



Master in
Key Enabling
Technologies
4 Food and
+ Bioprocesses



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUÑA

ESTUDIO DE QUELADOS DE GLICINA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FTIR

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍAS
FACILITADORAS PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA Y DE BIOPROCESOS
(KET4FOOD)

ALUMNO/A: **Jesús Clemente Villalba**

TUTORES: **Francisco Luis Sepulcre Sánchez**

David Artigas García

Curso Académico: 2017-2018

CASTELLDEFELS, SEPTIEMBRE 2017



Master in
Key Enabling
Technologies
+ Food and
+ Bioprocesses



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a Francesc Sepulcre y a David Artigas toda su implicación, todo su esfuerzo y todo el apoyo que me han mostrado a lo largo de este tiempo. Gracias por creer que con este trabajo empujamos un poquito más la ciencia.

Gracias a Mercè Raventós, por su voluntad de ayuda y amabilidad siempre.

Gracias a Umbrella F&FI, ya que sin ellos no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Gracias al Dr. Juan Jesús Pérez, del departamento de Ingeniería Química de la UPC, ya que su colaboración arroja más luz sobre esta temática.

Gracias a Enric Centelles por los “chutes” de Nitrógeno.

Gracias a María y Sheila por hacerme la vida más fácil en el laboratorio. Gracias a ti también Marc.

A mis padres por quererme tanto y haber creído siempre en mí.

A mi abuela por cuidarme siempre como nadie lo hace.

A mi hermano y mi cuñada, por estar ahí a cada momento.

A Carmen, por hacerme sonreír 7 meses.

A mi tíos/as y primos/as de Barcelona, porque sin ellos este máster no hubiera sido posible.

A mis amigos de siempre porque nunca falláis.

A mis compañeros del Ket4Food, gracias por un gran año.

A Sergio, Kathya, Laura y Fatene por vuestra amistad.

A Eva... Gracias por convertirme cada día en mejor persona. Gracias por una vida juntos. Gracias por dar todo lo que me das sin querer nada a cambio.

“No consigo encontrar ninguna noche como aquella en Barcelona”

¡Te quiero!



ÍNDICE

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
2.1 Materiales.....	7
2.2 Composición de los cristales	7
2.3 Formación de cristales	8
2.4 Limpieza de los cristales	10
2.5 Análisis de los espectros FTIR de los cristales obtenidos.....	10
2.5.1 FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy).....	10
2.5.2 Espectrofotómetro FTIR.....	11
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
3.1 Características de los cristales	1Error! Bookmark not defined.
3.2 Importancia del pH	14
3.3 Espectros FTIR	15
3.3.1. Glicina precipitación ácido/Glicina precipitación neutro	15
3.3.2. Glicina precipitación ácido/Glicina-Fe precipitación ácido	17
3.3.3. Glicina precipitación neutro/Glicina-Fe precipitación neutro	18
3.3.4. Glicina precipitación ácido/Glicina-Zn precipitación ácido	19
3.3.5. Glicina precipitación neutro/Glicina-Zn precipitación neutro	20
3.3.6. Glicina precipitación ácido/Glicina evaporado ácido.....	21
3.3.7. Glicina precipitación neutro/Glicina evaporado neutro.....	22
3.3.8. Glicina-Fe precipitación ácido/Glicina-Fe evaporado ácido	23
3.3.9. Glicina-Fe precipitación neutro/Glicina-Fe evaporado neutro	24
3.3.10. Glicina-Zn precipitación ácido/Glicina-Zn evaporado ácido	25
3.3.11. Glicina-Zn precipitación neutro/Glicina-Zn evaporado neutro	27
3.4 Simulación.....	28
4. CONCLUSIONES	29
5. PROPUESTAS DE FUTURO.....	29
6. REFERENCIAS	29



RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido elucidar sobre la estructura de los quelados de metales como el Fe y el Zn con aminoácidos. Para conseguir este objetivo se obtuvieron cristales con glicina, mediante dos métodos: precipitación y evaporación; a los que se añadieron cationes metálicos (Fe^{2+} y Zn^{2+}) a diferentes pH. Una vez obtenidos los cristales, se analizaron mediante espectroscopía FTIR, para posteriormente realizar un análisis de los espectros obtenidos. Las conclusiones a las que se llegaron fueron que, los cristales no tienen la misma estructura si son obtenidos por precipitación o por evaporación. También se comprobó que mediante el método de evaporación no se eliminaron totalmente las moléculas de agua del cristal. La coordinación con la glicina fue diferente en cada catión; el catión Fe^{2+} se coordinó con 3 glicinas, mientras que el catión Zn^{2+} se coordinó con 2 glicinas.

PALABRAS CLAVE: Gly, quelado con aminoácidos, Fe, Zn, FTIR, cristal.

RESUM

L'objectiu d'aquest treball ha estat elucidar sobre l'estructura dels quelats de metalls com el Fe i el Zn amb aminoàcids. Per aconseguir aquest objectiu es van obtenir cristalls amb glicina, mitjançant dos mètodes: precipitació i evaporació; als quals es van afegir cations metàl·lics (Fe^{2+} i Zn^{2+}) a diferents pH. Un cop obtinguts els cristalls, es van analitzar mitjançant espectroscòpia FTIR, per a posteriorment realitzar una anàlisi dels espectres obtinguts. Les conclusions a què es van arribar van ser que, els vidres no tenen la mateixa estructura si són obtinguts per precipitació o per evaporació. També es va comprovar que mitjançant el mètode d'evaporació no es van eliminar totalment les molècules d'aigua del vidre. La coordinació amb la glicina va ser diferent en cada catió; el catió Fe^{2+} es va coordinar amb 3 glicines, mentre que el catió Zn^{2+} es va coordinar amb 2 glicines.

PARAULES CLAU: Gly, quelat amb aminoàcids, Fe, Zn, FTIR, vidre.

ABSTRACT

The objective of this work has been to elucidate the structure of metal chelates such as Fe and Zn with amino acids. To achieve this objective crystals were obtained with glycine, by two methods: precipitation and evaporation; to which metallic cations (Fe^{2+} and Zn^{2+}) were added at different pH. Once the crystals were obtained, they were analyzed by FTIR spectroscopy, to later perform an analysis of the spectra obtained. The conclusions reached were that, the crystals do not have the same structure if they are obtained by precipitation or by evaporation. It was also found that the water molecules of the crystal were not completely removed by the evaporation method. Coordination with glycine was different in each cation; the Fe^{2+} cation was coordinated with 3 glycines, while the Zn^{2+} cation was coordinated with 2 glycines.

KEYWORDS: Gly, amino acid chelate, Fe, Zn, FTIR, crystal.



1. INTRODUCCIÓN

La anemia es una de las principales preocupaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), como hace público con su “*Documento Normativo sobre la Anemia*” (OMS, 2017) en el cual, propone como meta para el año 2025, la reducción en un 50% de la anemia en las mujeres en edad fecunda, ya que esta afectación según la OMS actualmente llega a la cifra de 500 millones de mujeres en edad fecunda. Para ello propone la ingesta de suplementos de hierro, que podrían ser realizados por el método de encapsulación o bien por el método de quelado con aminoácido, ya que son los más efectivos.

La microencapsulación es uno de los procesos más importantes hasta ahora para la realización de suplementos con el objetivo de maximizar la biodisponibilidad de los nutrientes (Dueik González, V. *et al.*, 2014). La microencapsulación es un método mediante el cual, el nutriente que deseamos absorber, es encapsulado con una capa continua de material, como un revestimiento, que permite hacer una separación física con la matriz del alimento. Esta técnica tiene como principal ventaja la alta biodisponibilidad que consigue para el nutriente que se precisa. Uno de los minerales que se necesita microencapsular, es el hierro, ya que así se evita un gusto metálico y un ennegrecimiento de los dientes en su ingesta (Urquidí B, C. *et al.*, 2009; Gupta, C. *et al.*, 2015, Rebellato, A. *et al.*, 2017). El problema de esta técnica es que usualmente para la encapsulación de minerales se utilizan técnicas como la aspersión por enfriamiento o congelación, o mediante liposomas. La primera de ellas es necesario un atomizador para realizarla, y en la segunda se necesitaría un sonicador y una inyección de soluciones de lípidos (Yañez, J. *et al.*, 2002), con lo cual, el coste y la complejidad de las técnicas, hacen que no sea asequible para cualquier industria.

Pero como se ha mencionado anteriormente este proceso no es el único para realizar esta función ya que hay una manera alternativa para la protección de los minerales; este método es el quelado con aminoácido, que tiene una estructura lo suficientemente fuerte para proteger al mineral y no sufrir daño en el proceso digestivo, pero lo suficientemente débil para que el mineral pueda ser liberado en el intestino. Uno de los principales aminoácidos en este método es la glicina ($C_2H_5NO_2$), es el aminoácido más pequeño de los 20 que existen y el único no quiral, es decir, no es superponible con su imagen especular. Este método es utilizado para la obtención de suplementos de hierro con resultados exitosos como ciertos estudios ya demuestran (Abdel Moety, G. *et al.*, 2017); pero no sólo en humanos sino que hay estudios recientes que también avalan su viabilidad para algunas especies animales (Winiarska-Mieczan, A. *et al.*, 2016). Su capacidad quelante no sólo se reduce al hierro, sino también con diversos cationes metálicos como zinc, cobre, etc. (Tepavitcharova, S. *et al.*, 2012; Yunarti, R. *et al.*, 2013; Winiarska-Mieczan, A. *et al.*, 2014; Kwiecień, M. *et al.*, 2016; Zhang, Z. *et al.*, 2017; Urdaneta, N. *et al.*, 2017). Respecto a la biodisponibilidad de la quelación, hay estudios que demuestran la alta biodisponibilidad que tiene la quelación (Gandia, P. *et al.*, 2006; Pineda y

Ashmead, 2001), incluso siendo superior a la encapsulación (Mehansho, H. 2006).

En las publicaciones que abarcan esta temática hay una gran variedad de estudios con vertientes emergentes de investigación que no sólo están centrados en la capacidad de suplemento alimentario, como a continuación podremos observar con algunos ejemplos:

- Efecto de diferentes cationes metálicos y el agua sobre la estructura de la glicina. Se determinaron las energías de Gibbs para determinar la “fuerza” de los complejos de los iones; la afinidad según los cationes con los diferentes enlaces de la glicina y la incorporación de moléculas de agua para comprobar si la estabilidad variaba (Remko, M., & Rode, B. 2006).
- Se escogieron diferentes cationes metálicos (hierro y zinc) en forma quelante, para estudiar el efecto de concentrados de proteínas oleaginosas y aminoácidos exógenos sobre la capacidad de dialización del hierro y el zinc (Joshi, V. *et al.*, 2014).
- Propiedades mecánicas de los cristales de glicina con diversos cationes donde se midieron las longitudes de fisuración, se determinaron el valor de tenacidad a la fractura y el índice de fragilidad, como también los parámetros relacionados con la dureza, la elasticidad y el módulo de Young. (Nagaraju, D. *et al.*, 2014).
- Formación de complejos ternarios con un catión, amino ácidos y ácido salicílico, donde se variaron las proporciones para estudiar los cambios que se daban mediante medidas potenciométricas (Rojas, D. *et al.*, 2016).
- Un método de adsorción de glicina con nanopartículas de plata, donde se utilizó la espectroscopía de Raman para la comparativa entre glicina y glicina con plata (Parameswari, A. *et al.*, 2016)
- Método novedoso de cribado de péptidos quelantes metálicos hidrolizados utilizando la resonancia del plasmón de la superficie (SPR) por sus propiedades antioxidantes para correlacionar la constante de afinidad con la capacidad de quelación (Canabady-Rochelle, L. *et al.*, 2017).

Dichos estudios que se encuentran publicados, son actuales y evidencian el enorme interés de esta temática siendo un campo con un gran desarrollo de futuro; por ello es debido que este trabajo siguiera esta línea de investigación. Lo que todavía no hay publicado, es la comparativa de dos métodos de formación de cristales de glicina con diversos cationes metálicos a diferentes pH; de ahí que el presente estudio sea una innovación dentro de este campo. Cabe destacar de este estudio que tanto la glicina (Reglamento (UE) 1119/2011 de la comisión, de 11 de noviembre de 2011) como los sulfatos (Reglamento (CE) 1170/2009 de la comisión, de 30 de noviembre de 2009) utilizados están permitidos por la unión europea para la formación de suplementos. Se debería también resaltar que el método de obtención de cristales mediante evaporación no deja residuo alguno.

Por todo lo explicado anteriormente, el objetivo general de este estudio es elucidar sobre la geometría del quelado creada entre aminoácido-catión metálico. Los objetivos particulares en este estudio, son:

1. Obtención de cristales mediante dos métodos: precipitación y evaporación
2. Obtención de cristales a diferentes pH
3. Obtención y caracterización de los espectros de los cristales mediante espectroscopía IR
4. Caracterización de la estructura molecular de los quelados de Gly con Fe^{2+} y Zn^{2+}

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

L-glicina (pureza 99%) fue proporcionada por la empresa Umbrella F&FI S.L (Llinars del Vallés, Barcelona, España). Se utilizaron los siguientes reactivos de la marca PANREAC (Castellar del Vallès, Barcelona, España) sin modificación en su composición original: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pureza 98%), $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (pureza 99%), NaOH (escamas, pureza 98%) y HCl (pureza 35%).

2.2 Composición de los cristales

La metodología a seguir para obtener los cristales, fueron dos: precipitación (Yunarti, R. *et al.*, 2013) y evaporación. Las composiciones de los cristales se muestran en las tablas (*Tablas 1 y 2*):

Las cantidades de los cationes en el método de precipitación fueron una modificación de las condiciones de Yunarti, R. *et al.*, 2013. Estas modificaciones se realizaron buscando otro tipo de relación molar entre glicina y catión.

TABLA 1: Composición de los cristales por precipitación

	Cristalización					
	Glicina		Gly-Fe		Gly-Zn	
	Ácido	Neutro	Ácido	Neutro	Ácido	Neutro
Agua Destilada	150 ml					
Glicina	60 gr.		60 gr.		60 gr.	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	-	-	55,61 gr.	44,48 gr.	-	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	35,87 gr.	14,84 gr.
Relación Molar (Gly:Catión)	-	-	1:0,25	1:0,20	1:0,25	1:0,10

Todas cantidades de los cationes del método de evaporación respetaron la relación molar del estudio de Yunarti, R. *et al.*, 2013.

TABLA 2: Composición de los cristales por evaporación

	Evaporación		
	Glicina	Gly-Fe	Gly-Zn
	Ácidos y neutros		
Agua Destilada	25 ml		
Glicina	6,25 gr.		
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	-	2,5 gr.	-
ZnSO ₄ · H ₂ O	-	-	1,5 gr.
Relación Molar (Gly:Catión)	1:0,10		

2.3 Formación de cristales

A continuación se describen ambos métodos para la obtención de los cristales:

1. Para la obtención de los cristales por precipitación, se mezclaron para cada catión las cantidades del apartado anterior; la adición de los componentes se realizó en agitación continua en un agitador magnético para favorecer la homogeneización de la mezcla. Se ajustaron los pH, adicionando ácido clorhídrico para las muestras ácidas, llevándolo por debajo del pK (2,34) de la glicina para el grupo carboxilo, e hidróxido de sodio para las muestras neutras (entre 6 y 7). El pH se comprobó con un pH-metro (Crison, modelo GLP22) previamente calibrado. Tras ello, a la mezcla se le incorporó nitrógeno con el fin de extraer todo el O₂ que contuviese el frasco para favorecer la formación de cristales (Yunarti, R. *et al.*, 2013), la incorporación de nitrógeno se realizó en agitación continua, y la duración fue de 5 minutos por cada frasco (*figura 1*).



FIGURA 1: Extracción del O₂ incorporando N₂ en las disoluciones utilizadas para la obtención de los cristales

Para evitar fugas de la atmósfera creada, se puso en la boca del frasco

Parafilm® y se cerró con el tapón del propio frasco, transcurridos estos 5 minutos. A continuación se mantuvo en agitación continua en una placa calefactora a una temperatura de 50°C durante 24 horas (*figura 2*); al concluir este periodo de tiempo, el frasco se llevó a refrigeración en una cámara a 4°C de temperatura hasta la precipitación de los cristales; el intervalo de tiempo fue aproximadamente de 8 a 11 días (*figura 3*). La limpieza de los cristales se realizó siguiendo el método posteriormente descrito (apartado Limpieza de los cristales).

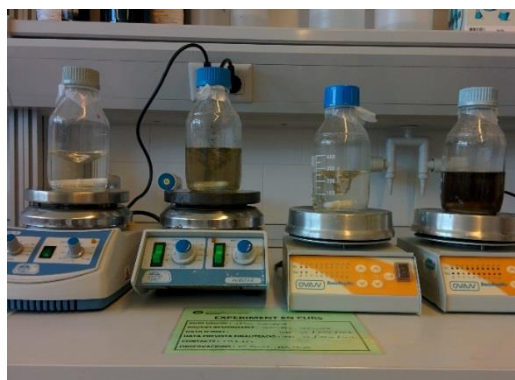


FIGURA 2: Preparación de muestras



FIGURA 3: Precipitación de los cristales

2. Para la obtención de los cristales por evaporación, se mezclaron para cada catión las cantidades del apartado anterior; la adición de los componentes se realizó en agitación continua en un agitador magnético para favorecer la homogeneización de la mezcla. Se ajustaron los pH, adicionando ácido clorhídrico para las muestras ácidas, llevándolo por debajo del pK (2,34) para el grupo carboxilo (COOH) de la glicina e hidróxido de sodio en neutras (entre 6 y 7). El pH se comprobó con un pH-metro (Crison, modelo GLP22) previamente calibrado. Tras ello, la disolución se vertió a una placa de Petri (15 cm x 2 cm) y se llevó a una estufa calefactora (J. P. Selecta, modelo 207) a 40°C donde estuvo 48 horas (*figura 4 y 5*); este proceso se siguió igual para todas las muestras. Posteriormente, se rascaron los cristales de la superficie de la placa Petri y fueron limpiados con el método que se describirá a continuación (apartado Limpieza de los cristales).



FIGURA 4: Cristales de Gly-Fe obtenidos mediante evaporación



FIGURA 5: Cristales de Gly-Zn obtenidos mediante evaporación

2.4 Limpieza de los cristales

Los cristales se limpiaron con etanol 96%, filtrando las muestras con un kitasato y metiéndolos posteriormente en una estufa calefactora a 40°C durante 2 horas (*figuras 6 y 7*) para eliminar totalmente la humedad que pudieran contener.

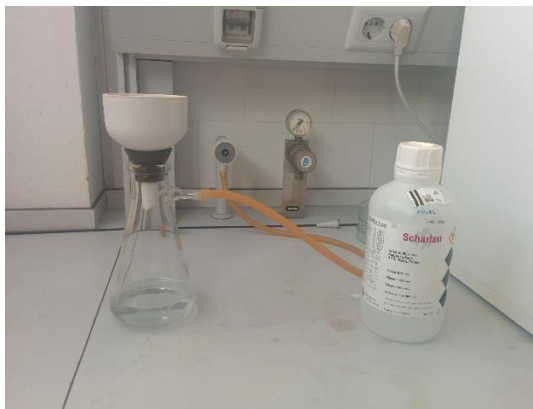


FIGURA 6: Método de limpieza de los cristales



FIGURA 7: Secado de los cristales

2.5 Análisis de los espectros FTIR de los cristales obtenidos

2.5.1 FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

La espectroscopía infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula. Un espectro infrarrojo se obtiene comúnmente pasando la radiación infrarroja a través de una muestra y determinando qué fracción de la radiación incidente es absorbida en una energía particular. La energía a la que aparece cualquier pico en un espectro de absorción corresponde a la frecuencia de una vibración de una parte de una molécula de muestra (Stuart, 2009). El fenómeno de resonancia se produce cuando la frecuencia angular de la onda incidente coincide con la frecuencia natural de oscilación del sistema, con un aumento de la amplitud.

Las frecuencias de vibración dependen de la masa de los átomos y de una constante (k) de proporcionalidad característica de cada enlace, es decir, de la fortaleza del enlace y viene derivada de la ley de Hooke.

$$\omega = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1)$$

donde:

ω = frecuencia de la vibración expresada como número de onda (cm^{-1})

k = constante dependiente de cada tipo de enlace

μ = masa reducida $\left(\frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}\right)$ (masa de los átomos)

Las vibraciones de los átomos de una molécula son la base de la espectroscopía IR. Hay dos tipos principales de vibraciones moleculares,

tensión y flexión. En el modo vibración de flexión cambia el ángulo de enlace (balanceo en el plano, tijereteo en el plano, aleteo fuera del plano, torsión fuera del plano); respecto a las vibraciones de tensión, la longitud de enlace cambia, y pueden ser simétricas o asimétricas (Jaleh, B. *et al.*, 2016). Para la descripción gráfica de dichos vibraciones se puede observar a continuación la figura 8:

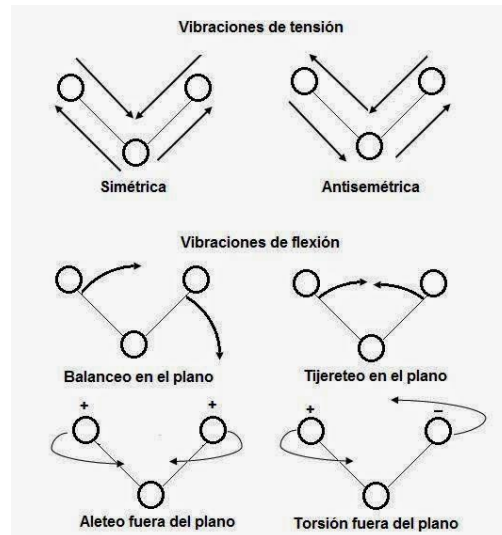


FIGURA 8: Tipos de vibraciones moleculares

2.5.2 Espectrofotómetro FTIR

Hay tres componentes básicos del espectrómetro en un sistema FTIR: fuente de radiación, interferómetro y detector. La diferencia principal entre un espectrofotómetro FTIR y un espectrofotómetro IR dispersivo es el interferómetro. El diagrama de los componentes básicos de un espectrofotómetro FTIR son los que se muestran en la figura 9:

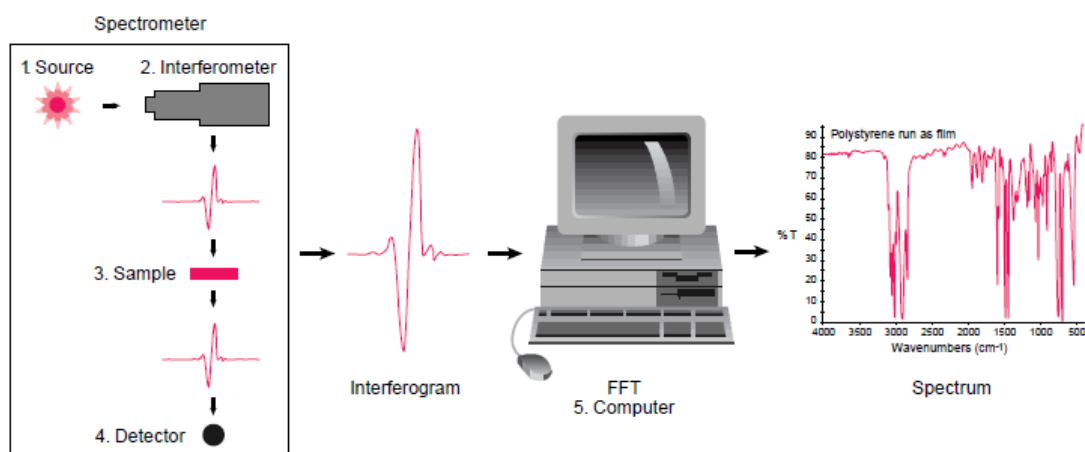


FIGURA 9: Proceso para el análisis mediante espectroscopía FTIR

El interferómetro comúnmente utilizado es un interferómetro de Michelson. La luz entrante se divide dentro de un interferómetro en dos haces de modo que las trayectorias de los dos haces sean diferentes. Un haz que va a un

espejo fijo interno y el otro a un espejo móvil. Después de la reflexión, el interferómetro de Michelson recombina los dos haces para producir un patrón de interferencia y dirigirlos al detector (*figura 10*). Entonces, es necesario realizar una operación de transformación matemática (una transformada de Fourier) sobre los datos para presentarla en una interfaz utilizable (Jaggi, N. et al., 2007).

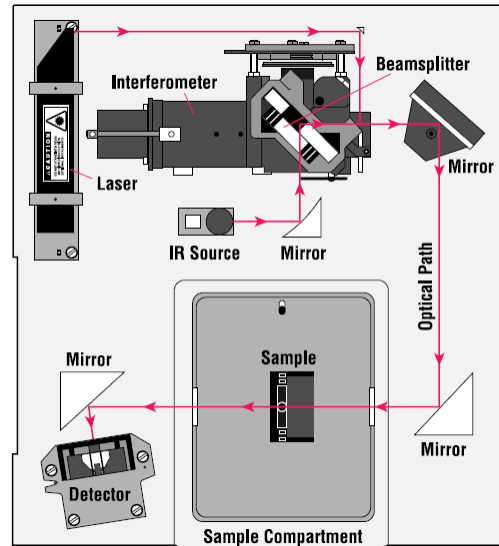


FIGURA 10: Funcionamiento de un espectrofotómetro FTIR

Los espectros de FTIR se obtuvieron en la empresa Umbrella F&FI; el instrumento que se utilizó fue un espectrofotómetro FTIR de la compañía Agilent, modelo The Cary 630 con un accesorio ATR de diamante (*figura 11*). Este accesorio aprovecha las propiedades físicas de la luz al encontrarse con dos materiales con diferencias en el índice de refracción. Cuando entra en contacto con una muestra que tiene un índice de refracción diferente, la luz infrarroja crea una onda evanescente, que proporciona una profundidad de penetración muy pequeña y específica en la muestra con cada reflexión interna. Esta trayectoria pequeña y consistente significa que se pueden obtener espectros de buena calidad, de una amplia variedad de muestras, sin preparación de la muestra. La clave para obtener estos resultados con el accesorio ATR de diamante es hacer buen contacto entre la muestra y el cristal ATR. Para ello se machacaron todos los cristales, tanto los obtenidos mediante el método precipitación como los obtenidos mediante el método de evaporación, formando con cada una un polvo que se situaba en el portamuestras del espectrofotómetro presionando el vidrio de diamante contra el polvo para favorecer el mayor contacto posible con la muestra (*figura 12*). Una vez la muestra había sido analizada, se debía limpiar el vidrio de diamante con una cantidad mínima de alcohol al 96%, para garantizar que no hubieran quedado restos del polvo anterior para la siguiente muestra y que hubiera una “contaminación” en los espectros. Las condiciones en las que se realizaron los análisis fueron en dos rangos distintos, de 400 a 1800 cm^{-1} y de 1800 a 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} . El software utilizado en los análisis fue © Agilent MicroLab, concretamente MicroLite.



FIGURA 11: Espectrofotómetro FTIR utilizado en el trabajo

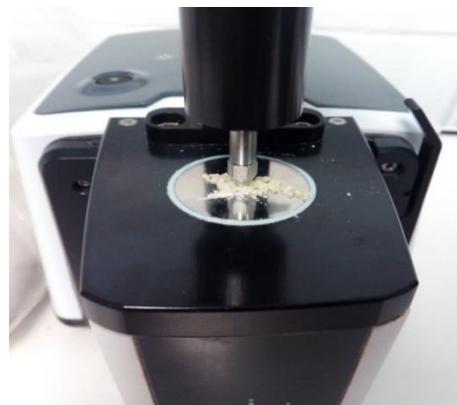


FIGURA 12: Detalle de la medición del portamuestras

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Características de los cristales

Se obtuvieron 12 cristales diferentes, de los cuales, 6 fueron mediante el método de precipitación y 6 mediante el método de evaporación. En las siguientes tablas (*tablas 3 y 4*) se muestran las diferentes características morfológicas de los cristales obtenidos. Como ejemplo de algunos de ellos se pueden observar las figuras de la 13 a la 18:

TABLA 3: Características morfológicas de los cristales por el método de precipitación

Composición		Duración Tratamiento	Color	Apariencia	Tamaño aproximado	Peso Cristales	Rto. (en peso)
Glicina	Ácida	8 días	Blanco	Brillante	3,5 x 1,5 cm	16,51 gr.	27,51%
	Neutra	9 días	Blanco	Brillante	1,0 x 1,0 cm	27,62 gr.	46,03%
Glicina - Fe	Ácida	10 días	Anaranjada	Brillante	2,0 x 1,0 cm	10,88 gr.	9,41%
	Neutra	9 días	Marrón	Brillante	0,5 x 0,3 cm	3,55 gr.	3,39%
Glicina - Zn	Ácida	8 días	Blanco	Brillante	4,0 x 2,8 cm	28,51 gr.	29,73%
	Neutra	9 días	Blanco	Brillante	2,5 x 1,2 cm	23,40gr.	31,26%

TABLA 4: Características morfológicas de los cristales por el método de evaporación

Composición		Duración Tratamiento	Color	Apariencia	Tamaño Aproximado	Peso Cristales	Rto. (en peso)
Glicina	Ácida	48 horas	Sin Color	Brillante	1,0 x 0,4 cm	6,67 gr.	108,32%
	Neutra	48 horas	Sin Color	Brillante	0,4 x 0,4 cm	4,45 gr.	71,20%
Glicina - Fe	Ácida	48 horas	Marrón Oscuro	Brillante	0,8 x 0,4 cm	4,01 gr.	47,17%
	Neutra	48 horas	Marrón Claro	Brillante	0,6 x 0,7 cm	4,57 gr.	53,76%
Glicina - Zn	Ácida	48 horas	Blanco	Brillante	0,5 x 0,5 cm	7,28 gr.	97,06%
	Neutra	48 horas	Blanco	Brillante	3,0 x 2,5 cm	7,55 gr.	100,60%



FIGURA 13: Cristal Gly ácido precip.



FIGURA 14: Cristal Gly-Fe ácido precip.



FIGURA 15: Cristal Gly-Zn neutro precip.



FIGURA 16: Cristal Gly ácida evap.



FIGURA 17: Cristal Gly-Fe ácida evap.



FIGURA 18: Cristal Gly-Zn ácida evap.

3.2 Importancia del pH

Para la formación del quelado con glicina el pH al que se encuentre es fundamental, ya que dos de sus grupos principales, amino y carboxilo, se pueden encontrar protonados o no. A pH ácido se encuentra como un ácido diprótico, es decir, tanto el grupo carboxilo como el grupo amino, están protonados; el valor debe estar por debajo del pK_1 (COOH) (2,34). Al añadir equivalentes de base el grupo α -carboxilo ($-\text{COOH}$) se disocia cediendo protones al medio y convirtiéndose en un grupo (COO^-); el grupo carboxilo no estaría protonado, pero el grupo amino sí. En el pI (punto Isoeléctrico) prácticamente el aminoácido es Zwitterión, es decir, el aminoácido es eléctricamente neutro; en el caso de la glicina su $pI = 5,97$. Añadiendo más equivalentes de base, el grupo amino ($-\text{NH}_3^+$) se disocia también, obteniéndose la forma totalmente desprotonada de la glicina ($pK_2 > 9,60$). En las figuras 20 y 21 se pueden apreciar estas diferencias en el aminoácido respecto a su pH.

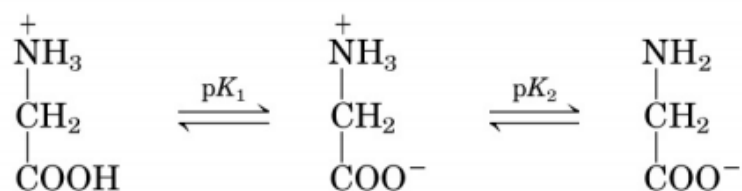


FIGURA 20: Diferentes estados de protonación según pH

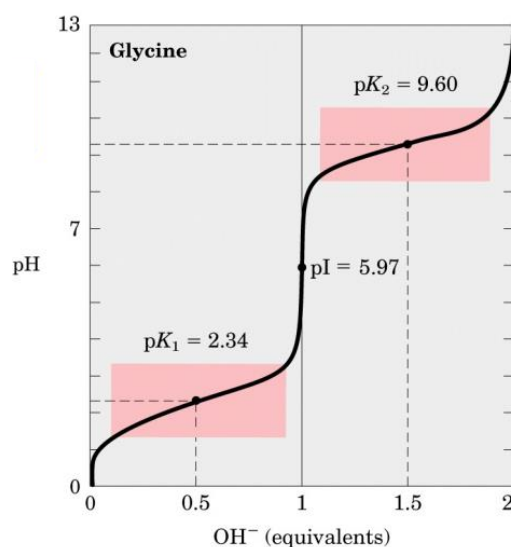


FIGURA 21: Curva titulaci3n Glicina

En la publicaci3n cient4fica de la agencia europea de seguridad alimentaria “EFSA Journal” (EFSA, 2006), se public3 que la solubilidad y la estabilidad del bisglicinato ferroso depende del pH; en el caso de este compuesto tambi3n se menciona que es inestable a pH b3sico debido a la rotura de los enlaces quelatos. Por esta raz3n no se pudieron obtener los cristales a pH b3sico.

3.3 Espectros FTIR

3.3.1 Glicina precipitaci3n 3cido/Glicina precipitaci3n neutro

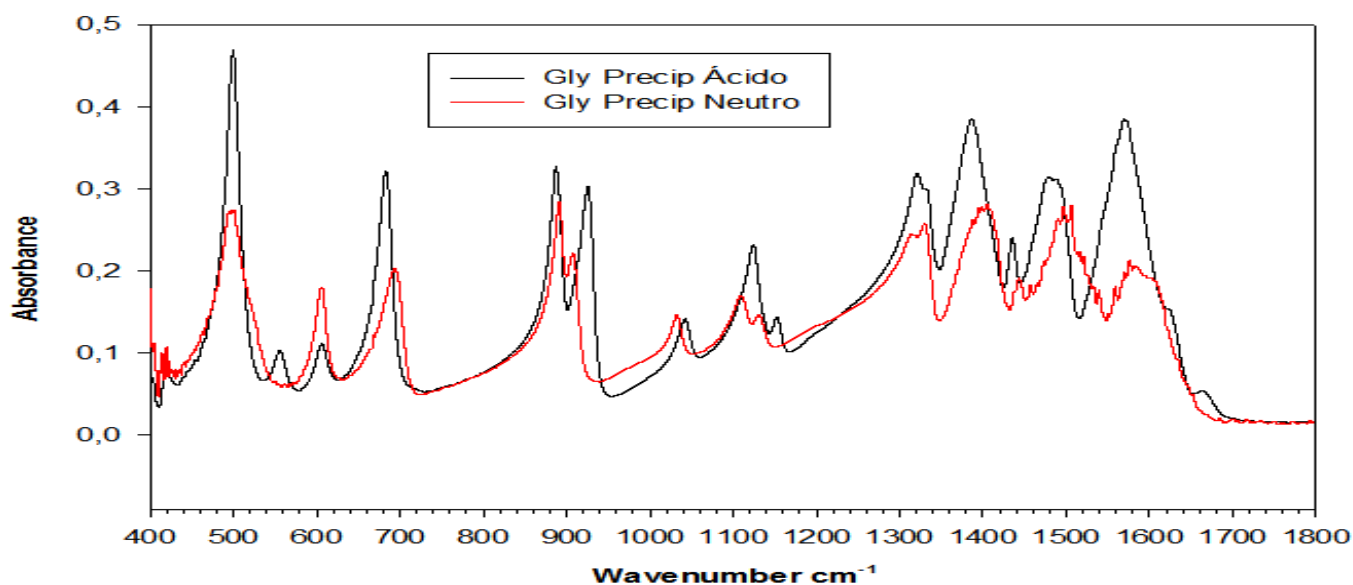


FIGURA 22: Comparaci3n de Glicina sintetizada mediante el m3todo de Precipitaci3n a diferentes pH (400-1800 cm⁻¹)

En la región entre 500-600 cm^{-1} , se puede observar como en 560 cm^{-1} aparece un pico en la glicina ácida, sin embargo en la glicina neutra no, esto es lógico, debido a que éste pico es típico del grupo carboxilo, con lo cual en su forma ácida está protonado, pero en su forma neutra no lo está, de ahí que no aparezca. A 900 cm^{-1} , en la forma ácida se aprecia un pico, que suele ser asociado a la glicina en forma dímero con otra (Rosado et al., 1998). De 1000 a 2000 cm^{-1} se reflejan los estados de agregación molecular, es la región donde aparecen las vibraciones correspondientes a los enlaces C-C, C-N, C-O, es decir, la estructura de la conformación entre glicinas (Rosado et al., 1998)

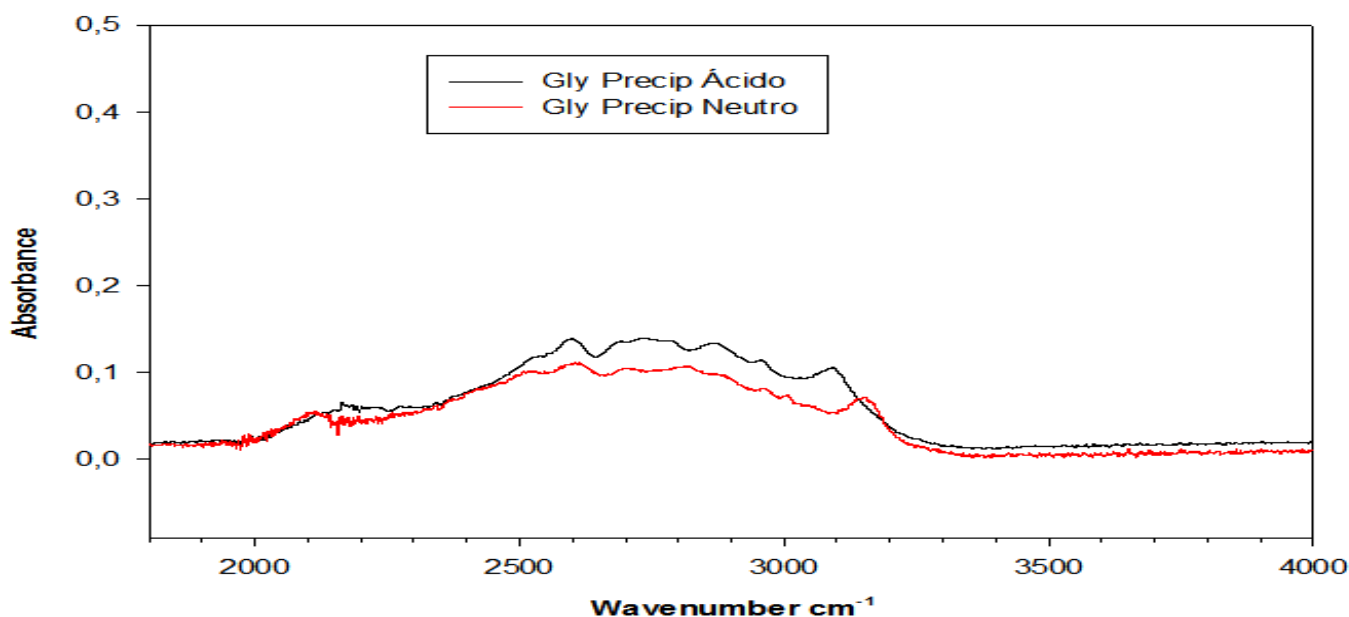


FIGURA 23: Comparación de Glicina sintetizada mediante el método Precipitación a diferentes pH (1800-4000 cm^{-1})

La región de 2000 a 4000 cm^{-1} está asociada principalmente al grupo amino (NH_3^+) y a las vibraciones del agua (Rosado et al., 1998) En este espectro se aprecia cómo influye ligeramente el pH en esta región, ya que ninguna de ellas tiene catión alguno y el método ha sido el mismo.

3.3.2 Glicina precipitación ácido/Glicina-Fe precipitación ácido

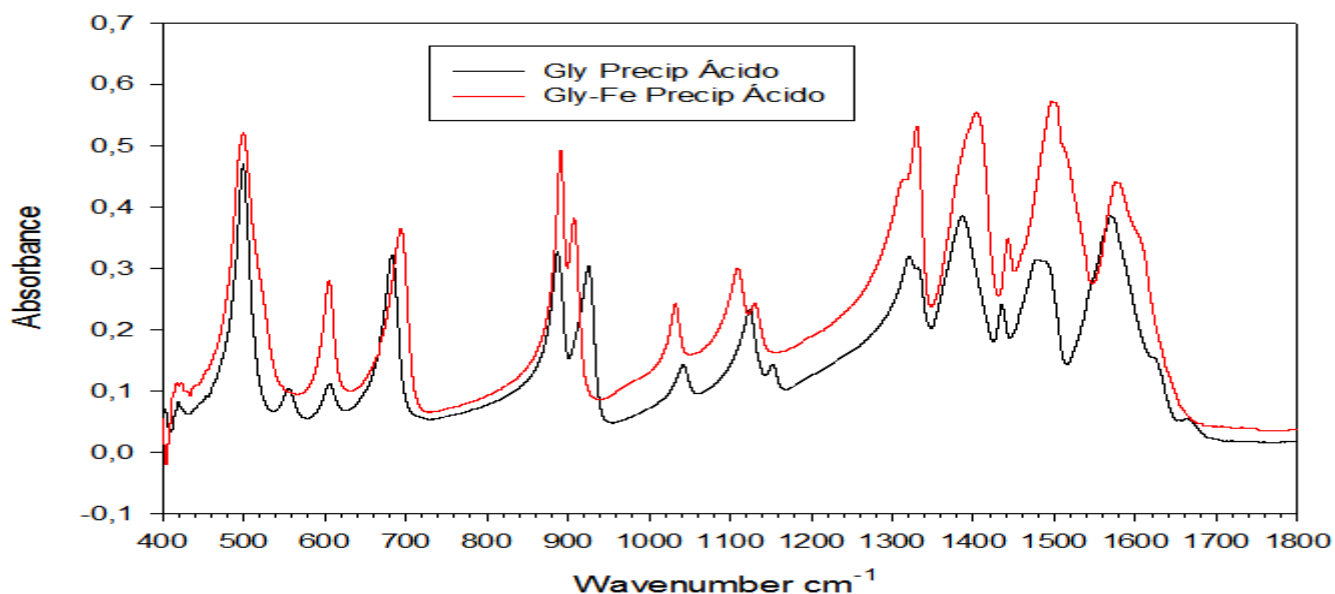


FIGURA 24: Comparación de Glicina Precipitación/Glicina-Fe Precipitación (pH ácido) (400-1800 cm^{-1})

Concretamente a 560 cm^{-1} se aprecia como en la Gly-Fe, no aparece el pico que sí se observa en la glicina sin adición de catión; al ser las dos muestras ácidas, el grupo carboxilo está protonado, y debería salir un pico en ambas, esto evidencia claramente, que si en la muestra de glicina con hierro, no ha salido es debido a que no está protonado, es decir, se ha unido con el catión (Fe^{2+}) formando el quelado.

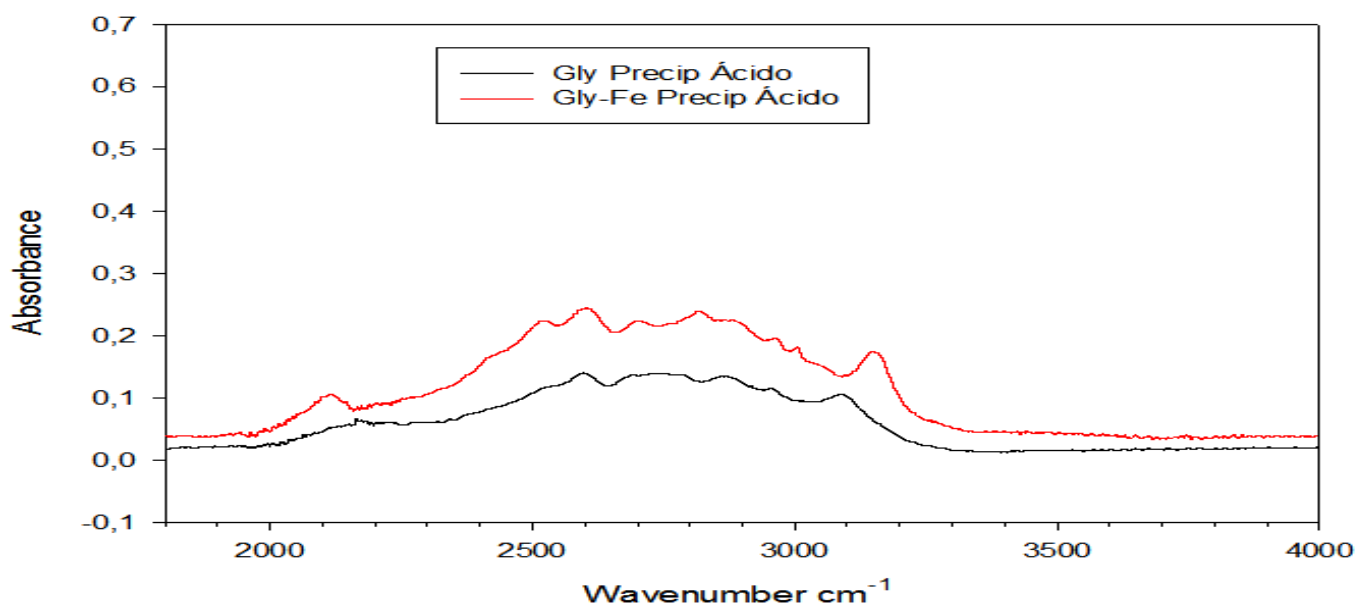


FIGURA 25: Comparación de Glicina Precipitación/Glicina-Fe Precipitación (pH ácido) (1800-4000 cm^{-1})

En esta región comprendida de 1800 a 4000 cm^{-1} se aprecia un aumento de intensidad en el espectro de la glicina con hierro, aunque se mantiene el mismo patrón que en el caso de la glicina sin catión, se podría pensar que estas diferencias son debidas a que el catión influye en esta región, ya que el pH es el mismo en ambas muestras.

3.3.3. Glicina precipitación neutro/Glicina-Fe precipitación neutro

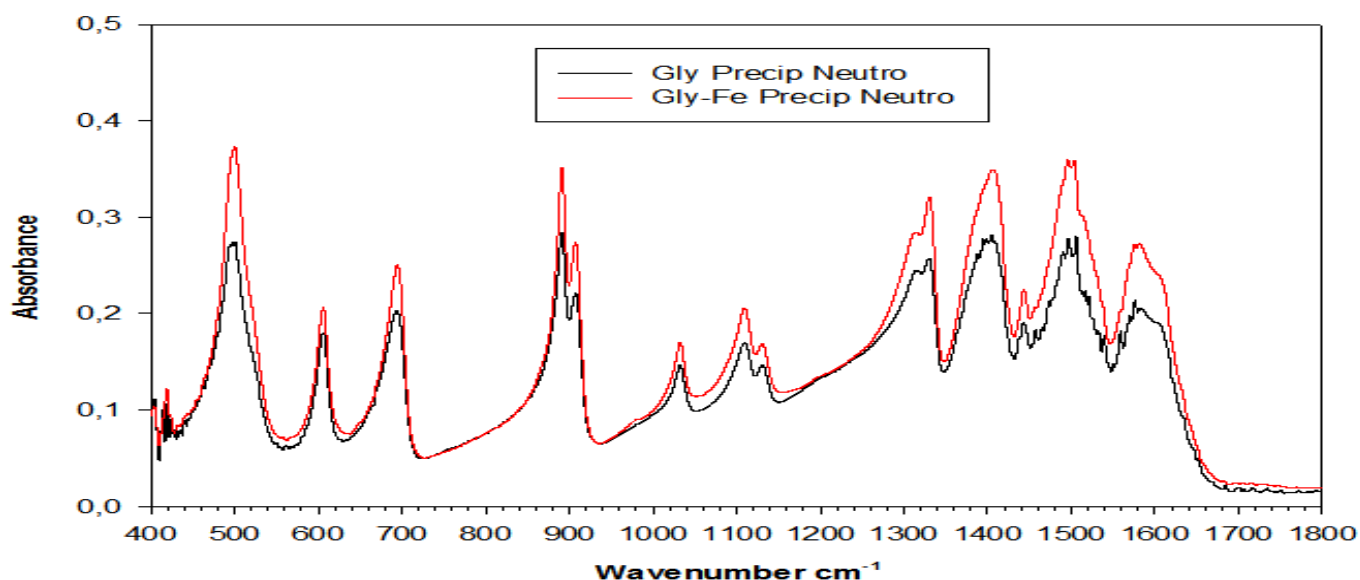


FIGURA 26: Comparación de Glicina Precipitación /Glicina-Fe Precipitación (pH neutro) (400-1800 cm^{-1})

En este espectro a 560 cm^{-1} no se aprecia en ninguno de los dos espectros pico alguno, debido a que están en la forma neutra, con lo cual el grupo carboxilo en ambos casos está desprotonado. Aunque teniendo en cuenta el anterior espectro ácido, se podría pensar que el hierro está quelando con la glicina. El resto del espectro se observa como mantienen ambos la misma forma, aunque hay un aumento leve de intensidad en la glicina con hierro.

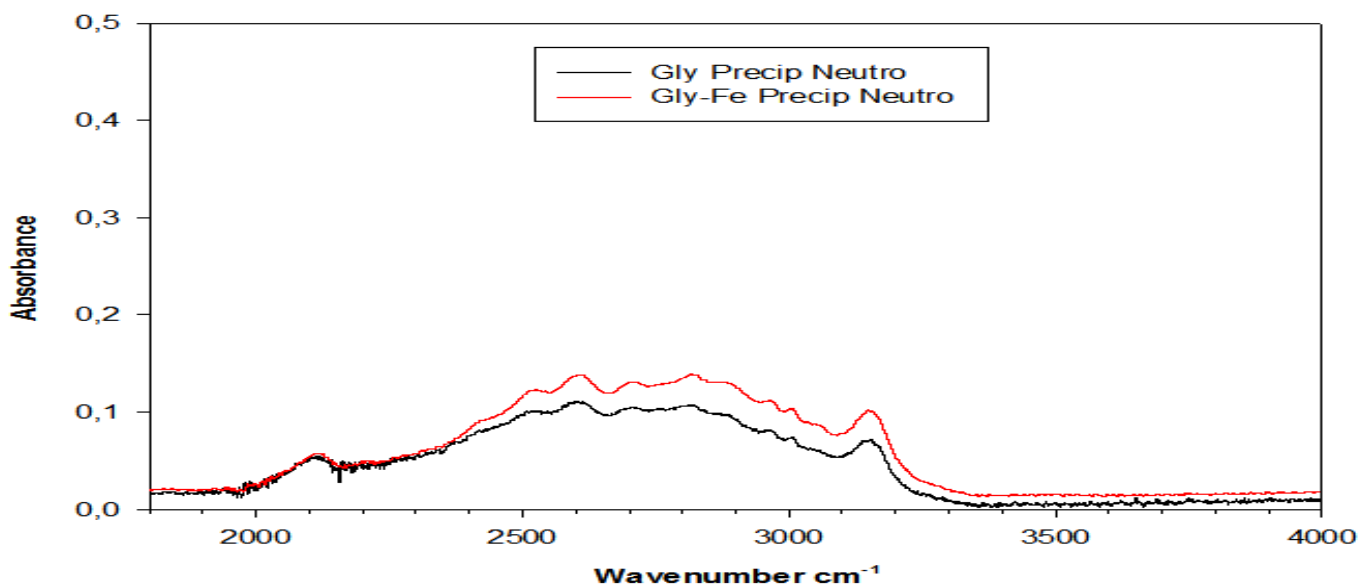


FIGURA 27: Comparación de Glicina Precipitación/Glicina-Fe Precipitación (pH neutro) (1800-4000 cm^{-1})

En esta región (1800-4000 cm^{-1}) los espectros son muy similares, y sucede como en la muestra anterior a pH ácido, hay mayor intensidad en la que lleva el catión, de ahí que sea el que influye en este cambio. Indicando como característico el pico de 3160 cm^{-1} correspondiente a grupos amino (NH_3^+) (Rosado *et al.*, 1998)

3.3.4. Glicina precipitación ácido/Glicina-Zn precipitación ácido

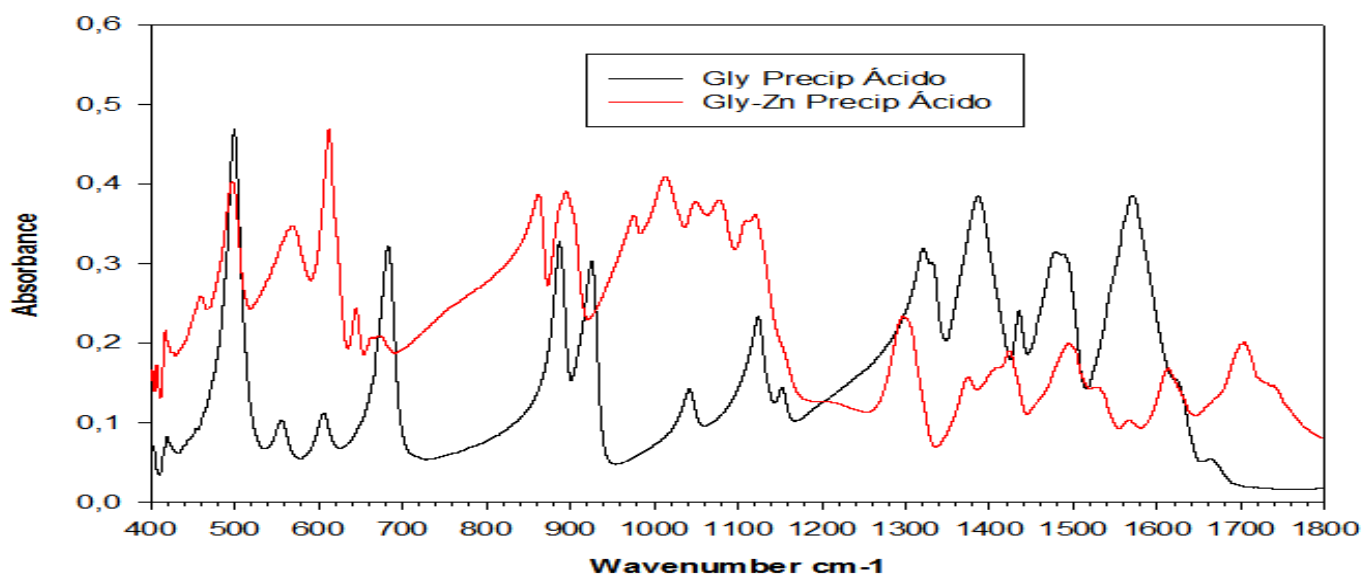


FIGURA 28: Comparación de Glicina Precipitación/Glicina-Zn Precipitación (pH ácido) (400-1800 cm^{-1})

En este espectro es apreciable un pico concretamente a 569 cm^{-1} , que es posible sea el carboxilo desprotonado, de ahí que se pueda suponer que la

quelación con el zinc no se ha dado. A 900 cm^{-1} se observa un pico intenso que podría ser un dímero entre glicinas, ya que no han interactuado con el catión. Esta teoría cobra fuerza ya que a 1740 cm^{-1} , es típico también que salga un pico de carboxilos, en este caso del zinc, sí aparece, con lo cual no hay quelación.

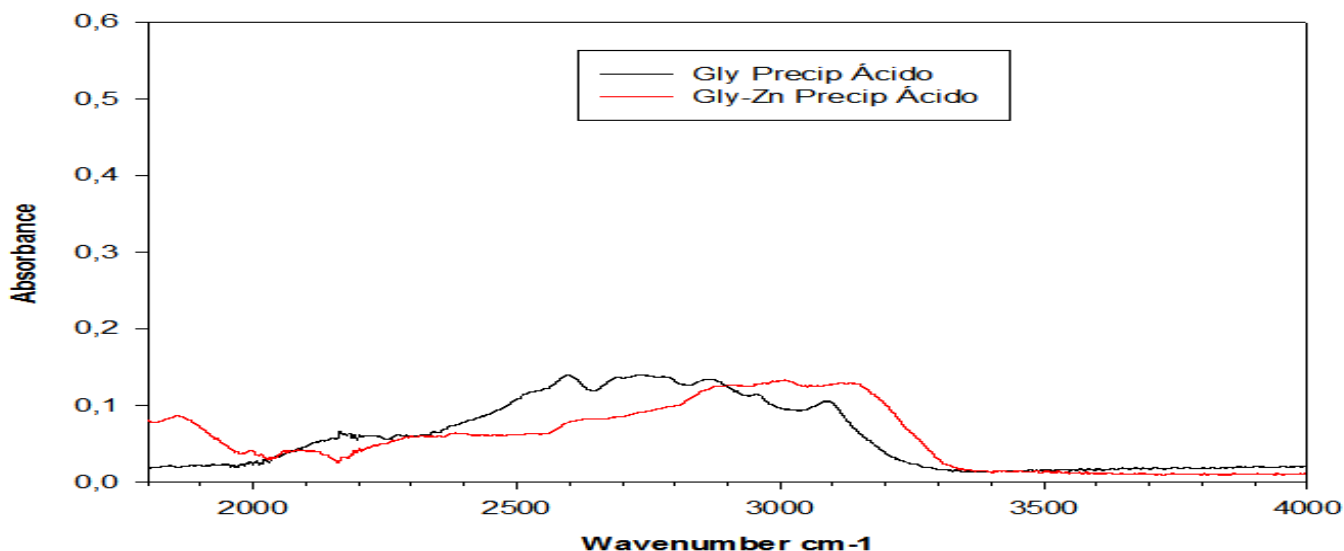


FIGURA 29: Comparación de Glicina Precipitación/Glicina-Zn Precipitación (pH ácido) ($1800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$)

Como anteriormente se ha comentado, esta región ($1800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) está asociada a grupos aminos; esta disminución destacable en esta región del espectro con catión metálico, puede indicar que el zinc no ha quelado con el grupo carboxilo, sino con el grupo amino.

3.3.5. Glicina precipitación neutro/Glicina-Zn precipitación neutro

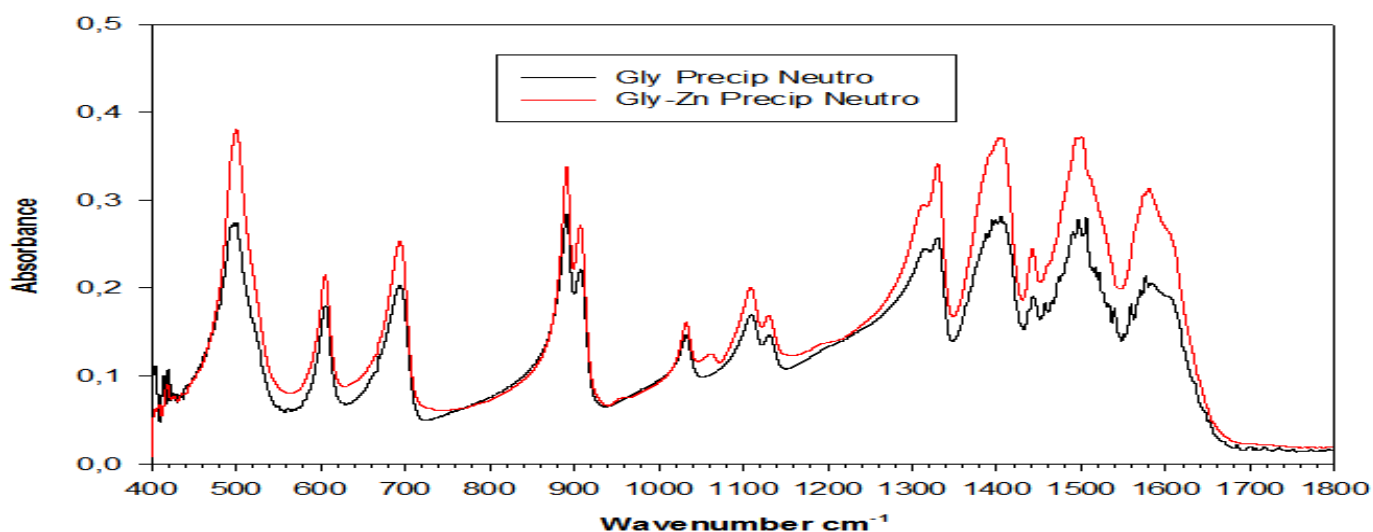


FIGURA 30: Comparación de Glicina Precipitación/Glicina-Zn Precipitación (pH neutro) ($400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$)

En la figura 30, se muestra cómo en la longitud de onda de 560 cm^{-1} , no hay pico en ninguno de los dos espectros ya que al ser ambos a pH neutro el carboxilo está desprotonado. Pero teniendo en cuenta la figura anterior de zinc que era ácida y comprobando que no había quelado, lo más probable es que en este caso, tampoco haya quelado.

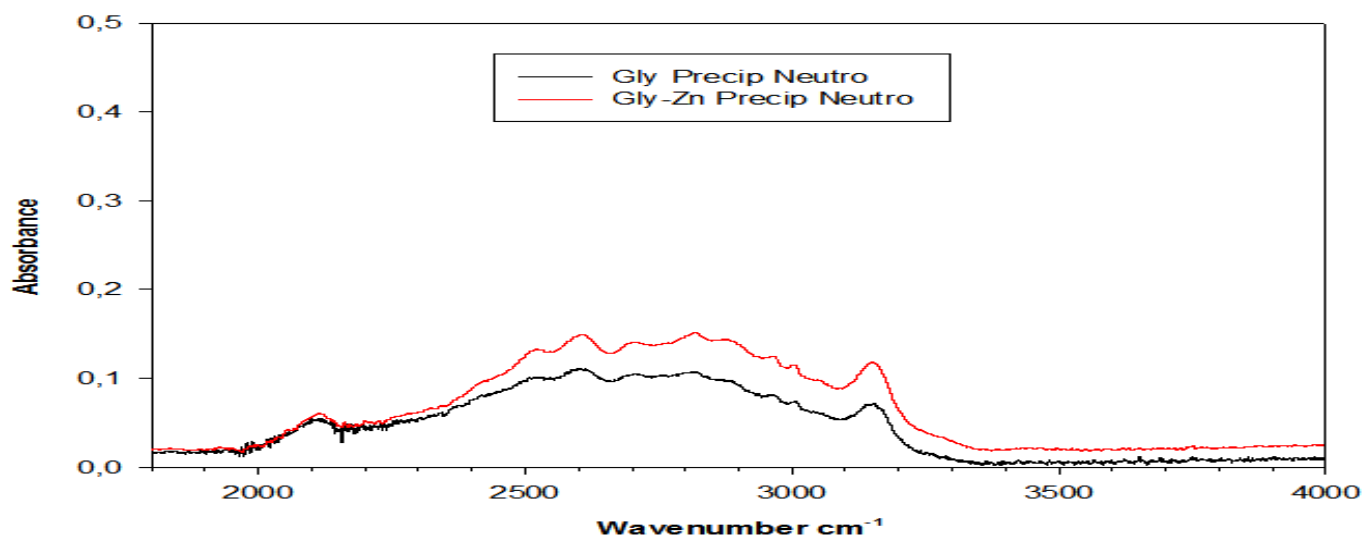


FIGURA 31: Comparación de Glicina Precipitación /Glicina-Zn Precipitación a pH neutro ($1800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$)

En la figura 31 se puede apreciar cómo la intensidad de la absorbancia del cristal con el catión de zinc a pH neutro es algo mayor que sin él, al igual que sucedía en la muestra de glicina con hierro al mismo pH.

3.3.6. Glicina precipitación ácido/Glicina evaporación ácido

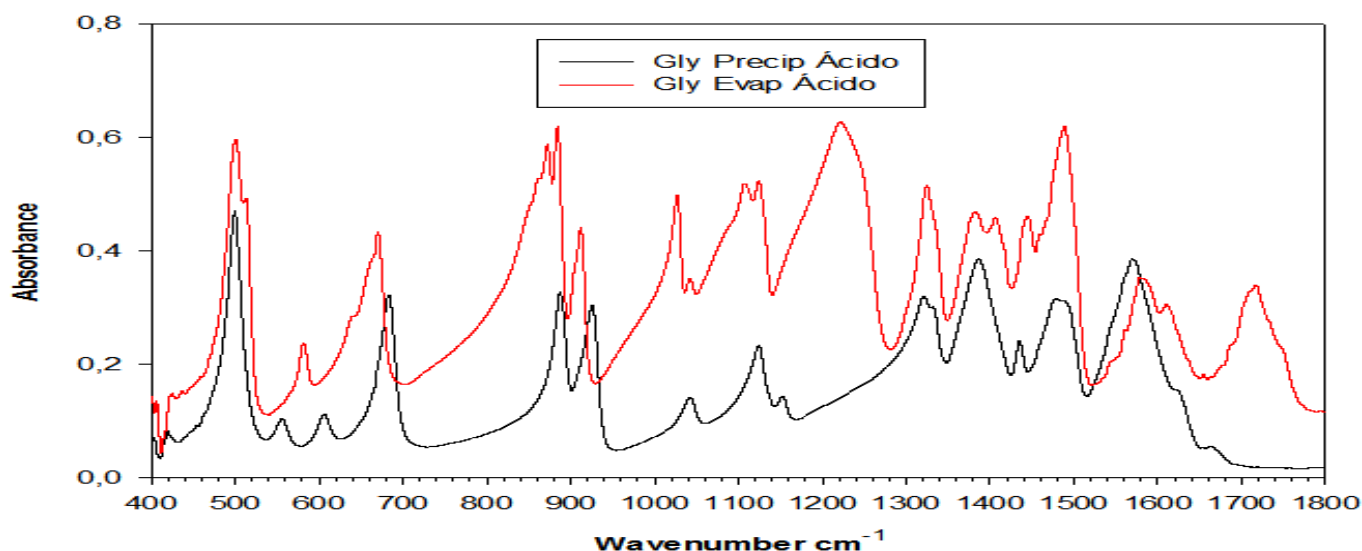


FIGURA 32: Comparación de Glicina Precipitación /Glicina Evaporación (pH ácido) ($400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$)

La figura 32, representa dos espectros bastante distintos, teniendo en cuenta que la diferencia son los métodos empleados. En la región de 560 cm^{-1}

no se aprecia en la muestra realizada por evaporación el pico que se debería ver correspondiente al grupo carboxilo, es posible que su unión se haya dado con otro grupo estructural.

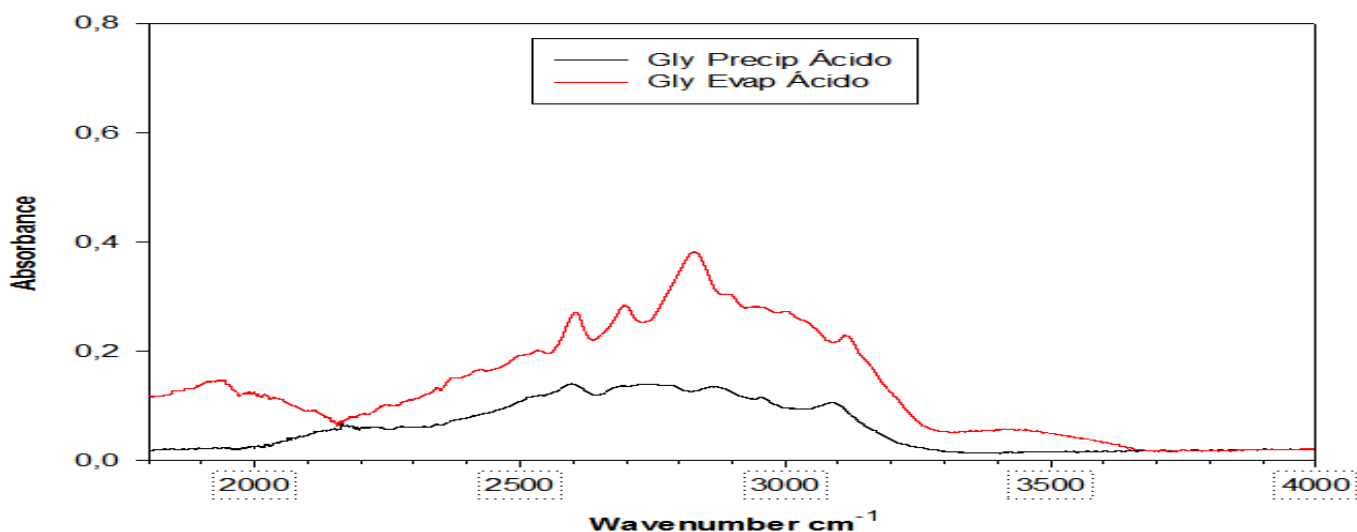


FIGURA 33: Comparación de Glicina Precipitación /Glicina Evaporación (pH ácido) (1800-4000 cm^{-1})

En la región del espectro comprendida entre 1800 y 4000 cm^{-1} comparativo entre los dos métodos, se aprecia la evidencia de que en el método de evaporación no se eliminado toda el agua posible, y de ahí esta diferencia de intensidad en el espectro.

3.3.7. Glicina precipitación neutro/Glicina evaporación neutro

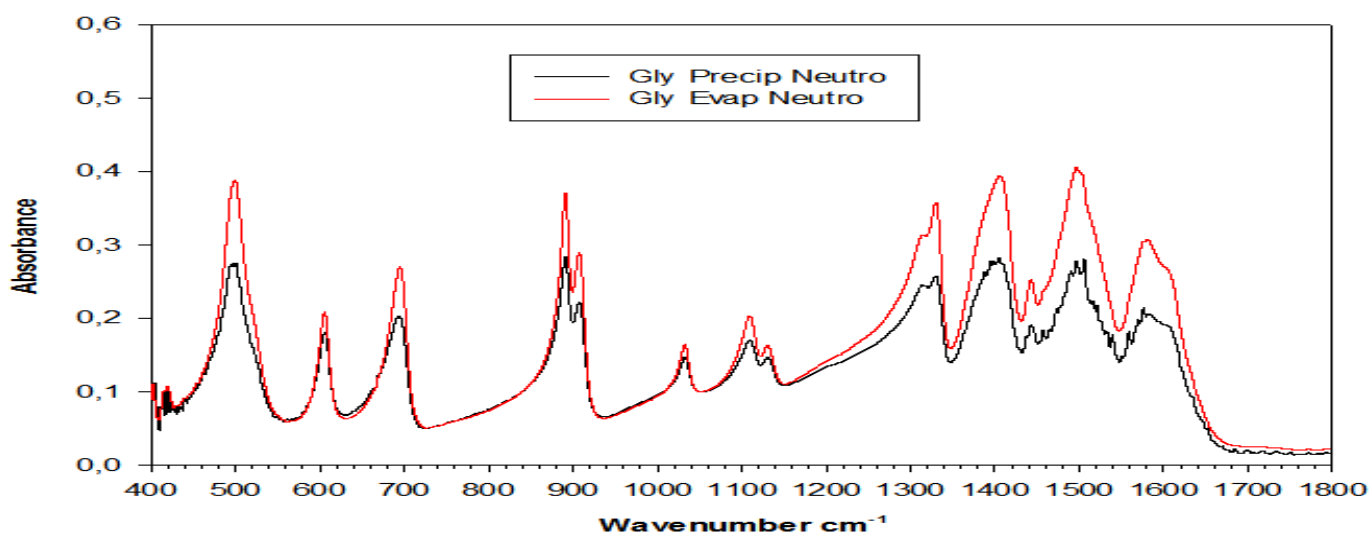


FIGURA 34: Comparación de Glicina Precipitación /Glicina Evaporación (pH neutro) (400-1800 cm^{-1})

En estos espectros se observa que en la región de 400 a 1800 cm^{-1} la forma es igual, pero la intensidad es mayor en el caso de la muestra obtenida

mediante evaporación. En ninguno de los dos espectros se observa el pico centrado a 560 cm^{-1} debido, probablemente a que al tener pH neutro.

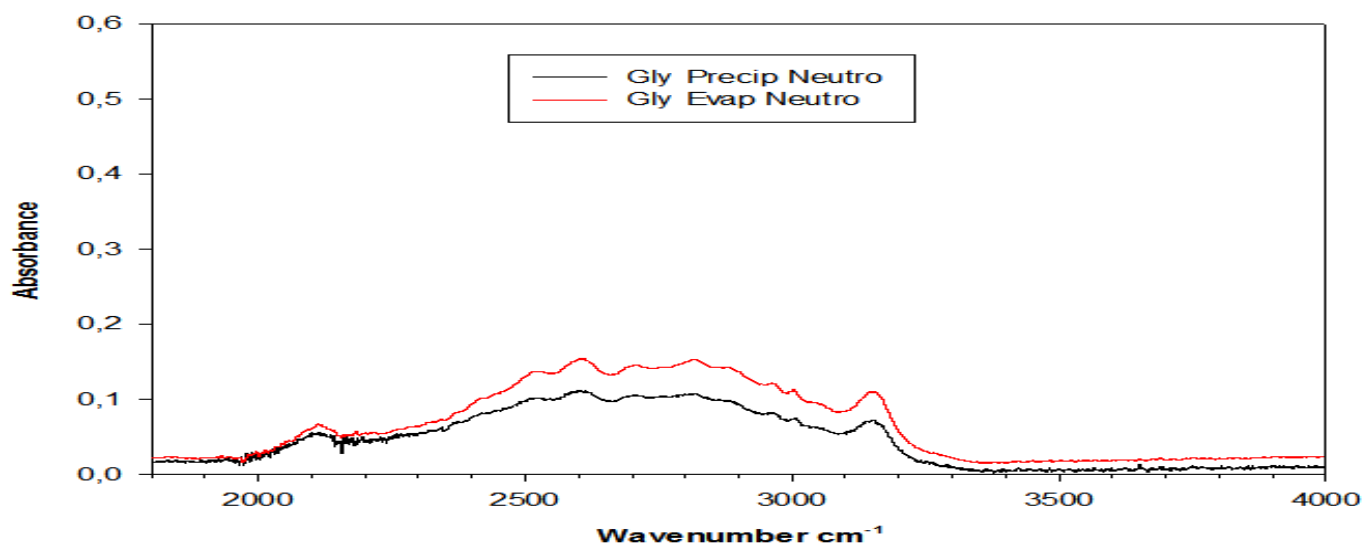


FIGURA 35: Comparación de Glicina Precipitación /Glicina Evaporación (pH neutro) ($1800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$)

En esta figura (figura 35) aunque la forma entre ambos espectros sea exactamente igual, la diferencia de intensidad en entre ellas puede ser debido a que mediante el método de evaporación no se ha podido eliminar todo el agua en las muestras.

3.3.8. Glicina-Fe precipitación ácido/Glicina-Fe evaporación ácido

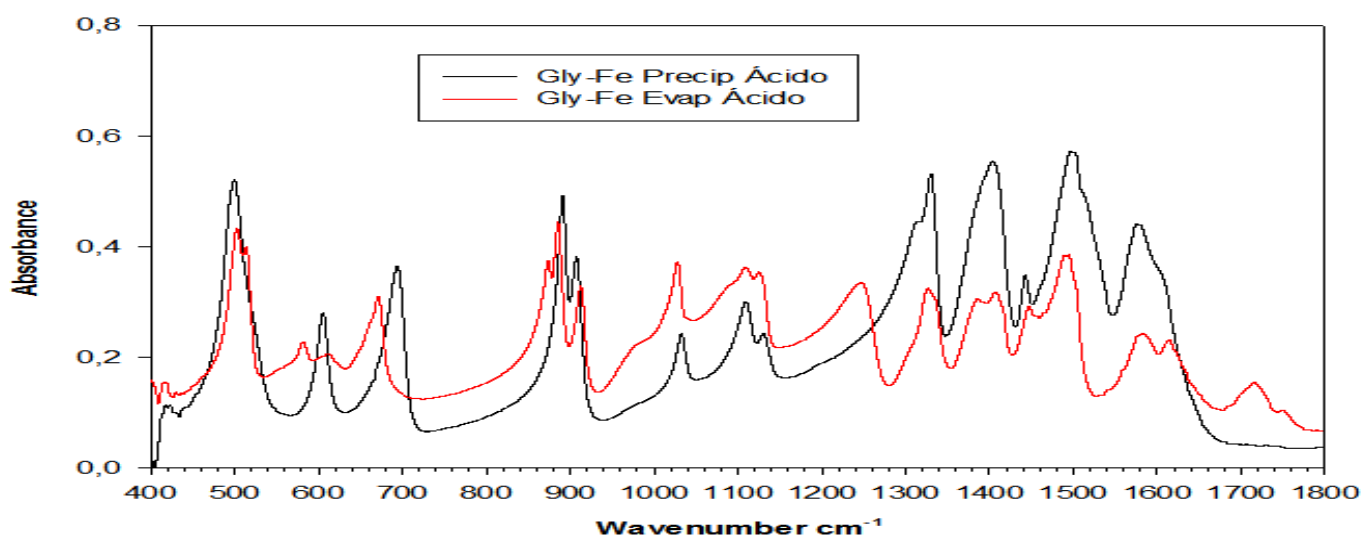


FIGURA 36: Comparación de Glicina-Fe Precipitación /Glicina-Fe Evaporación (pH ácido) ($400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$)

En la figura 36, se aprecian notables diferencias en las muestras a las que se les incorporó hierro como catión metálico; en primer lugar hay un pico cercano a los 560 cm^{-1} , lo cual indica que no ha quelado el catión con la glicina.

Hacia la parte final del espectro se observa como las longitudes de onda asociadas a la conformación estructural, son totalmente distintas, destacando un pico a 1250 cm^{-1} , que se asocia a un enlace COH encontrado únicamente en esta muestra.

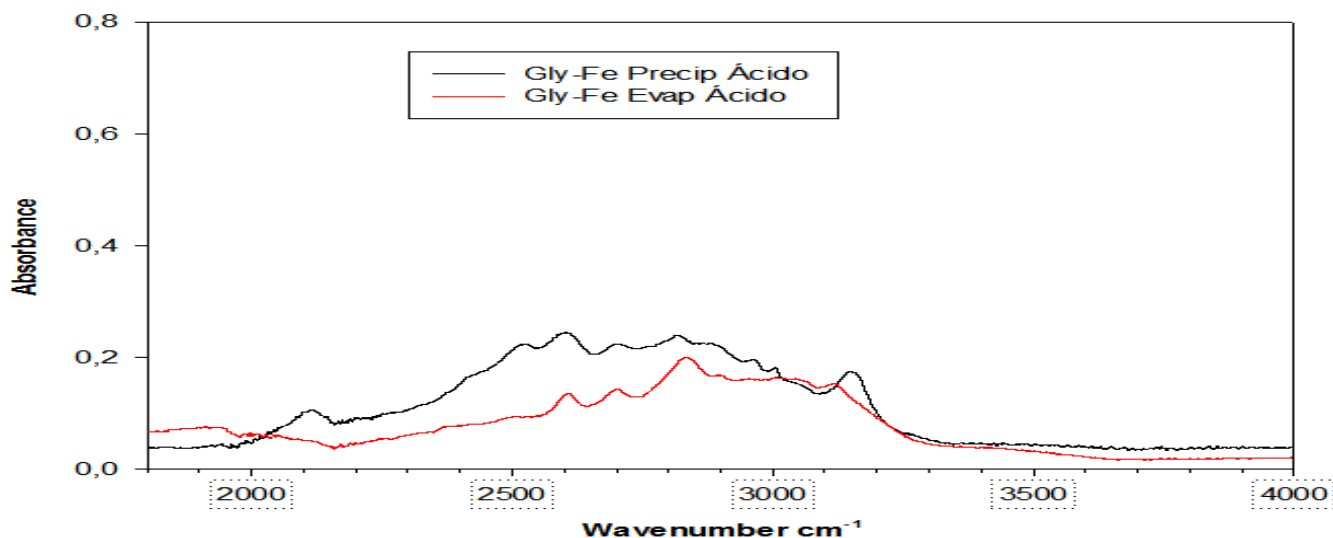


FIGURA 37: Comparación de Glicina-Fe Precipitación /Glicina-Fe Evaporación (pH ácido) ($1800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$)

En la región entre 1800 cm^{-1} hasta 4000 cm^{-1} , se observa como en el método de evaporación hay una disminución de intensidad y no está el pico característico a 3160 cm^{-1} correspondiente al grupo amino, estas dos peculiaridades pueden indicar que en este caso las glicinas se han unido a través de los grupos aminos.

3.3.9. Glicina-Fe precipitación neutro/Glicina-Fe evaporación neutro

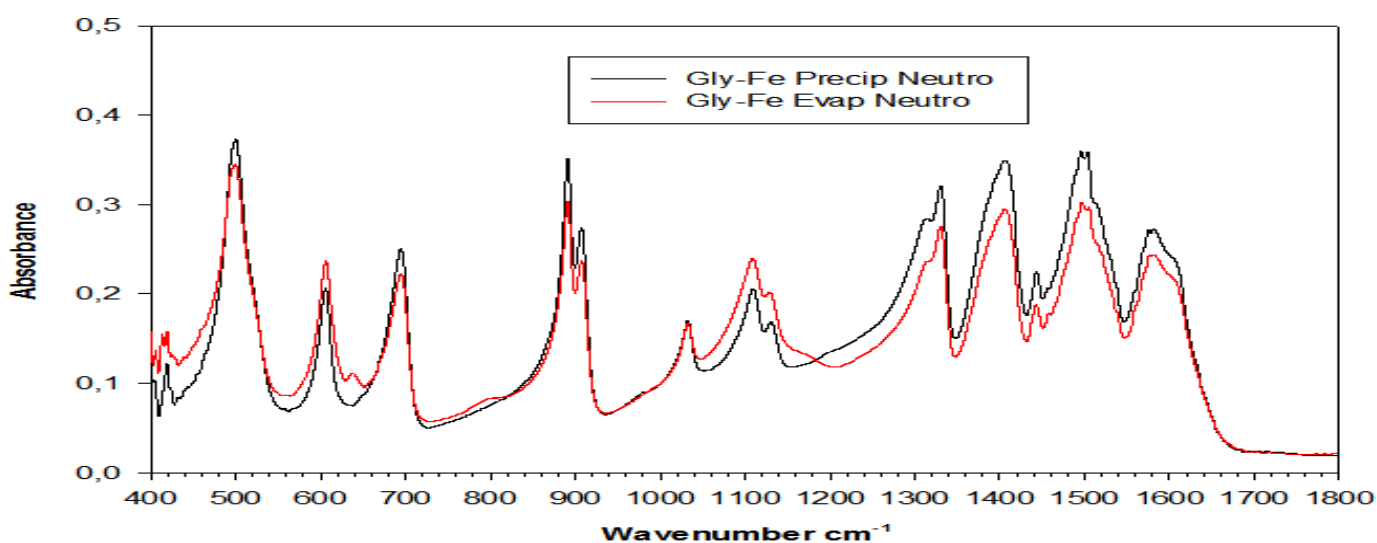


FIGURA 38: Comparación de Glicina-Fe Precipitación /Glicina-Fe Evaporación (pH neutro) ($400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$)

En esta figura 38 se aprecia como ambos espectros son similares siendo los métodos de realización de los cristales diferentes. Es lógico que no se aprecie el pico a 560 cm^{-1} típico del grupo carboxilo al ser ambas muestras neutras y estar de forma natural desprotonado dicho grupo.

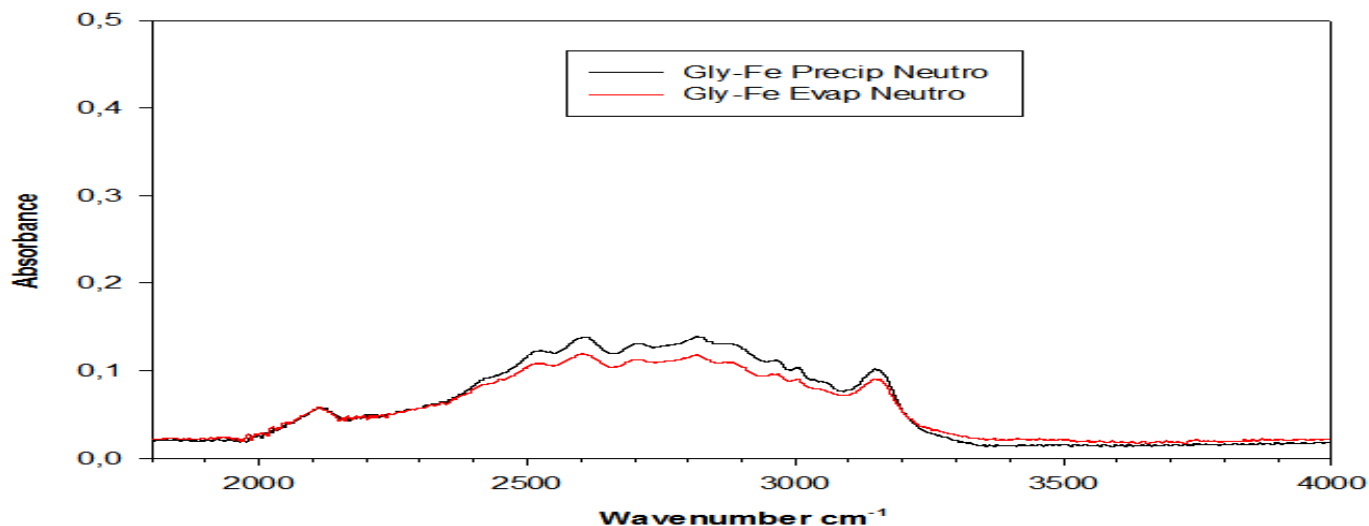


FIGURA 39: Comparación de Glicina-Fe Precipitación /Glicina-Fe Evaporación (pH neutro) ($1800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$)

En esta región final de la figura 39 es apreciable visualmente que ambos espectros son similares, incluso en el pico de 3160 cm^{-1} que no aparecía en la muestra de evaporación a pH ácido.

3.3.10. Glicina-Zn precipitación ácido/Glicina-Zn evaporación ácido

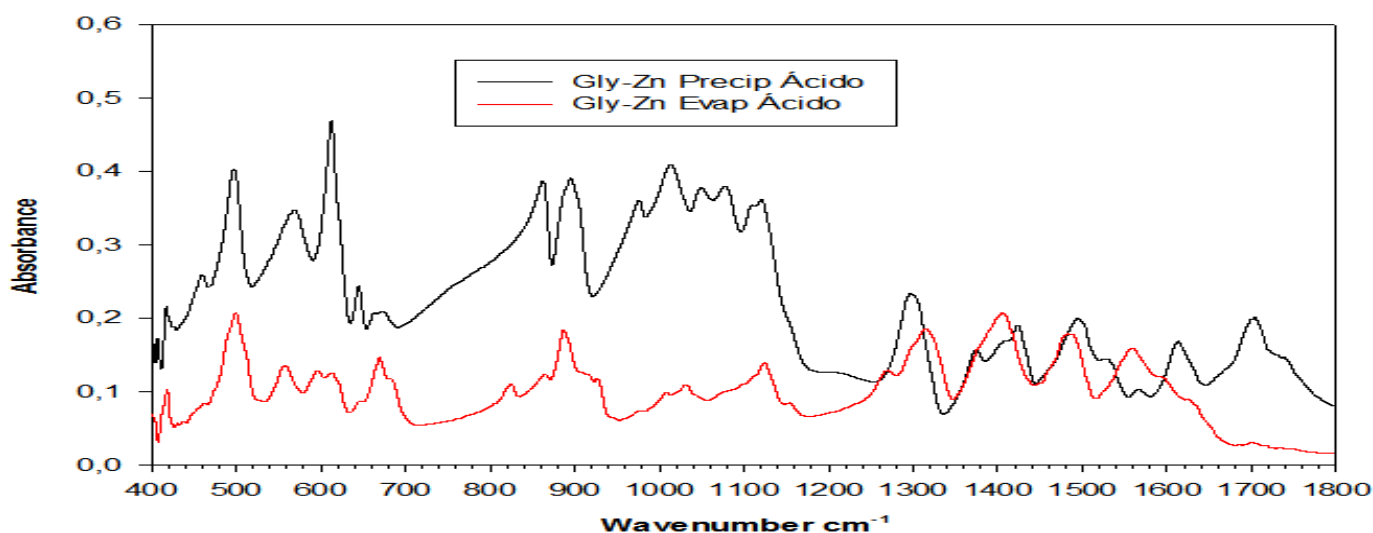


FIGURA 40: Comparación de Glicina-Zn Precipitación /Glicina-Zn Evaporación (pH ácido) ($400\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$)

La figura 40 es la más dispar de todas las comparativas que se hicieron, coinciden que en ambos espectros no ha quelado el zinc con la glicina. Pero tras eso, la intensidad es mucho mayor en la primera mitad del espectro mediante precipitación. También sus estructuras son muy diferentes

destacando algunos picos como por ejemplo, a 1027 cm^{-1} y a 1040 cm^{-1} , característicos del enlace CN (Rosado et al., 1998) o en los cristales obtenidos mediante evaporación a 1410 cm^{-1} , correspondiente a CH_2 . (Rosado et al., 1998).

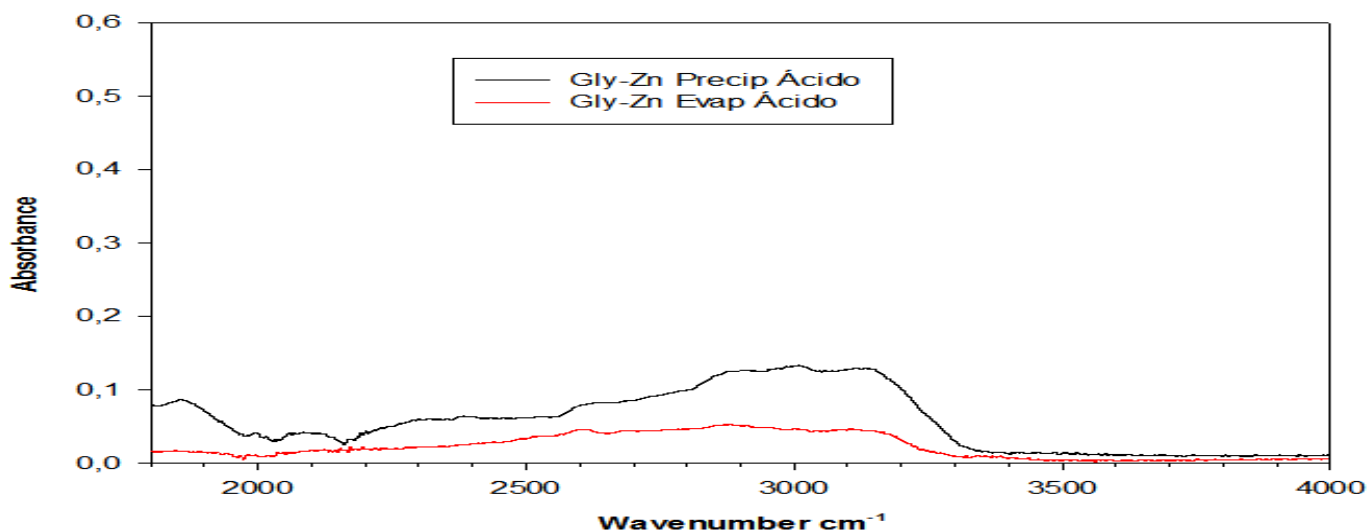


FIGURA 41: Comparación de Glicina-Zn Precipitación /Glicina-Zn Evaporación (pH ácido) ($1800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$)

En la figura 41, se comparan los espectros correspondientes a Glicina-Zn obtenidos mediante el método de precipitación y Glicina-Zn mediante el método de evaporación, estudiado el primero de ellos en la figura 28, y como ya se comentó, es posible que la disminución de intensidad de éste fuera debido a la unión entre el catión (Zn^{2+}) con grupos aminos. En esta nueva comparativa de espectros se observa que la intensidad de la muestra por evaporación es incluso menor que la previamente comentada que fue por precipitación; también se ha comentado que las muestras evaporadas contienen una mayor cantidad de agua que las precipitadas, es decir, dan una mayor intensidad en esta región que es donde se encuentran los enlaces OH y también los del grupo amino, por lo tanto, ello podría apoyar la teoría que observando la baja intensidad de esta muestra evaporada la unión del zinc es a grupos aminos.

3.3.11. Glicina-Zn precipitación neutro/Glicina-Zn evaporación neutro

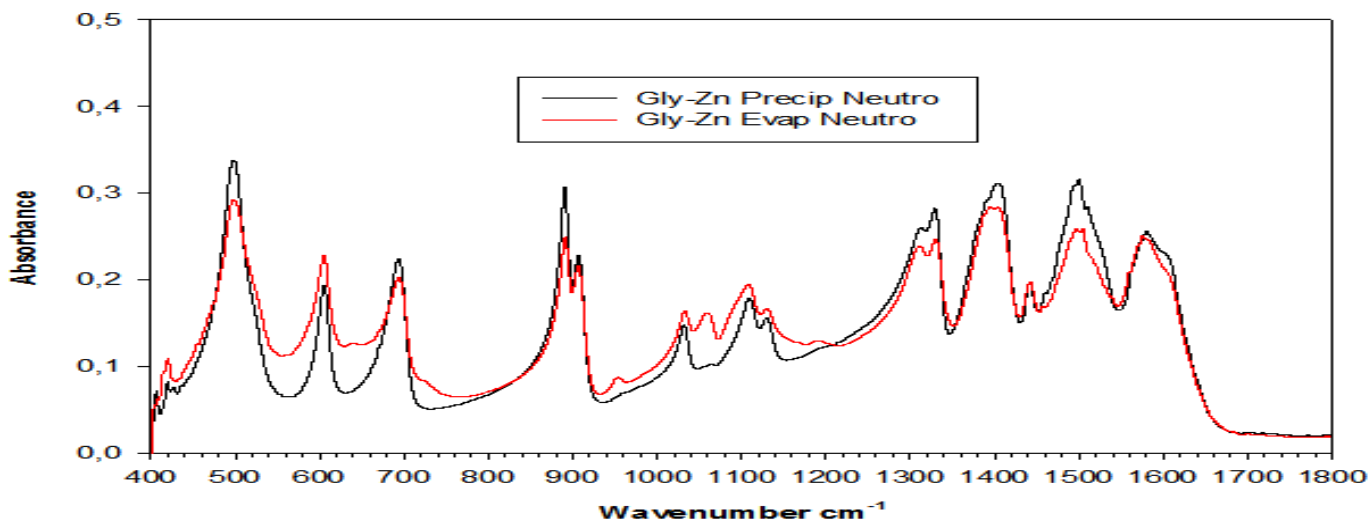


FIGURA 42: Comparación de Glicina-Zn Precipitación /Glicina-Zn Evaporación (pH neutro) (400-1800 cm^{-1})

En la figura 42 se aprecian dos espectros muy similares tanto en la forma, como en la intensidad. La única peculiaridad es un pico centrado a 1052 cm^{-1} en el cristal obtenido mediante evaporación y que corresponde a la unión CN.

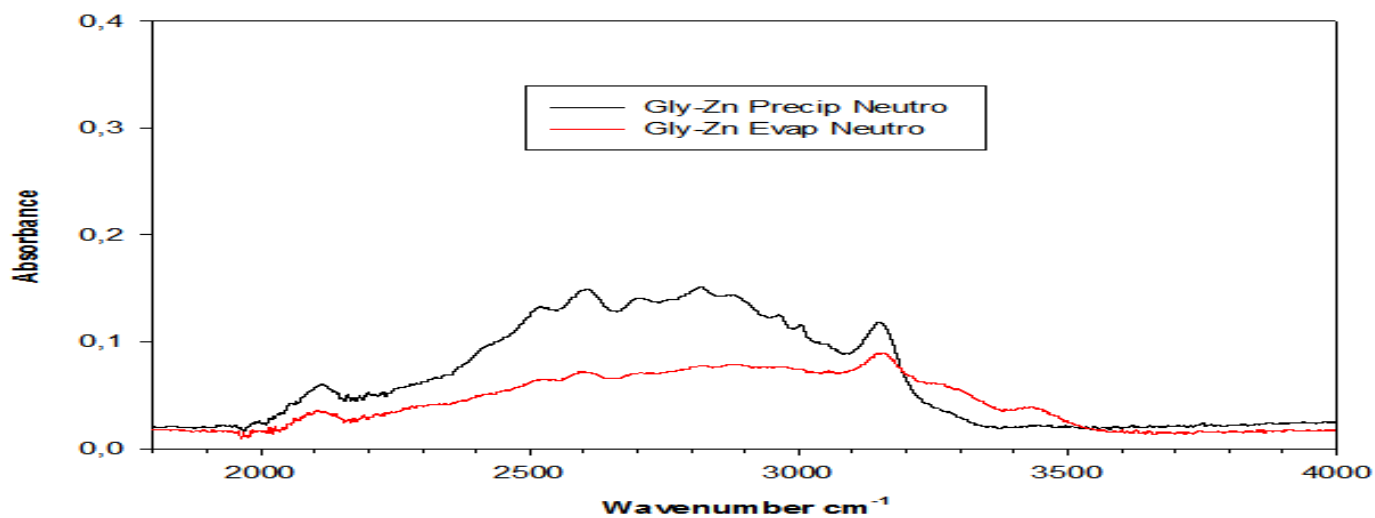


FIGURA 43: Comparación de Glicina-Zn Precipitación /Glicina-Zn Evaporación (pH neutro) (1800-4000 cm^{-1})

En la figura 43, vuelve a ser el espectro de la muestra obtenido mediante el método de evaporación menos intenso que el de precipitación, reforzando la teoría de la unión del zinc a los grupos aminos.

3.4 Simulación

En colaboración con el grupo del Dr. Juan Jesús Pérez, del Departamento de Ingeniería Química de la UPC se realizó una simulación utilizando técnicas de dinámica molecular, de la interacción entre Gly-Fe⁺² y Gly-Zn⁺². En este estudio se estudiaron complejos con 1, 2 y hasta 3 glicinas para saber con qué estructura era más estable. Las simulaciones se han hecho con el mínimo de moléculas de agua, intentando reproducir las condiciones de un cristal. Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

- Para el Fe⁺² la interacción siempre es más estable con oxígeno que con nitrógeno, para todos los complejos y el formado por 3 glicinas (donde la energía de enlace es más pequeña) (*figura 44*)
- Para el Zn⁺² la interacción es más estable con nitrógeno y con 2 glicinas (donde la energía de enlace es más pequeña) (*Figura 45*)

El resultado obtenido con zinc es contrario al estudio de Yang, G. *et al.*, 2012, en el cual se encuentra que el zinc es más estable cuando interacciona con el oxígeno del grupo carboxilo.

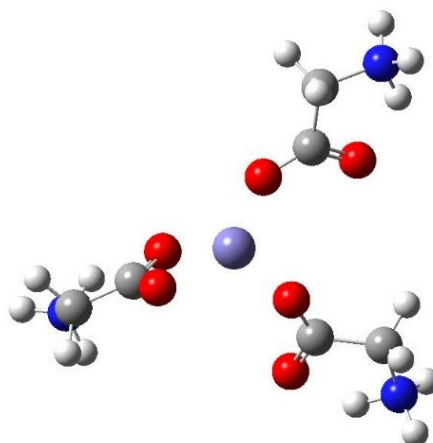


FIGURA 44: Representación de la estructura más probable entre la Gly y el Fe⁺²

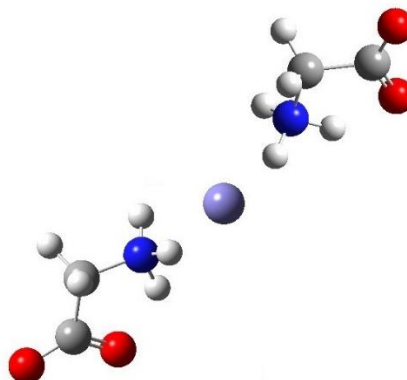


FIGURA 45: Representación de la estructura más probable entre la Gly y el Zn⁺²

4. CONCLUSIONES

Una vez realizados los diferentes estudios bajo las condiciones descritas anteriormente, así como el correspondiente análisis de los datos, obtenemos las siguientes conclusiones:

- Los espectros muestran que no forman la misma estructura molecular los cristales obtenidos mediante el método de evaporación que los obtenidos mediante el método de precipitación.
- En las muestras mediante evaporación predominó la unión del catión a grupos amino.
- Los espectros de los cristales obtenidos mediante el método de evaporación no mostraron quelado alguno con ninguno de los dos cationes.
- Los cristales obtenidos mediante el método de evaporación retuvieron más moléculas de agua que los obtenidos en el método de precipitación.
- En este trabajo se ha demostrado que la glicina no coordina de igual manera con los cationes metálicos Fe^{2+} y Zn^{2+} .
- En la interacción del catión metálico Fe^{2+} intervienen únicamente los oxígenos del grupo carboxilo.
- En la interacción del catión metálico Zn^{2+} intervienen únicamente los nitrógenos del grupo amino.
- El Fe^{2+} interacciona con 3 Gly mientras que el Zn^{2+} interacciona con 2 Gly.

Finalmente se podría concluir que el método de evaporación no sería eficaz para realizar el quelado ya que no ha demostrado unión alguna con los cationes metálicos.

5. PROPUESTAS DE FUTURO

Para elucidar profundamente en esta investigación se realizará en un futuro un análisis mediante difracción de Rayos X en el Sincrotrón ALBA, ya que esta técnica aportará mayor información de los enlaces y la conformación del quelado.

Si los resultados de dichos análisis fueran favorables, se podría realizar un escalado a planta piloto, ya que la viabilidad económica se ajustaría mejor a la realidad debido a que las estimaciones a nivel de laboratorio son irreales en este caso.

6. REFERENCIAS

Abdel Moety, G., Ali, A., Fouad, R., Ramadan, W., Belal, D., & Haggag, H. (2017). Amino acid chelated iron versus an iron salt in the treatment of iron deficiency anemia with pregnancy: A randomized controlled study. *European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology*, 210, 242-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.01.003>

Canabady-Rochelle, L., Selmeczi, K., Collin, S., Pasc, A., Muhr, L., & Boschi-Muller, S. (2017). SPR screening of metal chelating peptides in a hydrolysate for their



antioxidant properties. *Food Chemistry*, 239, 478-485.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.116>

Dueik González, V., Li, Y. and Diosady, L. (2014). Chapter 38 – Microencapsulation of Vitamins, Minerals, and Nutraceuticals for Food Applications. In: *Microencapsulation in the Food Industry*. pp. 501-522.

EFSA. (2006). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids (Yañez, Salazar Montoya, Chaires Martinez, Jiménez-Hernández, & Ramos-Ramírez, 2002) and materials in contact with food (AFC) related to Ferrous bisglycinate as a source of iron for use in the manufacturing of foods and in food supplements. *EFSA Journal*, 4, 299(1), 1-17. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2006.299>

Gandia, P., Bour, D., Maurette, J., Donazzolo, Y., Duchène, P., Béjot, M., & Houin, G. (2007). A Bioavailability Study Comparing Two Oral Formulations Containing Zinc (Zn Bis-Glycinate vs. Zn Gluconate) After a Single Administration to Twelve Healthy Female Volunteers. *International Journal For Vitamin And Nutrition Research*, 77(4), 243-248. <http://dx.doi.org/10.1024/0300-9831.77.4.243>

Gupta, C., Chawla, P., Arora, S., Tomar, S., & Singh, A. (2015). Iron microencapsulation with blend of gum arabic, maltodextrin and modified starch using modified solvent evaporation method – Milk fortification. *Food Hydrocolloids*, 43, 622-628. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.021>

Jaggi, N., & Vij, D. (2007). Chapter 9: FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY. In *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*. (pp. 411-450). Retrieved from https://dx.doi.org/10.1007/0-387-37590-2_9

Jaleh, B., & Fakhri, P. (2016). Chapter 5: Infrared and Fourier transform infrared spectroscopy for nanofillers and their nanocomposites. In *Spectroscopy of Polymer Nanocomposites* (pp. 112-129).

Joshi, V., Thatte, P., Prakash, J., & Jyothi Lakshmi, A. (2014). Effect of oilseed protein concentrates and exogenous amino acids on the dialysability of iron and zinc. *LWT - Food Science And Technology*, 59(1), 540-546. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.003>

Kwiecień, M., Winiarska-Mieczan, A., Milczarek, A., Tomaszewska, E. and Matras, J. (2016). Effects of zinc glycine chelate on growth performance, carcass characteristics, bone quality, and mineral content in bone of broiler chicken. *Livestock Science*, 191, pp.43-50.

Mehansho, H. (2006). Iron Fortification Technology Development: New Approaches. *The Journal of Nutrition*, 4(136), pp.1059-1063.

Nagaraju, D., Raja Shekar, P., Chandra, C., Rao, K., & Krishna, N. (2014). Evaluation of mechanical properties of some glycine complexes. *AIP Conference Proceedings*, 1591. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4872923>

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2017). *Documento normativo sobre anemia*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

Parameswari, A., Premkumar, S., Premkumar, R., & Milton Franklin Benial, A. (2016). Surface enhanced Raman spectroscopy and quantum chemical studies on glycine single crystal. *Journal Of Molecular Structure*, 1116, 180-187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.03.025>

Pineda, O., & Ashmead, H. (2001). Effectiveness of treatment of iron-deficiency anemia in infants and young children with ferrous bis-glycinate chelate. *Nutrition*, 17(5), 381-384. [http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007\(01\)00519-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007(01)00519-6)

Rebellato, A., Bussi, J., Silva, J., Greiner, R., Steel, C., & Pallone, J. (2017). Effect of different iron compounds on rheological and technological parameters as well as bioaccessibility of minerals in whole wheat bread. *Food Research International*, 94, 65-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.016>

Remko, M., & Rode, B. (2006). Effect of Metal Ions (Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺) and Water Coordination on the Structure of Glycine and



Zwitterionic Glycine. *The Journal Of Physical Chemistry A*, 110(5), 1960-1967. <http://dx.doi.org/10.1021/jp054119b>

Rojas, D., Araujo, M., Martínez, J., Brito, F., del Carpio, E., & Reina, K. et al. (2016). Mixed-ligand complex formation equilibria of copper(II), salicylic acid and some amino acids. *Journal Of Molecular Liquids*, 220, 238-242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.04.073>

Rosado, M., Duarte, M. and Fausto, R. (1998). Vibrational spectra of acid and alkaline glycine salts. *Vibrational Spectroscopy*, 16(1), pp.35-54.

Stuart, B. (2009). *Infrared spectroscopy*. Chichester (Royaume Uni): J. Wiley & Sons.

Tepavitcharova, S., Rabdjieva, D. and Havlíček, D. (2012). Crystallization and characterization of the compounds Gly·MSO₄·mH₂O (M=Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺; m = 0, 3, 5, 6). *Journal of Molecular Structure*, 1018, pp.113-121. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.02.068>

Unión Europea. Reglamento (CE) n° 1170/2009 de la comisión, de 30 de noviembre de 2009, por la que se modifican la Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) no 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a las listas de vitaminas y minerales y sus formas que pueden añadirse a los alimentos, incluidos los complementos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, 1 de diciembre de 2009, n° 314, pp.36-42. <http://eurlex.europa.eu/legalcontent/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1170&from=EN>

Unión Europea. Reglamento (UE) n° 1129/2011 de la comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. Diario Oficial de la Unión Europea, 12 de noviembre de 2011, n° 295, pp. 1-177.

Urdaneta, N., Madden, W., Landaeta, V., Rodríguez-Lugo, R., Hernández, L., & Lubes, V. (2017). Formation studies of binary and ternary complexes of copper (II) with an oxazol derivative of nicotinic acid and some amino acids. *Journal Of Molecular Liquids*, 227, 218-222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.12.007>

Urquidi B, C., Mejía S, H., & Vera A, C. (2009). Adherencia al Tratamiento de la Anemia con Fumarato Ferroso Microencapsulado. *Revista Chilena De Pediatría*, 80(3). <http://dx.doi.org/10.4067/s0370-41062009000300011>

Winiarska-Mieczan, A., & Kwiecień, M. (2014). The effects of copper-glycine complexes on chemical composition and sensory attributes of raw, cooked and grilled chicken meat. *Journal Of Food Science And Technology*, 52(7), 4226-4235. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-014-1510-8>

Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., Grela, E., Tomaszewska, E., & Klebaniuk, R. (2016). The chemical composition and sensory properties of raw, cooked and grilled thigh meat of broiler chickens fed with Fe-Gly chelate. *Journal Of Food Science And Technology*, 53(10), 3825-3833. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-016-2374-x>

Yang, G., Zhu, R., Zhou, L., & Liu, C. (2012). Interactions of Zn (II) with single and multiple amino acids. Insights from density functional and ab initio calculations. *Journal Of Mass Spectrometry*, 47(10), 1372-1383. <http://dx.doi.org/10.1002/jms.3075>

Yañez, J., Salazar Montoya, J. A., Chaires Martínez, L., Jiménez-Hernández, J., & Ramos-Ramírez, E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance Y Perspectiva*, 21, 313.

Yunarti, R., Zulys, A., Harahap, L. and Pramukti, M. (2013). Effectiveness of Iron Fortification on Soy-Based Foods Using Ferrous Bisglycinate in the Presence of Phytic Acid. *Makara Journal of Science*, 17(1), pp.11-16.

Zhang, Z., Han, Z., Zeng, X., & Wang, M. (2017). The preparation of Fe-glycine complexes by a novel method (pulsed electric fields). *Food Chemistry*, 219, 468-476. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.129>