendidas [8].

En las últimas décadas, el ICP-MS se ha convertido en el detector elemental más potente para detectar la presencia de un determinado elemento debido a sus muy bajos niveles de detección y su elevada sensibilidad. La alta versatilidad para acoplar este detector con un gran número de técnicas de separación (tales como cromatografía de gases (GC) [9], cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) [10], electroforesis en gel (GE) [11], fraccionamiento de flujo de campo (FFF) [12], etc.) confiere a estas técnicas "híbridas" la capacidad de detectar la presencia de un elemento dado asociado a las biomoléculas de interés mediante la monitorización del metal deseado [13,14]. A pesar de que este acoplamiento se utiliza en un gran número de laboratorios en todo el mundo, los datos cuantitativos sobre la especiación de elementos (es decir, hierro) son escasos debido a la falta de patrones de proteínas para llevar a cabo su cuantificación. Es realmente importante conocer la concentración del elemento presente en las diferentes especies previamente separadas (por ejemplo, por HPLC) con el fin de arrojar cierta luz sobre la importancia de su presencia y especiación (unión) a las diferentes biomoléculas en una muestra dada.

Con este fin, una herramienta desarrollada recientemente para el análisis de especiación cuantitativa basada en el uso de isótopos estables en combinación con la deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) y las mediciones mediante HPLC-ICP-MS [15,16], resulta de gran utilidad para realizar estudios nutricionales y de metabolismo de oligoelementos, porque permite obtener información cuantitativa fácilmente. El metabolismo mineral de un oligoelemento se puede estudiar en combinación con dos trazadores enriquecidos: un trazador metabólico (utilizado para la alimentación) y un trazador de cuantificación (se añade después de recoger las muestras [5,17]). La información cuantitativa se obtiene mediante la integración los cromatogramas de flujo másico tras la separación mediante HPLC, y, por lo tanto, se puede obtener importante información metabólica, puesto que cada medida de ICP-MS proporciona, tanto los valores de concentración total de metal, como las relaciones trazador / trazado [15].

A la luz de los datos anteriores, es evidente que hoy en día existe una demanda para desarrollar estrategias alternativas para mejorar la biodisponibilidad del hierro (la medida en que el hierro se absorbe de la dieta y se utiliza para las funciones corporales normales) [18] en leche fórmula fortificada con hierro. Con este fin, el uso de isótopos estables enriquecidos parece ser una herramienta muy adecuada para desentrañar el metabolismo del hierro utilizando la herramienta matemática de IPD y las mediciones con HPLC-ICP-MS.

DII.2.2. Objetivos parciales

Con el fin de arrojar luz sobre el efecto real de la presencia de Lf en la absorción de hierro, y estudiar el metabolismo del hierro desde las diferentes formas fisicoquímicas ensayadas, la leche de fórmula seleccionada fue fortificada con hierro de manera exógena con un isótopo enriquecido de hierro de dos maneras diferentes: como el complejo $^{57}\text{Fe(III)-Lf}$ y alternativamente, como $^{57}\text{Fe(II)SO}_4$ (a diferentes dosis de hierro) a la que se había añadido una cantidad dada de lactoferrina, tal y como se describe en la sección Experimental.

La especiación cuantitativa de hierro (natural y exógeno) en ratas se realizó en los tres compartimentos de ratas seleccionados (glóbulos rojos, suero e hígado) usando especiación de hierro por HPLC-ICP-MS e IPD para la cuantificación de especies de Fe. Por lo tanto, las principales especies de hierro observadas en los fluidos de rata estudiados y los tejidos analizados se identificaron primero y luego se cuantificaron para ser comparados (en los diferentes grupos fortificados) con los valores de las especies de hierro encontradas en ratas que recibían sólo alimentación materna.

Las *etapas* llevadas a cabo en el presente capítulo fueron:

- Desarrollo y validación de una metodología analítica de separación mediante cromatografía de líquidos y detección por masas elementales (HPLC-ICP-MS) para la determinación total de hierro endógeno ($^{\text{nat}}\text{Fe}$) y exógeno (^{57}Fe) en diferentes tejidos y fluidos biológicos, mediante el uso de una aproximación matemática denominada deconvolución de perfiles isotópicos (IPD).
- Aplicación de la metodología a la determinación total de hierro endógeno ($^{\text{nat}}\text{Fe}$) y exógeno (^{57}Fe) en muestras reales de todos los grupos ensayados.
- Comparación de los resultados obtenidos dependiendo de la dosis y la forma fisicoquímica de hierro administrada y con los obtenidos en el grupo control.

DII.2.3. Empleo de IPD post-columna

En el presente capítulo se estudió el metabolismo del hierro en diferentes leches fórmula empleadas en la alimentación de ratas lactantes, mediante la utilización de la metodología de deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) en combinación con la separación cromatográfica por HPLC y posterior detección mediante ICP-MS. Al igual que la metodología de IPD-ICP-MS utilizada en la primera parte del presente capítulo, su utilización implica el uso de dos isótopos de hierro: uno administrado de forma oral (^{57}Fe , en la forma fisicoquímica objeto de estudio) y otro utilizado para la cuantificación (^{54}Fe). En el caso de la determinación post-columna, dicho trazador de cuantificación se añade online, mediante un flujo constante a la salida de la separación cromatográfica, tal y como se representa en la **Figura DII.15**.

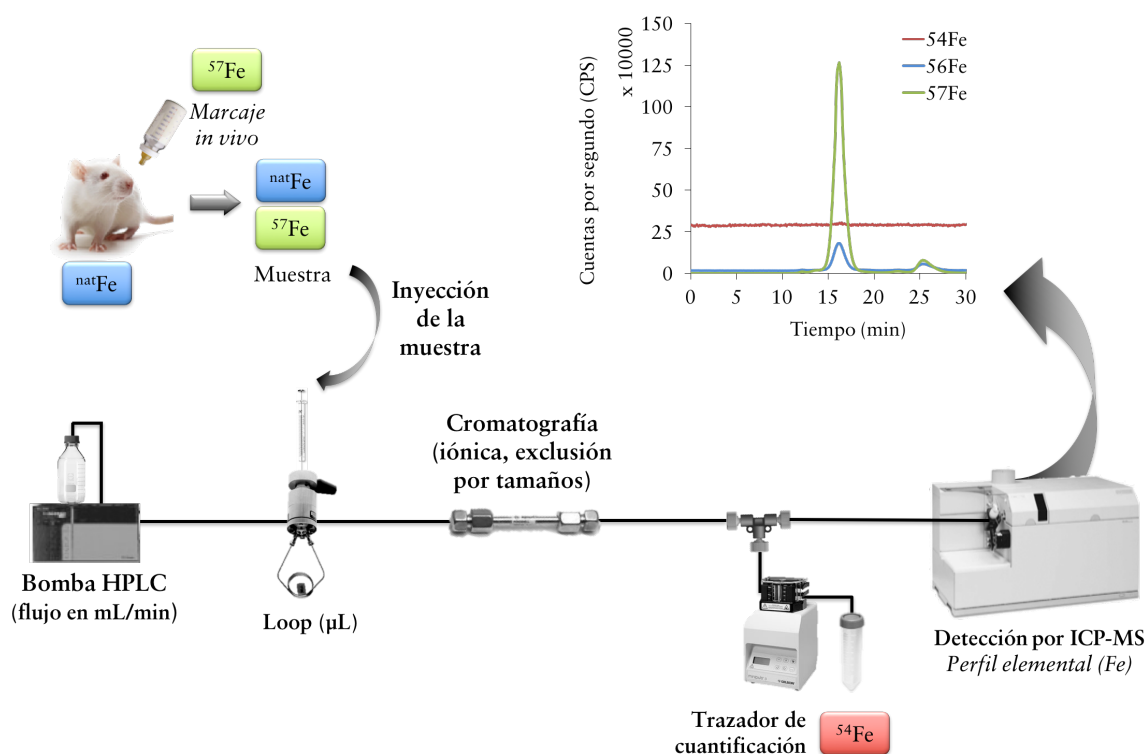


Figura DII.15. Representación esquemática de la metodología de IPD post-columna

Las abundancias de los cuatro isótopos de Fe en la muestra ($^{xx}\text{A}_M$), se calculan punto a punto a lo largo del cromatograma mediante la medida de las intensidades

isotópicas obtenidas mediante ICP-MS. Aplicando la ecuación recogida en la **Figura D.II.16** [5,15] en cada punto del cromatograma, se puede conocer la fracción molar de cada componente en dicho punto del cromatograma. A partir de las fracciones molares calculadas ($x_{\text{Fe}^{\text{nat}}}$, $x_{\text{Fe}^{57}}$, $x_{\text{Fe}^{54}}$), la cantidad de Fe trazador metabólico (^{57}Fe) y natural ($^{\text{nat}}\text{Fe}$) pueden calcularse, dado que tanto el flujo, las abundancias como la cantidad de trazador de cuantificación (^{54}Fe) añadida son todos conocidos. La cantidad requerida de disolución enriquecida en ^{54}Fe para llevar a cabo la cuantificación, se calculó intentando minimizar el factor de magnificación del error en cada muestra para ambos (natural y exógeno).

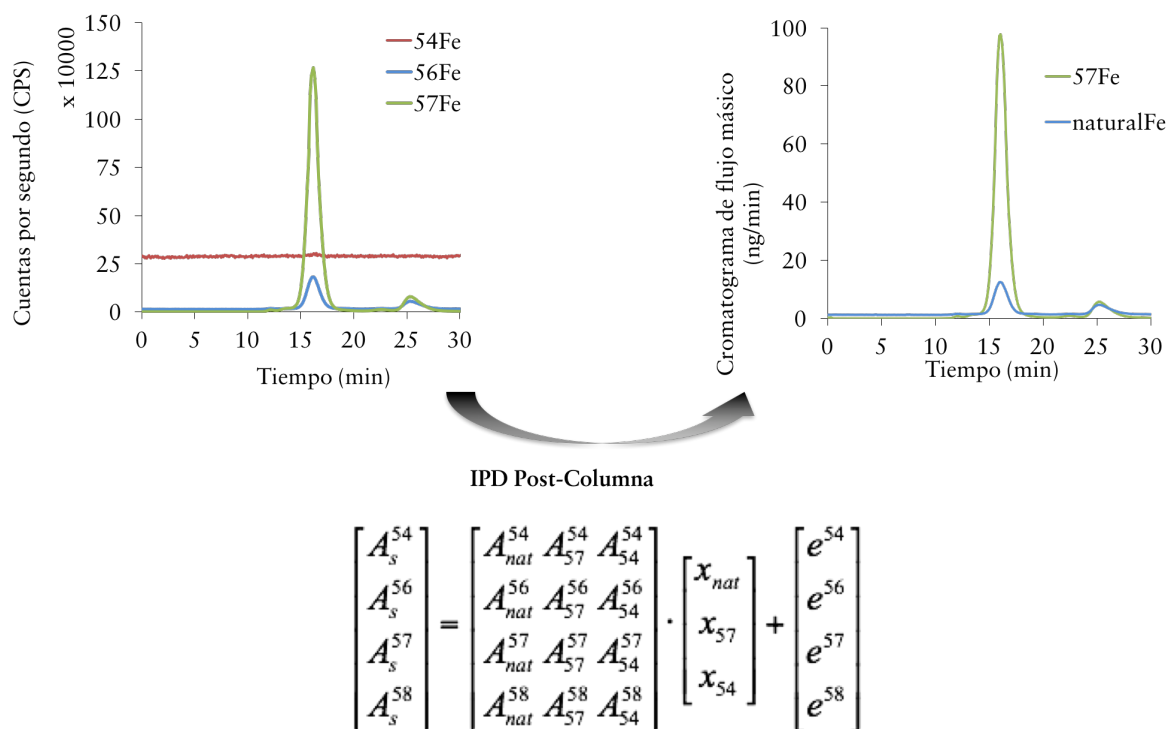


Figura DII.16. Representación esquemática de la metodología de IPD post-columnna

De este modo, se genera el conocido cromatograma de flujo másico que relaciona los ng/min de hierro exógeno y endógeno que eluyen por minuto tras la separación cromatográfica. Así, con una sencilla medida, es posible conocer en cada fluido o tejido estudiado, la cantidad de hierro endógeno ($^{\text{nat}}\text{Fe}$) que aún permanece, y cuánto hierro exógeno (^{57}Fe , administrado como alimento) se ha incorporado en las

proteínas o especies de dicho fluido o tejido. Posteriormente, el hierro natural y exógeno presente en cada pico cromatográfico se puede calcular fácilmente mediante la integración de los picos correspondientes.

DII.2.4. Optimización de las condiciones de medida

Para la separación de las principales especies que contienen hierro, presentes en cada muestra biológica, se investigaron diferentes estrategias de HPLC en este trabajo. La columna seleccionada para cada muestra, las fases móviles, el pH, el gradiente (si se requiere), el flujo y la dilución de la muestra (si se requiere) finalmente seleccionados se encuentran recogidos en la sección Experimental. Las condiciones de funcionamiento del plasma para el ICP-MS, y de los análisis mediante MALDI, así como los parámetros de adquisición de ambos, se presentan en **Tabla D.II.8**.

Se validó la metodología HPLC-IPD-ICP-MS analizando por triplicado un material de referencia certificado (1390 ± 160 $\mu\text{g/L}$ de hierro natural) con 1500 $\mu\text{g/L}$ de una solución enriquecida con ^{57}Fe . Los resultados obtenidos tanto para el hierro natural (1478 ± 5 $\mu\text{g/L}$) como para el ^{57}Fe (1442 ± 4 $\mu\text{g/L}$) están en concordancia con los valores esperados.

Parámetros del ICP-MS

<i>Parámetros del plasma</i>	
<i>Potencia de radiofrecuencia</i>	1500 W
<i>Flujo del gas plasmógeno</i>	15 L /min
<i>Flujo del gas portador</i>	1.12 L /min
<i>Parámetros de la celda de reacción/colisión</i>	
<i>Flujo del gas He</i>	4 mL/min
<i>Potencial del octapolo (Oct bias)</i>	-18 V
<i>Potencial del cuadrupolo (QP bias)</i>	-16 V
<i>Parámetros de adquisición de datos</i>	
<i>Modo de adquisición</i>	Time resolved analysis
<i>Isótopos monitorizados</i>	42,43,44,54,56,57,58,60
<i>Puntos por pico</i>	1
<i>Tiempo de adquisición por punto</i>	0.3

Parámetros del MALDI-QTOF

<i>Tipo de barrido</i>	Positivo
<i>Modo</i>	Lineal

<i>Calibración externa</i>	10 μ M albúmina de suero bovino
<i>Adquisición del espectro</i>	
<i>Disparos por espectro</i>	100
<i>Voltage del láser</i>	2500 V
<i>Accelerating voltage</i>	25000 V
<i>Grid voltage</i>	90-95%
<i>Delay time</i>	1000-2000 ns

Tabla DII.8. Condiciones cromatografías utilizadas para la separación de especies en los tejidos analizados mediante HPLC-ICP-MS e IPD

DII.2.5. Resultados obtenidos

La metodología analítica IPD-ICP-MS propuesta se utilizó para estudiar la distribución del hierro natural y/o hierro fortificado en el suero, los glóbulos rojos y el hígado de las ratas.

Como se ha comentado anteriormente, la caracterización de las proteínas aisladas (recogidas de las fracciones individuales de HPLC separadas) se llevó a cabo mediante MALDI-QTOF. La matriz 2-NPG es una matriz más volátil que absorbe bien la energía láser pero no se evapora o sublima durante el proceso de inserción de la muestra en el vacío de la fuente MALDI.

Bajo las condiciones MALDI descritas en la Tabla D.II.8, se ensayaron dos matrices diferentes. La matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) originó iones de carga múltiple, mientras que los iones producidos usando 2-NPG resultaron ser más estables y pasaron intactos a través del reflector TOF. Los mejores resultados en todas las fracciones analizadas por MALDI se obtuvieron utilizando la matriz 2-NPG. Los espectros MALDI ilustrativos obtenidos para las diferentes fracciones de HPLC en tales condiciones se muestran en la Figura D.II.17 y se discuten para cada compartimento de hierro en la siguiente sección de discusión de resultados.

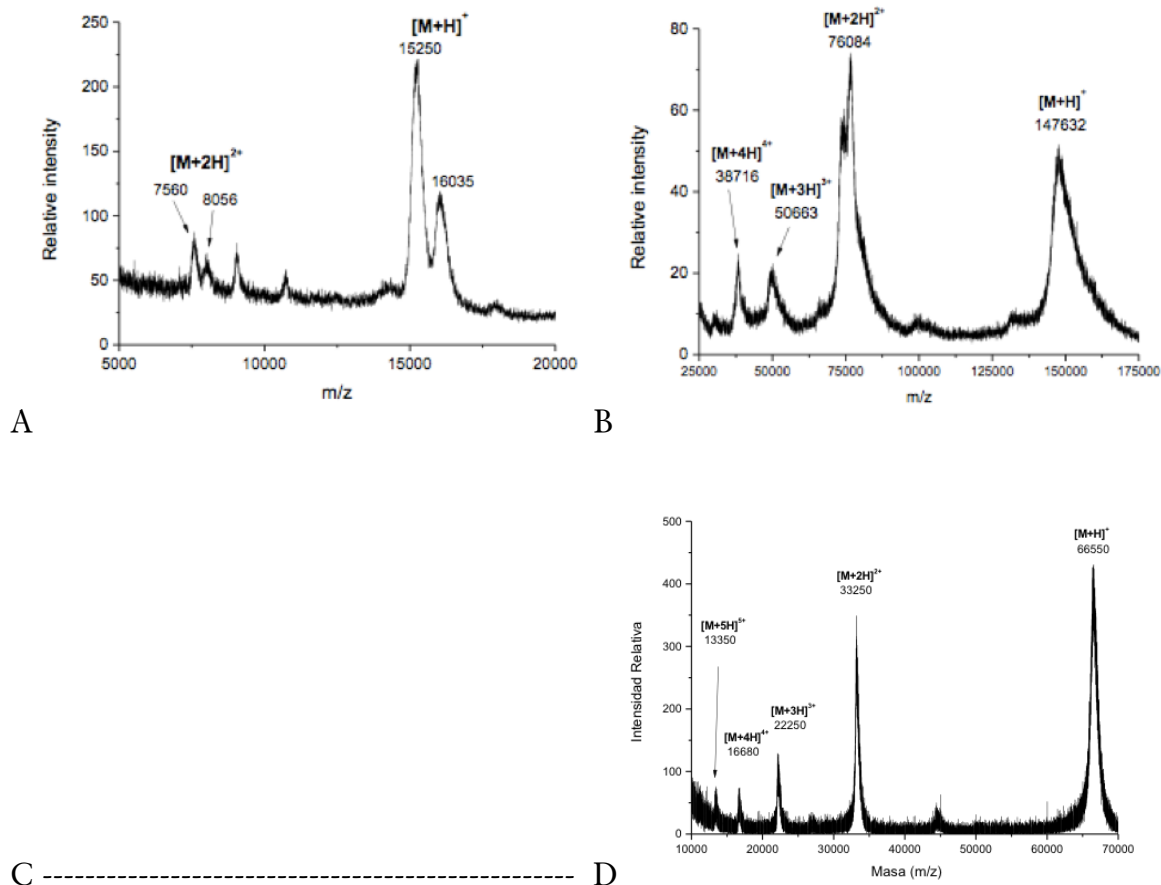


Figura DII.17. Espectro de MALDI de A) Glóbulos rojos, fracción 2: Hemoglobina, B) Suero, fracción 2: Immunoglobulinas, C) Suero, fracción 4: Transferrina y D) Suero, fracción 5: Albúmina.

La separación cromatográfica de las especies de Fe conteniendo/o hierro endógeno (natural) y/o exógeno (enriquecido) presente en cada muestra en estudio y para los tres compartimentos de Fe (funcional, transporte y almacenamiento) se realizó por HPLC-ICP-MS como se ha explicado en Experimental. La especiación cuantitativa de hierro se llevó a cabo mediante la deconvolución de perfiles isotópicos de los datos obtenidos para cada grupo de tres ratas analizadas por triplicado. Los resultados cuantitativos obtenidos para el contenido de hierro endógeno (natural) y exógeno (^{57}Fe) en cada fracción, se representan gráficamente en la Figura D.II.18, Figura D.II.19. y Figura D.II.20 para los glóbulos rojos, el suero y el hígado, respectivamente.

Compartimento funcional (glóbulos rojos)

En la Figura D.II.X18 se pueden observar los cromatogramas de flujo másico obtenidos tras la especiación de hierro en glóbulos rojos en los diferentes grupos estudiados, usando cromatografía de intercambio catiónico. La separación cromatográfica proporcionó dos fracciones bien diferenciadas: F1 (0-2 min) y F2 (13-17 min). Las proteínas cargadas negativamente no son retenidas por este tipo de cromatografía iónica y por lo tanto eluyen en el volumen muerto de la columna (0-2 min). El análisis de identificación por MALDI de la fracción F1 demostró ser transferrina (carga negativa y, por tanto, proteína no retenida). La cuantificación del hierro demostró que equivale a menos del 13% del total de hierro obtenido. El resto del hierro (87-93% dependiendo del grupo de glóbulos rojos analizado) se encontró en la fracción F2. Los experimentos de MALDI confirmaron que la proteína presente en esta segunda fracción (13-17 min) debe ser hemoglobina (ver Figura D.II.17a). Los picos de MALDI más intensos, centrados en m/z 15250 y 16035, corresponden a las formas α - y β - de la hemoglobina, respectivamente (también se observaron los dos iones doblemente cargados $[M + 2H]^{2+}$ de ambas isoformas a m/z 7560 y 8056).

Los resultados IPD observados de la cuantificación de hierro en esta fracción se han presentado gráficamente en la Figura D.II.18b (expresados en $\mu\text{g/g}$) para cada grupo ensayado. Los niveles encontrados para el hierro total fueron muy similares entre los grupos (MF: 716 $\mu\text{g/g}$, G1: 718 $\mu\text{g/g}$, G2: 8316 $\mu\text{g/g}$, G3: 749 $\mu\text{g/g}$), excepto para G4 que fue un poco superior (1119 $\mu\text{g/g}$). La incorporación de ^{57}Fe exógeno en esta fracción para los grupos fortificados con hierro osciló entre 48-63%.

Compartimiento de transporte (suero)

La mayoría de los métodos empleados para el aislamiento de metaloproteínas en suero se basan en la cromatografía de intercambio aniónico, ya que las cargas sobre las especies presentes (y por lo tanto la separación) pueden variar dependiendo de la carga, del punto isoeléctrico (pI) y también del contenido de hierro de las diferentes proteínas presentes en este tipo de muestra.

En este trabajo, la especiación cuantitativa de hierro del suero se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico. En la Figura D.II.19a se muestran

los cromatogramas de flujo de masa (ng/min por minuto) para cada grupo ensayado. Se observaron varias fracciones separadas en el cromatograma correspondiente: F1 (0-1.2 min), F2 (1.5-2.5 min), F3 (3.5-11.0 min), F4 (11.5-17.0 min), F5 (19.0-25.0 min).

Utilizando el procedimiento MALDI, como anteriormente, se caracterizaron casi todas las fracciones descritas. La fracción que eluyó en el volumen muerto (F1) se identificó como hemoglobina (procedente de la hemolización de la sangre durante su extracción). Otras fracciones identificadas fueron (ver Figura DII.17): Inmunoglobulinas (F2), Transferrina (F4) y Albúmina (F5). Resultados comparables fueron encontrados por Nuevo-Ordóñez et. al. [19,20] Y Soldado-Cabezuelo et. al. [21] Utilizando condiciones cromatográficas similares en muestras de suero humano.

Los resultados cuantitativos del hierro endógeno y/o exógeno encontrado en cada fracción (en $\mu\text{g/g}$) está representado gráficamente en la Figura DII.17b y el porcentaje por encima de cada barra representa el % de ^{57}Fe encontrado en cada fracción. La cantidad total de hierro unido a la transferrina (F4) fue bastante diferente entre los grupos: el grupo control mostró el valor más alto $3.82\pm 0.03 \mu\text{g/g}$, seguido por el grupo G4 ($0.25\pm 0.03 \mu\text{g/g}$, fortificado con hierro en alta dosis). Mientras tanto, se encontraron valores más bajos en los grupos fortificados con dosis baja de hierro ($0.066\pm 0.005 \mu\text{g/g}$ para G2 [Fe (III)] y $0.2\pm 0.1 \mu\text{g/g}$ para G3 [Fe (II)]) y para el grupo no fortificado con hierro, G1 ($0.09\pm 0.04 \mu\text{g/g}$).

Con respecto al porcentaje de hierro "exógeno" (^{57}Fe) incorporado en la transferrina (ver F4 en la Figura DII.17b), se observaron diferencias apreciables entre los grupos fortificados con hierro. En el grupo G4, fortificado con mayor dosis de hierro en forma de Fe (II), el hierro exógeno se elevó hasta $74\pm 2\%$ en esta fracción, mientras que a dosis más bajas (G3) la incorporación alcanzó el $53\pm 7\%$. Por el contrario, se obtuvo la proporción más baja de incorporación del hierro exógeno en transferrina para el grupo fortificado con el complejo Fe(III)-Lf, siendo sólo $35\pm 6\%$ del hierro total encontrado en dicha proteína.

Por otra parte, la incorporación de ^{57}Fe en la albúmina (F5) resultó ser muy similar en todos los grupos fortificados con hierro, siendo casi la misma para los grupos fortificados con sulfato ferroso $50\pm 3\%$ en G3, (con menor dosis de Fe (II)) y $51\pm 3\%$ en G4 (mayor dosis de Fe (II)) y ligeramente inferior en el grupo fortificado con Fe (III) de $44\pm 4\%$ (G2).

Compartimento de almacenamiento (hígado)

La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) se usa típicamente para separar compuestos de alto peso molecular, tales como proteínas y polímeros. Las moléculas más grandes que el tamaño de poro no son retenidas por la columna, mientras que las de tamaño más pequeño pueden difundirse en los poros y por lo tanto son retenidas en mayor o menor medida dependiendo del tamaño [14]. Es interesante destacar aquí que los depósitos de hierro en el hígado se encuentran principalmente bajo las formas de una fracción móvil soluble difusa (ferritina) y como depósitos insolubles, agregados (hemosiderina) [22,23]. Ambas especies tienen enormes dimensiones e interacciones iónicas comparativamente bajas. Es por eso que la especiación de hierro de las muestras de hígado se llevó a cabo por cromatografía de exclusión por tamaños (ver la Figura DII.20 para los resultados): se observaron dos picos principales en los cromatogramas de flujo de masa de la Figura DII.20a para todos los grupos ensayados: uno a 14-18 min (Fracción F1), y el otro a 23-28 min (fracción F2). Ambas fracciones juntas representan aproximadamente el 80-98% del Fe total eluido de la columna, tal como se esperaba de la literatura [22].

La mayor parte del Fe observado en las muestras de hígado del grupo fortificado con Fe (II) a alta dosis de hierro (G4) y en el grupo control (MF) se encontró asociado a la primera fracción (F1) en ambos grupos ($208\pm 16\ \mu\text{g/g}$ y $69\pm 16\ \mu\text{g/g}$, respectivamente, véase la figura DII.20b). Por el contrario, para los otros grupos (G1, G2 y G3) el contenido de hierro encontrado en la fracción F1 fue relativamente bajo (entre $1.7\text{-}18\ \mu\text{g/g}$), mientras que la cantidad de hierro encontrado en F2 fue mayor que en la fracción anterior (entre $11\text{-}20\ \mu\text{g/g}$). Es decir, la distribución real de hierro observada varió notoriamente dependiendo del grupo.

Con respecto al porcentaje de incorporación de ^{57}Fe "exógenos" en cada fracción, fueron similares entre los grupos ensayados y cercanos al 50%, excepto para la primera fracción F1 del grupo G4, donde la incorporación alcanzó el 89%.

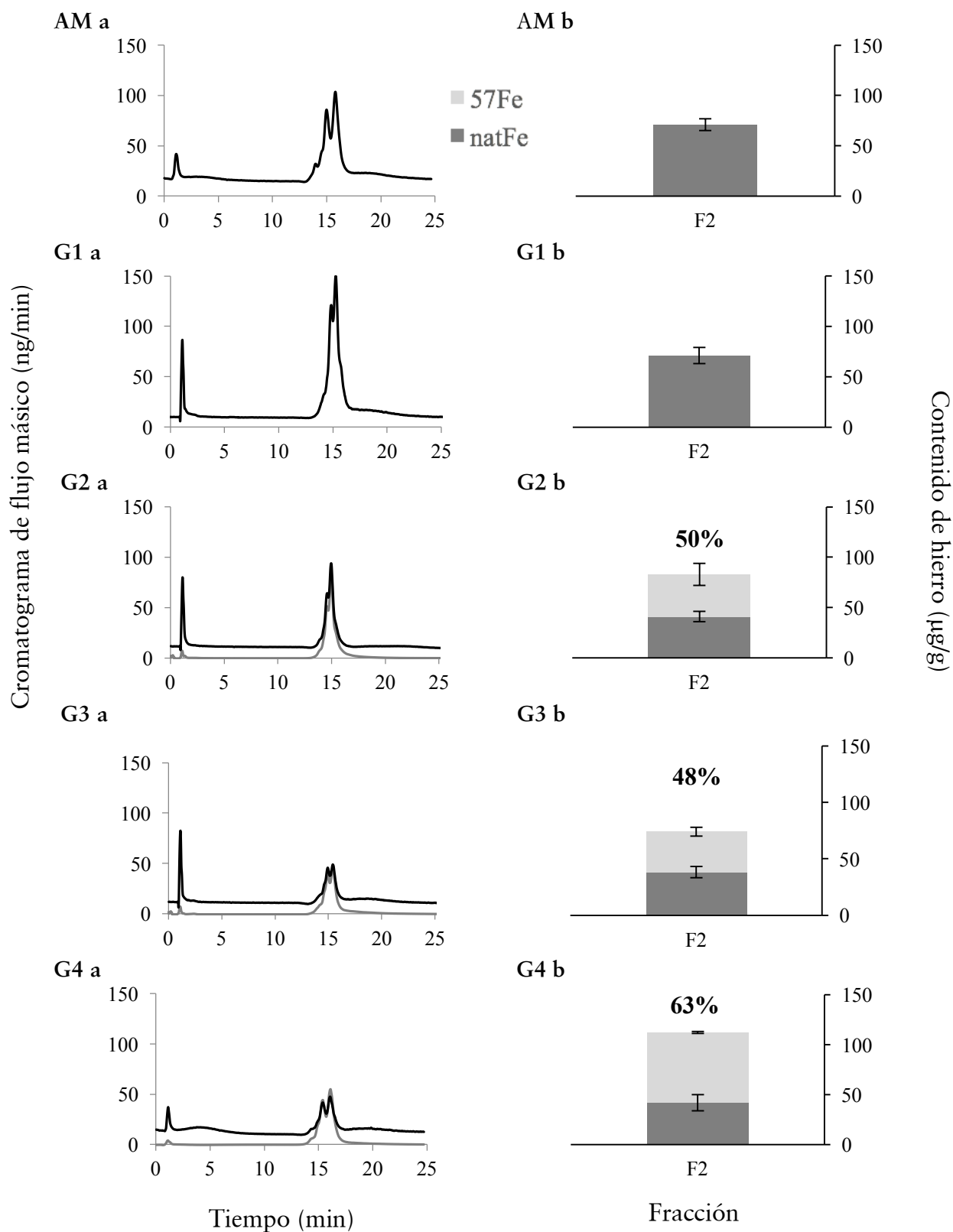


Figura DII.18. (a) Cromatograma de flujo másico y (b) contenido de hierro natFe y ^{57}Fe encontrado en los glóbulos rojos en los distintos grupos analizados; el porcentaje encima de cada barra representa el % de ^{57}Fe incorporado en cada fracción.

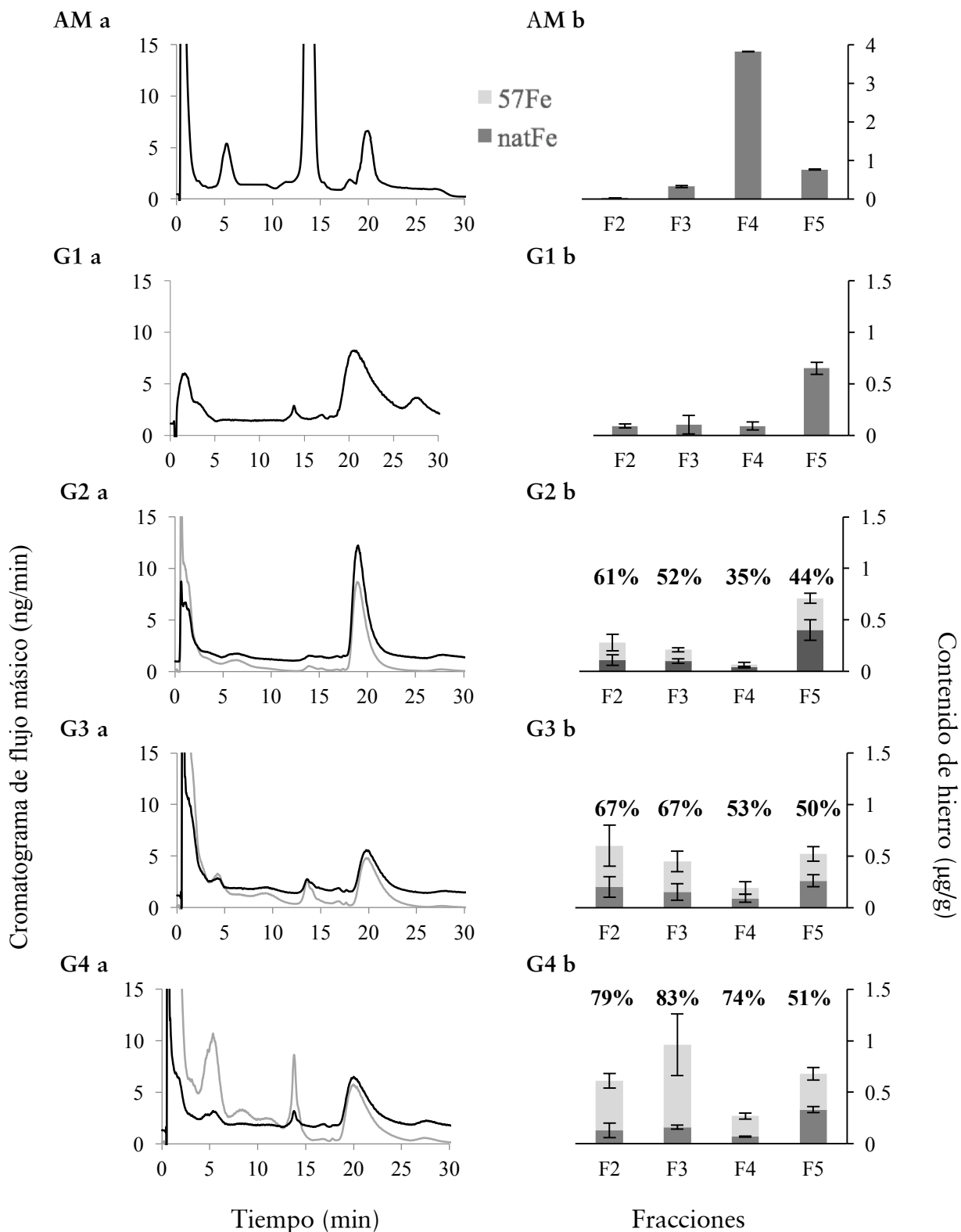


Figura DII.19. (a) Cromatograma de flujo másico y (b) contenido de hierro natFe y ^{57}Fe encontrado en el suero en los distintos grupos analizados; el porcentaje encima de cada barra representa el % de ^{57}Fe incorporado en cada fracción.

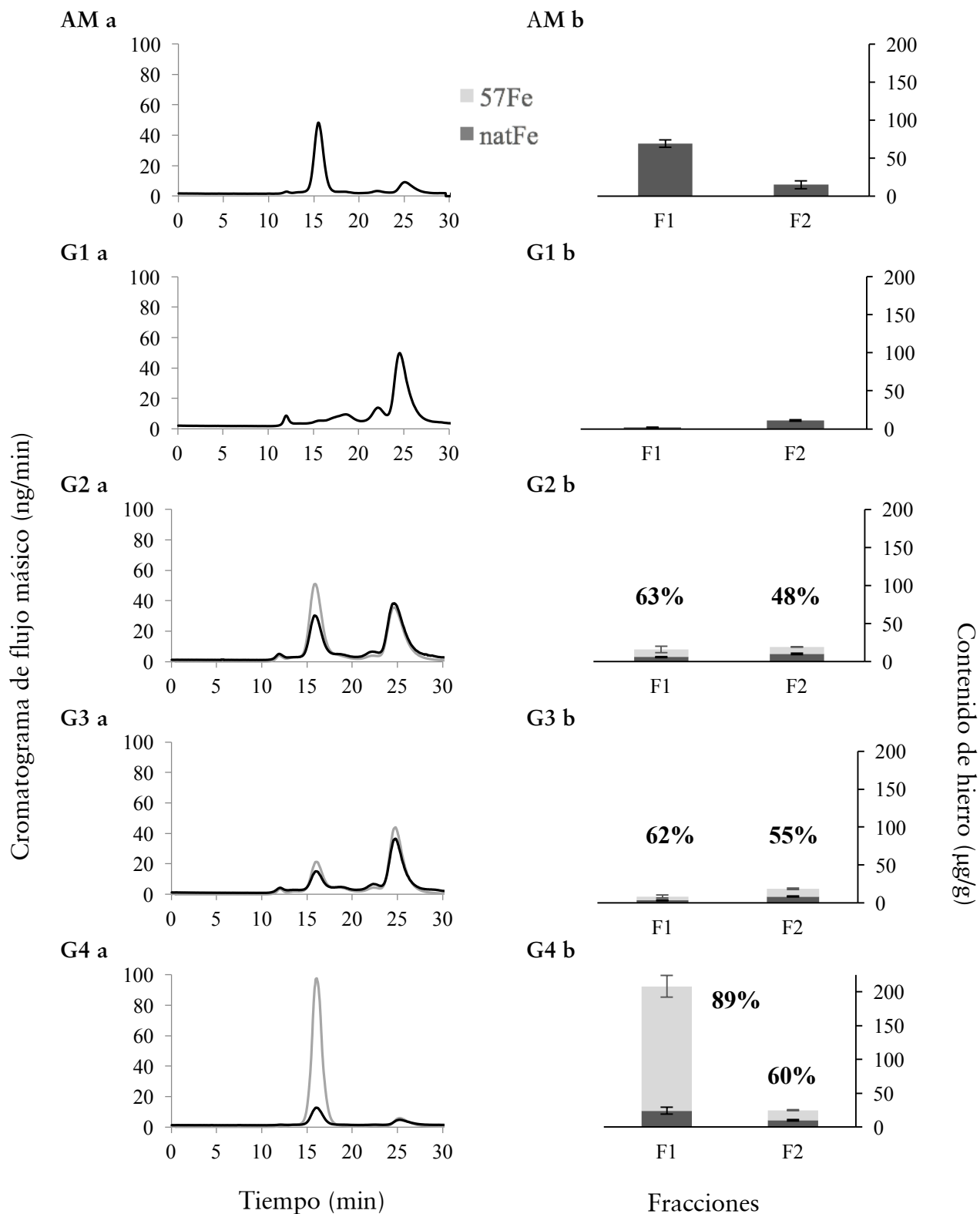


Figura DII.20. (a) Cromatograma de flujo másico y (b) contenido de hierro ^{nat}Fe y ^{57}Fe encontrado en el hígado en los distintos grupos analizados; el porcentaje encima de cada barra representa el % de ^{57}Fe incorporado en cada fracción.

DII.2.6. Discusión de los resultados

Compartimento funcional (glóbulos rojos)

Los resultados de IPD observados de la cuantificación de hierro (ver Figura DII.18b) revelaron que el hierro unido a la hemoglobina (fracción 2) en todos los grupos ensayados era bastante similar al grupo materno utilizado como referencia (tal vez un poco más alto en el grupo G4, fortificado con Lf y mayor dosis de Fe (II)), mostrando que independientemente de la forma fisicoquímica, los niveles totales de hierro unidos a la hemoglobina no cambiaron significativamente.

Además, el porcentaje de ^{57}Fe (hierro exógeno) encontrado en la hemoglobina fue similar en los grupos que recibieron la misma concentración de hierro, pero con forma de hierro diferente, siendo $50\pm 4\%$ para G2 [Fe (III)] y $48\pm 1\%$ para G3 [Fe II], revelando que la forma fisicoquímica administrada no parece ser un factor decisivo para la eventual incorporación de hierro en la hemoglobina (véanse los porcentajes de $^{57}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}^{\text{total}}$ encima de las barras de la Figura DII.18b). Mientras tanto, en el grupo fortificado con la dosis más alta [G4, Fe (II)], este valor resultó ser $63\pm 4\%$ mostrando que dosis más altas parecen conducir a una mayor incorporación de Fe en el compartimento funcional (este hallazgo puede indicar una rápida rotación de hierro en la hemoglobina [24]). Curiosamente, ^{57}Fe se incorporó en ambos picos de hemoglobina en la misma cantidad (ver Figura DII.18a) las intensidades entre ambos picos se mantuvieron constantes entre los grupos ensayados.

En general, al comparar los resultados de todos los grupos fortificados con el grupo de control de la alimentación materna, parece que los niveles de hierro no cambiaron significativamente (excepto el G4 que aumentó ligeramente). Esto indica que en el compartimento funcional la homeostasis del hierro debe mantener el balance de hierro para asegurar el transporte de oxígeno a los tejidos.

Compartimiento de transporte (suero)

Como se puede ver en los cromatogramas de flujo másico correspondientes en la Figura DII.19a, todos los grupos estudiados mostraron que el hierro se une a las mismas proteínas porque sus perfiles de especiación de hierro son bastante similares (mostrando picos en los mismos tiempos de retención), pero existen diferencias importantes en la distribución de hierro entre las especies, puesto que se observó que su contenido cambia significativamente entre grupos. Es bien sabido que la proteína principal para transportar hierro en suero humano es la transferrina. De hecho, el 77% de todo el hierro circulante se adhiere principalmente a la transferrina (F4, en la Figura DII.19), como se espera en la alimentación materna [25,26]. Sin embargo, en los otros grupos ensayados (G1 a G4), se encontraron sistemáticamente niveles más bajos de hierro como unidos a la transferrina. No se encontraron diferencias entre los grupos fortificados con la forma Fe (II) (G3 y G4) donde la cantidad de hierro encontrado en la transferrina fue del 11% independientemente de la dosis administrada. Este valor también se observó en el grupo fortificado sin hierro, G1. Por otra parte, sólo el 5% del hierro circulante encontrado en suero para el grupo G2 se unió a transferrina, revelando que la fortificación con Fe (III) como complejo Fe₂-Lf produce una reducción en los niveles de hierro unidos a transferrina.

Normalmente, el estado de hierro en el organismo se evalúa mediante la medición del grado de saturación de transferrina [27]. Por lo tanto, nuestros resultados indican claramente importantes diferencias entre la biodisponibilidad de hierro de la leche materna en comparación con la leche de fórmula, probablemente derivados de diferentes formas físico-químicas. Los resultados muestran que la incorporación de hierro en la transferrina parece claramente afectada por la dosis administrada y la forma fisicoquímica utilizada para la fortificación.

Por el contrario, en los grupos fortificados con Fe(II)SO₄ (G3 y G4), una cantidad importante de hierro se unió a F3 (especies no identificadas, véase la Figura DII.19). De la literatura, se podría sugerir que esta fracción puede ser una isoforma de transferrina, algo separada en la columna de intercambio aniónico utilizada [28].

Finalmente, la cantidad de hierro unido a la albúmina (F5, véase la identificación en la Figura DII.17) resultó ser similar en todos los grupos estudiados (véase la fracción F5 en la Figura DII.19b).

En cualquier caso, todos nuestros resultados de especiación confirman la menor biodisponibilidad de Fe de los fortificantes estudiados en leche de fórmula, en comparación con la leche materna de referencia. Este hallazgo es muy interesante ya que demuestra que los fortificantes de hierro pueden no seguir las mismas formas de incorporación que el hierro procedente de fuentes maternas (por ejemplo, su absorción / biodisponibilidad depende de la forma fisicoquímica del hierro y su dosis).

Compartimento de almacenamiento (hígado)

Como se puede ver en la Figura DII.20b, no se observaron diferencias significativas comparando la forma fisicoquímica utilizada para la fortificación con hierro, ya que los niveles de hierro encontrados en el grupo G2 [Fe (III)] y G3 [Fe (II)] fueron realmente similares y también su distribución entre las fracciones observadas fue casi la misma.

Los mayores niveles totales de hierro se encontraron en el grupo fortificado con Fe (II) a dosis más altas (G4), y se encontró principalmente en la primera fracción (F1, véase la Figura DII.20b), lo que revela que las mayores dosis de hierro en los alimentos producen un importante aumento de los depósitos de hierro en el cuerpo. En dicho grupo, después de dos semanas de fortificación, aproximadamente el 89% del hierro total encontrado en F1 corresponde al hierro exógeno ^{57}Fe (el isótopo utilizado en la fortificación, mostrando la incorporación comparativamente más alta debido a la alta dosis de Fe utilizada).

Aparentemente, el hierro pasa a través de los poros en la capa de molécula de apoferritina como el ion ferroso. Una vez dentro de la cáscara debe ser oxidado a la forma férrica (III), hidrolizado y polimerizado al polímero de oxihidróxido férrico [23]. Se pensó que dado que la lactoferrina parece no ser bien digerida [4], podría pasar a través del intestino como un complejo intacto de Fe(III)-Lf y tal vez llegar al

compartimento de reserva fácilmente, pero a partir de los resultados, se puede concluir que no hubo diferencias en la incorporación de hierro en los depósitos cuando el hierro se fortificó con Fe(II) o Fe(III) y sólo la dosis de hierro utilizada para la fortificación resultó ser un factor decisivo en la incorporación de hierro en las reservas de hígado.

Los cambios en el contenido de hierro (dosis) entre los grupos fortificados, demuestran claramente que una insuficiente captación de hierro provoca una liberación de hierro de sus almacenes hepáticos (probablemente para mantener el balance de hierro en el resto de los compartimentos de hierro en el cuerpo). Sin embargo, si la captación de hierro es suficiente (o por encima de los niveles necesarios) se puede almacenar para una entrega tardía, como se esperaba.

DII.2.7. Conclusiones del trabajo

El enfoque matemático IPD aplicado a los estudios de especiación cuantitativa [5,17], resultó ser una herramienta muy adecuada para estudiar el metabolismo del hierro y la biodisponibilidad en los estudios *in vivo*. Los resultados obtenidos ponen de relieve que el uso combinado de la especiación de oligoelementos con cuantificación de especies y estudios de nutrición vía IPD con una ICP-MS, ofrecen una manera novedosa y potente para estudiar el metabolismo del Fe. Está claro que la forma físico-química del elemento esencial y su dosis son dos parámetros críticos para lograr una fortificación eficaz.

Por supuesto, se requirió el uso de MALDI-MS molecular (especiación integral) para identificar las diferentes especies de biomoléculas metálicas separadas por HPLC (es decir, ICP-MS sólo proporciona información de elementos totales). Curiosamente, el hierro en el compartimento funcional resultó ser muy similar en todos los grupos estudiados, siendo sólo superior en el grupo fortificado con mayores dosis de hierro. Las subunidades de hemoglobina separadas por cromatografía de intercambio catiónico se identificaron en este trabajo y mostraron la misma incorporación de hierro en ambas isoformas, como se esperaba.

En el hierro circulante (compartimento de transporte) encontramos importantes diferencias en los grupos fortificados en comparación con el grupo control (alimentación materna). De hecho, el 77% del hierro total se encontró asociado a transferrina en el grupo materno. Este hecho importante no se observó en los otros grupos, donde el porcentaje de hierro total en transferrina fue siempre inferior al 10% (es decir, la especiación de Fe en la leche materna es claramente diferente a la de las fórmulas [6]).

La distribución de hierro en el compartimento de reserva o almacenamiento parece estar relacionada principalmente con la dosis de los elementos administrados: como se esperaba, una mayor ingesta de hierro conduce a mayores niveles de hierro hepático, lo que confirma el papel crítico del compartimento de almacenamiento en el metabolismo del hierro y la homeostasis. Los resultados también revelan que la forma fisicoquímica utilizada para la fortificación no es un factor decisivo en el almacenamiento de hierro, ya que no hay diferencias significativas en los niveles de hierro (o incorporación de ^{57}Fe) cuando el hierro se fortifica en forma ferrosa o férrica.

En cualquier caso, el alimento "ideal", la leche materna, resultó ser la mejor opción para alimentar a las ratas lactantes. Se observaron los niveles más altos de hierro en los compartimentos funcional y de transporte, con distribución diferente (especiación) que en los fortificantes. Esto hace hincapié en la importancia no sólo de conocer los niveles totales de hierro en cada compartimento (es decir, realizar el análisis total por ICP-MS), sino también en la especiación de hierro (usando HPLC-ICP-MS), porque este trabajo indica cómo la distribución de hierro entre las especies en los diferentes compartimentos ha cambiado dependiendo de la forma fisicoquímica utilizada para la fortificación y siendo más pronunciada en algunos compartimentos.

En cuanto a la incorporación de hierro ^{57}Fe (exógeno) entre los grupos ensayados, está claro que los mejores resultados se obtuvieron cuando el hierro se fortificó como Fe(II)SO_4 en presencia de lactoferrina. Comparando tales resultados con los descritos por Héctor et al. [17] usando la misma dosis de Fe(II)SO_4 pero sin lactoferrina, se puede ver que Lf claramente aumentó la absorción de hierro. De nuevo,

la forma fisicoquímica del elemento utilizado para la fortificación, así como su dosis, fueron aspectos clave para aumentar la biodisponibilidad y absorción del elemento.

Por supuesto, un desafío futuro en esta línea es asegurar la mejor composición posible de las leches fórmula infantiles (para proporcionar a los bebés un suministro adecuado de este oligoelemento esencial). Es decir, se necesitan más estudios con diferentes fortificantes de hierro para comprobar la mayor biodisponibilidad de Fe y descubrir maneras más eficientes para la fortificación de la leche de fórmula, siendo la especiación existente en la leche materna una buena guía para lograr ese objetivo.

DII.2.8. Referencias bibliográficas

- ¹ P Ponka. *Iron metabolism: Physiology and pathophysiology*. J Trace Elem Exp Med, 13 (2000) 73-83. doi:10.1002/(SICI)1520-670X(2000)13:1<73::AID-JTRA9>3.0.CO;2-X
- ² NC Andrews. Disorders of iron metabolism. N Engl J Med, 341 (1999) 1986-95. doi:10.1056/NEJM199912233412607
- ³ L Davidsson, P Kastenmayer, M Yuen, B Lönnerdal and RF Hurrell. *Influence of lactoferrin on iron absorption from human milk in infants*. Pediatr Res, 35:1 (1994) doi:117-24. 10.1203/00006450-199401000-00025.
- ⁴ JH Brock. *Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant*. Arch Dis Child, 55 (1980) 417-21.
- ⁵ S Fernández-Menéndez, ML Fernández-Sánchez, H González-Iglesias, B Fernández-Colomer, JB López-Sastre and A Sanz-Medel. *Iron bioavailability from supplemented formula milk: effect of lactoferrin addition*. Eur J Nutr, 2016, 1-10. [In Press].
- ⁶ ML Fernández-Sánchez, RRF St. Remy, H González-Iglesias, JB López-Sastre, B Fernández-Colomer, D Pérez-Solís and A Sanz-Medel. *Iron content and its speciation in human milk from mothers of preterm and full-term infants at early stages of lactation: a comparison with commercial infant milk formulas*. Microchem J, 105 (2012) 108-14. doi:10.1016/j.microc.2012.03.016.
- ⁷ B Lönnerdal. *Nutritional and physiologic significance of human milk proteins*. Am J Clin Nutr, 77:6 (2003) 1537S-43S.
- ⁸ A von Drygalski and JW Adamson. *Iron metabolism in man*. J Parenter Enteral Nutr, 37:5 (2013) 599-606.
- ⁹ A González-Gago, D Pröfrock and A Prange. *Optimizing GC-ICP-MS for ultra-trace quantification of PBDEs in natural water samples using species-specific isotope dilution*. J Anal At Spectrom, 30 (2015) 180-90. doi:10.1039/c4ja00112e.
- ¹⁰ U Araujo-Barbosa, E Peña-Vazquez, MC Barciela-Alonso, SL Costa Ferreira, AM Pinto dos Santos and P Bermejo-Barrera. *Simultaneous determination and speciation analysis of arsenic and chromium in iron supplements used for iron-deficiency anemia treatment by HPLC-ICP-MS*. Talanta, 170 (2017) 523-9. Doi:10.1016/j.talanta.2017.04.034.
- ¹¹ L López-Fernández, M Montes-Bayón, EB González, LM Sierra, A Sanz-Medel and J Bettmer. *Initial studies on quantitative DNA induced oxidation by gel electrophoresis (GE)-ICP-MS*. J Anal At Spectrom, 26 (2011) 195-200. doi: 10.1039/C0JA00163E.
- ¹² G Artiaga, K Ramos, L Ramos, C Cámara and M Gómez-Gómez. *Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF4-ICP-MS*. Food Chem, 166 (2015) 76-85. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.139.
- ¹³ A Sanz-Medel, M Montes-Bayón and ML Fernández-Sánchez. *Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics*. Anal Bioanal Chem, 377:2 (2003) 236-47.
- ¹⁴ JA Caruso and M Montes-Bayón. *Elemental speciation studies--new directions for trace metal analysis*. Ecotoxicol Environ Saf 56:1 (2003) 148-63.

- ¹⁵ JIG Alonso and P Rodriguez-González. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. The Royal Society of Chemistry, (2013). ISBN: 978-1-84973-333-5.
- ¹⁶ A Sanz-Medel, ML Fernández-Sánchez, H González-Iglesias and JB López-Sastre. *Speciation and isotope pattern deconvolution for inductively coupled plasma-mass spectrometry quantitative studies of mineral metabolism and supplementation*. *Pure Appl Chem*, 82:2 (2010) 447-460.
- ¹⁷ H González-Iglesias, ML Fernández-Sánchez, JB López-Sastre and A Sanz-Medel. *Nutritional iron supplementation studies based on enriched ⁵⁷Fe, added to milk in rats, and isotope pattern deconvolution-ICP-MS analysis*. *Electrophoresis*, 33 (2012) 2407-15. doi:10.1002/elps.201100334.
- ¹⁸ R Hurrell and I Egli. *Iron bioavailability and dietary reference values*. *Am J Clin Nutr*, 91:5 (2010) 1461S-7S. doi:10.3945/ajcn.2010.28674F.
- ¹⁹ Y Nuevo-Ordóñez, M Montes-Bayón, E Blanco-González, J Paz-Jiménez, JM Tejerina-Lobo, JM Peña-López and A Sanz-Medel. *J Anal At Spectrom*, 24 (2009) 1037-43.
- ²⁰ Y Nuevo-Ordóñez, M Montes-Bayón, E Blanco-González, J Paz-Aparicio, DJ Raimundez, JM Tejerina, MA Peña and A Sanz-Medel. *Anal Bioanal Chem*, 401 (2011) 2747-54.
- ²¹ AB Soldado-Cabezuelo, M Montes-Bayón and JIG Alonso. *Analyst*, 123 (1998) 865-9.
- ²² L Stuhne-Sekalec, SX Xu, JG Parkes, NF Olivieri and DM Templeton. *Anal Biochem*, 205 (1992) 278-84.
- ²³ JE Smith. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th ed. Elsevier Inc. (1997) 223-39. ISBN: 978-0-12-396305-5.
- ²⁴ W Hagar, EC Theil and EP Vichinsky. *Pediatr Clin N Am*, 49 (2002) 893-909.
- ²⁵ DJ Lane, AM Merlot, ML Huang, DH Bae, PJ Jansson, S Sahni, DS Kalinowski and DR Richardson. *Biochim Biophys Acta*, 1853 (2015) 1130-44.
- ²⁶ RC Hider and X Kong. Springer, Dordrecht. (2013) 229-294. ISBN: 978-94-007-7499-5.
- ²⁷ ME Elsayed, MU Sharif and AG Stack. *Adv Clin Chem*, 75 (2016) 71-97.
- ²⁸ E del Castillo-Busto, M Montes-Bayón, JIG Alonso, JA Caruso and Sanz-Medel. *Analyst*, 135 (2010) 1538-40.

*D.III. BIODISPONIBILIDAD
Y ABSORCIÓN DEL HIERRO
DESDE LECHE FÓRMULA
FORTIFICADA CON
NANOPARTÍCULAS*



DIII.1. BIODISPONIBILIDAD Y ABSORCIÓN DEL HIERRO DESDE LECHEs FÓRMULA FORTIFICADAS CON NANOPARTÍCULAS DE HIERRO

DIII.1.1. Introducción

Con el fin de evitar posibles estados carenciales de hierro en neonatos no amamantados, se recomienda ampliamente el uso de leches fórmula fortificadas en hierro. Desgraciadamente, se conoce que la biodisponibilidad y/o absorción del hierro desde dichas fórmulas es menor que desde leche materna, y por ello, resulta de gran interés conocer nuevas formas fisicoquímicas que puedan mejorar la efectividad de la fortificación con hierro. Existen estudios recientes que investigan diferentes formas fisicoquímicas de hierro que puedan ofrecer mayor absorción y biodisponibilidad [1,2,3] y menores efectos secundarios gastrointestinales [4] para la suplementación o fortificación con hierro. Típicamente, las especies de hierro utilizadas para fortificar las fórmulas son sales ferrosas [Fe(II)] (tales como FeSO_4 [2,3], fumarato ferroso, fumarato ferroso, gluconato ferroso [4]), mientras que las sales férricas [Fe(III)] son menos utilizadas (pirofosfato férrico, citrato férrico) [5]. Sin embargo, ciertas especies pueden producir efectos secundarios tóxicos como irritación del estómago, diarrea, estreñimiento, envenenamiento por hierro y disminución del crecimiento [6], los cuales pueden atribuirse a la alta solubilidad y velocidad de disolución de ciertas sales de hierro en el tracto gastrointestinal. Por otro lado, se conoce que algunos compuestos de hierro pueden proporcionar una dosificación o liberación controlada del hierro (por ejemplo, óxidos de hierro o sales de hierro complejadas con una proteína, un aminoácido, un ácido orgánico, un polímero natural, un agente formador de aniones, etc.). Tales formas químicas utilizadas para la fortificación de hierro

podrían conducir a un mejor estado de hierro en el organismo (es decir, la cantidad de hierro liberado del fortificante e incorporado en el torrente sanguíneo está mejor controlado) [7].

Como se comentó en el capítulo anterior, la ferritina es una clase de proteína de almacenamiento de hierro multimérica caracterizada por la arquitectura esférica con un núcleo interno de miles de átomos de hierro. Dentro de su estructura protéica, una única molécula de ferritina puede albergar hasta 4500 iones de hierro [Fe (III)] en una forma nanoparticulada, establecida en combinación con iones fosfato e hidróxido. De esta manera, la liberación de hierro podría ser más controlada y menos propensa a interactuar con quelantes al pasar por el duodeno [8]. Recientemente, dicha proteína de almacenamiento se ha señalado como una buena alternativa para llevar a cabo la fortificación del hierro, debido principalmente a la estructura a nanoestructura del hierro contenido en su interior. En esta línea, Lönnnerdal y colaboradores demostraron que el hierro de ferritina de soja es absorbido adecuadamente en mujeres no anémicas, siendo similar a la absorción observada para el FeSO_4 sin diferencias significativas entre los grupos estudiados [9]. La ferritina se supone que es una forma celular para almacenar el hierro (en el hígado), en lugar de transportarla, sin embargo, los niveles de ferritina sérica se miden ampliamente como indicadores del estatus de hierro corporal, puesto que se dice que su concentración es directamente proporcional a las reservas totales de hierro corporal [8,10]. Esta relación hace que el análisis de suero o plasma para la ferritina sea una posible prueba del estado físico del hierro.

En los últimos años, el uso de nanopartículas (NPs) como suplementos nutricionales ha sido investigado por diferentes autores utilizando: NPs de hierro magnético [11], NPs de óxido de hierro [4,12] o NPs de fosfato de hierro [13,14]. Entre todas, las nanopartículas de oxohidróxido [15] en particular, han surgido como una especie prometedora para suplementos / fortificantes de hierro, ya que son más bioactivas que las formas químicas clásicas y tienen mucho mejor acceso a los tejidos, y además, su estructura es similar a la observada en la naturaleza (por ejemplo, en ferritina). Es decir, las nanopartículas de óxido de hierro tienen una estructura similar a la del hierro dentro de la ferritina, por lo que se piensa que su biodisponibilidad

podría ser mejor que las formas fisicoquímicas tradicionales utilizadas para la fortificación de leche de fórmula típicamente basadas en iones de hierro soluble [6].

Por otro lado, como se demostró en el capítulo anterior, el uso de isótopos estables y posterior cuantificación mediante deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) resulta de gran utilidad para desentrañar el metabolismo del Fe en el organismo, permitiendo determinar la cantidad de hierro "exógeno" (utilizado para la fortificación) y la cantidad de hierro "natural" presente en la muestra biológica de interés, utilizando para ello un trazador de cuantificación y realizando una simple medida usando ICP-MS. Utilizando este enfoque se puede revelar el metabolismo del hierro y su incorporación en los diferentes compartimentos de hierro del cuerpo [1].

DIII.1.2. Objetivos parciales

En este capítulo, se investigó en un estudio *in vivo* con ratas lactantes, la idoneidad de las nanopartículas de oxo-hidróxido de $^{57}\text{Fe}(\text{III})$ estabilizadas con tartrato (previamente sintetizadas y caracterizadas) para llevar a cabo la fortificación de la leche fórmula (grupo: ^{57}Fe -NPs). Asimismo, se estudió su absorción y biodisponibilidad a partir de este alimento utilizando ICP-MS e IPD, verificando el estatus del hierro en el organismo a partir de la medida de dicho elemento en los diferentes compartimentos (funcional, transporte y almacenamiento) en los que se encuentra distribuido en el organismo. Adicionalmente, se evaluaron los niveles de ferritina sérica como biomarcador del estado de hierro corporal.

A modo comparativo se utilizó un grupo de ratas alimentadas con FeSO_4 a la misma dosis (grupo: FeSO_4) y un grupo de ratas que fue alimentada con leche no fortificada (grupo: NF).

Dicho objetivo global fue abordado a través de las siguientes *etapas*:

- Síntesis y caracterización de las nanopartículas.
- Alimentación de las ratas lactantes con las leches fórmulas enriquecidas y toma de muestra tras el período de alimentación.
- Aplicación de la metodología validada en el capítulo anterior para la determinación total de hierro endógeno ($^{\text{nat}}\text{Fe}$) y exógeno (^{57}Fe) en muestras reales de todos los grupos ensayados.
- Comparación de los resultados obtenidos en el grupo de NPs con el grupo no fortificado y el fortificado con FeSO_4 a la misma dosis.

DIII.1.3. Empleo de IPD para el estudio nutricional del hierro

Al igual que el capítulo anterior, ratas lactantes que poseen hierro en su organismo (endógeno) con abundancia isotópica natural (^{nat}Fe), fueron alimentadas *ad libitum* con leche fórmula fortificada en el isótopo enriquecido ^{57}Fe (exógeno) proveniente del fortificante objeto de estudio. A lo largo del período de suplementación (14 días) se recogieron las muestras de orina y heces. Y tras el periodo de suplementación, las ratas fueron sacrificadas y se tomaron las muestras de sangre y tejidos para su análisis. Las muestras conteniendo Fe natural y exógeno se mezclan con una cantidad conocida de un segundo isótopo enriquecido de Fe (^{54}Fe) previa a su cuantificación mediante ICP-MS por IPD. De este modo, con una sencilla medida, es posible conocer en cada fluido o tejido estudiado, la cantidad de hierro endógeno (^{nat}Fe) que aún permanece, y cuánto hierro exógeno (^{57}Fe , administrado como alimento) se ha incorporado en dicho fluido o tejido.

DIII.1.4. Optimización de las condiciones de medida

Al igual que el capítulo anterior, la cuantificación de hierro en tejidos y fluidos biológicos puede estar influida por la aparición de interferencias, las cuales fueron corregidas mediante el uso de He a 4 mL/min en la celda de colisión y, en los casos en los que fuera necesario, se realizaron además las correcciones matemáticas pertinentes. El resto de las condiciones de medida son idénticas a las utilizadas en el capítulo anterior y están recogidas en la Tabla DII.3.

DIII.1.5. Síntesis y caracterización de los fortificantes ensayados

Síntesis del sulfato ferroso natural ($^{nat}\text{FeSO}_4$)

El sulfato de hierro enriquecido isotópicamente ($^{nat}\text{FeSO}_4$) se preparó a partir de hierro elemental disolviendo el metal en un volumen mínimo de H_2SO_4 de calidad suprapur, y luego se diluyó con agua ultrapura. Para asegurar el estado de oxidación del hierro $^{nat}\text{Fe(II)}$, se empleó atmósfera inerte de N_2 durante el procedimiento de disolución y se aseguró un almacenamiento especial evitando la entrada de oxígeno

(mediante atmósfera interna de nitrógeno y aislamiento con Teflón). La concentración del patrón fue determinada mediante ICP-MS.

Síntesis de las nanopartículas ($^{57}\text{Fe(III)}$ -NPs)

Las nanopartículas de hierro (Fe(III) -NPs) se sintetizaron de acuerdo con el protocolo descrito por Powell et al. [15], pero utilizando un isótopo de hierro estable (^{57}Fe), según el protocolo descrito en la sección Experimental. A modo ilustrativo los pasos llevados a cabo para su síntesis y posterior purificación se recogen en la Figura DIII.1. Los pasos de purificación y secado se optimizaron según los resultados obtenidos en los diferentes estudios de caracterización de las nanopartículas tal y como se explicará en la sección correspondiente.

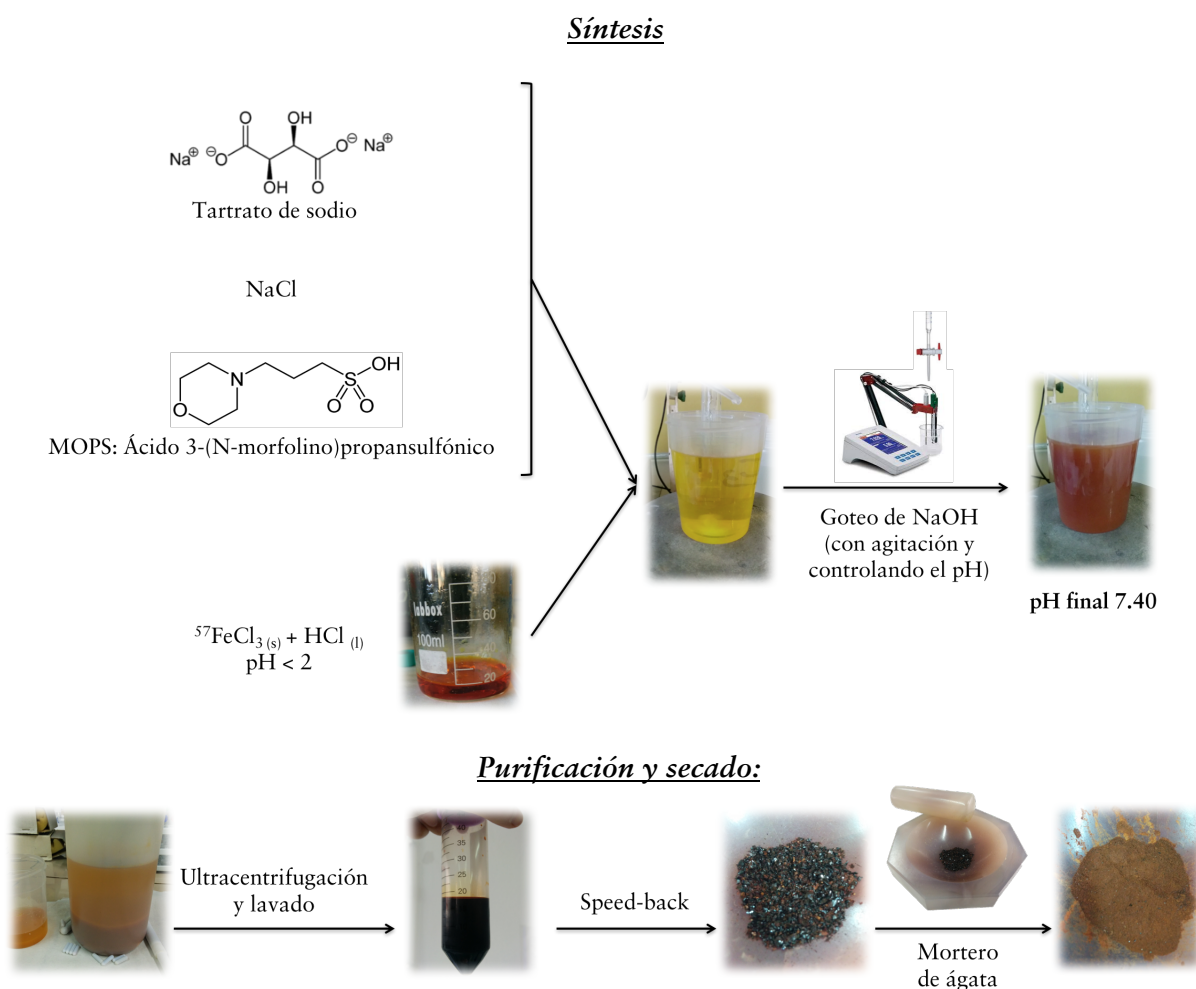


Figura DIII.1. Síntesis y purificación de las nanopartículas de $^{57}\text{Fe(III)}$

Caracterización de las nanopartículas

La información acerca de la morfología y la estructura de las nanopartículas se obtuvo mediante el uso de diferentes técnicas analíticas complementarias, como el microscopio electrónico de transmisión (TEM) de alta resolución (HR-TEM) o la difracción de Rayos X (XRD). El DLS o *dynamic light scattering*, se utilizó para determinar el perfil de distribución de tamaño de las NPs en suspensión. Finalmente, la espectrometría de energía dispersiva de Rayos X (EDX) y el ICP-MS se usaron para establecer la composición química y pureza de las NPs sintetizadas.

- *Microscopio electrónico de transmisión (TEM)*

Para llevar a cabo las medidas mediante microscopio electrónico de transmisión de alta resolución, una alícuota de polvo de nanopartículas fue depositada en una rejilla de carbono y posteriormente secada al aire durante 4h.

Con ayuda del *TEM*, se pudo estudiar la eficacia de los diferentes procesos de lavado utilizados al final de la síntesis (lavado con agua o con mezcla de tartrato+agua) con objeto de purificar las nanopartículas sintetizadas. Los resultados obtenidos mediante esta técnica mostraron la existencia de pequeños cristales (Figura DII.2. A y B) que fueron disminuyendo su tamaño con los subsiguientes lavados (Figura DII.2.C). Se observó que los mejores resultados se obtuvieron con lavados con concentraciones decrecientes de agua+tartrato.

Igualmente, se ensayaron distintos procedimientos para “secar” las nanopartículas tras su síntesis con el objetivo final de conseguir un fino polvo nanoparticulado (Estufa a 45°C; Speedback 45°C a vacío; Speedback 60°C y vacío; Estufa 45°C + Speedback 45°C a vacío). Los resultados obtenidos mostraron que la eliminación del disolvente a speedback a 45°C y vacío generaba imágenes con una estructura nanoparticulada más definida y precisa entre diferentes muestras. Figura DII.2.D).

Con el objetivo de suspender las partículas en un medio líquido, se ensayaron varios disolventes (p.ej. etanol, agua) y varios procesos de secado (al aire, bajo

lámpara de infrarrojo) para obtener aquel que tuviera menores tiempos de secado, que condujera a mejores fotos en el microscopio, y que presentara menor variación entre muestras tratadas con el mismo disolvente, con el fin de evitar modificar la estructura de la nanopartícula con agentes externos. Los mejores resultados se obtuvieron con agua, puesto que con el secado bajo lámpara de infrarrojo la forma y distribución de las nanopartículas entre alícuotas mostraba mayores desviaciones, indicando una posible degradación indeseada.

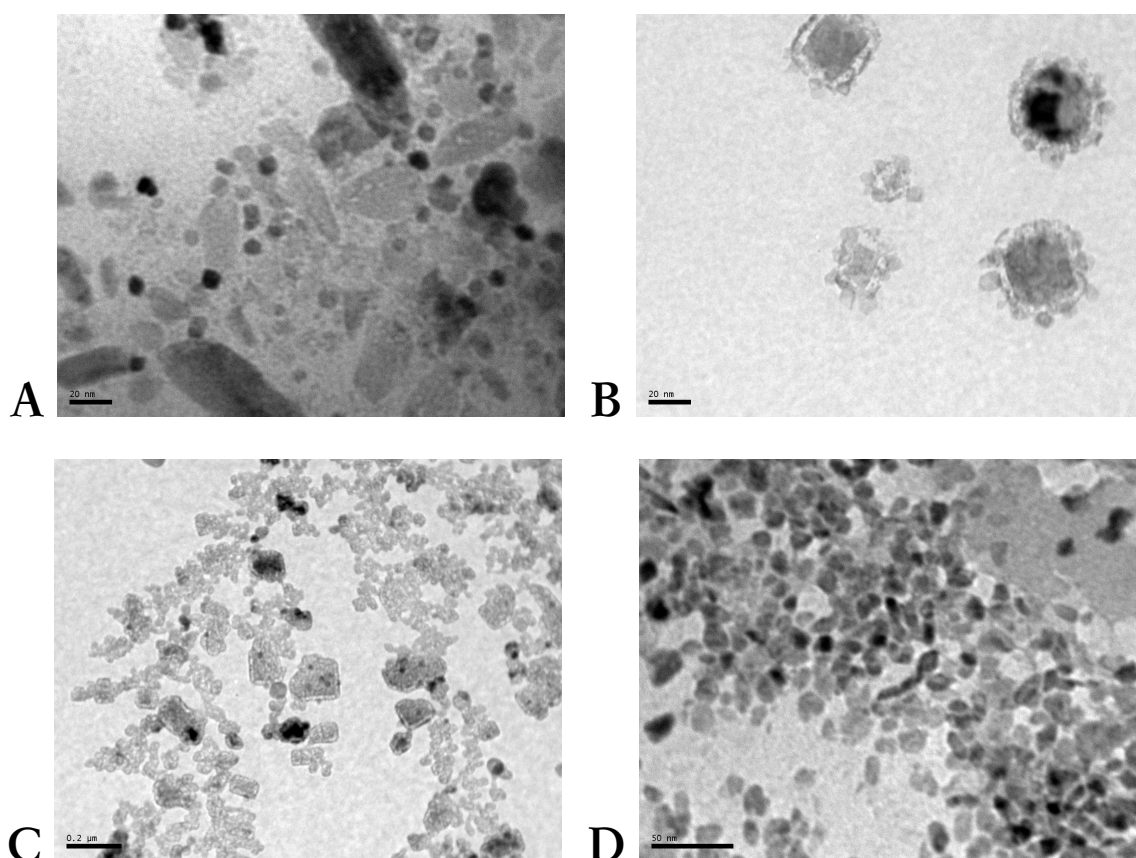


Figura DIII.2. Imágenes de TEM obtenidas para diferentes síntesis de las $^{57}\text{Fe(III)}$ -NPs

- *Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM)*

Una vez optimizado el proceso de síntesis, se llevaron las muestras al microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM). A partir de las imágenes obtenidas para distintas zonas de una misma muestra (y repitiendo el

proceso entre alícuotas), se llevó a cabo la medida del tamaño de partícula mediante un software informático que tiene en cuenta el aumento aplicado en el momento de registrar la medida.

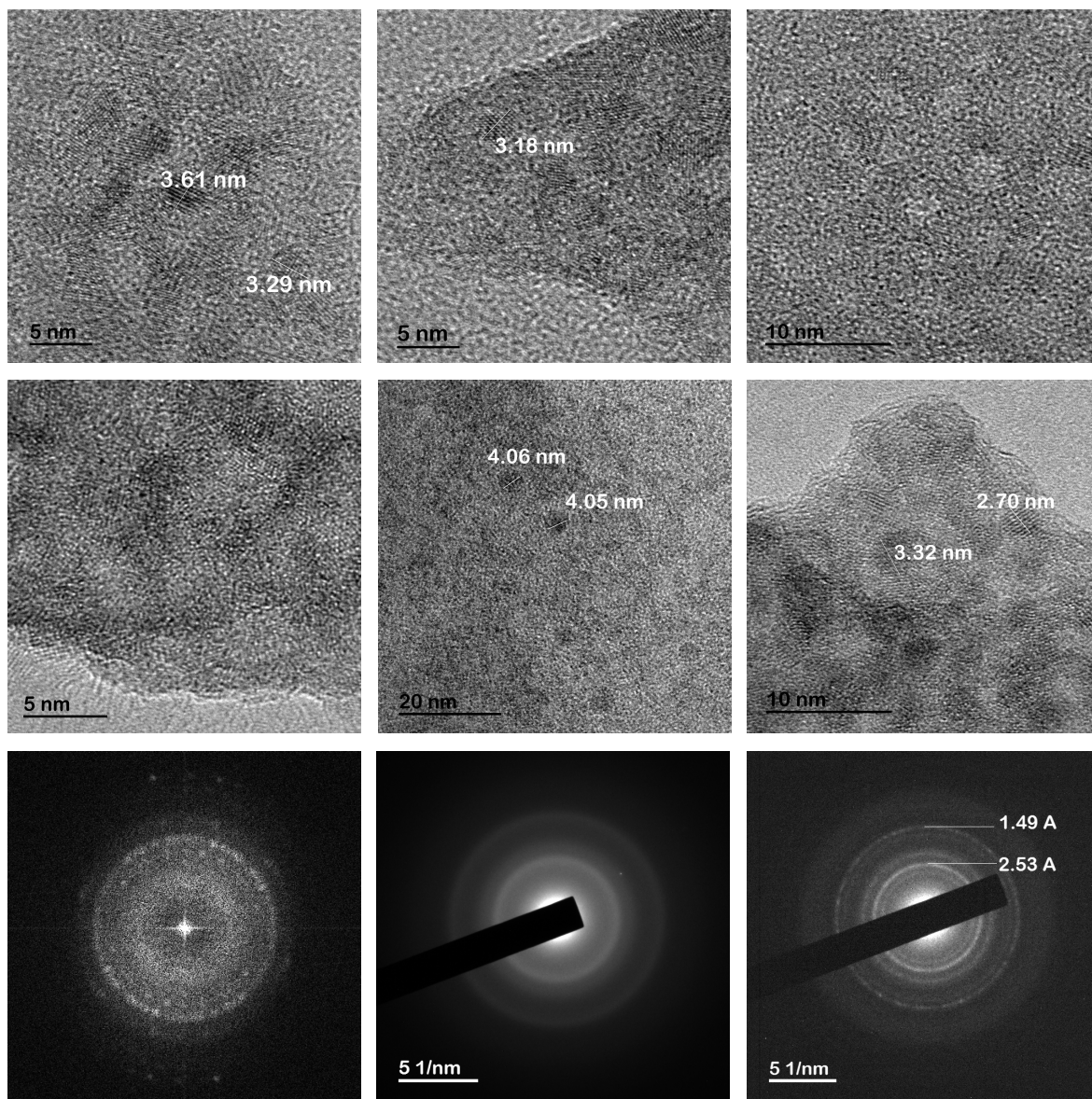


Figura DIII.3. Imágenes de HR-TEM obtenidas para diferentes síntesis de las $^{57}\text{Fe(III)}$ -NPs

Al llevar a cabo las medidas mediante HR-TEM se observó la presencia de una estructura cristalina (ver últimas 3 imágenes de la Figura DIII.3.), y por ello se decidió llevar a cabo la caracterización de las nanopartículas mediante difracción de Rayos X

de cristal. Desafortunadamente, el tamaño de los cristales era tan pequeño que no fue posible realizar el análisis del material nanoparticulado mediante esta técnica. Por ello, se decidió llevar a cabo el análisis mediante difracción de Rayos X de polvo, cuyos resultados serán descritos en el siguiente apartado.

Adicionalmente a las medidas de HR-TEM, se llevó a cabo un análisis mediante EDX, el cual mostró los elementos mayoritarios encontrados, en % atómico. Como se puede observar en la Figura DIII.4 y la Tabla DIII.1, a pesar de la limpieza aún existen restos de Na y Cl procedentes de la síntesis.

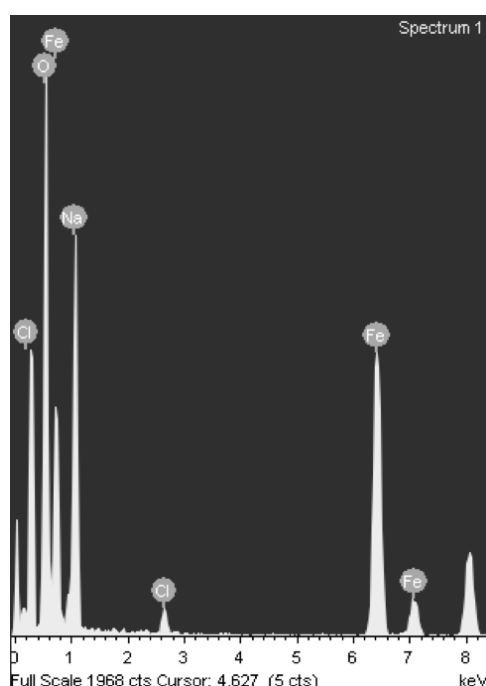


Figura DIII.4. Resultados obtenidos tras el análisis mediante EDX de las NPs sintetizadas

	O	Na	Cl	Fe
Espectro 1	63.89	21.08	1.11	13.92
Media	63.89	21.08	1.11	13.92
Desviación estándar	0.00	0.00	0.00	0.00
Máximo	63.89	21.08	1.11	13.92
Mínimo	63.89	21.08	1.11	13.92

Tabla DIII.1. Parámetros de los picos de Bragg observado en los difractogramas de las NPs sintetizadas

- *Difracción de Rayos X (XRD)*

Para confirmar la presencia de una posible estructura cristalina, se creó una pastilla de polvo de NPs (previamente molido con un mortero de ágata para conseguir un polvo más finamente dividido), y posteriormente la pastilla se montó sobre una placa que minimiza el fondo emitido. La radiación es producida por un tubo cerámico de rayos X con ánodo de Cu (foco fino) siendo la colimación conseguida mediante un juego de rendijas automáticas: divergencia, anti-scatter y recepción; que fijan el tamaño del haz en el plano ecuatorial sobre la muestra al valor de 10 mm, mientras que rendijas fijas de tipo Soller evitan divergencias superiores a 0.04 rad en el plano axial. El rango angular estudiado está comprendido entre 5° y 80° en 2θ , con paso de 0.05° y tiempo de contaje 3 s.

Una vez obtenido el difractograma, se realizó un tratamiento previo de las señales que consistió en: a) Determinación automática del fondo mediante un proceso iterativo automático [16] con parámetros de uso: factor de curvatura 2, granularidad 10 y suavizado de puntos. b) Búsqueda de picos de Bragg utilizando el método del mínimo de la segunda derivada [17] con factores de búsqueda: señal mínima sobre fondo 1%, anchura mínima-máxima-base del pico en: 0.05-0.20-0.50°. c) Ajuste de picos de Bragg mediante funciones pseudo-Voigt dobles, es decir con forma y anchura independientes en ambos lados (izquierdo y derecho) y divergencia axial [18].

A partir del listado de los parámetros posición e intensidad de los picos de Bragg, definidos según este procedimiento, se ha realizado la identificación de las fases cristalinas mediante búsqueda en la base de estructuras inorgánicas ICDD PDF-2 (descarga 2004). La comparación con las fichas cristalográficas contenidas en dicha base se ha restringido a fases con composiciones en las que sólo están presentes elementos químicos contenidos en los reactivos: cloruro de hierro(II), cloruro de sodio, tartrato de sodio, hidróxido de sodio y MOPS. Este proceso está computerizado y las fichas se ordenan a tenor de una puntuación que refleja la similitud en la posición e intensidad de los picos asociados a las reflexiones de la ficha, de modo que una puntuación del 100% indica la total semejanza entre el difractograma medido y el

esquema correspondiente al candidato, en ausencia de picos intensos distintos a los contenidos en la ficha.

Nº	Posición 2θ [°2Th.]	Intensidad I [cts·º]	Anchura β [°2Th.]	Índices de Miller
1	27.437	16.7	0.2669	1 1 1
2	31.806	203.8	0.2780	2 0 0
3	45.517	152.6	0.2161	2 2 0
4	56.562	80.5	0.1234	2 2 2
5	66.288	25.2	0.2551	4 0 0
6	75.361	59.5	0.2957	4 2 0
1	34.387	483.3	8.1328	-
2	61.924	453.4	10.3279	-

Tabla DIII.2. Parámetros de los picos de Bragg observado en los difractogramas

La Tabla DIII.2 recoge los parámetros característicos de los picos de Bragg: posición, intensidad (área) y anchura natural; que se han derivado del procedimiento de ajuste sobre el difractograma. Todos estos picos han sido identificados por la fase cristalina del cloruro de sodio, cuyos parámetros estructurales y de identificación se muestran en la Tabla DIII.3. Dado que sólo consta de una única fase macrocristalina, en la última columna de la tabla 1 se ha incluido los índices de Miller de las reflexiones asociadas a cada pico.

Nomenclatura	Sistema cristalino	Grupo de espacio	Parámetros de celda	Reflexiones identificadas	Puntuación
Cloruro de sodio	cúbico	<i>F</i> m -3 m	<i>a</i> =5.6419Å	6/6	97

Tabla DIII.3. Fases cristalinas identificadas sobre los difractogramas

La Figura DIII.5. muestra los difractogramas medidos en las antes y después del lavado. En el primer caso son claramente observables unos 6 picos de Bragg, correspondientes a una o varias fases cristalinas, sobre un fondo sinuoso compuesto por al menos dos “jorobas”, centradas en los ángulos de Bragg $2\theta = 34.4^\circ$ y 61.9° , que están asociadas a la presencia de material nanocristalino con tamaños del orden de 1 nm (estimación hecha a partir de la ecuación de Scherrer, que relaciona la anchura del pico con el tamaño cristalino). En la síntesis tras el lavado los picos de

Bragg de las fases cristalinas desaparecen, teniendo únicamente la señal de fondo proporcionada por las nanopartículas. De este modo se puede comprobar que la limpieza de las nanopartículas ha resultado efectiva.

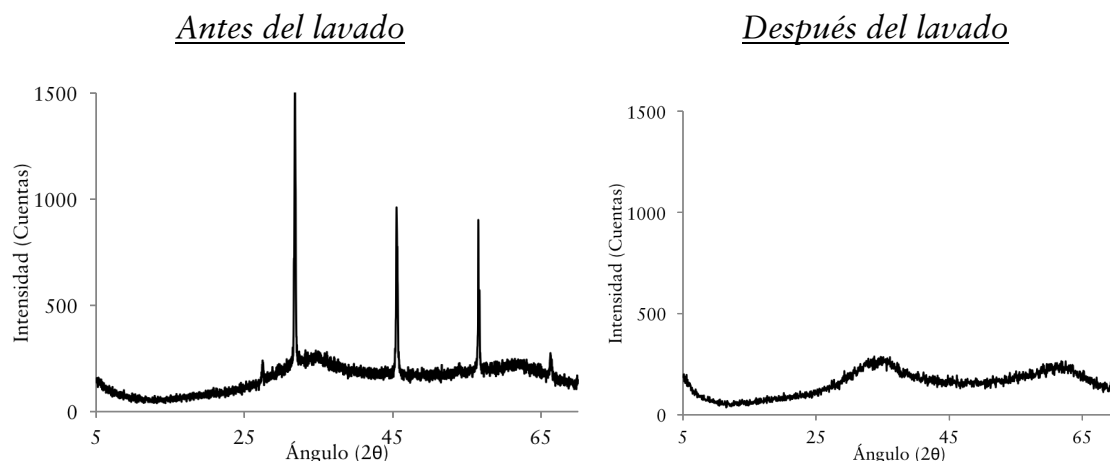


Figura DIII.5. Parámetros de los picos de Bragg observado en los difractogramas antes y después del proceso de lavado de las nanopartículas sintetizadas

- *Dynamic light scattering (DLS)*

Para las medidas mediante *dynamic light scattering DLS*, una alícuota del polvo obtenido ($^{57}\text{Fe(III)-NPs}$) fue suspendido en agua y filtrado a través de filtros de $0.44\ \mu\text{m}$ de tamaño para eliminar posibles partículas contaminantes. En el método se seleccionó que el índice de refracción del medio es $n_r = 2.85$.

Se ensayaron diferentes diluciones de las nanopartículas en agua para encontrar la óptima concentración para realizar triplicados con elevada precisión entre medidas.

Como se puede observar en la Tabla DII.4., la dilución #3 del polvo nanoparticulado fue la que condujo a menores valores del índice de polidispersión entre nanopartículas, y por tanto fue la dilución utilizada para realizar el triplicado de la muestra. No obstante, los valores del PDI obtenidos para las diferentes diluciones de la muestra fueron menores a 0.4, lo cual indica la presencia de una única población de NPs. El valor de Z promedio obtenido corresponde al diámetro de la nanopartícula,

y podría ser debido a la propia NP y a los grupos de tartrato que se encuentran unidos a su estructura, con el fin de estabilizarla en medio acuoso.

Dilución	Z promedio (diámetro en nm)	PdI
#1 (Concentrada)	139.0	0.191
	136.8	0.189
	136.2	0.165
#2 (Diluída 1:1)	155.7	0.131
	152.8	0.150
#3 (Diluída 1:10)	165.1	0.145
	170.1	0.073
	169.9	0.106

Tabla DIII.4. Diluciones ensayadas y resultados obtenidos

- *Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)*

El contenido total de ^{57}Fe contenido en las NPs sintetizadas se determinó mediante ICP-MS tras la digestión ácida del polvo nanoparticulado.

DIII.1.6. Grupos de animales ensayados

Para el estudio *in vivo*, se tomaron 9 ratas *wistar* hembra de 2 semanas de edad y se distribuyeron aleatoriamente para conformar grupos de tres ratas por cada grupo, a los cuales se les alimentó con leche fórmula con o sin fortificación *ad libitum*. Adicionalmente, para los estudios de ferritina sérica, se utilizó un grupo de alimentación materna (AM) como grupo control.

En éste estudio, el grupo *no fortificado* (NF) fue alimentado con leche fórmula y sin ningún tipo de fortificación adicional. El grupo denominado *sulfato ferroso* ($^{\text{nat}}\text{FeSO}_4$) fue alimentado con leche fórmula fortificada con sulfato ferroso (Fe(II), con abundancia isotópica natural) a baja dosis ($16 \mu\text{g } ^{\text{nat}}\text{Fe/g}$ leche en polvo), y finalmente, el grupo *nanopartículas* (^{57}Fe -NPs) fue alimentado con leche fórmula fortificada con las nanopartículas de ^{57}Fe -NPs oxo-hidróxido, a una concentración de

16 $\mu\text{g } ^{57}\text{Fe/g}$ leche en polvo en las cuales el hierro se encuentra en estado de oxidación Fe(III) o férrico.

En la Tabla DIII.5 se describen brevemente los grupos de ratas estudiados, la forma fisicoquímica en la cual se llevó a cabo la fortificación de hierro en leche, así como la dosis empleada, expresada como μg de hierro/ g de leche en polvo.

Código de grupo	Nombre del grupo	Forma fisicoquímica de Fe	Dosis de Fe administrada ($\mu\text{g Fe/g leche polvo}$)	Código de la dosis
NF	No fortificado	-	-	-
FeSO ₄	Sulfato ferroso	^{nat} FeSO ₄ (Fe ²⁺)	16	BAJA
⁵⁷ Fe-NPs	Nanopartículas	⁵⁷ Fe-NPs (Fe ³⁺)	16	BAJA

Tabla DIII.5. Grupos estudiados y alimentación suministrada

Por otro lado, la Tabla DIII.6 recoge los pesos individuales de cada una de las ratas al inicio, al final del estudio y el incremento de peso para cada uno de los grupos estudiados en el presente capítulo.

DIII.1.7. Resultados obtenidos

Caracterización de las nanopartículas (⁵⁷Fe(III)-NPs)

Las nanopartículas enriquecidas en ⁵⁷Fe sintetizadas (⁵⁷Fe-NPs) se caracterizaron mediante difracción de polvo de ICP-MS, HR-TEM, DLS y Rayos X. La Figura DIII.7 muestra las imágenes y micrografías observadas a partir del análisis HR-TEM. Las ⁵⁷Fe-NPs sintetizadas mostraron un diámetro medio de 3.6 ± 0.1 nm.

Los resultados EDX (Figura 2B) confirmaron la composición de las nanopartículas de óxido férrico (principalmente hierro y oxígeno).

El perfil de distribución de tamaños de las NPs en solución acuosa se llevó a cabo mediante DLS (véase el gráfico de la Figura DIII.8.). Se obtuvo una población única, con un diámetro hidrodinámico de 170 nm (media Z) y un índice de

polidispersidad (PDI) de 0.073, lo cual revela la presencia de una única población de nanopartículas.

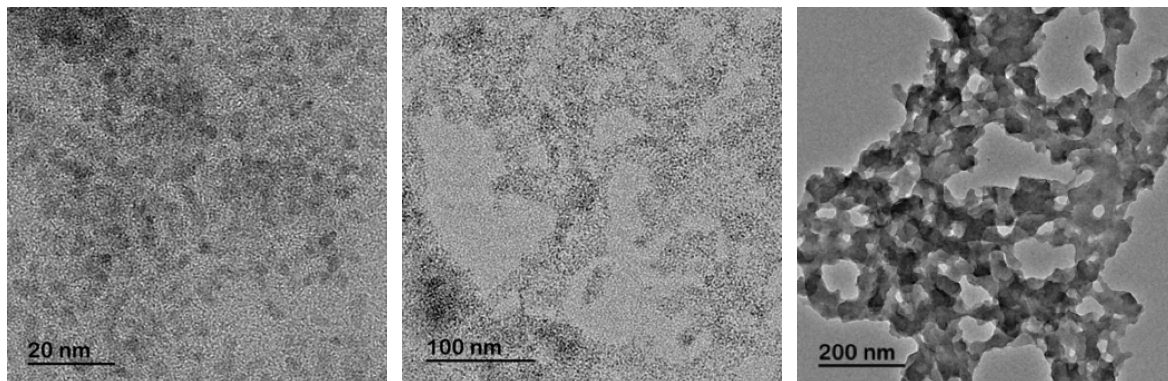


Figura DIII.7. Imágenes de TEM obtenidas para las nanopartículas sintetizadas

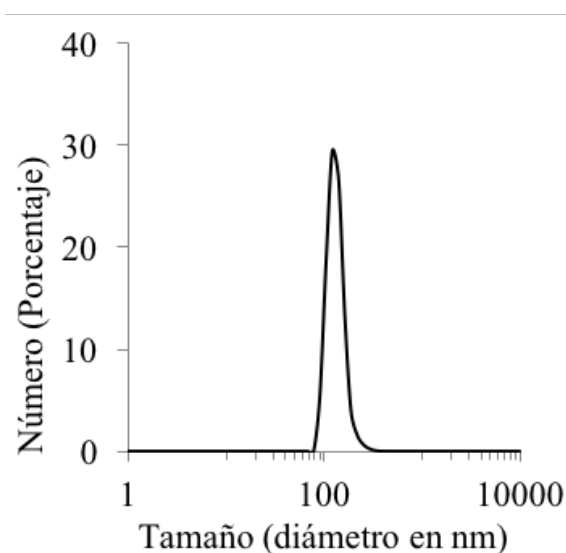


Figura DIII.8. Gráfico de DLS obtenido para las nanopartículas sintetizadas

El análisis de difracción de rayos X permitió obtener el difractograma de polvo de las nanopartículas, (Figura DIII.9.). Éste presentó dos picos amplios en los ángulos de Bragg $2\theta = 34^\circ$ y 62° , característicos de la variedad 2L de la ferrihidrita [19].

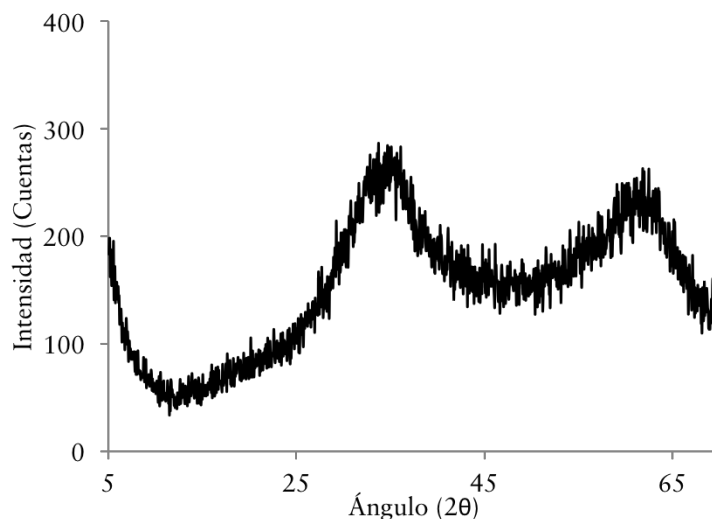


Figura DIII.9. Diffractograma de las nanopartículas sintetizadas

Finalmente, el análisis elemental de ICP-MS demostró que las ^{57}Fe -NP sintetizadas tenían una concentración de ^{57}Fe de 246.8 mg/g de NP.

Estudio in vivo

- *Absorción aparente*

El porcentaje de absorción de hierro aparente del hierro enriquecido de ^{57}Fe proveniente de las NPs utilizadas para la fortificación de la leche fórmula, se calculó de acuerdo con la siguiente expresión [1]: $[(\text{ingestión} - \text{excreción fecal})] \times 100$. Los resultados mostraron una disminución de la absorción de hierro del primer pool 1-3 días (100%), 4-11 días (98%) hasta el pool final 12-15 días (91%).

- *Cuantificación de hierro en suero (compartimiento de transporte)*

La cuantificación del contenido total de hierro en el compartimiento de transporte de hierro mostró menores niveles de hierro en el grupo no fortificado ($0.51 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$), como puede verse en la Figura DIII.10. El grupo fortificado con $^{57}\text{Fe(III)}$ -NPs presentó $2.81 \pm 0.66 \mu\text{g/g}$ y un porcentaje de ^{57}Fe de incorporación de $67 \pm 9\%$. Se encontraron valores más altos para el grupo alimentado con leche de fórmula que contenía Fe(II)SO_4 ($3.58 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$).

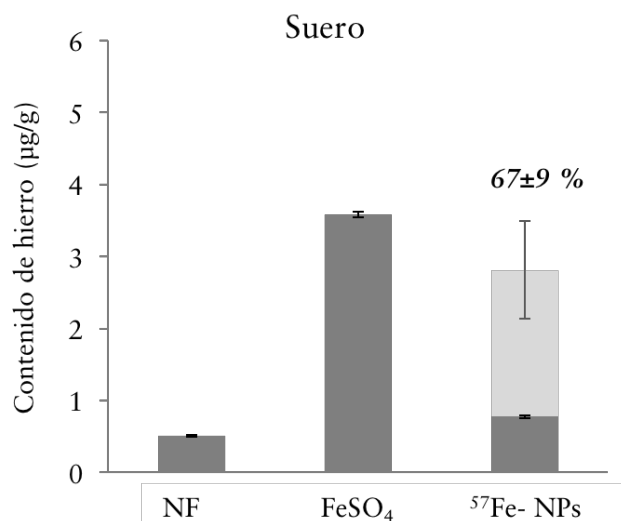


Figura DIII.10. Resultados cuantitativos del hierro endógeno (^{nat}Fe , gris oscuro) y exógeno (^{57}Fe , gris claro) (expresado en $\mu\text{g/g}$) encontrados en el suero para los grupos estudiados. El porcentaje de incorporación del ^{57}Fe se muestra encima de la columna.

- **Cuantificación de hierro en glóbulos rojos (compartimiento funcional)**

La cantidad total de hierro obtenida para el grupo no fortificado (2476 ± 164 $\mu\text{g/g}$) y el grupo alimentado con FeSO_4 (3166 ± 405 $\mu\text{g/g}$) fueron inferiores a los valores encontrados para el grupo alimentado con fórmula leche fortificada con las ^{57}Fe -NPs sintetizadas (5520 ± 187 $\mu\text{g/g}$) que presentaron una incorporación de $56\pm 4\%$ del isótopo enriquecido ^{57}Fe (exógeno) utilizado para la alimentación (véase la Figura DIII.11).

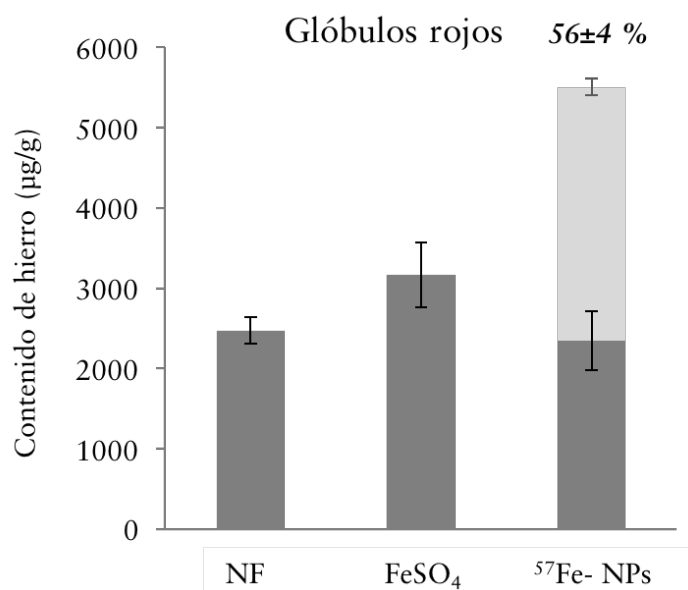


Figura DIII.11. Resultados cuantitativos del hierro endógeno (^{nat}Fe , gris oscuro) y exógeno (^{57}Fe , gris claro) (expresado en $\mu\text{g/g}$) encontrados en los glóbulos rojos para los grupos estudiados. El porcentaje de incorporación del ^{57}Fe se muestra encima de la columna.

- **Cuantificación de hierro en el hígado (compartimiento de reserva)**

Después del período estudiado, los depósitos de hierro aumentaron en los grupos que recibieron fortificación de hierro, ya sea en forma de Fe(II)SO_4 ($459\pm 41 \mu\text{g/g}$) o en forma de ^{57}Fe (III) -NPs ($368\pm 98 \mu\text{g/g}$). El grupo no fortificado presentó valores claramente más bajos de hierro total ($210\pm 47 \mu\text{g/g}$). La incorporación de hierro exógeno (^{57}Fe) en el compartimiento de almacenamiento analizado para el grupo alimentado con la fórmula fortificada con ^{57}Fe -NP fue $60\pm 11\%$ (véase la Figura DIII.12).

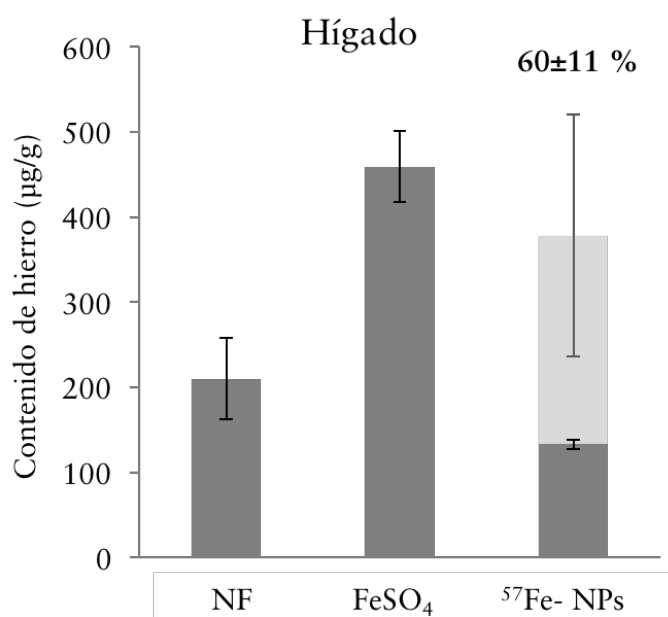


Figura DIII.12. Resultados cuantitativos del hierro endógeno (^{nat}Fe , gris oscuro) y exógeno (^{57}Fe , gris claro) (expresado en $\mu\text{g/g}$) encontrados en el hígado para los grupos estudiados. El porcentaje de incorporación del ^{57}Fe se muestra encima de la columna.

- **Concentración de ferritina en suero de rata**

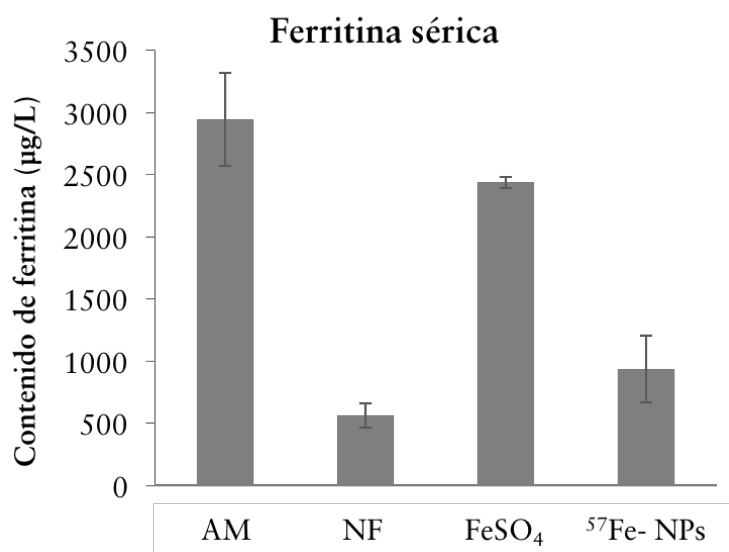


Figura DIII.13. Concentración de ferritina (expresada en µg/L) encontrada en el suero para los grupos ensayados (alimentación materna, AM, no fortificado, NF, FeSO₄ y ⁵⁷Fe-NPs) utilizando la técnica ELISA.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de ferritina en suero en los diferentes grupos investigados, se representan gráficamente en la Figura DIII.13. Claramente, los niveles más altos corresponden al grupo materno (MF) analizado (2945±376 µg/L). Para el estudio del grupo alimentado con hierro en forma de Fe(II)SO₄ se obtuvieron 2440±45 µg/L, mientras que en el grupo alimentado con nanopartículas ⁵⁷Fe(III)-NPs se encontraron niveles inferiores de ferritina 939±268 µg/L. El grupo que no recibió fortificación con hierro (NF) mostró los niveles más bajos de ferritina en suero (562±98 µg/L).

DIII.1.8. Discusión de los resultados

Caracterización de las nanopartículas (⁵⁷Fe(III)-NPs)

A partir de los resultados obtenidos mediante HR-TEM, se obtuvo un tamaño de 3.6±0.1 nm para el diámetro de las NPs sintetizadas (ver Figura DIII.7.). Dicho valor concuerda con el encontrado en la síntesis propuesta por Powell et al. [15], donde se informó un tamaño promedio entre 2-4 nm. Las mediciones DLS se usan típicamente para determinar el perfil de distribución de tamaños de partículas pequeñas en suspensión o polímeros en solución expresado como diámetro en

nanómetros. La población observada en nuestras medidas de DLS (ver Figura DIII.8.) mostraron una única población de NPs con una distribución estrecha (0.073 PdI) centrada en 170 nm (diámetro), formada por nanopartículas rodeadas de grupos tartrato estabilizándolas en medio acuoso [20].

Con respecto a la composición química observada, el patrón de difracción de polvo de rayos X de las nanopartículas sintetizadas (ver Figura DIII.9.) confirmó la presencia de pequeños nanocristales, centrados en dos ángulos de Bragg que son típicos de la variedad ferrihidrita 2-L, indicando que las NPs sintetizadas presentan un núcleo mineral similar a ferrihidrita, que es una estructura similar a la encontrada en ferritina [19]. Un microanálisis por Rayos X de energía dispersiva (EDX), de las mismas NPs permitió la detección y la cuantificación relativa de los elementos que constituyen las nanopartículas metálicas. Los resultados de EDX (en la Figura DIII.4) confirmaron la composición esperada de las nanopartículas de oxohidróxido férrico (principalmente Fe y O). La cuantificación elemental se realizó usando la ICP-MS y los resultados determinaron el contenido de ^{57}Fe en el polvo nanoparticulado (246.8 mg ^{57}Fe / g de NP).

Generalmente, la ferritina se caracteriza por una arquitectura esférica hueca bien definida con diámetros interior y exterior de 8 y 12 nm respectivamente [6], pero a pesar de esa diferencia de tamaño con respecto a nuestras NPs sus propiedades funcionales podrían ser similares. Lo que conduce a un aumento de la biodisponibilidad de hierro [15]. En otras palabras, las NPs sintetizadas podrían tener efectos beneficiosos en la prevención de la anemia por deficiencia de hierro sin el efecto secundario indeseable (induciendo el ciclo redox en el tracto gastrointestinal).

Estudio in vivo

- *Absorción aparente*

De acuerdo con el metabolismo del hierro, la absorción de hierro tiene lugar en el duodeno y la parte superior del yeyuno a través de los enterocitos, gracias al transportador de metal divalente 1 (DMT1, un miembro del grupo portador de transporte de proteínas de membrana) que facilita la transferencia de hierro a través

de las células epiteliales intestinales. Como el cuerpo carece de un mecanismo definido para la excreción activa del hierro, la regulación de su absorción desde el duodeno desempeña un papel crítico en la homeostasis del hierro en el cuerpo. La mucosa intestinal responde a los cambios en las reservas de hierro corporal, la hipoxia tisular y la demanda de hierro, y altera la absorción en consecuencia: la absorción aumenta cuando existe una deficiencia de hierro y se reduce cuando existe una sobrecarga de hierro.

El exógeno ^{57}Fe encontrado en las heces, durante el período de 14 días de fortificación, reveló un aumento de la excreción de ^{57}Fe a partir del día 4 en (hasta el final del período estudiado). Es decir, que la excreción de ^{57}Fe se vuelve más alta que la excreción del $^{\text{nat}}\text{Fe}$ (endógeno) después del cuarto día de fortificación.

Por otro lado, los resultados sobre la absorción aparente de ^{57}Fe mostraron una ligera disminución de la absorción de hierro desde los primeros días hasta el final del estudio (91%). En estudios anteriores ([1] y el estudio descrito en el Capítulo DII) que utilizaron Fe (II) como FeSO_4 y Fe (III) como complejo $\text{Fe}_2\text{-Lf}$ (Lactoferrina) en diferentes dosis (la dosis de hierro recomendada para la fortificación con leche de fórmula: 60 g de Fe/g de leche en polvo y una dosis más baja: 16 g de Fe/g de leche en polvo), se observó una disminución más abrupta de la absorción intestinal de hierro cuando se administró hierro a dosis más altas (86%), mientras que dosis menores resultaron en una menor disminución de la absorción intestinal de hierro (98%). Estos resultados sugirieron que la absorción de hierro estaba directamente relacionada con la dosis: cuanto mayor es la dosis de Fe, más rápidamente se saturan los receptores de hierro y por lo tanto la absorción disminuye, lo cual parecía no estar tan relacionado con la forma fisicoquímica utilizada para la fortificación de la leche. Pero a partir de los resultados obtenidos con las nanopartículas ensayadas, se puede sugerir que la forma fisicoquímica del Fe podría ser también un factor relevante que afecte la absorción aparente de hierro. A pesar de esto, la absorción aparente de hierro desde las NPs ensayadas fue similar a la observada para FeSO_4 . Este hecho está de acuerdo con lo que otros autores ya han propuesto: la absorción de hierro a partir de suplementos con estructura de ferritina [9,15] presentan una absorción similar a

FeSO₄, pero nuestro trabajo también señala la importancia de la dosis sobre la forma fisicoquímica administrada en el fortificante, con respecto a la absorción de hierro.

- *Cuantificación de hierro en suero (compartimiento de transporte)*

El hierro se llega a los tejidos a través de la transferrina, un transportador que captura el hierro liberado en el torrente sanguíneo, principalmente a partir de enterocitos intestinales o macrófagos reticuloendoteliales. La ausencia de ingesta de hierro produce una disminución de la concentración del metal en el compartimiento de transporte de hierro. Como era de esperar, se obtuvieron los valores de Fe más bajos en suero para el grupo no fortificado (0.51 ± 0.01 µg/g, véase la Figura DIII.10). Por el contrario, los valores encontrados en el grupo alimentado con ⁵⁷Fe(III)-NPs (2.81 ± 0.66 µg/g) y en el grupo alimentado con Fe(II)SO₄ (3.58 ± 0.04 µg/g), confirmaron una vez más que la forma fisicoquímica de Fe utilizada puede afectar la cantidad final de hierro que se encuentra en el suero: en nuestro caso, la fortificación con Fe(II)SO₄ condujo a mayores niveles séricos que la fortificación con ⁵⁷Fe(III)-NPs.

Con respecto a la incorporación en suero del isótopo de hierro enriquecido utilizado para la fortificación (⁵⁷Fe exógeno), el grupo alimentado con ⁵⁷Fe(III)-NPs presentó una incorporación de $67 \pm 9\%$. Se obtuvieron porcentajes similares de incorporación de Fe para el Fe(II)SO₄ en estudio anteriores (Ver [1] y Capítulo DII) independientemente de la dosis administrada (en los grupos alimentados con dosis bajas fue similar al observado para la dosis recomendada (alta concentración), 69%), y ambos fueron más altos que los observados para el complejo ⁵⁷Fe(III)₂-Lf (57%). De los resultados de comparación entre las diferentes opciones de fortificación de hierro, se puede concluir que la rotación de hierro depende de la forma fisicoquímica administrada más que la dosis utilizada, y también que la rotación de hierro de las NPs ensayadas es comparable a la observada para el FeSO₄ (típicamente utilizado) y superior a la observada para el complejo ⁵⁷Fe(III)₂-Lf.

- *Cuantificación de hierro en glóbulos rojos (compartimiento funcional)*

Los glóbulos rojos (RBCs) en circulación (torrente sanguíneo) contienen aproximadamente el 80% del hierro corporal total que se emplea en las funciones

corporales diarias. Los valores más bajos de hierro circulante se encontraron en el grupo no fortificado (NF: 2476 ± 164 $\mu\text{g/g}$), este valor muestra la importancia de la fortificación / suplementación con hierro para cumplir los requerimientos corporales en el compartimento funcional. Los valores bajos encontrados en los glóbulos rojos para el grupo NF corresponden a una ingesta inadecuada de hierro por los alimentos y la liberación del hierro del compartimento de depósito, ya sea porque la tasa de liberación desde el almacén no es suficiente para cubrir los requisitos en el compartimento funcional, o quizás porque el almacén posee también bajos niveles y su liberación no es suficiente para cumplir los requisitos de hierro con el fin de mantener el equilibrio de hierro en el cuerpo.

En cuanto a la forma fisicoquímica utilizada para la fortificación, se observa que el grupo alimentado con $^{57}\text{Fe(III)}$ -NPs conduce a mayores niveles de hierro total en los hematíes (5520 ± 187 $\mu\text{g/g}$) que el grupo alimentado con leche fórmula fortificada con Fe(II)SO_4 (3166 ± 405 $\mu\text{g/g}$, véase la Figura DIII.11). Estos resultados demuestran claramente que la fortificación de la leche con NPs de hierro aumenta los niveles de hierro en el compartimento funcional más que el Fe(II)SO_4 (cuando se administra a la misma dosis).

La incorporación de hierro exógeno (^{57}Fe) en los glóbulos rojos cuando las ratas fueron alimentadas con leche de fórmula fortificada con ^{57}Fe (III) en forma nanoparticulada, fue de $56 \pm 4\%$. Esta incorporación de ^{57}Fe fue menor en los grupos previamente ensayados (Capítulo DII) en diferentes formas fisicoquímicas como Fe(II) o Fe(III) (que fue alrededor del 50%), lo que revela que las nanopartículas ensayadas conducen a niveles de incorporación más altos para el hierro ingerido. En otras palabras, la rotación de hierro (la tasa de incorporación) de las nanopartículas sintetizadas es más alta que la de otras formas físico-químicas administradas a la misma dosis y similares a las encontradas para la dosis más alta (recomendada). Por lo tanto, además parece que la rotación de hierro está más relacionada con la dosis administrada que con la forma fisicoquímica utilizada para la fortificación de hierro, las NPs ensayadas mostraron un aumento de la rotación de hierro en el

compartimento funcional, lo que sugiere que podría seguir un metabolismo interno diferente.

Según el metabolismo del hierro, las especies de Fe(III) pueden necesitar una reducción a Fe(II) antes de su incorporación, comprometiendo su absorción. Esta reducción no parece tener lugar con las NPs sintetizadas con una estructura de ferrihidrita modificada [15]; de hecho, tales resultados en ratones apoyan fuertemente la captación directa de nano Fe(III) por los enterocitos como un mecanismo eficiente de adquisición de hierro dietético, que puede complementar la vía conocida de absorción de Fe(II) / DMT1 [21]. Esta observación también puede ser apoyada por nuestros resultados, que muestran una mayor incorporación de $^{57}\text{Fe(III)}$ cuando se utilizan las NPs para llevar a cabo la fortificación de hierro en leche de fórmula. Este hecho es realmente prometedor para mejorar la biodisponibilidad de Fe en suplementos puesto que con niveles más bajos de fortificación de Fe, se puede ver (Figura DIII.11) que hay un mayor porcentaje de incorporación del hierro exógeno utilizado para la alimentación, dando lugar a mayores niveles de circulación hierro.

- *Cuantificación de hierro en el hígado (compartimiento de reserva)*

Las células también pueden almacenar y desintoxicar el exceso de hierro intracelular en el citosol dentro de la ferritina, una proteína de depósito que proporciona, como dijimos, un espacio de almacenamiento de hasta 4500 iones de Fe(III). El hierro almacenado dentro de la ferritina se considera biodisponible y puede movilizarse para fines metabólicos durante su rotación lisosomal. En este compartimento de almacenamiento, los depósitos totales de hierro observados para ambos grupos fortificados que recibieron hierro en forma de Fe(II)SO_4 (459 ± 41 $\mu\text{g/g}$) o en forma nanoparticulada como $^{57}\text{Fe(III)-NPs}$ (368 ± 98 $\mu\text{g/g}$) fueron más altos que los típicamente observados para el grupo que recibió la alimentación materna (alrededor de 300 $\mu\text{g/g}$), lo que reveló que la dosis propuesta en el experimento (16 g de hierro/g de leche en polvo en lugar de la recomendada 60 g de hierro/g de leche en polvo) fue suficiente para cubrir los requerimientos de hierro del organismo, permitiendo el almacenamiento de exceso de hierro ingerido, en caso de necesidades posteriores. Además, como se esperaba, el grupo no fortificado presentó valores más

bajos ($210 \pm 47 \mu\text{g/g}$); lo cual indica una liberación de hierro de las reservas de hígado para suministrar hierro para ser utilizado en las funciones metabólicas.

Cuando se comparan estos resultados con los reportados inicialmente para la misma dosis de hierro (Capítulo DII), parece que esta fortificación basada en NPs conlleva niveles más altos de almacenamiento de hierro, cercano a los descritos para las dosis más altas de Fe(II), Es decir, las NPs producen una absorción de hierro mejorada que da como resultado un almacenamiento eventual de Fe en el hígado.

Con el fin de desentrañar las vías de hierro dentro del organismo, la medición de la incorporación exógena de hierro (^{57}Fe) en el compartimiento de almacenamiento puede proporcionar pistas sobre la forma en que el hierro ingerido se absorbe y luego se almacena. Para el grupo de ratas alimentado con las nanopartículas ensayadas (^{57}Fe -NPs), la incorporación fue de $60 \pm 11\%$, claramente superior a los valores de incorporación encontrados en estudios previos para la misma dosis de hierro, pero administrados en diferentes formas fisicoquímicas (alrededor del 20%), pero similares a los obtenidos usando la dosis más alta probada de $^{57}\text{Fe(II)SO}_4$ (alrededor del 75%) [1]. Es decir, usando dosis inferiores de hierro en la forma de tales NPs en la fortificación de leche de fórmula, tanto los niveles de hierro total como los porcentajes de incorporación de hierro exógenos en el hígado son más altos que los observados usando otras formas fisicoquímicas de Fe utilizadas para la fortificación leche de fórmula.

De los resultados encontrados en el capítulo anterior, se podría concluir que el almacenamiento de hierro en el hígado es mayor cuando se administra a dosis más altas (es decir, está relacionado con la dosis), pero con las nanopartículas sintetizadas se han obtenido mayores niveles de incorporación del hierro exógeno administrado, incluso utilizando una dosis baja de hierro. Este hecho significa que con dosis inferiores de hierro estas NPs son capaces de lograr no sólo un aumento de los niveles de hierro, sino que también lo realizan más rápido que el uso de otras formas físico-químicas de Fe a la misma dosis. Estos resultados revelan que el mecanismo de incorporación de hierro de las NPs ensayadas podría ser diferente a las otras formas físico-químicas, favoreciendo su incorporación dentro del cuerpo. Este hecho fue

sugerido previamente después de estudiar el compartimento funcional y revela que ambos compartimentos están, más probablemente, íntimamente relacionados.

- *Concentración de ferritina en suero de rata*

El estudio de los niveles de hierro se utiliza comúnmente en diferentes laboratorios para el diagnóstico de trastornos relacionados con el hierro. La evaluación del estado de hierro mediante medidas en el laboratorio se basa típicamente en la medición de cinco parámetros en el suero: hierro, ferritina, transferrina, saturación de transferrina y receptor soluble de transferrina [22]. En particular, los niveles séricos de ferritina disminuyen generalmente en caso de deficiencia de hierro, mientras que aumentan ante sobrecargas de hierro, revelando su estrecha relación con los depósitos de hierro en el hígado. Sin embargo, la interpretación de los valores de hierro puede ser confusa ya que se ven afectados por la terapia con hierro y la respuesta en fase aguda. En este trabajo hemos intentado relacionar si los niveles más bajos de ferritina sérica estaban directamente relacionados con niveles bajos de hierro total en suero o en el hígado.

El intervalo normal de referencia de ferritina tiene un amplio rango debido a las variaciones de edad y género (los niños suelen tener menor concentración de ferritina que los adultos). En adultos, una concentración de ferritina sérica inferior a 12-15 $\mu\text{g/L}$ indica siempre reservas de hierro agotadas y es evidencia de la disminución de hierro en el organismo con o sin anemia. El rango típico para recién nacidos oscila entre 90-628 $\mu\text{g/L}$ de ferritina, mientras que en la sobrecarga de hierro la concentración sérica de ferritina puede ir hasta 4000 $\mu\text{g/L}$. Aparte de eso, se ha reportado una concentración sérica de ferritina de hasta 400000 $\mu\text{g/L}$, tanto en niños como en adultos [22]. En el plasma de rata, los niveles séricos de ferritina están típicamente entre 500 y 1300 $\mu\text{g/L}$ [23].

En la Figura DIII.13. se han representado los niveles de ferritina en suero de rata obtenidos en este trabajo para los grupos estudiados: el grupo materno, AM (2945 ± 376 $\mu\text{g/L}$), el grupo fortificado con Fe(II)SO_4 (2440 ± 45 $\mu\text{g/L}$), el grupo no fortificado, NF (562 ± 98 $\mu\text{g/L}$) los cuales coincidieron bien con las diferencias

observadas en el contenido de hierro observado para las correspondientes muestras de suero. Sin embargo, el grupo alimentado con las nanopartículas enriquecidas con ^{57}Fe presentaron valores notablemente inferiores de ferritina en suero ($939\pm 268\ \mu\text{g/L}$), incluso si esperábamos encontrar niveles similares a los del grupo alimentado con sulfato ferroso. El grupo alimentado con los Fe-NPs estudiados debe tener menores reservas de hierro (debido a que sus niveles de ferritina en el suero fueron menores, similares a los encontrados en el grupo no fortificado). Sin embargo, el contenido de hierro en los tres compartimentos de hierro estudiados (funcional, transporte y almacenamiento) parece apropiado (incluso a veces más alto que en el grupo materno). A pesar del alto número de artículos que evalúan y recomiendan el uso de ferritina sérica como marcador del estado físico del hierro, la idoneidad de tal medida de ferritina en la detección de la deficiencia de hierro es cuestionada por nuestros resultados y por otros autores [22].

DIII.1.9. Conclusiones

El metabolismo del hierro a partir de las nanopartículas de oxo-hidróxido de Fe(III) en la fortificación de leche de fórmula se ha estudiado cuantitativamente utilizando un isótopo estable en hierro (^{57}Fe) y la determinación del contenido de hierro en los diferentes compartimentos se llevó a cabo mediante la medida por ICP-MS y la aplicación de la herramienta matemática de deconvolución de perfiles isotópicos (IPD).

La absorción aparente de ^{57}Fe exógeno (calculada a partir de la excreción de ^{57}Fe) al final del estudio para las nanopartículas de $^{57}\text{Fe(III)-NPs}$ ensayadas, fue del 91%, como se esperaba considerando la mayor absorción de hierro de la ferritina (con similitudes estructurales con las NPs ensayadas) ya informada por otros autores [6,9]. La absorción aparente de hierro se asoció previamente con la dosis administrada: cuanto mayor es la dosis de Fe, más rápidamente se saturan los receptores de hierro y, por lo tanto, la absorción de ^{57}Fe disminuye más rápidamente al final del estudio. Sin embargo, los resultados de las NPs de hierro ensayadas han sugerido que puede estar relacionado también con la forma fisicoquímica administrada. Es decir, las nanopartículas sintetizadas podrían saturar el receptor de hierro más rápidamente,

por lo que la absorción de ^{57}Fe disminuye al final del estudio más que otras formas físico-químicas en la misma dosis.

El estado de hierro en el cuerpo se evaluó analizando el contenido de hierro en diferentes compartimentos de hierro (como el transporte, funcional y de almacenamiento). El uso del isótopo enriquecido de hierro (^{57}Fe) como trazador en las NPs utilizadas para la fortificación de leche fórmula, permitió detectar el hierro exógeno (^{57}Fe) incorporado en eritrocitos, suero y hígado de rata, es decir, la porción de hierro exógeno (usada para fortificación de leche) que es absorbida y usada en funciones metabólicas (es decir, es biodisponible desde las NPs). El hierro exógeno ^{57}Fe (utilizado en la alimentación) se incorporó en todos los compartimentos estudiados siempre en un porcentaje superior al 56% (respecto al total encontrado). Además, la incorporación observada en el hígado fue mayor que la de otras formas físico-químicas ensayadas. Es decir, la fortificación con forraje de leche con las NPs de hierro ensayadas conduce a niveles de Fe más altos de incorporación en el compartimento de almacenamiento (hígado) cuando se administra a la misma dosis de Fe (inferior a la recomendada). En cualquier caso, las NPs estudiadas ofrecen una buena alternativa para la fortificación/suplementación con hierro en la leche, teniendo en cuenta la elevada tasa de incorporación de ^{57}Fe exógeno.

A la luz de los resultados de la ferritina sérica obtenidos en este trabajo, su uso como biomarcador único del estado físico del hierro es cuestionable (en algunos casos se necesita un análisis adicional para dilucidar si hay deficiencia de hierro).

A pesar de la absorción de hierro de las nanopartículas sintetizadas no mostró diferencias estadísticamente comparables con la absorción de hierro cuando se fortificó como sulfato ferroso (a la misma dosis), se puede ver a partir de los resultados que el isótopo enriquecido ^{57}Fe utilizado para la fortificación de leche fórmula se ha incorporado de manera más eficiente en los tres principales compartimentos de hierro analizados (funcional, de transporte y de almacenamiento) con un mayor volumen de intercambio que otras formas físico-químicas ya estudiadas. Es decir, los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados previamente por otros autores: la absorción de hierro a partir de los ^{57}Fe -NPs evaluados es similar a su absorción a

partir del sulfato ferroso [9,21], pero la biodisponibilidad (distribución en todo el cuerpo y uso para funciones metabólicas) a partir de esta estructura nanoparticulada es mayor que la observada a partir del sulfato ferroso (al igual que sucede con la ferritina [6]).

Para concluir, se ha demostrado que el rápido intercambio de hierro observado de las ^{57}Fe -NPs ensayadas las convierte en una alternativa eficaz para ser utilizada en fortificación de leche de fórmula con mayor biodisponibilidad que la de las especies convencionales actualmente en uso (FeSO_4).

DIII.1.10. Referencias bibliográficas

- ¹ H González-Iglesias, ML Fernández-Sánchez, JB López-Sastre and A Sanz-Medel. *Nutritional iron supplementation studies based on enriched ⁵⁷Fe, added to milk in rats, and isotope pattern deconvolution-ICP-MS analysis*. Electrophoresis, 33 (2012) 2407-15. doi:10.1002/elps.201100334.
- ² F Pizarro, M Olivares, E Maciero, G Krasnoff, N Cócara, and D Gaitan. *Iron absorption from two milk formulas fortified with iron sulfate stabilized with maltodextrin and citric acid*. Nutrients, 7:11(2015) 8952-9. doi:10.3390/nu7115448.
- ³ MG Zariwala, S Somavarapu, S Farnaud and D Rensha. *Comparison study of oral iron preparations using a human intestinal model*. Sci Pharm, 81:4 (2013) 1123-1139. doi:10.3797/scipharm.1304-03.
- ⁴ S Chamorro, L Gutiérrez, MP Vaquero, D Verdoy, G Salas, Y Luengo, A Brenes and FJ Terán. *Safety assessment of chronic oral exposure to iron oxide nanoparticles*. Nanotechnology, 26:20 (2015) 205101 (11p) doi:10.1088/0957-4484/26/20/205101.
- ⁵ B Sachdeva, R Kaushik, S Arora, and Kapila. *Bioavailability of iron in multiple fortified milk*. J Food Sci Technol, 52:9(2015) 6017-23. doi:10.1007/s13197-015-1711-9.
- ⁶ R Yang, Z Zhou, G Sun, Y Gao and J Xu. *Ferritin, a novel vehicle for iron supplementation and food nutritional factors encapsulation*. Trends Food Sci Tech, 44:2 (2015) 189-200. doi:10.1016/j.tifs.2015.04.005.
- ⁷ T deVries. *Dual iron containing nutritional supplement* (2003) Patent US 6521247 B1 (checked online via Google Patents: <https://www.google.ch/patents/US6521247>).
- ⁸ P Arosio and S Levi. *Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage*. Free Radic Biol Med, 33:4 (2002) 457-63. doi:10.1016/s0891-5849(02)00842-0.
- ⁹ B Lönnerdal, A Bryant, X Liu, EC Theil. (2006). *Iron absorption from soybean ferritin in nonanemic women*. Am J Clin Nutr, 83:1 (2006) 103-7.
- ¹⁰ DB Kell and E Pretorius. *Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells*. Metallomics, 6 (2014) 748-73. doi:10.1039/c3mt00347g.
- ¹¹ M Martín, A Rodríguez-Nogales, V Garcés, N Gálvez, L Gutiérrez, J Gálvez, D Rondón, M Olivares and JM Dominguez-Vera. *Magnetic study on biodistribution and biodegradation of oral magnetic nanostructures in the rat gastrointestinal tract*. Nanoscale, 8 (2016) 15041-7. doi: 10.1039/C6NR04678A.
- ¹² EK Schlachter, HR Widmer, A Bregy, T Lönnfors-Weitzel, I Vajtai, N Corazza, VJP Bernau, T Weitzel, P Mordasini, J Slotboom, G Herrmann, S Bogni, H Hofmann, M Frenz and M Reinert. *Metabolic pathway and distribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: in vivo study*. Int J Nanomedicine, 6 (2011) 1793–1800. doi:10.2147/IJN.S23638.
- ¹³ F Rohner, FO Ernst, M Arnold, M Hilbe, R Biebing, F Ehrensperger, SE Pratsinis, W Langhans, RF Hurrell and MB Zimmermann. *Synthesis, characterization, and bioavailability in rats of ferric phosphate nanoparticles*. J Nutr, 137:3 (2007) 614-9.

- ¹⁴ M Zimmermann, F Rohner, F Ernst, R Biebing, F Ehrensperger, S Pratsinis and R Hurrell, R. *Synthesis, characterization and bioavailability of ferric phosphate nanoparticles*. Fed Am Soc Exp Biol, 21:6 (2007). A1113-4.
- ¹⁵ JJ Powell, SFA Bruggaber, N Faria, LK Poots, N Hondow, TJ Pennycook, GO Latunde-Dada, RJ Simpson, AP Brown and DIA Pereira. *A nano-disperse ferritin-core mimetic that efficiently corrects anemia without luminal iron redox activity*. Nanomedicine: NBM, 10:7 (2014) 1529-38. doi: 10.1016/j.nano.2013.12.011.
- ¹⁶ EJ Sonneveld and JW Visser. *Automatic collection of powder data from photographs*. J Appl Cryst, 8 (1975) 1-7. doi:10.1107/S0021889875009417.
- ¹⁷ A Savitzky and MJE Golay. *Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures*. Anal Chem, 36:8 (1964) 1627-39. doi:10.1021/ac60214a047.
- ¹⁸ LW Finger, DE Cox and AP Jephcoat. *A correction for powder diffraction peak asymmetry due to axial divergence*. J Appl Cryst, 27 (1994) 892-900. doi:10.1107/S0021889894004218.
- ¹⁹ U Schwertmann and RM Cornell. *Iron Oxides in the Laboratory*. (2nd ed.) Wiley VCH Germany, (2000) ISBN: 978-3-527-29669-9.
- ²⁰ EJ Cho, H Holback, KC Liu, SA Abouelmagd, J Park, Y Yeo. *Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies*. Mol Pharm, 10:6 (2013) 2093-110. doi:10.1021/mp300697h.
- ²¹ GO Latunde-Dada, DIA Pereira, B Tempest, H Ilyas, AC Flynn, MF Aslam, RJ Simpson and JJ Powell. *A nanoparticulated ferritin-core mimetic is well taken up by HuTu 80 duodenal cells and its absorption in mice is regulated by body iron*. J Nutr, 144:12 (2014) 1896-902. doi:10.3945/jn.114.201715.
- ²² World Health Organization, Centers for Disease Control and Prevention (2007). *Assessing the iron status of populations*. (2nd ed.). WHO Press, World Health Organization, Switzerland. ISBN: 978 92 4 1596107.
- ²³ FM Zuyderhoudt, W Boers, C Linthorst, GC Jörning and P Hengeveld. *An enzyme-linked immunoassay for ferritin in human serum and rat plasma and the influence of the iron in serum ferritin on serum iron measurement, during acute hepatitis*. Clin Chim Acta, 88:1 (1978) 37-44.

DIII.2. METABOLISMO DEL HIERRO DESDE LECHEs FÓRMULA FORTIFICADAS CON NANOPARTÍCULAS DE HIERRO

DIII.2.1. Introducción

El ciclo biológico del hierro y las principales especies de hierro involucradas en éste regulan íntimamente los niveles de hierro en el organismo, teniendo en cuenta su absorción, su almacenamiento intracelular y su uso en diferentes procesos biológicos [1]. Debido a la insolubilidad del hierro y a la posible toxicidad en condiciones fisiológicas, algunas especies químicas particulares participan en su adquisición, transporte y almacenamiento en forma de especies no tóxicas [2]. Como se comentó anteriormente, en el ambiente extracelular del cuerpo humano, el hierro se encuentra principalmente como unido a la transferrina y el hierro intracelular como ferritina o como unido a la hemoglobina en los eritrocitos [1]. Estas tres especies de hierro (hemoglobina, transferrina y ferritina) son las principales especies metabólicas de hierro que se encuentran en los tres compartimentos de hierro corporal: funcional, de transporte y de almacenamiento, respectivamente [2,3]

Sin embargo, a pesar de la importancia de algunas metaloespecies, la cuantificación del contenido de metal que contienen y su propia identificación en sistemas biológicos puede ser una tarea analítica difícil que depende en gran medida de nuestra capacidad para distinguir entre las diferentes formas químicas de un elemento dado [4], así como en la instrumentación disponible para llevar a cabo las medidas. Con el objetivo de estudiar el metabolismo del hierro desde las nanopartículas sintetizadas en la primera parte del presente capítulo, se realizó la especiación de hierro en las muestras correspondientes a los tres compartimentos del

hierro (eritrocitos, suero e hígado) mediante HPLC. Para llevar a cabo la cuantificación del hierro presente en cada compartimento se utilizó la metodología de HPLC-ICP-MS e IPD post-columna explicada en el capítulo anterior.

DIII.2.2. Objetivos parciales

En este estudio, se investigó el metabolismo del hierro cuando se administró como $^{57}\text{Fe(III)}$ -NPs considerando el modelo de tres compartimentos para el hierro en el cuerpo humano: funcional, transporte y almacenamiento, con la cuantificación de las principales especies de hierro en cada uno de los compartimentos: hemoglobina en el compartimento funcional (eritrocitos), transferrina en el compartimento de transporte (suero) y ferritina en el compartimento de almacenamiento (hígado).

La cuantificación del hierro endógeno (Fe natural) y exógeno (^{57}Fe) se calcularon aplicando la metodología de deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) post columna, tal y como se explicó en el capítulo anterior. Los resultados obtenidos para el grupo alimentado con leche de fórmula suplemento con ^{57}Fe -NPs se compararon con el grupo que recibió leche fórmula sin fortificación (NF), y con otro grupo alimentado con leche de fórmula fortificada con FeSO_4 .

Dicho objetivo global fue abordado a través de las siguientes *etapas*:

- Aplicación de la metodología validada en el capítulo anterior para la especiación de hierro endógeno ($^{\text{nat}}\text{Fe}$) y exógeno (^{57}Fe) en muestras reales de todos los grupos ensayados.
- Comparación de los resultados obtenidos en el grupo de NPs con el grupo no fortificado (NF) y el fortificado con FeSO_4 a la misma dosis.

DIII.2.3. Empleo de IPD y optimización de condiciones

Al igual que en la segunda parte del capítulo anterior (Sección DII.2), las muestras (pre-tratadas según el procedimiento requerido) que contienen Fe natural y exógeno se inyectaron en el sistema cromatográfico donde se produce la separación de especies (las condiciones cromatográficas utilizadas están recogidas en la sección Experimental).

El flujo a la salida de la columna se conectó con un flujo constante de disolución de trazador enriquecido (^{54}Fe) cuya concentración fue optimizada para trabajar con bajos valores de magnificación del error, y se llevó a cabo la detección mediante ICP-MS. Posteriormente, el cromatograma obtenido se transformó en cromatograma de flujo másico y después de la integración de los picos se obtuvo el contenido de hierro endógeno y exógeno en cada pico cromatográfico (asociado a una o más especies). Dicho estudio se llevó a cabo para las muestras de glóbulos rojos, suero e hígado.

Al igual que el capítulo anterior, la especiación de hierro en tejidos y fluidos biológicos puede estar influida por la aparición de interferencias, las cuales fueron corregidas mediante el uso de He a 4 mL/min en la celda de colisión y, en los casos en los que fuera necesario, se realizaron además las correcciones matemáticas pertinentes. El resto de las condiciones de medida son idénticas a las utilizadas en el capítulo anterior y están recogidas en la Tabla DII.3.

DIII.2.4. Resultados obtenidos

Compartimento funcional (glóbulos rojos)

La Figura DIII.14. muestra los cromatogramas de flujo másico obtenidos en los glóbulos rojos tras la separación cromatográfica mediante intercambio catiónico, para cada grupo de ratas estudiadas tras la aplicación de la metodología de IPD post-columna. En todos los grupos el hierro eluye principalmente en el pico cromatográfico localizado entre 10-12.5 min. Los resultados cuantitativos obtenidos para el hierro en

dicha fracción se muestran en la Tabla DIII.6 y los niveles promedio encontrados en cada grupo se presentan en la Figura DIII.15. En el grupo fortificado con las nanopartículas, la concentración de hierro se representa como la suma de ^{57}Fe y Fe natural.

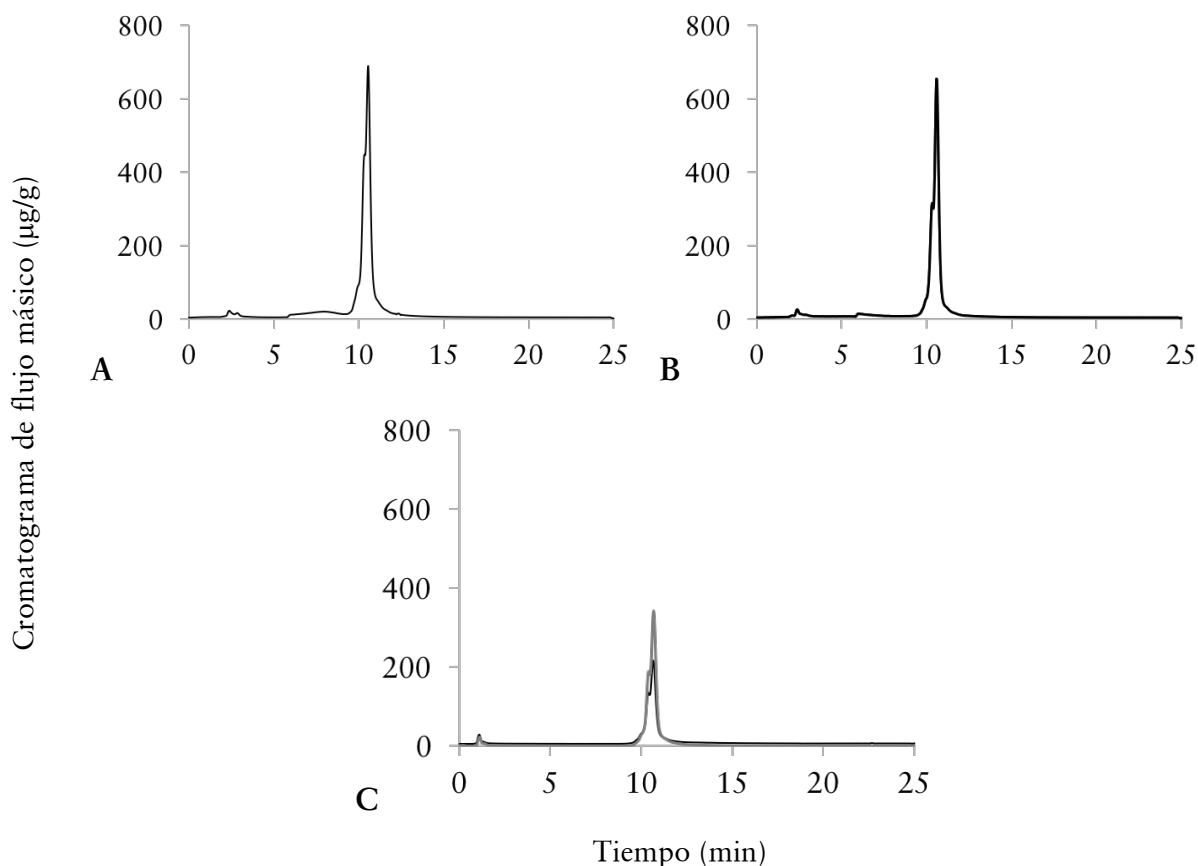


Figura DIII.14. Cromatograma de flujo másico para las muestras de glóbulos rojos analizadas para los diferentes grupos estudiados. (A) Grupo no fortificado, NF (B) Grupo fortificado con $^{\text{nat}}\text{Fe}(\text{II})\text{SO}_4$ (C) Grupo fortificado con $^{57}\text{Fe}(\text{III})\text{-NPs}$. La línea negra representa el $^{\text{nat}}\text{Fe}$ y la línea gris, el ^{57}Fe exógeno.

Grupo	Rata	Concentración de hierro
Grupo no fortificado (NF)	#1	159.1 ± 8.0
	#2	156.4 ± 0.9
Grupo FeSO_4	#1	73.5 ± 2.9
	#2	134.6 ± 0.7
Grupo $^{57}\text{Fe}\text{-NPs}$	#1	114.9 ± 1.2
	#2	147.0 ± 4.5

Tabla DIII.6. Resultados cuantitativos (expresados en $\mu\text{g/g}$) obtenidos para el hierro en la fracción atribuida a la hemoglobina en glóbulos rojos para los diferentes grupos estudiados

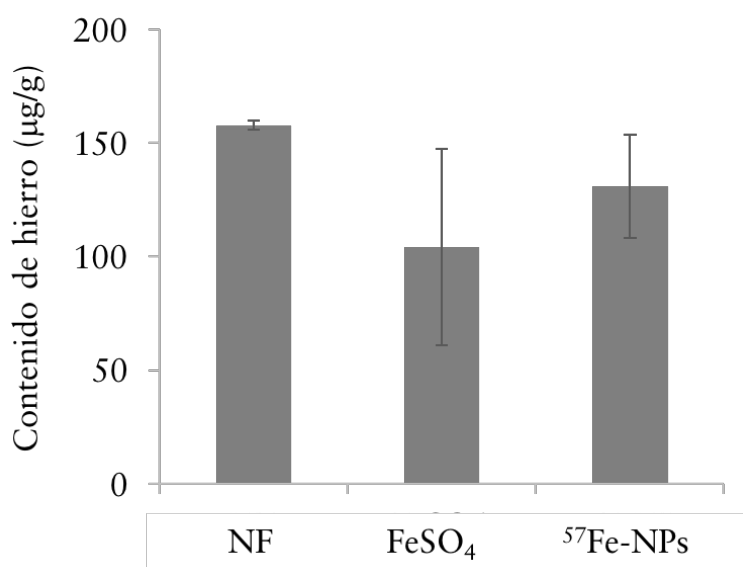


Figura DIII.15. Contenido de hierro (expresado en µg/g) encontrado en la fracción de la hemoglobina para los diferentes grupos estudiados

Compartimento de transporte (suero)

En la Figura DIII.16. se muestran los diferentes cromatogramas de flujo másico obtenidos tras el análisis de suero mediante cromatografía de intercambio catiónico, para cada grupo de ratas estudiadas tras la aplicación de la metodología de IPD post-columna. Como puede observarse, el hierro en este fluido se encuentra distribuido a lo largo del cromatograma, eluyendo en diferentes fracciones cromatográficas, numeradas del 1 al 6 según su orden de aparición. Los resultados cuantitativos de hierro encontrado en cada pico cromatográfico se encuentran recogidos en la Tabla DIII.7.

Grupo	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Grupo no fortificado (NF)	0	0.08±0.03	0.31 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.85 ± 0.05
Grupo FeSO ₄	1.20±0.04	0.61±0.05	0.27 ± 0.01	1.07 ± 0.04	0.97 ± 0.01	0.79 ± 0.04
Grupo ⁵⁷ Fe-NPs	0.69± 0.01	0.81±0.01	0.36 ± 0.01	0.99 ± 0.01	1.05 ± 0.04	1.29 ± 0.07

Tabla DIII.7. Resultados cuantitativos (expresados en µg/g) obtenidos para el hierro encontrado en las distintas fracciones del suero para los diferentes grupos estudiados

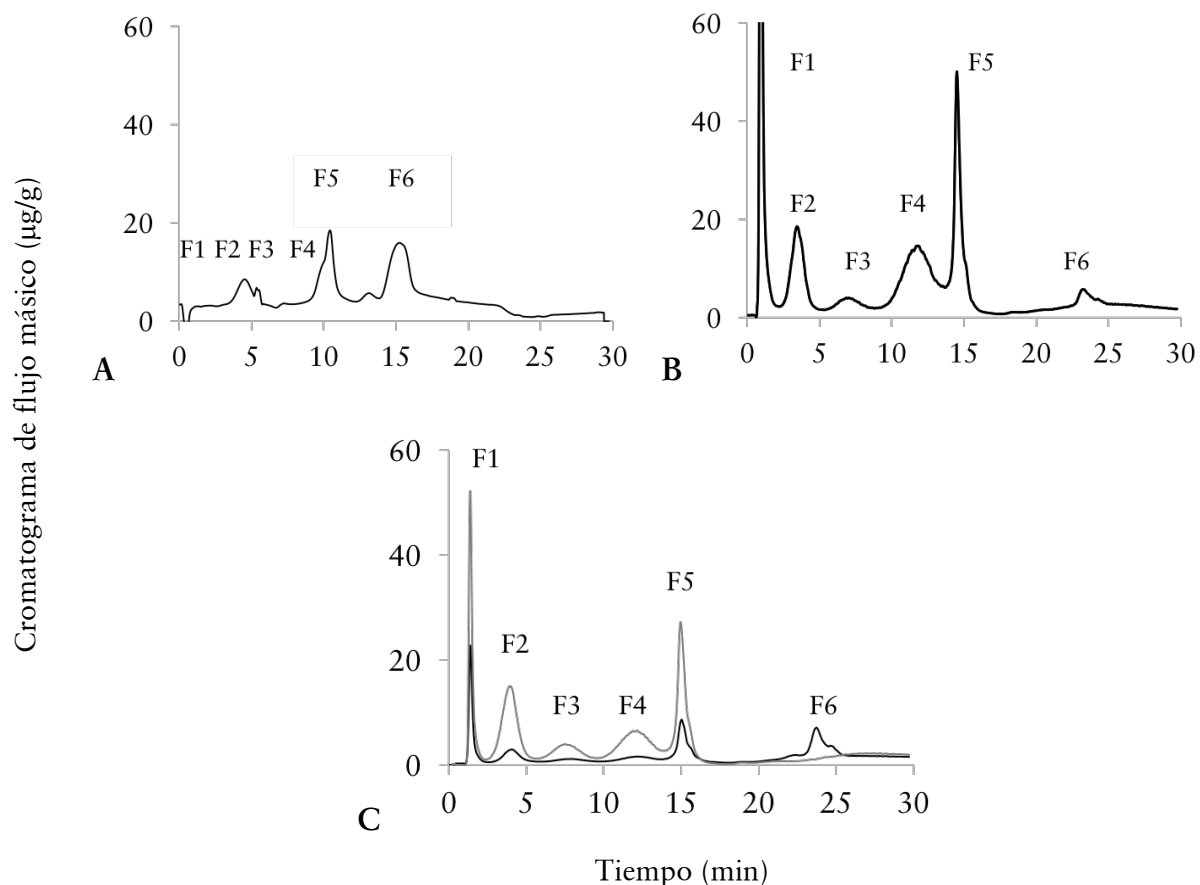


Figura DIII.16. Cromatograma de flujo másico para las muestras de suero analizadas para los diferentes grupos estudiados. (A) Grupo no fortificado, NF (B) Grupo fortificado con $^{nat}\text{Fe(II)SO}_4$ (C) Grupo fortificado con $^{57}\text{Fe(III)-NPs}$. La línea negra representa el ^{nat}Fe y la línea gris, el ^{57}Fe exógeno.

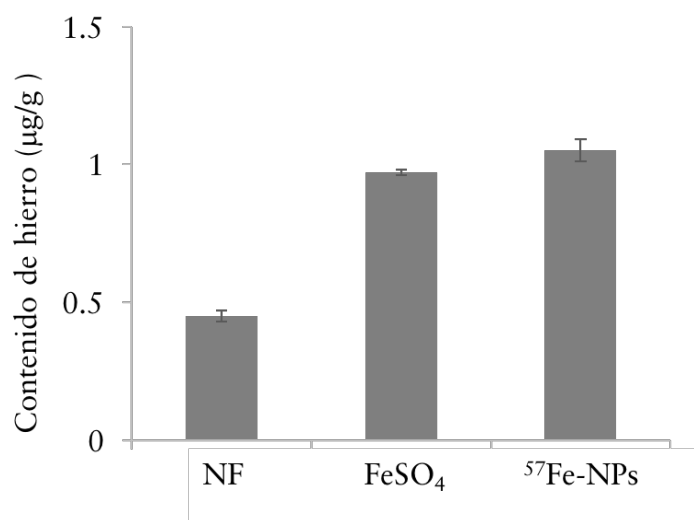


Figura DIII.17. Contenido de hierro (expresado en µg/g) encontrado en la fracción de la transferrina (F5) para los diferentes grupos estudiados

Compartimento de almacenamiento (hígado)

La especificación de hierro en hígado de rata se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC-ICP-MS). Los picos cromatográficos obtenidos son, en general, más amplios que los obtenidos por cromatografía de intercambio iónico. Considerando los perfiles obtenidos, el hierro se dividió en tres fracciones principales, como se indica en cada uno de los cromatogramas de flujo másico recogidos en la Figura DIII.18 para cada uno de los grupos investigados.

Los resultados cuantitativos obtenidos para el hierro en las tres fracciones diferenciadas se muestran en la Tabla DIII.8 y los niveles promedio de hierro encontrados en la fracción atribuida a la ferritina se presentan en la Figura DIII.19.

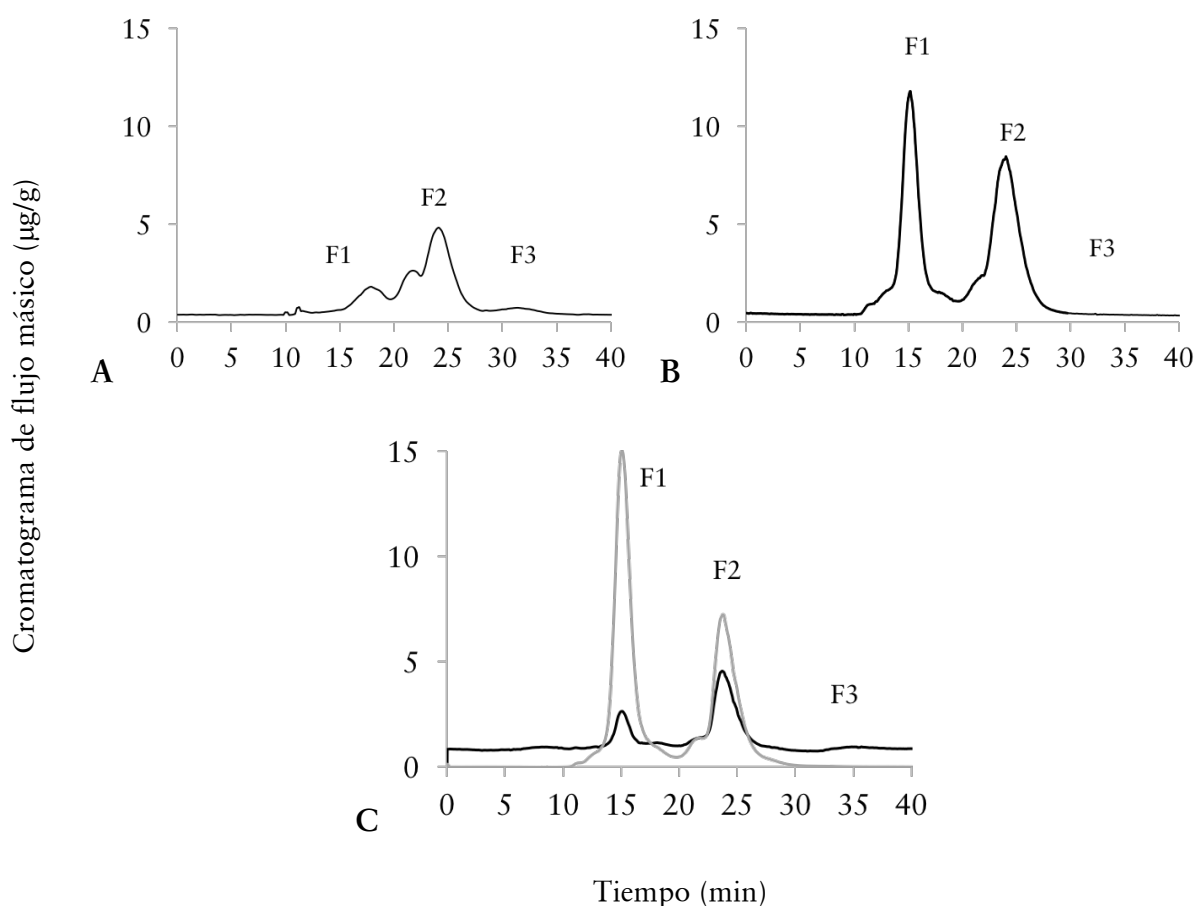


Figura DIII.18. Cromatograma de flujo másico para las muestras de hígado analizadas para los diferentes grupos estudiados. (A) Grupo no fortificado, NF (B) Grupo fortificado con $^{nat}\text{Fe(II)SO}_4$ (C) Grupo fortificado con $^{57}\text{Fe(III)-NPs}$. La línea negra representa el ^{nat}Fe y la línea gris, el ^{57}Fe exógeno.

Grupo	F1	F2	F3
Grupo no fortificado (NF)	2.96 ± 0.05	8.31 ± 0.19	1.64 ± 0.29
Grupo FeSO ₄	24.5 ± 1.15	26.41 ± 4.01	0
Grupo ⁵⁷ Fe-NPs	16.20 ± 1.44	15.36 ± 1.94	0.62 ± 0.88

Tabla DIII.8. Resultados cuantitativos (expresados en µg/g) obtenidos para el hierro encontrado en las distintas fracciones del hígado para los diferentes grupos estudiados

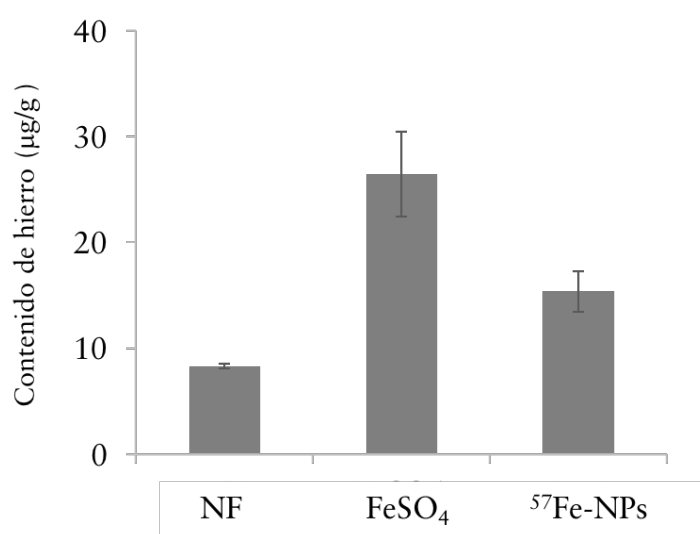


Figura DIII.19. Contenido de hierro (expresado en µg/g) encontrado en la fracción de la ferritina (F3) para los diferentes grupos estudiados

DIII.2.5. Discusión de los resultados

Compartimento funcional (glóbulos rojos)

Como se puede observar en la Figura DIII.14., el hierro se encuentra asociado a única especie que eluye entre 10-12.5 min, atribuida a la hemoglobina. La identificación de este pico ya fue indicada en trabajos previos [5] y confirmada por experimentos de MALDI realizados con anterioridad, los cuales están recogidos en el Capítulo DII..

En los cromatogramas obtenidos para Fe en la ICP-MS para el grupo fortificado con ^{57}Fe -NPs (Figura DIII.14.C), también es posible observar la presencia de otro pico de pequeña intensidad que aparece entre 0-2 min, que es posiblemente transferrina, presente principalmente en muestras de suero, lo que está de acuerdo con el mecanismo de separación (intercambio catiónico). En este caso, la transferrina, como proteína cargada positivamente, no quedará retenida en una columna de intercambio catiónico y eluirá en el volumen muerto de la columna.

En dicho grupo, alimentado con el isótopo enriquecido de hierro, se observó una incorporación de hierro exógeno (^{57}Fe) en la hemoglobina de aproximadamente un 58%. De esta manera, el hierro administrado como nanopartículas se incorporó adecuadamente al compartimento funcional unido a la hemoglobina, tal y como se esperaba.

En la Tabla DIII.6 y la Figura DIII.15 se encuentran recogidos los niveles totales de hierro encontrados asociados a la fracción identificada como hemoglobina. Considerando los niveles medios obtenidos para Fe en los tres grupos no es posible inferir sobre la eficacia de la fortificación de hierro cuando éste se administra como nanopartículas, considerando que los niveles encontrados no cambian en gran extensión entre los diferentes grupos. De esta manera, la forma química del hierro no es un factor importante para la incorporación de hierro en los eritrocitos, ya que se observaron niveles similares en el grupo no fortificado. Tal y como se infirió de los resultados de la primera parte de este capítulo, el compartimento funcional parece no estar afectado en gran medida por la forma fisicoquímica en la que se realiza la fortificación.

En este caso, las altas concentraciones encontradas coinciden con el hecho de que alrededor del 75% del hierro en el organismo humano se encuentra en los glóbulos rojos [1] y en los recién nacidos a término, en buenas condiciones de salud, presenta altos niveles de hierro en el momento del nacimiento, principalmente en la circulación [6] y, en los casos de insuficiencia de hierro, es muy probable que se encuentre hierro en el compartimento funcional, tal como se encuentra en este trabajo en el grupo no fortificado con hierro (NF).

Compartimento de transporte (suero)

La especiación del hierro en muestras de suero por cromatografía de intercambio aniónico reveló que el hierro está presente en esta matriz como especies diferentes, aunque se sabe que el hierro está principalmente ligado a la transferrina en la circulación en condiciones fisiológicas. En situaciones de exceso de hierro en el plasma, la transferrina se satura y el hierro puede ser encontrado no unido a la transferrina [7], lo cual no es el caso de este trabajo, puesto que las dosis de Fe utilizadas fueron relativamente pequeñas y, además, teniendo en cuenta que en la transferrina de sangre normalmente sólo posee un 25-35% de los sitios de unión de hierro ocupados [1].

En los cromatogramas de ICP-MS obtenidos para el hierro, es posible identificar seis fracciones principales, que se identifican en cada uno de los cromatogramas (Figura DIII.16). El pico de transferrina se atribuyó a la fracción F5 (11-17 min), lo que fue apoyado por la inyección de un estándar de transferrina en el sistema de HPLC-ICP-MS. La identificación de esta proteína también fue previamente investigada en nuestro grupo por MALDI y/o análisis ESI, según la cual la fracción correspondiente F5 en estos cromatogramas es probablemente transferrina, proteína responsable del transporte de hierro en una forma no-redox dentro del sistema circulatorio [8,9]. En los cromatogramas presentados en la Figura DIII.16 para el hierro, también es notable la presencia de la proteína eluida en F1, que es probablemente hemoglobina, que podría ser resultado de una hemolización parcial de la sangre durante los procedimientos de extracción.

Como era de esperar, el grupo no fortificado presentó los menores niveles de hierro asociados a transferrina sérica, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos fortificados ensayados en este capítulo. No obstante, los niveles de los grupos alimentados con leche fórmula fortificada con hierro mostraron niveles superiores de hierro unido a transferrina, lo que confirma el hecho de que es necesaria una ingesta de hierro para mantener un correcto estatus de hierro en el organismo.

De acuerdo con los datos cuantitativos obtenidos para el grupo fortificado con las nanopartículas ensayadas ($^{57}\text{Fe(III)-NPs}$), el grado de incorporación de hierro exógeno (^{57}Fe) en las proteínas encontradas en suero de rata fue del 77%, mostrando que el hierro administrado como $^{57}\text{Fe(III)-NPs}$ se incorporó en una gran extensión al compartimento de transporte. Este valor de hierro exógeno incorporado en la transferrina es muy superior al encontrado en los grupos fortificados con la misma dosis pero diferente forma fisicoquímica (35% para el complejo de $^{57}\text{Fe(III)-Lf}$ y 53% para $^{57}\text{FeSO}_4$ en presencia de Lf). Este hecho indica que la forma fisicoquímica resulta de vital importancia en el turnover o intercambio de hierro en el compartimento de transporte (es decir, la incorporación de ^{57}Fe en la transferrina del suero). La tasa de incorporación de ^{57}Fe exógeno encontrado en las nanopartículas ensayadas (77%) alcanza e incluso supera a la incorporación observada para altas dosis de sulfato hierro en presencia de lactoferrina (74%), revelando que, el uso de menores dosis de una forma fisicoquímica más efectiva, conduce a una mayor incorporación en el compartimento de transporte, algo que ya se observó con el análisis de totales (Capítulo DIII.1).

Compartimento de almacenamiento (hígado)

Dependiendo del grupo observado, el perfil cromatográfico observado varió notablemente. En los grupos alimentados con leche fórmula fortificada con hierro, es posible observar dos fracciones principales (F1 y F2), mientras que, en el grupo no fortificado, la fracción F1 se encontró en menor proporción. Debido a las menores concentraciones de hierro encontradas en el grupo no fortificado (NF), la separación de las proteínas correspondientes a F1 y F2 no es tan adecuada como las obtenidas para los otros dos grupos.

En los cromatogramas de flujo másico presentados en la Figura DIII.18. para el hierro, la fracción F2 que se eluye entre 20-27 minutos es donde probablemente se eluye la ferritina, lo cual se confirmó inyectando un estándar de ferritina de rata en las mismas condiciones en el sistema SEC-ICP-MS. La ferritina es la especie de hierro más importante encontrada en el hígado y su función principal es almacenar el hierro en una forma altamente biodisponible, protegiendo las células de los potenciales

efectos tóxicos que el hierro libre puede causar [10]. La ferritina se considera como la "proteína clave" para regular la homeostasis intracelular del hierro, cuando la concentración de hierro biodisponible es alta, se produce ferritina para almacenar el exceso de hierro y cuando las concentraciones intracelulares son bajas, el compartimento de almacenamiento se reduce para permitir la utilización del hierro [11].

Aunque la ferritina es conocida por ser la principal proteína de almacenamiento de hierro en mamíferos, el hierro también puede encontrarse en otras formas en el hígado, como la hemosiderina y otras especies similares a las ferritinas [1,12,13]. En este caso, en los cromatogramas obtenidos para hígado de rata, principalmente en los grupos que recibieron alguna forma de fortificación de Fe (en forma de sulfato o como nanopartículas), es posible observar que F1 también presentó hierro en una gran extensión, siendo esta concentración muy similar a las concentraciones encontradas en F2 (Tabla DIII.8). Se ha informado de que los depósitos de hierro en el hígado se pueden encontrar también en forma de dímeros, trímeros y otros oligómeros formados por monómeros de ferritina [12] y, de esta manera, tales estructuras se eluirían en un tiempo más corto que ferritina en una separación de exclusión por tamaños. Con el objetivo de confirmar la identidad de dicha fracción sería necesario realizar más experimentos mediante técnicas de espectrometría de masas moleculares, tales como ESI-MS.

Según la Figura DIII.19, se encontró mayor concentración de hierro en la fracción atribuida a la ferritina en el grupo alimentado con leche fórmula fortificada con sulfato ferroso. Las concentraciones más bajas se encontraron en el grupo no fortificado (NF), tal y como se esperaba. Dicha disminución en los depósitos de reserva indica el movimiento de los depósitos de hierro hacia otros compartimentos (p. ej. el funcional) necesario para mantener el estatus de hierro en el organismo en situaciones en las que la ingesta de hierro no es suficiente, tal y como sucede en el grupo NF. En el caso del grupo alimentado con leche fórmula fortificada con las nanopartículas ensayadas, se encontró una concentración intermedia de hierro en esta fracción asociada a la ferritina. La tasa de incorporación de hierro exógeno (^{57}Fe)

encontrado en la ferritina resultó ser del 62%, confirmando también que el hierro administrado como ^{57}Fe -NPs se incorporó adecuadamente al compartimento de almacenamiento. Dicha incorporación es similar a la encontrada con el resto de fortificantes anteriormente ensayados.

No obstante, a la luz de los resultados obtenidos resulta de gran interés comparar la incorporación del hierro exógeno ^{57}Fe utilizado para la fortificación de leche fórmula en los distintos grupos ensayados en ambos capítulos de la presente Tesis Doctoral.

Comparando los resultados obtenidos con el hierro férrico Fe(III), (comparación entre $^{57}\text{Fe(III)-Lf}$ vs. $^{57}\text{Fe(III)-NPs}$), se puede observar que la incorporación preferente en F1 observada en el caso de las NPs, no tiene lugar en el caso de la fortificación con el complejo, donde el hierro se incorpora aproximadamente en la misma proporción en ambas fracciones. Por el contrario, dicha incorporación preferente en la F1 sí se observó en el grupo alimentado con $^{57}\text{Fe(III)SO}_4$ a alta dosis en presencia de Lf. Esto puede sugerir que la fortificación de leche fórmula con nanopartículas conduce a un incremento en las reservas de hierro en los depósitos, donde, al poseer tanto hierro, las moléculas de ferritina se aglomeran formando monómeros o trímeros con mayor peso molecular. Esto podría ser de gran interés puesto que probaría que la fortificación con esta forma fisicoquímica ($^{57}\text{Fe(III)-NPs}$) se incorpora de manera adecuada, siendo absorbida más eficientemente y resultando más biodisponible que otras formas fisicoquímicas estudiadas.

No obstante, cabe resaltar que los niveles totales de hierro fueron similares entre grupos, siendo únicamente mayores en el caso de la fortificación realizada con $^{57}\text{Fe(III)SO}_4$ en alta dosis en presencia de Lf. Podría estudiarse el efecto de las nanopartículas en los niveles totales de hierro en los diferentes compartimentos utilizando dosis superiores con el fin de estudiar qué concentración podría ser efectiva para mantener un estado adecuado de hierro con una forma fisicoquímica de elevada biodisponibilidad.

DIII.2.6. Conclusiones del trabajo

Los niveles de hierro total en la hemoglobina presentes en los glóbulos rojos fueron similares entre los diferentes grupos estudiados, sugiriendo que la forma fisicoquímica administrada no es un factor clave para modificar en gran medida el contenido de hierro en este compartimento. Los niveles de hierro asociados a transferrina en el suero fueron similares en los dos grupos fortificados (con sulfato ferroso o con nanopartículas, ambos a la misma dosis), sugiriendo una incorporación efectiva del metal utilizado en la fortificación de la leche fórmula. En el caso del compartimento de depósito, los niveles de hierro total observados para el grupo no fortificado fueron muy inferiores a los encontrados en los grupos fortificados, mostrando una vez más que la fortificación de hierro es necesaria para mantener un adecuado estatus de hierro en el organismo. No obstante, los niveles encontrados para ambos grupos fortificados (FeSO_4 y $^{57}\text{Fe(III)-NPs}$) fueron similares.

El hierro exógeno ^{57}Fe utilizado en la fortificación de leche fórmula en forma de nanopartículas ($^{57}\text{Fe(III)-NPs}$) se incorporó adecuadamente en las proteínas principales de los diferentes compartimentos del hierro del organismo. En cuanto a la incorporación en el compartimento funcional (glóbulos rojos), ésta resultó ser similar a la encontrada para otras formas fisicoquímicas, ligeramente superior al 50%, tal y como se esperaba. Los resultados encontrados en este compartimento concordaron con los encontrados en el análisis total de la muestra.

La incorporación de ^{57}Fe exógeno en la transferrina dentro del compartimento de transporte (suero) resultó muy superior a la encontrada con anterioridad para otras formas fisicoquímicas a la misma dosis, alcanzando niveles superiores, comparables con los encontrados para altas dosis de hierro. Este hecho sugiere la importancia de la forma fisicoquímica de hierro en la que este elemento es añadido a la leche fórmula, más allá de la dosis utilizada. Los resultados obtenidos en este compartimento concordaron de igual modo con los obtenidos en el análisis total.

La incorporación de hierro exógeno ^{57}Fe encontrada en el grupo alimentado con las nanopartículas ensayadas fue superior en la fracción no identificada como

ferritina, sino que podría ser un agregado de ferritinas, producidas por una elevada concentración de hierro intracelular que necesita ser almacenado para un posible uso en el futuro.

A la luz de los resultados de especiación obtenidos, se ha observado que el hierro proveniente de las nanopartículas ensayadas se ha incorporado de manera efectiva en los diferentes compartimentos de hierro en el organismo, presentando mayor biodisponibilidad que otras formas fisicoquímicas ensayadas incluso a baja dosis, lo cual resulta muy prometedor para proseguir los estudios con éste tipo de fortificantes nanoparticulados.

DIII.2.7. Referencias bibliográficas

- ¹ RC Hider and X Kong. *Chapter 8. Iron: Effect of overload and deficiency*. From: A Sigel, H Sigel, RKO Sigel. *Interrelations between essential metal ions and human diseases*. (ed.) Springer, (2013) Pages 229-94. ISBN 978-94-007-7500-8.
- ² P Ponka. *Iron metabolism: Physiology and pathophysiology*. *J Trace Elem Exp Med*, 13:1 (2000) 73-83. doi: 10.1002/(SICI)1520-670X(2000)13:1<73::AID-JTRA9>3.0.CO;2-X.
- ³ DM Templeton. *Molecular and cellular iron transport*. Marcel Dekker, New York. (2002). ISBN: 0-8247-0621-8.
- ⁴ DM Templeton, F Ariese, R Cornelis, LG Danielson, H Muntau, HP Van Leeuwen and R Lobinski. *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches*. *Pure Appl Chem*, 72:8 (2000) 1453-1470.
- ⁵ MEC Busto, M Montes-Bayón, E Añón and Sanz-Medel. *Simultaneous determination of glycated haemoglobin, a long term biomarker of diabetes mellitus, and total haemoglobin by isotope dilution and HPLC-ICP-MS*. *J Anal At Spectrom*, 23 (2008) 758-64. doi:10.1039/B718008J.
- ⁶ CM Chaparro. *Setting the stage for child health and development: prevention of iron deficiency in early infancy*. *J Nutr*, 138:12 (2008) 2529-33.
- ⁷ DJR Lane, AM Merlot, MLH Huang, DH Bae, PJ Jansson, S Sahni, DS Kalinowski and DR Richardson. *Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: key molecules and mechanisms and their roles in disease*. *Biochim Biophys Acta*, 1853:5 (2015) 1130-44. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.021
- ⁸ MC Ming Chung. *Structure and function of transferrin*. *Biochem Educ*, 12:4 (1984) 146-54.
- ⁹ PT Gomme and KB McCann. 2005. *Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions*. *Drug Discov Today*, 10:4 (2005) 267-73. doi:10.1016/S1359-6446(04)03333-1
- ¹⁰ R Yang, Z Zhou, G Sun, Y Gao and J Xu. *Ferritin, a novel vehicle for iron supplementation and food nutritional factors encapsulation*. *Trends Food Sci Technol*, 44:2 (2015) 189-200. doi:10.1016/j.tifs.2015.04.005.
- ¹¹ P Arosio and S Levi. *Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage*. *Free Radic Biol Med*, 33:4 (2002) 457-63.
- ¹² S San-Marina and DM Nicholls. *Metal binding and ferritin immunoreactivity in a high molecular weight fraction from rat brain*. *Biochim Biophys Acta*, 1310:3 (1996) 277-83. doi:10.1016/0167-4889(95)00190-5.
- ¹³ L Gutiérrez, C Quintana, C Patiño, J Bueno, H Coppin, MP Roth and FJ Lázaro. *Iron speciation study in Hfe knockout mice tissues: Magnetic and ultrastructural characterisation*. *Biochim Biophys Acta*, 1792:6 (2009) 541-547. doi:10.1016/j.bbadis.2009.03.007.

*E. CONCLUSIONES/
CONCLUSIONS*

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a una serie de conclusiones de interés que podrían resumirse en los siguientes puntos:

1. Se ha comprobado la capacidad del ICP-MS con celdas de colisión para llevar a cabo el análisis de Zn en muestras de leche materna y fórmula. Los resultados obtenidos mostraron valores similares para leche de madres a término y pretérmino (edad gestacional) y un descenso significativo en el contenido de Zn con el período de lactancia en ambos grupos. Las leches fórmula analizadas presentaron niveles superiores a los encontrados en leche madura, dentro de los límites permitidos, y por encima del mínimo legal. Los niveles de Zn para ambas muestras cumplen los requerimientos necesarios para la alimentación de neonatos.

2. El acoplamiento técnicas cromatográficas (HPLC) con detección mediante ICP-MS para llevar a cabo análisis de especiación elemental produjo resultados satisfactorios con las condiciones cromatográficas optimizadas. La herramienta de IDA post-columna ha permitido cuantificar el contenido de Zn en las diversas especies obtenidas tras la separación cromatográfica en los distintos tipos de muestra estudiadas. Los resultados no mostraron diferencias significativas atendiendo a la edad gestacional, pero sí con el período de lactancia. La especiación de las fórmulas comprobó y la presencia Zn en especies con bajo peso molecular, con ello explica la diferente biodisponibilidad de este elemento desde las leches fórmulas.

3. Se ha iniciado la línea de especiación “integral” (complementar resultados de detección elemental con los de caracterización molecular) para el estudio de metaloproteínas intactas, con fuentes que minimicen la ruptura del enlace metal-proteína. El uso de fuentes de ionización blandas como ESI y SSI mostraron su capacidad para llevar a cabo dichos análisis para los complejos Zn- α -lactalbúmina y Zn-citrato.

4. Estudios de biodisponibilidad del hierro mostraron la necesidad de fortificar las leches fórmula con este elemento con el fin de evitar estados carenciales. Se comprobó la idoneidad del estudio *in vivo* mediante el uso de un isótopo enriquecido (exógeno) para comprobar la absorción/biodisponibilidad del hierro utilizando la herramienta matemática de IPD tanto en estudios del contenido total de hierro, como

para la especiación de hierro en las diferentes proteínas de los compartimentos del hierro en el organismo. Se observó que el hierro exógeno (^{57}Fe) utilizado para la fortificación de hierro en leches fórmula fue adecuadamente absorbido e intercambiado dentro del organismo consiguiendo alcanzar los diferentes tejidos diana de este elemento.

5. Se ha comprobado que la lactoferrina parece ayudar a la absorción del hierro, preferiblemente cuando éste es adicionado a la leche fórmula como sulfato ferroso, $^{57}\text{Fe(II)SO}_4$. El complejo $^{57}\text{Fe(III)}_2\text{-Lf}$ estudiado mostró resultados comparables a los obtenidos con el sulfato ferroso a la misma dosis. A pesar de que todas las formas fisicoquímica ensayadas mostraron una absorción superior al 90%, en los primeros estudios realizados se valoró más la importancia de la dosis de hierro administrada frente a la forma fisicoquímica utilizada, la cual parece tener menor influencia en el estatus del hierro en el organismo.

6. Los estudios llevados a cabo con nanopartículas de oxo-hidróxido de hierro (III) mostraron que la forma fisicoquímica en la que se fortifica el elemento puede resultar de gran importancia para la posterior distribución del elemento dentro del organismo. Esta forma fisicoquímica presentó un intercambio elevado en todos los compartimentos estudiados (>60%), y presentó los mayores niveles de hierro en depósito, comparables a los encontrados previamente para dosis superiores. Este hecho sugiere una mayor biodisponibilidad del hierro desde esta especie férrica, lo cual resulta muy prometedor para realizar nuevos estudios en el campo de la nutrición humana, en concreto en la fortificación de leche.

The work done in this Doctoral Thesis has given rise to a series of conclusions of interest that could be summarized in the following points:

1. The ability of the ICP-MS with collision cells to perform the analysis of Zn in samples of breast milk and formula has been verified. The results obtained showed similar values for mother's milk at term and preterm (gestational age) and a significant decrease in the Zn content with the lactation period in both groups. The formula milk analyzed presented higher levels than those found in mature milk, within the permitted limits, and above the legal minimum. Zn levels for both samples meet the requirements for feeding neonates.

2. Coupling chromatographic techniques (HPLC) with detection by ICP-MS to perform elemental speciation analysis produced satisfactory results with the optimized chromatographic conditions. The post-column IDA tool has allowed the quantification of the Zn content in the different species obtained after the chromatographic separation in the different sample types studied. The results did not show significant differences considering the gestational age, but with the lactation period. The specificity of the formulas tested and the presence Zn in species with low molecular weight, this explains the different bioavailability of this element from the milk formulas.

3. The "integral" specimen line has been started (complement elemental detection results with molecular characterization) for the study of intact metalloproteins, with sources that minimize the breakdown of the metal-protein bond. The use of soft ionization sources such as ESI and SSI showed their ability to carry out such analyzes for the Zn - lactalbumin and Zn - citrate complexes.

4. Bioavailability studies of iron showed the need to fortify the formula milks with this element in order to avoid deficiency states. The suitability of the in vivo study was verified by the use of an enriched (exogenous) isotope to check the absorption / bioavailability of the iron using the mathematical tool of IPD in both the studies of the total iron content and the iron speciation in the different Proteins of iron compartments in the body. It was observed that the exogenous iron (^{57}Fe) used

for iron fortification in milks formula was adequately absorbed and exchanged within the organism achieving to reach the different target tissues of this element.

5. Lactoferrin has been shown to assist iron uptake, preferably when iron is added to the formula formula as ferrous sulfate, $^{57}\text{Fe(II)SO}_4$. The $^{57}\text{Fe(III)}_2\text{-Lf}$ complex studied showed results comparable to those obtained with ferrous sulfate at the same dose. Although all the physicochemical forms tested showed an absorption of more than 90%, in the first studies, the importance of the dose of iron administered was compared to the physicochemical form used, which seems to have less influence on the status of the Iron in the body.

6. Studies carried out with iron (III) oxo-hydroxide nanoparticles showed that the physicochemical form in which the element is fortified may be of great importance for the subsequent distribution of the element within the organism. This physicochemical form showed a high exchange in all compartments studied (> 60%), and presented the highest levels of iron deposit, comparable to those previously found for higher doses. This fact suggests a greater bioavailability of iron from this ferric species, which is very promising for new studies in the field of human nutrition, specifically in milk fortification.

*F. TRABAJOS
FUTUROS/
OUTLOOK*



A la luz de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral se pueden sugerir algunas investigaciones futuras en esta línea:

Generalmente, los compuestos de zinc utilizados como suplementos nutricionales o en la fortificación de alimentos son óxidos y sulfatos de Zn. Sin embargo, el sulfato de zinc interacciona con la matriz del alimento provocando sabores indeseados mientras que, a su vez, los óxidos de zinc, a pesar de no interactuar con la matriz de la muestra son insolubles en productos líquidos (como sería la leche fórmula) depositándose en el fondo del envase y su uso está restringido a fortificaciones de alimentos sólidos. Recientemente, el gluconato de zinc estabilizado con glicina ha demostrado poseer la misma biodisponibilidad y seguir la misma ruta metabólica que el sulfato de zinc sin los indeseados cambios en las propiedades organolépticas del producto. Además, su bajo precio, alta solubilidad e inocuidad en la matriz líquida posiciona a esta especie fisicoquímica como una gran candidata para ser utilizada como fortificante de zinc en diversas matrices. Debido a la idoneidad de la técnica de IPD para realizar estudios metabólicos y a la importancia de conocer nuevas formas fisicoquímicas de Zn para la fortificación de leches fórmula, dos posibles trabajos serían:

- 1) **Evaluación de la interacción de gluconato de zinc estabilizado con glicina con leche fórmula para evaluar su idoneidad como candidato para ser utilizado como fortificante en leches fórmula.** El desarrollo de estudios con células madres proporcionaría información de gran utilidad para conocer la toxicidad de la especie.
- 2) **Evaluación el metabolismo y biodisponibilidad del zinc desde leches fórmulas utilizando especies de zinc con elevada biodisponibilidad y absorción (como el gluconato de zinc estabilizado con glicina) utilizando la herramienta de IPD aplicada a los isótopos de zinc.**

Dichos estudios serían aplicables a cualquier otra forma fisicoquímica del Zn, ya que se ha demostrado la viabilidad de la realización de los estudios in vivo con IPD con varias formas fisicoquímicas diferentes de hierro.

Por otro lado, existe cierta preocupación respecto la interacción de cationes divalentes cuando se utiliza fortificación de hierro. Varios autores mostraron que la suplementación de zinc en leche fórmula en una relación 4:1 frente al hierro no interfiere en la incorporación en los eritrocitos de un isótopo enriquecido de hierro (y presumiblemente en su absorción intestinal). Por ello, un estudio interesante consistiría en:

3) Estudiar la influencia de dicho fortificante (gluconato de zinc estabilizado con glicina) en la absorción del hierro y el cobre. Resultaría interesante realizar estudios en líneas celulares (y, posteriormente, en estudios *in vivo*) para conocer el efecto de dichas interacciones en el caso de la fortificación de leches fórmula, utilizando para ello las formas consideradas más biodisponibles del elemento objeto de estudio administradas isotópicamente enriquecidas. El uso de la herramienta de cuantificación IPD permitiría extraer la información relevante acerca de su paso a través de la membrana intestinal (Caco cells).

4) Estudiar la influencia de dicho fortificante (gluconato de zinc estabilizado con glicina) en la absorción del hierro (y posteriormente ampliar el estudio al cobre). Después de comprobar su toxicidad, y la interacción que presentan, podría diseñarse un estudio basado en: el uso conjunto de isótopos estables de Zn y Fe para llevar a cabo la fortificación de leches fórmula en las mejores condiciones encontradas en estudios anteriores con líneas celulares. La herramienta de cuantificación IPD ayudaría a obtener de manera precisa y sencilla, resultados acerca de la incorporación de ambos elementos administrados a través de una sencilla medida mediante IPD-ICP-MS y, en el caso de estudios de especiación, mediante HPLC-ICP-MS IPD post-columna.

La Lactoferrina (Lf) es una proteína que no se digiere totalmente en el estómago, y por ello se transmite al intestino donde puede pasar intacta al torrente sanguíneo, es común encontrarla en concentraciones bajas, en torno a los 0.2µg/L. Debido a la disponibilidad de anticuerpos específicos para la detección de Lf, a su

importancia en nutrición humana y a que dicho mecanismo de introducción en el organismo continúa sin ser del todo conocido, sería interesante realizar:

5) **Ensayo ELISA tipo sándwich competitivo para la identificación y cuantificación de lactoferrina (Lf) en suero de rata y cuantificación posterior de hierro marcado mediante IPD.** Para ello, grupos de ratas alimentados con diferentes concentraciones de Lf libre o complejada con un metal (p.ej. hierro) marcado isotópicamente, permitiría determinar mediante un simple ensayo ELISA si existe un aumento de la concentración de Lf en el plasma, demostrando así dicho mecanismo de transporte. Adicionalmente, si se extrajera la disolución contenida en cada pocillo, podría realizarse un análisis mediante IPD-ICP-MS o HPLC-ICP-MS IPD post-columna para detectar fácilmente el metal marcado y conocer su grado de incorporación en el suero o en transferrina, respectivamente.

Teniendo en cuenta los prometedores resultados observados con ESI-MS y SSI-MS en la determinación de metaloproteínas intactas, y las diferencias encontradas en la fracción 5 (citratos) en la especiación cuantitativa de Zn mediante HPLC-ICP-MS IDA post-columna (atendiendo a la edad gestacional y el periodo de lactancia), y debido a los buenos resultados obtenidos en cuanto a la identificación y cuantificación de Zn-citrato mediante la transición $m/z=447 \rightarrow m/z=313$, resultaría de gran interés llevar a cabo:

6) **La cuantificación de Zn-citrato mediante ESI-MS o SSI-MS, estudio de las variaciones a lo largo del periodo de lactancia y con la edad gestacional.**

7) Además, tras identificar que el Zn-citrato es la especie que probablemente más Zn proporcione al organismo, sería interesante llevar a cabo **estudios de metabolismo (absorción y biodisponibilidad) del Zn-citrato marcado isotópicamente** y llevar a cabo la cuantificación del elemento en los diversos tejidos diana mediante IPD.

8) Siguiendo con la espectrometría de masas moleculares, sería interesante iniciar **simulaciones de digestiones gástricas “in vitro” para comparar la fracción de elementos esenciales dializables (absorbibles) en leche humana y en fórmulas.** Continuación de los estudios de identificación y caracterización de las especies moleculares presentes en las distintas fracciones cromatográficas resultantes de la cromatografía de exclusión por tamaños. Para llevar a cabo estos estudios se emplearían técnicas de espectrometría molecular como la MALDI-TOF y la ESI-MS/MS. Naturalmente la purificación previa es crucial para el aislamiento de los biocompuestos buscados, antes de su análisis por MS.

9) **Aplicación de la metodología IPD en combinación con el uso de Isótopos Estables y detección por ICP-MS para el estudio de la absorción y/o biodisponibilidad de suplementos nutricionales de elementos esenciales en ensayos clínicos en humanos.** Dado que el uso de isótopos estables no presenta ningún riesgo para la salud en humanos pudiendo incluso utilizarse en grupos de riesgo como niños y mujeres embarazadas, sería posible aplicar la metodología desarrollada en estudios clínicos de absorción y biodisponibilidad de distintas formas fisicoquímicas utilizadas como suplementos nutricionales de los elementos esenciales, en humanos.

10) Como broche final, y debido a los buenos resultados obtenidos con las nanopartículas ensayadas ($^{57}\text{Fe(III)}$ -NPs), podrían realizarse **estudios de mapeo mediante resonancia magnética (Body MRI, *magnetic resonance imaging*) in vivo con ratas wistar alimentadas con diferentes dosis de Fe(III)-NPs**, esta técnica permitiría dar información acerca de la distribución de las NPs en el organismo de manera no invasiva. Debido a los recientes avances en el diseño y preparación de las imágenes mediante (MRI), esta técnica ofrece perspectivas y soluciones para la evaluación de la distribución de las NPs en el organismo.

In the light of the results obtained throughout this Ph.D. Thesis and some additional ideas, some future research in this line can be suggested:

1. Generally, zinc compounds used as nutritional supplements or in food fortification are Zn oxides and sulfates. However, zinc sulfate interacts with the food matrix causing unwanted flavors while zinc oxides, in spite of not interacting with the sample matrix, are insoluble in liquid products (such as formula) Being deposited in the bottom of the container and its use is restricted to solid food fortifications. Recently, glycine-stabilized zinc gluconate has been shown to have the same bioavailability and to follow the same metabolic pathway as zinc sulfate without the undesired changes in the organoleptic properties of the product. In addition, its low price, high solubility and innocuity in the liquid matrix positions this physicochemical species as a great candidate to be used as a zinc fortifier in various matrices. Due to the suitability of the IPD technique to perform metabolic studies and to the importance of knowing new physicochemical forms of Zn for the fortification of milks formula, two possible works would be:

1) Evaluation of the interaction of zinc gluconate stabilized with glycine with formula milk to evaluate its suitability as a candidate to be used as a fortifier in formula milks. The development of stem cell studies would provide useful information on the toxicity of the species.

2) Evaluation of the metabolism and bioavailability of zinc from milk formulas using zinc species with high bioavailability and absorption (such as zinc gluconate stabilized with glycine) using the IPD tool applied to zinc isotopes.

These studies would be applicable to any other physicochemical form of Zn, since the feasibility of conducting the in vivo studies with IPD with several different physicochemical forms of iron has been demonstrated.

On the other hand, there is some concern about the interaction of divalent cations when iron fortification is used. Several authors showed that zinc supplementation in formula milk in a 4: 1 ratio to iron does not interfere with the

erythrocyte incorporation of an iron (and presumably in its intestinal absorption) isotope. Therefore, an interesting study would consist of:

3) To study the influence of this fortifier (zinc gluconate stabilized with glycine) in the absorption of iron and copper. It would be interesting to carry out studies in cell lines (and, later, in vivo studies) to know the effect of these interactions in the case of fortification of formula milks using the forms considered more bioavailable of the element under study administered isotopically enriched . The use of the IPD quantification tool would allow the extraction of relevant information about its passage through the intestinal membrane (Caco cells).

4) To study the influence of this fortifier (zinc gluconate stabilized with glycine) on the absorption of iron (and later extend the study to copper). After testing their toxicity, and the interaction they present, a study could be designed based on the joint use of stable isotopes of Zn and Fe to carry out the fortification of formula milks under the best conditions found in previous studies with cell lines. The IPD quantification tool would help to obtain, in an accurate and simple way, results on the incorporation of both elements administered through a simple measurement using IPD-ICP-MS and, in the case of speciation studies, using HPLC-ICP- MS IPD post-column.

Lactoferrin (Lf) is a protein that is not fully digested in the stomach, and is therefore transmitted to the intestine where it can pass intact into the bloodstream, it is common to find it in low concentrations, around 0.2g / L. Due to the availability of specific antibodies for the detection of Lf, its importance in human nutrition and to the fact that said mechanism of introduction into the body remains unknown, it would be interesting to carry out:

5) Competitive sandwich ELISA for the identification and quantification of lactoferrin (Lf) in rat serum and further quantification of isotopic iron via IPD. To do this, groups of rats fed different concentrations of free Lf or complexed with an isotopically-labeled metal (i.e. iron) would allow a simple ELISA assay to determine

whether there is an increase in Lf concentration in plasma, thus demonstrating such transport mechanism. Additionally, if the solution contained in each well were extracted, an analysis could be performed by post-column IPD-ICP-MS or HPLC-ICP-MS IPD to easily detect the labeled metal and know its degree of incorporation in serum or in transferrin, respectively.

Considering the promising results observed with ESI-MS and SSI-MS in the determination of intact metalloproteins, and the differences found in fraction 5 (citrates) in the quantitative speciation of Zn by post-column HPLC-ICP-MS IDA (Considering the gestational age and the lactation period), and due to the good results obtained in the identification and quantification of Zn-citrate through the transition $m/z = 447$ $m/z = 313$, it would be of great interest to carry out:

6) Quantification of Zn-citrate by ESI-MS or SSI-MS, study of variations throughout the lactation period and with gestational age.

7) In addition, after identifying that Zn-citrate is the species most likely to provide to the organism, it would be interesting to carry out metabolism studies (absorption and bioavailability) of the isotopically labeled Zn-citrate and to carry out the quantification of the element in the various target tissues by IPD.

8) Following molecular mass spectrometry, it would be interesting to initiate gastric digestion simulations "in vitro" to compare the fraction of dialysable (absorbable) essential elements in human milk and formulas. Continuation of the studies of identification and characterization of the molecular species present in the different chromatographic fractions resulting from size exclusion chromatography. Molecular spectrometric techniques such as MALDI-TOF and ESI-MS / MS were used to carry out these studies. Naturally, prior purification is crucial for the isolation of the sought-after biocomposites prior to MS analysis.

9) **Application of the IPD methodology in combination with the use of Stable Isotopes and detection by ICP-MS for the study of the absorption and / or bioavailability of nutritional supplements of essential elements in clinical trials in humans.** Since the use of stable isotopes poses no health risk to humans and may even be used in risk groups such as children and pregnant women, it would be possible to apply the methodology developed in clinical studies of absorption and bioavailability of different physicochemical forms used as nutritional supplements Of the essential elements, in humans.

10) As a final point, and due to the good results obtained with the nanoparticles tested (^{57}Fe (III) -NPs), magnetic resonance imaging (MRI) studies could be performed in vivo with wistar rats fed with different Doses of Fe (III) -NPs, this technique would provide information about the distribution of NPs in the organism in a noninvasive way. Due to the recent advances in the design and preparation of the images through (MRI), this technique offers perspectives and solutions for the evaluation of the distribution of NPs in the organism.

*G. PUBLICACIONES
/ SCIENTIFIC
ARTICLES*



G.1. Factor de impacto de las publicaciones de la Tesis Doctoral

El interés científico del trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral se hace visible a través de las publicaciones derivadas de la misma, las cuales se incluyen en categorías como: la Química Analítica, la Espectroscopía, la Bioquímica y la Nutrición.

Todos los artículos han sido publicados en revistas internacionales indexadas en el JCR (Journal Citation Report), y la mayoría dentro del primer cuartil de las categorías a las que pertenece. En la tabla siguiente se muestran los datos de factor de impacto y la(s) categoría(s) científica(s) de las revistas en las que se pueden encontrar las publicaciones de la presente Tesis Doctoral. Además, cabe resaltar que esta Tesis Doctoral ha generado otros artículos que están pendientes de publicación pero que también han sido enviados a revistas de gran rigor científico.

Revista	Factor de impacto	Categoría(s)	Puesto	Fuente
Journal of Chromatography A	3.926	Métodos de investigación bioquímica Química Analítica	14/77 (Q1) 11/75 (Q1)	JCR 2015
Journal of Analytical Atomic Spectrometry	3.379	Espectroscopía Química Analítica	13/75 (Q1) 7/43 (Q1)	JCR 2015
European Journal of Nutrition	3.239	Nutrición y Dietética	27/80 (Q2)	JCR 2015

Tabla G.1. Revistas científicas y factor de impacto

G.2. Publicaciones de la Tesis Doctoral

Los estudios realizados en la presente Tesis de Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

G.2.1.: *Total zinc quantification by inductively coupled plasma-mass spectrometry and its speciation by size exclusion chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry in human milk and commercial formulas: Importance in infant nutrition.* S. Fernández-Menéndez, M. L. Fernández-Sánchez, B. Fernández-Colomer, R.R. de la Flor St. Remy, G. D. C. Cotallo, A. S. Freire, B. F. Braz, R. E. Santelli and A. Sanz-Medel. *J. Chrom. A.*, **1428** (2016) 246-254.

G.2.2.: *Iron bioavailability from supplemented formula milk: effect of lactoferrin addition.* S. Fernández-Menéndez, M. L. Fernández-Sánchez, H. González-Iglesias, B. Fernández-Colomer, J. López-Sastre and A. Sanz-Medel. *Eur. J. Nutr.* [In Press] DOI 10.1007/s00394-016-1325-7.

G.2.3.: *Quantitative iron speciation and isotope pattern deconvolution (IPD) for trace element fortification and metabolism studies: the iron case.* S. Fernández-Menéndez, M. L. Fernández-Sánchez, R. R. A. Peixoto, B. Fernández-Colomer and A. Sanz-Medel. (Enviado a Electrophoresis / Sent to Electrophoresis)

G.2.4.: *Searching for enhanced iron fortification of formula milk via nanoparticles (⁵⁷Fe-NPs) and isotope pattern deconvolution (IPD).* S. Fernández-Menéndez, R. R. A. Peixoto, M. L. Fernández-Sánchez, B. Fernández-Colomer, M. C. Romero and A. Sanz-Medel (Enviado para publicación/ Sent for publication)

G.3. Publicaciones relacionadas

G.3.1.: *Elemental and molecular mass spectrometry for integrated selenosugar speciation in liver and kidney tissues of maternal feeding and supplemented rats.* H. González-Iglesias, M. L. Fernández-Sánchez, Y. Lu, S. Fernández-Menéndez, S. A. Pergantis and A. Sanz-Medel. *J. Anal. At. Spectrom.*, 30 (2015) 267–276.

G.3.2.: *Effect of holder pasteurization on essential elements from maternal milk: total contents and protein-binding profile.* R. R. A. Peixoto, S. Fernández-Menéndez, M. L. Fernández-Sánchez, B. Fernández-Colomer, S. Cadore and A. Sanz-Medel. (Enviado para su publicación / Sent to the Journal).

G.4. Otras publicaciones

G.4.1.: *Uso de isótopos estables de elementos traza esenciales en estudios nutricionales y de biodisponibilidad.* S. Fernández-Menéndez, R. R. A. Peixoto and M. L. Fernández-Sánchez. (Boletín de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA). Diciembre 2016.

