(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 662 649**

(51) Int. Cl.:

| | |
|---|---|
| ***A23L 2/00*** | (2006.01) |
| ***A23C 9/13*** | (2006.01) |
| ***A61K 9/50*** | (2006.01) |
| ***A61K 33/26*** | (2006.01) |
| ***A23P 10/30*** | (2006.01) |
| ***A23L 29/256*** | (2006.01) |
| ***A23L 33/165*** | (2006.01) |

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.10.2009** **PCT/EP2009/063059**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2010** **WO10040789**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2009** **E 09783831 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017** **EP 2349228**

(54) Título: **Producto de fuente de hierro en forma de cápsulas y procedimiento para su preparación**

(30) Prioridad:

**08.10.2008 EP 08166052**
**13.11.2008 US 114261 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**09.04.2018**

(73) Titular/es:

**FRUTAROM BELGIUM, N.V. (100.0%)**
**Ambachtsstraat 6**
**1840 Londerzeel, BE**

(72) Inventor/es:

**DRUDIS SOLÉ, GALÍ**

(74) Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 662 649 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Producto de fuente de hierro en forma de cápsulas y procedimiento para su preparación

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a un producto alimenticio enriquecido con hierro y a su uso para prevenir la aparición de carencia de hierro o para reducir una carencia de hierro en un humano tal como se define por las reivindicaciones.

### Técnica anterior

La carencia de hierro es una de las enfermedades por carencia más frecuentes que se produce en la mayoría de los países en desarrollo y también es la principal enfermedad por carencia en países industriales. El enriquecimiento con hierro de determinados productos alimenticios es una manera de prevenir la aparición de carencia de hierro. Sin embargo, para que los alimentos enriquecidos sean eficaces en la reducción de la carencia de hierro, el hierro añadido debe estar lo suficientemente biodisponible.

Un agente de enriquecimiento con hierro adecuado debe satisfacer varios requisitos. En primer lugar, debe ser inocuo para el cuerpo humano. Además, debe ser insoluble en agua en entorno neutro o moderadamente ácido, lo cual es decisivo para buenas propiedades de almacenamiento. Además, debe tener una alta absorbabilidad en el cuerpo humano, es decir, buena biodisponibilidad (lo que significa buena solubilidad en el tracto gastrointestinal). También debe tener buena estabilidad y poder definirse químicamente y producirse de una manera reproducible, es decir, debe tener propiedades constantes y controlables garantizadas.

La biodisponibilidad del hierro es una función de su forma química, de la que depende su solubilidad, y de la presencia de componentes alimenticios que o bien fomentan o bien inhiben su absorción. La biodisponibilidad está estrechamente vinculada a cambios sensoriales. Las fuentes de hierro libremente solubles en agua, tales como sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso y citrato férrico de amonio, presentan una biodisponibilidad relativamente alta; no obstante, presentan la desventaja de provocar alteración del color y cambios en el sabor de los productos enriquecidos cuando reaccionan con otros componentes en el alimento. El fumarato ferroso, succinato ferroso y sacarato férrico son lentamente solubles en agua pero fácilmente solubles en ácidos diluidos tales como jugo gástrico. Aunque pueden parecer superiores al sulfato ferroso en cuanto a su efecto sobre la oxidación de grasa y alteración del color, su interacción con el alimento puede reducir la absorción de hierro. La ausencia de cualquier interacción con el alimento durante el almacenamiento de fuentes de hierro escasamente solubles, tales como pirofosfato férrico, ortofosfato férrico y hierro elemental, les ha convertido en agentes de enriquecimiento atractivos desde un punto de vista comercial, y muchos cereales para bebés contienen actualmente tales formas de hierro. No obstante, la biodisponibilidad de estas fuentes de hierro siempre es baja.

Por tanto, los compuestos de hierro comunes comercialmente usados parecen ser o bien lo suficientemente solubles en agua como para provocar problemas técnicos o bien tan difíciles de disolver que la absorbabilidad en el cuerpo humano es baja.

Se han realizado varios intentos para proporcionar una fuente de hierro biodisponible estable para el enriquecimiento encapsulándola con un compuesto inerte con el fin de protegerla frente a la oxidación y minimizar su efecto organoléptico. No obstante, la encapsulación de varias sales de hierro con aceite de soja hidrogenado, mono y diglicéridos o etilcelulosa, aunque proporciona algo de protección a la sal de hierro, ha resultado no ser adecuada para el enriquecimiento de determinados productos alimenticios (véase R.F. Hurrell *et al*. “Iron fortification of infant cereals: a proposal for the use of ferrous fumarate or ferrous succinate”, Am. J. Clin. Nutr. 1989, vol. 49, págs. 1274).

El documento EP-A-1694312 divulga partículas de sulfato ferroso monohidratado recubiertas con una capa de alginato de sodio. Para obtener las partículas, se pulveriza una disolución de alginato de sodio sobre la superficie de las partículas de sulfato ferroso sólidas con agitación. Se deposita una fina capa de la disolución de alginato sobre las partículas, favoreciendo así la formación de una película de alginato de hierro que recubre el núcleo de sulfato ferroso sin modificar. Cuando entran en contacto con agua, las partículas se disuelven lentamente, liberando el núcleo de sulfato ferroso en el medio. Por consiguiente, estas partículas pueden incorporarse en producto alimenticio deshidratado, tal como harina de trigo y otros cereales, pero no son adecuadas para enriquecer productos alimenticios que contienen agua, tales como yogures o zumos.

Adicionalmente, agentes quelantes han mostrado su eficacia en aumentar la biodisponibilidad de sales ferrosas y férricas. Se considera que la combinación de hierro y la sal de sodio de EDTA es un agente de enriquecimiento con hierro prometedor. La unión de EDTA con hierro se ve favorecida en el medio ácido del estómago, pero en el medio más alcalino del duodeno el hierro experimenta intercambio, en parte, con otros metales. En algunos estudios basados en estudios en animales y humanos se ha propuesto que el hierro se disocia del complejo de EDTA en la luz intestinal antes de absorberse, por lo que puede transportarse mediante la ruta transcelular DMT-1 altamente regulada. También se ha notificado que la combinación de hierro y EDTA protege el hierro frente a los efectos de

otros inhibidores de la absorción de hierro, tales como fitatos o polifenoles. Su potencial como agente de enriquecimiento con hierro se ha confirmado en cinco ensayos de enriquecimiento prolongados llevados a cabo en países en desarrollo (L. Zhu *et al*. "Iron dissociates from the NaFeEDTA complex prior to or during intestinal absorption in rats", J. Agric. Food Chem. 2006, vol. 54, 7929-34). Algunos ácidos orgánicos de cadena corta, tales como ácido tartárico, ácido málico, ácido succínico y ácido fumárico, han mostrado aumentos de la biodisponibilidad de compuestos de hierro de hasta 40 veces en ensayos *in vitro* usando células CACO-2 (S. Salovaara *et al*., "Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2", J. Agric. Food Chem. 2002, vol. 50, pág. 6233). El mecanismo de acción propuesto es análogo al de EDTA. El agente quelante se une al catión de hierro, Fe(II) o Fe(III), y evita que precipite debido a un pH básico o a cualquier otro compuesto que atrapa y precipita hierro. Entonces el hierro puede difundirse a los enterocitos, en los que puede absorberse.

La técnica describe el uso de partículas de alginato para aplicaciones diferentes del enriquecimiento de productos alimenticios. Por ejemplo, el documento US 4689322 divulga productos farmacéuticos (no productos alimenticios) en forma, por ejemplo, de comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, capaces de regular los niveles de calcio y hierro en la sangre, comprendiendo estas formulaciones sales de calcio de ácidos carboxílicos aniónicos poliméricos naturales o químicamente modificados, tales como ácido algínico. Específicamente, se divulga la preparación de perlas de alginato de calcio dopadas con hierro. Las perlas tienen un diámetro de 1-2 o 5 milímetros que son demasiado grandes como para ser adecuadas en el enriquecimiento de productos alimenticios. Provocarían problemas en la palatabilidad y en la obtención de un producto homogéneo durante procedimientos de fabricación de alimentos.

Como otro ejemplo de partículas de alginato, el documento WO 2008/028264 A divulga un procedimiento de producción de microcápsulas poliméricas con nanopartículas de óxido de hierro magnéticas para la liberación controlada de principios activos. Las partículas de óxido de hierro se incorporan en una red polimérica de alginato y quitosano que atrapa el principio activo deseado, tal como, por ejemplo, insulina. Después, tiene lugar la liberación controlada de principios activos mediante la aplicación de un campo magnético oscilante.

Aunque ya se conocen diversas fuentes de hierro para enriquecer un producto alimenticio, sigue existiendo la necesidad de un agente de enriquecimiento con hierro para productos alimenticios que pueda usarse con productos alimenticios hidratados y que tenga una buena resistencia mecánica, al tiempo que garantice una alta biodisponibilidad en humanos y una buena estabilidad del producto enriquecido durante su almacenamiento.

**Sumario de la invención**

Los inventores han encontrado un producto de fuente de hierro biodisponible con propiedades físicas mejoradas, que no es soluble en agua ni en medios ácidos débiles, de manera que cuando se añade a un producto alimenticio el producto alimenticio enriquecido con hierro resultante no experimenta cambios de color y no se vuelve rancio, aunque contenga un alto contenido en agua. Al mismo tiempo, el nuevo producto de fuente de hierro es suficientemente soluble al pH del estómago (que puede ser de tan solo 1 en un estómago vacío), como para proporcionar una buena biodisponibilidad. Este producto de fuente de hierro es fácil de manipular, tiene una buena resistencia mecánica y puede reproducirse de manera sistemática.

Por tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un producto alimenticio enriquecido con hierro que comprende un producto de fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas, en el que las cápsulas comprenden un núcleo que comprende alginato de hierro, y una capa exterior que comprende alginato de calcio tal como se define por las reivindicaciones. Otro aspecto de la presente invención es el uso del producto alimenticio enriquecido con hierro tal como se definió anteriormente para prevenir la aparición de carencia de hierro o para reducir una carencia de hierro en un humano.

**Descripción detallada de la invención**

Los términos "biodisponibilidad" y "biodisponible" se refieren al grado en el que un nutriente o micronutriente puede absorberse y usarse por el organismo. Para los fines de la invención, la sal de hierro usada para preparar el producto de fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas usado en el producto alimenticio enriquecido con hierro de la presente invención debe tener una buena biodisponibilidad, lo que significa buena solubilidad en el tracto gastrointestinal. Por consiguiente, los términos "sal de hierro biodisponible", "sal de hierro soluble en agua biodisponible" y "sal de hierro soluble en agua" tal como se usan en el presente documento se refieren a cualquier sal de hierro que es libremente soluble en agua, tal como sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso y citrato férrico de amonio, así como a cualquier sal de hierro que es lentamente soluble en agua pero fácilmente soluble en ácidos diluidos, tales como fumarato ferroso, succinato ferroso y sacarato férrico.

Las sales de alginato solubles en agua, tales como alginato de sodio, potasio, magnesio o amonio, son polisacáridos lineales naturales de algas marrones marinas compuestos por dos tipos de monómeros, residuos de ácido beta-D-manurónico (M) y alfa-L-gulurónico (G) dispuestos de manera no regular y en bloques a lo largo de la cadena. El biopolímero que porta grupos carboxílicos es capaz de formar complejos con iones polivalentes de metales.

Cuando una sal de hierro soluble en agua entra en contacto con una sal de alginato soluble en agua, tiene lugar la reticulación y gelación de grupos carboxílicos del alginato mediante reacción con los cationes de hierro, tales como $Fe^{2+}$ o $Fe^{3+}$.

Se ha encontrado que, cuando se coloca un núcleo que comprende alginato de hierro en contacto con una disolución en agua de una sal de calcio, se forma una cápsula (formada por el núcleo cubierto con una capa exterior que comprende alginato de calcio) mediante reacción de la sal de alginato con los cationes de calcio. Esta capa exterior, que no es soluble en agua ni en ácidos débiles, evita el contacto del hierro con el entorno al tiempo que aumenta la resistencia mecánica de las cápsulas. Este producto de fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas es adecuado para enriquecer un producto alimenticio hidratado.

De manera general, el producto alimenticio que va a enriquecerse con el producto de fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas anteriormente mencionado es un alimento o bebida, particularmente un alimento o bebida que es sensible a la oxidación, desarrollo de aroma extraño o alteración del color en presencia de hierro libre. Particularmente, el producto de fuente de hierro puede usarse para enriquecer un producto alimenticio hidratado, tal como yogur, leche, caldos, salsas, zumos y otras bebidas, así como un producto alimenticio comúnmente enriquecido, tal como productos en polvo, harina de trigo y otros cereales, y un producto alimenticio preparado a partir de los mismos, tal como pan, pasta y tartas. Ejemplos adicionales de producto alimenticio adecuado para enriquecerse según la invención son emulsiones de carne, tales como salchichas.

Cuando se forma el núcleo, si la cantidad de sal de hierro es superior a la necesaria para reaccionar con todos los monómeros de la sal de alginato, la sal de hierro se atrapará en el gel formado. Por el contrario, si la cantidad de la sal de alginato soluble en agua es superior a la necesaria para reaccionar con todos los cationes polivalentes disponibles, la sal de alginato soluble en agua también formará parte del gel obtenido. Por consiguiente, en una realización del primer aspecto de la presente invención, el núcleo comprende además al menos una sal de hierro biodisponible. En otra realización del mismo aspecto de la invención, el núcleo comprende además al menos una sal de alginato soluble en agua, tal como alginato de sodio, potasio, magnesio o amonio. Preferiblemente, la sal de alginato soluble en agua es alginato de sodio.

Las sales de hierro solubles en agua mejoran la biodisponibilidad de hierro y, por tanto, se prefieren. Por tanto, preferiblemente, la sal de hierro biodisponible es una sal de hierro libremente soluble en agua, tal como sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso y citrato férrico de amonio, o una sal de hierro lentamente soluble en agua pero fácilmente soluble en ácidos diluidos, tal como fumarato ferroso, succinato ferroso y sacarato férrico. Preferiblemente, la sal de hierro biodisponible se selecciona de sulfato ferroso y sacarato férrico. Más preferiblemente, la sal de hierro biodisponible es sacarato férrico.

Adicionalmente, tal como se mencionó anteriormente, agentes quelantes han mostrado su eficacia en aumentar la biodisponibilidad de sales ferrosas y férricas.

Por consiguiente, en una realización del primer aspecto de la presente invención, el núcleo comprende además un agente quelante. Preferiblemente, el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en ácido tartárico, málico, succínico, fumárico, cítrico, láctico y oxálico, o una sal de los mismos, EDTA y sacarosa. Más preferiblemente, el agente quelante es sacarosa. La combinación de una sal ferrosa o férrica y un agente quelante para formar un núcleo que comprende alginato de hierro con una capa exterior que comprende alginato de calcio según la presente invención mejora la biodisponibilidad de hierro, al tiempo que es capaz de mantenerlo aislado de su entorno fuera del tracto gastrointestinal, evitando la degradación de la matriz que contiene el hierro y el mal sabor asociado con sales de hierro usadas en el enriquecimiento. Tal como se mencionó anteriormente, el sacarato férrico se incluye entre las sales de hierro solubles en agua usadas en la presente invención, aunque estrictamente es un complejo de hidróxido férrico-sacarosa. El uso de sacarato férrico como sal de hierro incorpora las ventajas del agente quelante por la presencia de sacarosa.

El producto de fuente de hierro mencionado se fabrica mediante el siguiente procedimiento que comprende las etapas de (i) formar un núcleo que comprende alginato de hierro poniendo en contacto al menos una sal de hierro soluble en agua biodisponible y al menos una sal de alginato soluble en agua, (ii) poner en contacto el núcleo con una disolución acuosa de una sal de calcio de una concentración comprendida entre 0,025 M y una concentración inferior al punto de saturación de la disolución, y (iii) aislar las cápsulas sólidas obtenidas. Preferiblemente, la al menos una sal de hierro biodisponible usada para formar el núcleo es sacarato férrico. Además, preferiblemente, la al menos una sal de alginato usada para formar el núcleo es alginato de sodio.

El núcleo usado para obtener la cápsula puede formarse depositando la al menos una sal de alginato soluble en agua sobre la superficie de partículas de la al menos una sal de hierro. Puede emplearse cualquier operación que permita el depósito de una película de alginato sobre las partículas de sal de hierro. Preferiblemente, se lleva a cabo pulverizando la disolución de sal de alginato a través de una boquilla de pulverización sobre las partículas de sal de hierro mantenidas con agitación en un equipo convencional para agitar sólidos. Equipos tales como placas inclinadas o tambores rotatorios, que pueden estar dotados o no de álabes de agitación auxiliares de lecho fluidizado, cuya temperatura está controlada, en los que las partículas se mantienen moviéndose hacia arriba y hacia

abajo por una corriente de aire que penetra en el lecho de partículas, son indicados para esta operación.

El producto de fuente de hierro se prepara preferiblemente (i) formando el núcleo disolviendo o suspendiendo al menos una sal de hierro biodisponible en una disolución acuosa de al menos una sal de alginato soluble en agua para obtener un gel, (ii) añadiendo lentamente el gel obtenido sobre una disolución acuosa de una sal de calcio de una concentración comprendida entre 0,025 M y una concentración inferior al punto de saturación de la disolución, con agitación vigorosa, y (iii) filtrando y lavando con agua las cápsulas sólidas obtenidas.

Cuando el núcleo interior que comprende alginato de hierro se forma disolviendo o suspendiendo al menos una sal de hierro en una disolución en agua de al menos una sal de alginato, se produce reticulación del alginato mediante los cationes de hierro a lo largo de todo el núcleo, lo que hace que el propio núcleo sea menos soluble en agua y tenga una mayor resistencia mecánica. Para formar el núcleo, se requiere una concentración de alginato de sodio por encima del 0,6 % (p/p) (o la concentración equivalente cuando se usa otra sal de alginato soluble en agua). Por tanto, preferiblemente la al menos una sal de alginato es alginato de sodio y su concentración en la disolución acuosa es de al menos el 0,6 % (p/p). Concentraciones inferiores conducen a disoluciones viscosas, pero no a la formación de cápsulas sólidas. El límite superior para la concentración de sal de alginato usada se fija por su solubilidad en agua y la viscosidad de la disolución de alginato resultante.

La concentración de la sal de hierro usada en la fabricación del núcleo puede elegirse a voluntad. Concentraciones inferiores de hierro conducirán a cápsulas pobres en hierro, mientras que concentraciones superiores conducirán a cápsulas con una carga superior de hierro. El límite superior de la concentración de la sal de hierro usada se fija por su solubilidad en agua. Se han logrado resultados totalmente satisfactorios usando sales tanto ferrosas como férricas, en intervalos de concentración de hasta 1 M. El mezclado de la sal de hierro con la disolución acuosa de alginato se lleva a cabo con agitación vigorosa para evitar que la mezcla resultante se vuelva muy viscosa o la formación de precipitados.

Cuando, posteriormente, se añade lentamente la mezcla en forma de un gel de la sal de hierro y de alginato sobre una disolución que comprende la sal de calcio para proporcionar al núcleo la capa externa que comprende alginato de calcio, se obtienen cápsulas con una resistencia mecánica particularmente buena. Se requiere una concentración mínima de calcio por encima de 0,025 M para formar las cápsulas. La concentración máxima no es crítica, siempre que sea una concentración inferior al punto de saturación de la disolución. Cualquier experto en la técnica entenderá fácilmente que el punto de saturación de la disolución, es decir, el punto de concentración máxima, depende de la temperatura del líquido así como de la naturaleza química de las sustancias implicadas.

La concentración de calcio durante la preparación puede usarse para ajustar la concentración final de calcio en las cápsulas. Mientras se añade el núcleo de cápsula de hierro/alginato sobre la disolución de sal de calcio, pueden usarse equipos de trituración para reducir el tamaño de las cápsulas. En los ejemplos a continuación, se usó un homogeneizador a escala de laboratorio para convertir las cápsulas sólidas en una pasta arenosa. Finalmente, se filtran las cápsulas obtenidas y se lavan exhaustivamente con agua para eliminar cualquier catión metálico libre.

El producto de fuente de hierro definido anteriormente debe tener un tamaño de partícula lo suficientemente pequeño como para permitir un buen mezclado y no provocar segregación del mismo cuando se añade al producto alimenticio que va a enriquecerse, así como tener el menor impacto organoléptico sobre el producto alimenticio enriquecido final. Por tanto, el tamaño de partícula preferido de las cápsulas de la invención dependerá del producto alimenticio que va a enriquecerse.

El procedimiento para la preparación del producto de fuente de hierro usado para enriquecer un producto alimenticio hidratado permite controlar el tamaño de partícula de las cápsulas obtenidas mediante el equipo de trituración usado (cuanto más fino triture el equipo de trituración, más finas serán las cápsulas). En el procedimiento de fabricación, pueden formarse agregados macroscópicos de las cápsulas, tales como agregados que tienen tamaños del orden de 0,1-1 mm, aunque también se obtienen entidades mucho más pequeñas correspondientes a agregados de un número reducido de cápsulas, o cápsulas aisladas. Por tanto, adicionalmente, puede llevarse a cabo la clasificación de tamaño de partícula de las cápsulas mediante tamizado del producto acabado, con el fin de eliminar las gruesas. El procedimiento de fabricación de las cápsulas permite proporcionar un polvo muy fino con cápsulas apenas visibles. Preferiblemente, el tamaño promedio del producto de fuente de hierro, que puede estar en forma de cápsulas o de algunos agregados pequeños de las cápsulas, está comprendido en el intervalo de 5 a 20 $\mu$m, aunque pueden formarse cápsulas incluso más pequeñas.

Las cápsulas que definen el producto de fuente de hierro usado para enriquecer un producto alimenticio hidratado se caracterizan por una excelente capacidad de carga. Además, tienen una buena estabilidad en condiciones locales convencionales de almacenamiento y uso. Por tanto, afectan de manera insignificante al aspecto, al sabor y a las cualidades de conservación del producto alimenticio enriquecido. Adicionalmente, se ha demostrado que son inocuas para el cuerpo humano, es decir, no son tóxicas cuando se administran por vía oral, siendo su citotoxicidad incluso menor que la de la sal de hierro libre que comprenden. Por tanto, estas cápsulas son muy adecuadas para el enriquecimiento de alimentos, ya que son estables durante un periodo de tiempo prolongado en la matriz de alimento y son capaces de liberar el componente de hierro soluble en agua cuando entran en el tracto

gastrointestinal.

La cantidad de hierro y calcio presente en las cápsulas puede obtenerse solubilizando en primer lugar las cápsulas y sometiendo la disolución a técnicas de espectroscopía atómica para cuantificación. Los altos niveles de hierro en las cápsulas permiten un enriquecimiento de producto alimenticio para garantizar la absorción de hierro deseada por el organismo incluso añadiendo pequeñas cantidades del producto de enriquecimiento.

El producto de fuente de hierro usado para enriquecer el producto alimenticio puede añadirse como agente de enriquecimiento con hierro tanto a un producto alimenticio deshidratado, tal como harina de trigo y otros cereales y un producto alimenticio preparado a partir del mismo, tal como pan, pasta y tartas, como a un producto alimenticio hidratado, tal como yogur, leche, caldos, salsas, zumos y otras bebidas.

La resistencia mecánica particularmente buena, junto con la ausencia de solubilidad en agua o en medios ácidos débiles de las cápsulas, hace que el producto de fuente de hierro sea particularmente adecuado para enriquecer un producto alimenticio que se somete a procedimientos de fabricación agresivos y/o a condiciones agresivas del propio producto alimenticio, tales como un alto contenido de agua y un entorno ácido, tal como será el caso del enriquecimiento de yogur.

La posible incorporación de las cápsulas a un vehículo alimenticio se sometió a prueba usando yogur. El yogur lo aceptan bien la mayoría de los grupos de población con una inclinación superior a carencia de hierro. Por tanto, enriquecer yogures sería una excelente manera de combatir la anemia por carencia de hierro. Las condiciones adversas que pueden encontrar las cápsulas en el yogur sirven como indicación de la capacidad de las cápsulas para proteger el entorno de la presencia de una fuente de hierro soluble. Uno de los problemas en alimentos ricos en grasas enriquecidos con una alta concentración de hierro es la oxidación de la grasa y el desarrollo de un sabor rancio. Esto no solo reduce la aceptación del alimento por parte del consumidor, sino que también reduce su valor nutricional.

Tal como se divulga en los ejemplos a continuación, se preparó yogur enriquecido usando el producto de fuente de hierro en forma de cápsulas de la presente invención. Se añadieron las cápsulas de hierro a la leche, y después se llevaron a cabo la pasteurización, homogeneización y fermentación mediante incorporación de un fermento. Los resultados de los ensayos llevados a cabo mostraron que las cápsulas eran capaces de superar las dificultades encontradas en el enriquecimiento de yogur (tanto en el procedimiento de fabricación como en las propiedades del propio vehículo), ya que el producto final era tanto visual (ni cambios relevantes en el color ni en el aspecto) como organolépticamente (no se apreciaron sabores rancios ni metálicos) similar a un yogur no enriquecido. Adicionalmente, se ha demostrado que el yogur enriquecido obtenido, que comprende el producto de fuente de hierro de la presente invención, tiene una buena estabilidad durante su almacenamiento. Por consiguiente, vehículos más suaves supondrán un reto más sencillo.

Por consiguiente, en una realización preferida, el producto alimenticio enriquecido con hierro según la invención es yogur.

En otra realización preferida, el producto alimenticio enriquecido con hierro según la invención es leche.

En otra realización preferida, el producto alimenticio enriquecido con hierro según la invención es una bebida.

En otra realización preferida el producto alimenticio enriquecido con hierro según la invención es una emulsión de carne.

En una realización adicional preferida, el producto alimenticio enriquecido con hierro según la invención es una salchicha.

Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de grupos particulares y preferidos descritos anteriormente en el presente documento.

Los intervalos facilitados, tales como temperaturas, tiempos, tamaños y similares, deben considerarse aproximados, a menos que se mencione específicamente.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra la evolución del peso corporal en gramos de los animales en el grupo de blanco (B) y aquellos que tomaron las cápsulas (C). El eje de abscisas representa el tiempo en días y el eje de ordenadas, el peso en gramos.

La figura 2 muestra la evolución de la ingesta de alimento en gramos por día y jaula para el grupo de blanco (B) y el grupo que tomaba las cápsulas (C).

La figura 3 muestra la evolución de la ingesta de agua en gramos por día y jaula para el grupo de blanco (B) y el grupo que tomaba las cápsulas (C).

La figura 4 muestra el porcentaje de liberación de hierro (% de Fe) en cuatro condiciones de almacenamiento diferentes, en la que, TA = almacenamiento a temperatura ambiente, 37C = almacenamiento a 37 °C, w = almacenamiento en disolución acuosa, d = almacenamiento sin disolvente. El eje de abscisas representa el tiempo en meses.

La figura 5 muestra el porcentaje de liberación de calcio (% de Ca) en las cuatro condiciones de almacenamiento diferentes tal como se mencionó anteriormente. El eje de abscisas representa el tiempo en meses.

La figura 6 muestra la razón de cationes metálicos liberados en el medio (% de Fe/% de Ca) tras medio mes y un mes en las cuatro condiciones de almacenamiento diferentes tal como se mencionó anteriormente.

La figura 7 representa esquemáticamente la liberación de metales desde la región próxima a la superficie de: (A) las cápsulas que tienen un núcleo interior que comprende alginato de hierro y una capa exterior que comprende alginato de calcio (representadas por la zona con rayas), y (B) una partícula en la que ambos metales están distribuidos de manera homogénea en la matriz de alginato.

La figura 8 muestra los periodos de lactancia, inducción de anemia y recuperación de la anemia a los que se sometieron a prueba los animales en el ensayo de biodisponibilidad *in vivo*.

La figura 9 muestra el aumento de peso durante el periodo de recuperación de la anemia. El tiempo en días se muestra en el eje horizontal, y el peso en gramos en el eje vertical. Grupos: M = macho, H = hembra, - = control negativo, + = control positivo, c = cápsulas.

Ventajas, objetos adicionales y características nuevas de la invención se expondrán en parte en la descripción, y en parte resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras examinar la descripción o pueden aprenderse mediante la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que limiten la presente invención.

**Ejemplos**

EJEMPLO 1- Procedimiento de preparación de cápsulas de Fe/Ca

En una disolución de 1,5 g de alginato de sodio en 100 ml de agua, se disolvieron 7,98 g de sacarato férrico (Fe a aproximadamente el 35 %). Usando un embudo de extracción, se añadió la mezcla de alginato de sodio/sacarato férrico gota a gota sobre 300 ml de una disolución acuosa de $CaCl_2$ 0,5 M. Durante la adición gota a gota, se agitó la suspensión de cápsulas formada usando un homogeneizador de laboratorio (Diax 900, Heidolph Instruments GmbH). Se separaron las cápsulas sólidas obtenidas mediante filtración a vacío. Se suspendieron las cápsulas tres veces en agua destilada para eliminar cualquier sal soluble y se filtraron de nuevo a vacío. Se obtuvieron 30 g de cápsulas húmedas (cápsula 0).

Se llevó a cabo el mismo procedimiento usando o bien cloruro férrico o bien sulfato ferroso heptahidratado como sal de hierro, en lugar de sacarato férrico. Se prepararon satisfactoriamente las siguientes cápsulas usando una cualquiera de las tres sales de hierro diferentes mencionadas y también diferentes concentraciones de los tres componentes principales (es decir sal de hierro, sal de alginato y sal de calcio):

Cápsula 1: Sacarato férrico (35 % de hierro) 1 M, $CaCl_2$ 0,1 M, alginato de sodio al 1,5 %

Cápsula 2: Sacarato férrico (35 % de hierro) 1 M, $CaCl_2$ 0,1 M, alginato de sodio al 3,0 %

Cápsula 3: Sacarato férrico (35 % de hierro) 1 M, $CaCl_2$ 1 M, alginato de sodio al 1,5 %

Cápsula 4: Sacarato férrico (35 % de hierro) 1 M, $CaCl_2$ 1 M, alginato de sodio al 3,0 %

Cápsula 5: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 M, $CaCl_2$ 0,1 M, alginato de sodio al 1,5 %

Cápsula 6: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 M, $CaCl_2$ 0,1 M, alginato de sodio al 3,0 %

Cápsula 7: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 M, $CaCl_2$ 1 M, alginato de sodio al 1,5 %

Cápsula 8: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 M, $CaCl_2$ 1 M, alginato de sodio al 3,0 %

Cápsula 9: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 M, $CaCl_2$ 0,1 M, alginato de sodio al 1,5 %

Cápsula 10: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 M, $CaCl_2$ 0,1 M, alginato de sodio al 3,0 %

Cápsula 11: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 M, $CaCl_2$ 1 M, alginato de sodio al 1,5 %

Cápsula 12: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 M, $CaCl_2$ 1 M, alginato de sodio al 3,0 %

Cápsula 13: $FeCl_4$ 0,1 M, $CaCl_2$ 0,1 M, alginato de sodio al 1,5 %

Cápsula 14: $FeCl_3$ 0,1 M, $CaCl_2$ 1 M, alginato de sodio al 1,5 %

Las cápsulas obtenidas tenían un color que dependía de la sal de hierro empleada. La baja liberación de cationes desde las cápsulas hace que sean insípidas y puedan suspenderse en agua.

EJEMPLO 2. Tamaño de partícula del producto de fuente de hierro

Con el fin de estimar el tamaño de las cápsulas preparadas en el ejemplo 1 (cápsulas 1-14), se usó un microscopio óptico calibrado para medir longitudes. En todos los casos, agregados macroscópicos de las cápsulas eran claramente visibles incluso a simple vista, y de manera muy clara usando el microscopio. Aunque estos agregados tenían tamaños del orden de 0,1-1 mm, pudieron observarse entidades mucho más pequeñas, probablemente agregados de un número reducido de cápsulas o cápsulas aisladas.

Se colocó una parte pequeña, apenas visible, de la muestra de cápsulas en un portaobjetos de microscopio marcado. Se añadió una gota de agua sobre las cápsulas. Se agitó suavemente la suspensión con la ayuda de un cuchillo metálico y se colocó un cubreobjetos encima de cada portaobjetos de microscopio. Se observó cada muestra usando un microscopio óptico (Nikon Eclipse E800, Nikon Corp., Tokio, Japón) con un objetivo de 20x y un ocular de 10x. Se seleccionó una región para cada muestra en la que podían observarse o bien cápsulas individuales o bien las agrupaciones más pequeñas de cápsulas. Se fotografió esta región usando una cámara digital (Soft Imaging Systems, Colorview II) conectada a un PC que ejecutaba un analizador de imágenes (analySIS3.0, SoftImaging System Corp., Lakewood Co.). Se superpuso una escala calibrada a cada imagen para una referencia de tamaño.

Las imágenes registradas mostraron que el tamaño de las cápsulas y de algunos de los agregados más pequeños era habitualmente próximo a 20 $\mu$m, llegando en algunos casos hasta menos de 5 $\mu$m. También podían obtenerse cápsulas más grandes usando un equipo de trituración en grano más grueso, aunque habitualmente se prefieren cápsulas más finas para el enriquecimiento de alimentos.

EJEMPLO 3. Caracterización de cápsulas

Se digirieron 0,3 g de cápsulas húmedas en un horno microondas en ácido nítrico concentrado. Se cuantificó la concentración de hierro y calcio usando ICP-OES (espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado por inducción).

La cantidad de hierro y calcio en las cápsulas apenas dependía del lote en las cápsulas analizadas. Se prepararon dos lotes de cápsulas según el ejemplo 1 (cápsula 0). Las concentraciones de hierro y calcio expresadas como porcentaje de peso (± desviación estándar) en los dos lotes se muestran en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1

| | Lote 1 | Lote 2 |
|---|---|---|
| % de Fe | 8,6 (± 0,49) | 7,93 (± 0,071) |
| % de Ca | 0,84 (± 0,021) | 1,23 (± 0,0074) |

En ambos lotes no solo se lograron resultados muy similares, sino que además se observó una excelente capacidad de carga de las cápsulas.

EJEMPLO 4. Citotoxicidad de cápsulas

Se usó una prueba *in vitro* para comprobar la ausencia de toxicidad de las cápsulas de la invención que contenían una sal de hierro. La prueba implicaba incubar células de la línea celular HELA con las sustancias frente a las cuales iba a someterse a prueba la citotoxicidad, usándose comúnmente esta prueba como modo de comprobar la toxicidad. Los compuestos sometidos a prueba incluyeron las cápsulas, así como sus constituyentes principales por separado: la sal de hierro usada en las cápsulas (sacarato férrico) y alginato de sodio. También se preparó un control negativo, que contenía medio de crecimiento de HELA solo, y se usó como crecimiento de referencia.

Se prepararon los medios de prueba en condiciones estériles. Se esterilizaron cápsulas preparadas como en el ejemplo 1 (cápsula 0; lote 2 del ejemplo 3) en un autoclave (20 min, 110 °C). Usando material estéril, se disolvieron

72 mg de cápsulas (medio de cápsulas), 17 mg de sacarato férrico (medio de sal de hierro) y 18 mg de alginato de sodio (medio de alginato) cada uno en 50 ml de medio de crecimiento de HELA. Las cápsulas eran insolubles y permanecieron como suspensión. Se prepararon diluciones a 1:1, 1:10 y 1:100 de cada uno de los medios de prueba diluyendo las siguientes cantidades de medio de cápsulas, sal de hierro o alginato con medio de crecimiento de HELA reciente:

1:1 20 µl + 0 µl de medio de HELA reciente

1:10 2 µl + 18 µl de medio de HELA reciente

1:100 0,2 µl + 19,8 µl de medio de HELA reciente

Las disoluciones de cápsulas y sal de hierro 1:1 tenían casi la misma concentración de hierro (0,285 mg de hierro/ml y 0,297 mg de hierro/ml respectivamente). Lo mismo es válido para sus diluciones a 1:10 y 1:100.

Se cultivaron 3500 células HeLa en 36 pocillos de dos placas de 96 pocillos: 9 pocillos de control y 27 para triplicados de 3 concentraciones de 3 productos. Se añadió medio a cada pocillo hasta 100 µl. Se incubaron las células a 37 °C durante 24 h. Se añadieron 20 µl de cada medio de prueba y 80 µl de medio reciente a cada pocillo. En los controles solo se añadieron 100 µl de medio reciente. Se incubó una de las placas durante 24 h y la otra durante 72 h. Se midió la viabilidad de las células tras 24 y 72 h de incubación usando el ensayo de citotoxicidad y proliferación celular no radiactiva EZ4U (Biomedica Medizinproducte GmbH).

Se expresaron los resultados como porcentaje de crecimiento con respecto a los controles, es decir como porcentaje de viabilidad, que se calcula como el número de células vivas en cualquiera de las disoluciones problema (cápsulas, sacarato férrico o alginato de sodio) dividido entre el número de células vivas en el control negativo, y expresado como porcentaje. Los resultados, mostrados en la tabla 2 a continuación, revelan que la citotoxicidad del hierro encapsulado es menor que la del hierro libre. Teniendo en cuenta que el sacarato férrico es un suplemento alimenticio seguro, también lo es la forma encapsulada. Tampoco se observó ninguna toxicidad para alginato de sodio.

Tabla 2

| % de viabilidad a las 24 h | | | |
|---|---|---|---|
| | 1:1 | 1:10 | 1:100 |
| Cápsulas | 82,5 % ± 2,8 | 98,7 % ± 12,4 | 100,5 % ± 7,5 |
| Sal de hierro | 76,3 % ± 9,7 | 101,7 % ± 8,5 | 95,7 % ± 3,2 |
| Alginato de sodio | 87,9 % ± 6,6 | 85,8 % ± 6,6 | 79,9 % ± 1,7 |
| % de viabilidad a las 72 h | | | |
| | 1:1 | 1:10 | 1:100 |
| Cápsulas | 65,7 % ± 8,8 | 85,2 % ± 12,7 | 80,9 % ± 18,6 |
| Sal de hierro | 66,8 % ± 23,0 | 62,0 % ± 15,7 | 68,7 % ± 15,3 |
| Alginato de sodio | 74,2 % ± 6,7 | 91,7 % ± 16,4 | 80,2 % ± 14,7 |

EJEMPLO 5. Toxicidad tras una única dosis de cápsulas

Se usó una prueba *in vivo* para evaluar la ausencia de toxicidad en ratas en una dosis 100 veces superior a la esperada en humanos. Se tomó la dosis de referencia en humanos como dos tercios de la IDR (ingesta diaria recomendada) para un humano de 70 kg (0,14 mg de Fe/kg de peso corporal). Por tanto, se usó una dosis de 14 mg de Fe/kg de peso corporal en este estudio de toxicidad tras una única dosis en ratas.

Las cápsulas de hierro usadas en esta prueba se fabricaron como en el ejemplo 1 (cápsula 0; lote 2 del ejemplo 3). Dado que las cápsulas estaban destinadas a ingerirse por animales vivos, se fabricaron en condiciones estériles, con el fin de evitar la contaminación de las cápsulas por microorganismos patógenos.

A continuación se describen los animales usados:

- Especie y raza: Rata, Sprage-Dawley (SD), Crl:CD proporcionada por Charles River Laboratories, Francia.

- Número y tipo de animales: 12 ratas hembra nulíparas y no gestantes.

- Edad (cuando se trataron): 2 semanas.

- Peso (cuando se trataron): 172-193 g.

- Criterios de inclusión: ±20 % del peso promedio al comienzo del estudio.

- Grupos: Se distribuyeron los animales en dos grupos (control y experimental) basándose en una distribución uniforme de pesos en los grupos.

La cronología del estudio fue la siguiente:

- Día -5: Las ratas entran en las instalaciones. Comienzo de la cuarentena en la sala de cuarentena.

- Día -3: Final de la cuarentena. Comienza el periodo de aclimatación en la sala definitiva.

- Día 0: Administración del blanco o las disoluciones experimentales. Comienzo del estudio.

- Día 14: Final del estudio. Sacrificio usando pentobarbital y autopsia.

Las ratas pasaron dos días en la sala de cuarentena y tres días adicionales en la sala definitiva para la aclimatación. Las condiciones de estabulación convencionales fueron de 20 °C-24 °C, humedad relativa (HR) del 30-70 % y más de 15 cambios de aire por hora. La temperatura y la humedad se monitorizaron de manera constante. Se aplicó un ciclo de luz de 12 h de luz fluorescente y 12 h de oscuridad. A los animales (dos por jaula) se les alimentó y suministró agua (agua de grifo descalcificada, filtrada e irradiada con luz UV) a voluntad.

A continuación se describen la administración de las cápsulas y el blanco, y las observaciones llevadas a cabo:

Volumen administrado: se administraron 2 ml/kg de peso corporal una vez (día 0 del estudio). El grupo de control solo recibió el medio de transporte (agua destilada) mientras que el grupo experimental recibió 87 mg/ml de una suspensión de las cápsulas (14 mg/kg de cuerpo de hierro).

Intervalo de administración: El tiempo transcurrido entre el comienzo de la administración del primer animal y el final del último fue de 45 minutes.

Mortalidad y morbididad: Se comprobaron ambas diariamente hasta el día 0, 5, 15, 30, 90 minutos, 2, 4, 6 y 8 h tras la administración, y diariamente hasta el día 14.

Peso corporal: Se registró diariamente desde el día 3. En el día 0 se pesaron los animales antes de recibir la administración.

Ingesta de alimento y agua: Se registró tres veces por semana (los lunes, miércoles y viernes), comenzando el día 3.

Síntomas clínicos: Se comprobaron tras 5, 15, 30, 90 minutos, 2, 4, 6 y 8 h tras la administración, y diariamente durante 13 días adicionales.

Todos los procedimientos usados en este estudio se basan en, y siguen estrictamente, la siguiente legislación: Directiva 2003/63/CE de la Comisión Europea, de 25 de junio de 2003, que modifica la 2001/83/CE relacionada con medicamentos para uso humano. Los procedimientos y las instalaciones de estabulación cumplen estrictamente con los requisitos para la protección de animales usados en experimentación:

• Directiva de la Comisión Europea 2003/63/CE

• Directiva europea 89/609/CEE

• Real Decreto español 1201/2005

• Directrices de FELASA

• Documento de la OCDE ENV/JM/MONO (2000)7

Se comprobaron los parámetros anteriormente mencionados para cada una de las ratas, y se compararon los grupos de blanco y con suplemento usando una prueba de la *t* de Student con alfa <0,05 (si se aplica). No se observó ninguna mortalidad espontánea en ninguno de los animales. No se observaron signos clínicos significativos que indicaran una necesidad de sacrificio en ninguno de los animales durante el periodo de observación de 14 días. No se observaron diferencias significativas ni en el peso corporal (véase la tabla 3 a continuación, en la que los valores medios se obtienen a partir de los resultados con 6 animales; figura 1) ni en la ingesta de agua y alimento (véase la tabla 4 a continuación, en la que los valores medios se obtienen a partir de los resultados con 3 grupos de animales (3 jaulas); figura 2 y figura 3, respectivamente) entre los grupos con suplemento y sin suplemento. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar. Las observaciones macroscópicas de la autopsia fueron similares en los grupos con suplemento y sin suplemento.

Tabla 3. Evolución del peso corporal en gramos de los animales en el grupo de blanco (blanco) y los que tomaban las cápsulas (cápsulas)

| | Blanco | Cápsulas |
|---|---|---|
| Día | Media (g) | Media (g) |
| -3 | 166,8 (5,3) | 165,1 (7,8) |
| -2 | 173,9 (6,3) | 172,1 (6,9) |
| -1 | 177,1 (5,7) | 173,1 (7,5) |
| 0 | 184,2 (5,2) | 181,9 (7,8) |
| 1 | 181,7 (4,4) | 182,1 (6,8) |
| 2 | 184,3 (4,5) | 183,1 (4,5) |
| 3 | 189,2 (4,5) | 190,4 (7,9) |
| 4 | 193,5 (5,5) | 191,0 (7,5) |
| 7 | 204,0 (5,6) | 204,4 (7,9) |
| 8 | 209,9 (2,1) | 203,8 (10,2) |
| 9 | 211,1 (4,3) | 209,1 (5,7) |
| 10 | 209,5 (4,2) | 210,7 (8,4) |
| 11 | 215,3 (4,9) | 216,3 (7,4) |
| 12 | 224,3 (4,4) | 221,3 (7,3) |
| 13 | 224,7 (4,9) | 222,0 (9,9) |
| 14 | 224,9 (5,9) | 223,4 (8,0) |

Tabla 4. Evolución de la ingesta de alimento en gramos por día y jaula para el grupo de blanco (blanco) y el grupo que tomaba las cápsulas (cápsulas)

| | Blanco | Cápsulas |
|---|---|---|
| Día | Media (g) | Media (g) |
| -3 | 38,3 (2,9) | 38,7 (2,6) |
| 0 | 34,1 (3,0) | 33,8 (0,4) |
| 2 | 35,3 (5,2) | 36,9 (2,9) |
| 4 | 36,5 (1,1) | 38,2 (0,2) |
| 7 | 35,8 (2,2) | 35 (2,0) |
| 9 | 38,3 (6,4) | 40,05 (4,6) |
| 11 | 40,5 (0,8) | 39,2 (1,6) |

Tabla 5. Evolución de la ingesta de agua en gramos por día y jaula para el grupo de blanco (blanco) y el grupo que tomaba las cápsulas (cápsulas)

| | Blanco | Cápsulas |
|---|---|---|
| Día | Media (g) | Media (g) |
| -3 | 59,7 (16,8) | 48,9 (1,2) |
| 0 | 53,2 (2,9) | 50,8 (2,5) |
| 2 | 61,9 (9,8) | 48,6 (7) |
| 4 | 58,5 (8,4) | 73,4 (9,3) |
| 7 | 56,2 (25,3) | 98 (42,9) |
| 9 | 83,1 (29,6) | 58,6 (1,3) |
| 11 | 62,6 (9,1) | 48,9 (1,2) |

A partir de los resultados mencionados anteriormente puede concluirse que, debido a la falta de mortalidad o cualquier signo clínico relevante, el producto sometido a prueba no provoca toxicidad tras una única dosis y no es tóxico cuando se administra por vía oral a ratas Sprage-Dawley hembra de ocho semanas de edad a una dosis de hierro equivalente de 14 mg/kg de cuerpo.

EJEMPLO 6. Estabilidad de cápsulas

Se ha sometido a prueba la capacidad de las cápsulas para evitar la liberación de su carga útil durante el almacenamiento en diferentes condiciones, próximas a lo que puede encontrarse en los diferentes medios que van a suplementarse con las cápsulas. Se dividieron las cápsulas en cuatro grupos y se sometió cada grupo a diferentes condiciones:

1. Almacenamiento a temperatura ambiente (TA), disolución acuosa

2. Almacenamiento a temperatura ambiente, cápsulas sólidas

3. Almacenamiento a 37 °C, disolución acuosa

4. Almacenamiento a 37 °C, cápsulas sólidas

Las dos condiciones diferentes referentes al contenido en agua se eligieron para simular los dos entornos extremos a los que es más probable que se enfrenten las cápsulas: productos alimenticios líquidos o productos alimenticios con un alto contenido de agua, y productos alimenticios secos o productos alimenticios con un bajo contenido de agua. Dado que los productos alimenticios o suplementos alimenticios se almacenan habitualmente a temperatura ambiente o menos, y dado que cuanto mayor es la temperatura más agresivo es el entorno, los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. También se eligió una temperatura superior para extrapolar tiempos más prolongados a una temperatura inferior y para simular el comportamiento de las cápsulas en condiciones más estrictas que las que es probable que se encuentren.

Se fabricaron las cápsulas de hierro como en el ejemplo 1 (cápsula 0; lote 2 del ejemplo 3). Se eliminó cualquier traza de hierro del material de plástico o vidrio usado en los experimentos dejándolo sumergido durante la noche en una disolución al 10 % (v/v) de ácido nítrico o ácido clorhídrico concentrado, y aclarando 5-6 veces con agua mili-Q abundante. Se prepararon dos muestras y un blanco para cada análisis en condiciones estériles, pesando aproximadamente 120 mg de cápsulas (excepto en los blancos) y añadiendo 15 ml de agua destilada (excepto en los experimentos con “cápsulas sólidas”). Se mantuvo cada muestra sellada a temperatura ambiente o a 37 °C durante 0, 0,5 o 1 mes. Tras 0, 0,5 o 1 mes, se añadieron 15 ml de agua destilada a las muestras de “cápsulas sólidas”. Después se filtraron todas las muestras analizadas para eliminar el sólido, y se cuantificaron el hierro y calcio liberados en el sobrenadante usando ICP-AOS.

Se usó la liberación de hierro y calcio desde las cápsulas como indicador de la estabilidad de cápsulas. Cuanto menos hierro se liberó, mejor era la capacidad de las cápsulas para mantener la carga útil dentro de las cápsulas y para proteger tanto el entorno frente a la degradación por el hierro como al hierro frente a quedar capturado por el entorno. La liberación de hierro (valor promedio de las dos muestras) en las cuatro condiciones de almacenamiento diferentes se muestra en la tabla 6 a continuación (véase también la figura 4). Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

Tabla 6. Liberación de hierro

| Meses | % de Fe liberado | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ***37C, w*** | ***TA, w*** | ***37C, d*** | ***TA, d*** |
| 0,0 | 0,199 (0,161) | 0,199 (0,161) | 0,199 (0,161) | 0,199 (0,161) |
| 0,5 | 1,280 (0,056) | 0,775 (0,026) | 0,183 (0,058) | <0,017 |
| 1,0 | 1,388 (0,081) | 0,541 (0,005) | 0,284 (0,038) | 0,037 (0,011) |
| 2,0 | 1,352 (0,177) | 0,967 () | 0,242 (0,002) | 0,029 () |
| 3,0 | 1,271 (0,005) | - | 0,252 (0,068) | - |
| 6,0 | - | 0,288 () | - | 0,050 () |
| 12,0 | - | 0,337 (0,134) | - | 0,376 (0,062) |
| TA = Almacenamiento a temperatura ambiente, 37C = Almacenamiento a 37 °C, w = almacenamiento en disolución acuosa, d = almacenamiento sin disolvente. | | | | |

A partir de los valores de la liberación de la carga útil de hierro desde las cápsulas mostrados anteriormente puede observarse que la estabilidad de las cápsulas es excelente. Para las condiciones más duras, solo se libera menos del 1,4 % del hierro encapsulado. Comparando la tasa de liberación en diferentes condiciones puede observarse cómo la presencia de agua y la temperatura de almacenamiento afectan a la estabilidad de las cápsulas. La tendencia es bastante clara entre los cuatro grupos. El aumento de la temperatura (37 °C en lugar de temperatura ambiente, aproximadamente 20 °C-25 °C) aumenta la tasa de liberación, al igual que lo hace tener más agua en contacto con las cápsulas. A partir de los resultados anteriores también puede observarse que el efecto de añadir agua a las cápsulas o mantenerlas en un entorno con una alta actividad de agua tiene un efecto más fuerte sobre la tasa de liberación de hierro que aumentar la temperatura desde temperatura ambiente hasta 37 °C. Las buenas tasas de liberación logradas manteniendo las cápsulas en una disolución acuosa y a 37 °C se mejoran aún más cuando se reduce la temperatura hasta unas más realistas. A temperatura ambiente la tasa de liberación máxima es de tan solo el 0,5410 % ± 0,0050 tras el primer mes. El rendimiento de las cápsulas se vuelve casi excelente si también se mantienen a temperatura ambiente pero en un entorno con baja actividad de agua: no se detectó liberación de hierro durante las dos primeras semanas (la liberación de hierro era inferior al 0,017 %) y tan solo el 0,037 % ± 0,011 de la carga útil se perdió en el entorno tras un mes almacenamiento.

El resultado es algo diferente para la cantidad de calcio liberada, tal como se muestra en la tabla 7 a continuación (véase también la figura 5). Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

Tabla 7. Liberación de calcio

| Meses | % de Ca liberado | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ***37C, w*** | ***TA, w*** | ***37C, d*** | ***TA, d*** |
| 0,0 | 10,264 (8,308) | 10,264 (8,308) | 10,264 (8,308) | 10,264 (8,308) |
| 0,5 | 29,595 (5,152) | 22,692 (0,752) | 16,158 (1,411) | 13,711 (0,853) |
| 1,0 | 35,228 (2,593) | 23,148 (3,389) | 18,001 (1,027) | 17,198 (3,238) |
| 2,0 | 38,421 (1,944) | 40,825 () | 17,305 (0,278) | 20,683 () |
| 3,0 | 39,760 (0,004) | - | 19,661 (2,740) | - |
| 6,0 | - | 23,532 () | - | 13,965 () |
| 12,0 | - | 23,738 (3,811) | - | 25,67 (1,939) |
| TA = Almacenamiento a temperatura ambiente, 37C = Almacenamiento a 37 °C, w = almacenamiento en disolución acuosa, d = almacenamiento sin disolvente. | | | | |

La fracción de calcio liberada en el entorno es más de diez veces mayor que la de hierro, lo que muestra que la capacidad de las cápsulas para mantener los metales dentro es mucho mejor para el hierro que para el calcio. La liberación de calcio indica que lo más probablemente las cápsulas se desgastarán a lo largo del tiempo, pero dado que el calcio está más accesible que el hierro, el calcio se libera primero en el entorno. Si se prepararan las cápsulas usando solo hierro, sería el hierro y no el calcio el que se liberaría en el entorno.

EJEMPLO 7. Estructura de cápsulas

Se eligió la preparación de las cápsulas usando dos cationes metálicos diferentes, hierro y calcio, para proporcionar a las cápsulas una capa de protección adicional a la ofrecida solo por el polímero de alginato. El orden en el que se añaden los cationes metálicos durante la preparación de las cápsulas también se elige específicamente para favorecer la formación de un núcleo interior que comprende alginato de hierro (es decir, rico en hierro) y una capa exterior que comprende alginato de calcio (es decir, rica en calcio). Esto garantiza que si las cápsulas se desgastan durante su almacenamiento o manipulación, las regiones ricas en calcio se liberarán al medio circundante, retrasando la liberación de hierro desde el núcleo que comprende alginato de hierro.

Tal como puede observarse a partir de los datos obtenidos en el estudio de estabilidad de cápsulas, en todas las condiciones sometidas a prueba, la fracción de calcio liberada es mucho mayor que la fracción de hierro (véanse las tablas 6 y 7, y la figura 6). Este hecho concuerda perfectamente con la estructura de cápsulas propuesta, con un núcleo interior que comprende alginato de hierro y una capa exterior que comprende alginato de calcio. La liberación de metales desde las cápsulas se debe a la solubilización química de sus componentes, o al desgaste físico de las cápsulas. En ambos casos, es la región próxima a la superficie de las cápsulas la que se libera en primer lugar. Dado que las cápsulas son mucho más ricas en hierro que en calcio (el 7,93 % de Fe frente al 1,23 % de Ca), la mayor parte del calcio estará ubicado cerca de la superficie de la cápsula, mientras que la mayor parte del hierro debe estar ubicado lejos de la misma, tal como se representa en la figura 7, (A). Si la distribución de ambos metales en las cápsulas fuera completamente homogénea, tal como se representa en la figura 7, (B), se esperaría tener una razón de hierro/calcio liberados muy próxima o igual a la de las cápsulas, y tener el % de Fe liberado/% de Ca liberado próximo a 1. La razón observada es más de 23 veces menor que la razón predicha por este modelo. Por tanto, esto corrobora la estructura en capas de las cápsulas, que tienen una región interna rica en hierro y una cubierta exterior rica en calcio.

EJEMPLO 8. Biodisponibilidad – pruebas de solubilidad

La absorción de Fe tiene lugar en el tracto gastrointestinal. El pH del estómago varía a lo largo del día, dependiendo de la cantidad de alimento que contiene. En general, es más bien ácido. En un estómago vacío, el pH puede ser de tan solo 1, aumentando hasta cerca de 5 tras una comida completa.

Dado que una prueba de biodisponibilidad completa en humanos es muy complicada y requiere mucho tiempo, la biodisponibilidad del producto de fuente de hierro según la invención se evaluó en primer lugar usando como referencia la solubilidad en un entorno gástrico artificial.

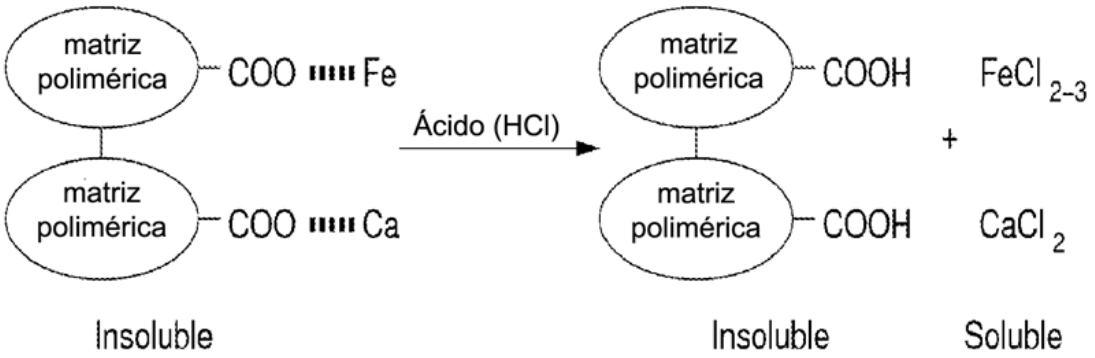
La biodisponibilidad de las cápsulas de hierro depende de su capacidad para liberar la carga útil. Si las cápsulas son tan estables que resisten el tracto gastrointestinal sin liberar su contenido, la biodisponibilidad del hierro será próxima a cero, ya que las cápsulas son demasiado grandes como para absorberse en el intestino. Por otro lado, si las cápsulas se desestabilizan durante su paso a través del tracto gastrointestinal, la carga útil se liberará como sal de hierro soluble que se absorberá en el intestino, proporcionando una alta biodisponibilidad para el hierro encapsulado. El experimento *in vitro* realizado para estimar la liberación de carga útil durante la digestión ácida va dirigido a identificar la liberación de hierro desde las cápsulas tras digerirse mediante ácido clorhídrico a pH = 2, próximo al pH del estómago.

En un tubo Eppendorf de 10 ml, se pesaron 10 mg de cápsulas de sacarato férrico preparadas como en el ejemplo 1 (cápsula 1) y después se añadieron 9 ml de agua. Se agitó el tubo Eppendorf vigorosamente de modo manual para

facilitar la resuspensión de las cápsulas. La mayoría de las cápsulas se resuspendieron fácilmente, aunque algunos agregados grandes de cápsulas permanecieron en el fondo del tubo. Se colocó una gota de la suspensión sobre un portaobjetos de microscopio para su observación. Las cápsulas, así como algunos agregados más grandes, eran visibles usando un aumento de 100x (Olympus CH-2, ocular de 10x, objetivo de 10x). Al tubo Eppendorf se le añadió 1 ml de HCl 0,1 M en agua y se agitó vigorosamente. También se colocó una segunda gota de la suspensión ácida sobre un portaobjetos de microscopio y se comparó con la anterior. No se observaron grandes diferencias entre las dos gotas. Tras 30 min de digestión ácida, se colocó una gota de las cápsulas sobre un portaobjetos de microscopio. Antes de observarse con el microscopio, se colocó una gota de NaOH 1 M en contacto con la primera gota y se observó la mezcla con el microscopio. La disolución de las cápsulas fue casi instantánea, ya que el NaOH se difundió a través de la suspensión de cápsulas.

Se colocó una pequeña muestra de cápsulas recientes sobre un portaobjetos de microscopio limpio. Se colocó una gota de NaOH 1 M encima de las cápsulas. No pudo observarse ningún cambio en la estructura de las cápsulas y las cápsulas permanecieron estables durante el tiempo en que se observaron (hasta que la gota se evaporó dejando un precipitado de NaOH con cápsulas atrapadas).

El experimento de liberación consiste en dos fases. En la primera fase se suspenden las cápsulas en un medio ácido a un pH aproximado de 2. Este pH es próximo al pH encontrado en el estómago. No pudo observarse ningún cambio visible en la estructura de las cápsulas en tales condiciones, tal como se reveló mediante las dos microfotografías, observadas con un aumento de 100x. Esta ausencia de cambios cuando se suspenden las cápsulas en agua destilada o en HCl 0,01 M no es sorprendente si tenemos en cuenta las especies químicas esperadas en estas disoluciones. En agua destilada, las cápsulas son estables, formando un precipitado de alginato de hierro y alginato de calcio. La interacción de hierro y calcio con alginato es fuerte debido a la presencia de grupos carboxilato (-COO-) en el polímero de alginato. La acidificación de la suspensión por debajo del pKa de ácido algínico (pKa >4) convierte los grupos carboxilato (-COO-) en grupos carboxilo (-COOH), que tienen una interacción mucho más débil con los cationes. Esta es la etapa crucial que conduce a la liberación de la carga útil de las cápsulas. Aunque la forma no protonada de alginatos (-COO-) es relativamente soluble en agua, la forma protonada es insoluble. Esto explica la ausencia de cambios visibles, ya que la matriz polimérica se deja insoluble, aunque químicamente diferente, tal como puede mostrarse en el siguiente esquema de reacción:




Habiendo convertido alginato en ácido algínico, la liberación de los metales se mide de manera indirecta, solubilizando el ácido algínico en un medio básico. Si los cationes se han liberado, lo que queda es cloruros de hierro y calcio solubles y ácido algínico insoluble. Basificar el medio, por ejemplo con NaOH 1 M, disolverá el precipitado de ácido algínico. Esta rápida disolución se explica mediante la conversión de ácido algínico de nuevo en alginato de sodio. El hierro y calcio están presentes en una concentración demasiado baja como para formar un precipitado con el alginato de sodio, que en forma de alginato es soluble.

Por otro lado, si los cationes todavía están unidos a la matriz de alginato, la basificación convertiría el ácido algínico de nuevo en alginato, que es insoluble cuando se une a hierro y calcio. Por tanto, la basificación de las cápsulas realizada con cápsulas sin digerir debería dejarlas sin modificar, ya que los grupos carboxilo presentes en las cápsulas ya están en forma de carboxilato (-COO-) e interaccionan fuertemente con ambos cationes, hierro y calcio. También se fotografió con un microscopio la pequeña fracción de cápsulas sin digerir suspendidas en NaOH 1 M, permaneciendo la imagen inalterada a lo largo del tiempo, lo que, tal como se esperaba, revela que las cápsulas son estables si no se digieren y se mantienen en NaOH 1 M.

La liberación indirecta de metales observada usando el experimento revela que, tras entrar en el estómago, el pH ácido convierte las cápsulas insolubles en ácido algínico insoluble y sales de calcio y hierro solubles. Dado que las sales de hierro solubles tienen una alta biodisponibilidad, la biodisponibilidad esperada de estas cápsulas también es alta. Por tanto, estas cápsulas son muy adecuadas para el enriquecimiento de alimentos, ya que son estables durante un periodo de tiempo prolongado en la matriz de alimento, y son capaces de liberar los metales cuando entran en el tracto gastrointestinal.

EJEMPLO 9. Biodisponibilidad – prueba *in vivo*

Este estudio de biodisponibilidad va dirigido a comparar la biodisponibilidad del hierro microencapsulado con la de sulfato ferroso. Se eligió sulfato ferroso como control positivo porque no solo se usa habitualmente como hierro convencional en estudios de biodisponibilidad, sino que también tiene una alta biodisponibilidad.

El estudio se diseñó para medir la capacidad de reposición de hierro de ratas anémicas usando tres fuentes de hierro diferentes:

- Grupo de control negativo: dieta basal pobre en hierro sin hierro añadido

- Grupo de control positivo: dieta basal pobre en hierro enriquecida con 10 ppm de hierro a partir de sulfato ferroso soluble

- Grupo experimental: dieta basal pobre en hierro enriquecida con 10 ppm de hierro a partir de microcápsulas de hierro (sacarato férrico encapsulado)

Las tres dietas se formularon basándose en las recomendaciones de la dieta AIN-93G para roedores en experimentación sin hierro añadido (que se notifica que tiene 2-6 ppm de Fe). La dieta basal se usó como control negativo. La dieta de control positivo se preparó suplementando la dieta basal con 10 ppm de Fe usando 50 mg/kg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. La dieta experimental se preparó suplementando la dieta basal con 10 ppm de Fe usando 125 mg/kg de hierro microencapsulado (el 7,93 % p/p de Fe en las microcápsulas en forma de sacarato férrico). Se administraron las dietas y agua desionizada a voluntad a lo largo de todo el estudio.

Se usaron 40 ratas Sprage Dawley (20 machos, 20 hembras) de 4 camadas diferentes. Se destetaron las ratas a la edad de 21 días (día 0, comienzo del estudio) y se dividieron aleatoriamente en jaulas de acero inoxidable. Se asignaron dos animales del mismo sexo a cada jaula. Se estabularon los animales en un entorno controlado (20 °C-22 °C, HR del 30-50 %, ciclo de luz: 08:00 h-20:00 h).

Se indujo anemia en los tres grupos de animales, a los que se les alimentó con la dieta basal sin hierro durante los primeros 22 días (hembras) o 23 días (machos) del estudio, tal como se muestra en la figura 8. Tras el periodo de inducción de anemia, se cambiaron las dietas de los tres grupos a:

- Control negativo: jaulas de 3 machos y 3 hembras (6+6 animales). Este grupo siguió recibiendo la dieta basal sin suplemento de hierro.

- Control positivo: jaulas de 3 machos y 3 hembras (6+6 animales). Este grupo recibió la dieta basal enriquecida con 10 ppm de Fe en forma de sulfato ferroso

- Grupo experimental: jaulas de 4 machos y 4 hembras (8+8 animales). Este grupo recibió la dieta basal enriquecida con 10 ppm de Fe en forma de hierro microencapsulado (sacarato férrico encapsulado).

Se dejó que los animales se recuperaran de la anemia durante 2 semanas (14 días). Tras este periodo se anestesiaron con isoflurano inhalado (dosis de inducción: 3 %, dosis de mantenimiento: 1,5-2 %) y se sacrificaron mediante una extracción de sangre a través de punción intracardiaca. Se pesaron los animales periódicamente a lo largo de todo el procedimiento. También se midió la cantidad de alimento consumida.

La evolución de peso corporal durante el periodo de recuperación se muestra en las tablas 8 y 9 (véase también la figura 9).

Tabla 8. Evolución del peso corporal de machos, calculado como peso($día_n$) - peso($día_0$). El periodo de recuperación de la anemia comenzó el día 22 (véase también la figura 9).

| Día | Control negativo *x* (DE) | Control positivo *x* (DE) | Grupo experimental *x* (DE) |
|---|---|---|---|
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 4 | 11,9 (4,1) | 13,5 (1,3) | 13,1 (3,1) |
| 7 | 25,7 (1,9) | 25,4 (1,7) | 27,3 (2,7) |
| 11 | 44,8 (3,9) | 44,3 (3,4) | 47,3 (4,6) |
| 14 | 58,0 (6,4) | 57,3 (5,3) | 63,5 (4,6) |
| 16 | 65,7 (6,4) | 65,7 (5,5) | 72,4 (5,0) |
| 18 | 70,4 (7,5) | 70,1 (6,7) | 78,0 (5,1) |
| 23 | 85,8 (10,7) | 85,2 (11,1) | 96,8 (7,2) |
| 25 | 86,3 (10,5) | 93,2 (13,5) | 98,9 (7,4) |
| 29 | 94,3 (12,2) | 120,4 (17,4) | 122,7 (12,9) |
| 32 | 101,7 (12,0) | 139,7 (19,2) | 132,1 (11,0) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 36 | 107,3 (14,8) | 164,7 (22,2) | 149,2 (12,2) |
| 37 | 111,9 (15,1) | 171,5 (24,2) | 158,0 (12,2) |
| x = valor promedio DE = desviación estándar | | | |

Tabla 9. Evolución del peso corporal de hembras, calculado como peso(día$_n$) - peso(día$_0$). El periodo de recuperación de la anemia comenzó el día 23 (véase también la figura 9).

| Día | Control negativo *x* (DE) | Control positivo *x* (DE) | Grupo experimental *x* (DE) |
|---|---|---|---|
| 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 4 | 10,8 (1,4) | 10,0 (1,3) | 11,4 (1,4) |
| 7 | 21,0 (2,3) | 20,1 (0,9) | 22,0 (2,2) |
| 11 | 35,6 (3,5) | 35,8 (1,7) | 39,0 (3,1) |
| 14 | 47,9 (4,8) | 48,2 (2,0) | 53,4 (3,3) |
| 18 | 61,3 (7,4) | 62,9 (2,7) | 67,5 (4,7) |
| 22 | 73,8 (9,5) | 75,6 (2,9) | 81,7 (5,0) |
| 24 | 75,5 (8,8) | 80,9 (4,5) | 84,5 (4,9) |
| 28 | 84,7 (12,1) | 102,6 (4,2) | 100,4 (5,6) |
| 29 | 84,7 (12,1) | 102,6 (4,2) | 100,4 (5,6) |
| 31 | 86,4 (12,2) | 113,4 (6,6) | 109,5 (5,5) |
| 35 | 97,2 (11,2) | 128,6 (10,0) | 122,2 (6,1) |
| 36 | 98,4 (11,1) | 132,0 (10,5) | 125,8 (7,1) |
| *x* = valor promedio DE = desviación estándar | | | |

Los resultados mostraron una clara diferencia entre los tres grupos diferentes, con un aumento de peso corporal mucho mayor y similar en los grupos con enriquecimiento, dejando el grupo con la dieta basal muy por debajo de los otros dos grupos. Estadísticamente no existió ninguna diferencia significativa entre los dos grupos con enriquecimiento durante el periodo de recuperación de la anemia. Por otro lado, los pesos de cualquiera de los dos grupos con enriquecimiento (control positivo y grupo experimental) fueron significativamente superiores a los pesos del control negativo.

Aparece la misma imagen si se estudia la eficiencia alimentaria. La eficiencia alimentaria se define como:

$$\text{eficiencia alimentaria} = \frac{\text{aumento de peso (g)}}{\text{ingesta de alimento (g)}}$$

y se refiere a lo bien que se convierte el alimento en tejido corporal. Las eficiencias alimentarias calculadas para los tres grupos durante el periodo de recuperación de la anemia se muestran en la tabla 10. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

Tabla 10. Eficiencia alimentaria para machos y hembras durante el periodo de recuperación de anemia

| Eficiencia alimentaria | Control negativo *x* (DE) | Control positivo *x* (DE) | Grupo experimental *x* (DE) |
|---|---|---|---|
| Machos | 0,19 (0,03) | 0,43 (0,08) | 0,36 (0,04) |
| Hembras | 0,19 (0,02) | 0,32 (0,04) | 0,28 (0,03) |
| *x* = valor promedio DE = desviación estándar | | | |

Entre los grupos de machos o los de hembras, las diferencias solo son significativas entre el control negativo y cualquiera de los grupos con suplemento, pero no entre los grupos con suplemento. Por tanto, puede concluirse que las diferencias entre sulfato ferroso y las microcápsulas de hierro no son estadísticamente significativas, pero que son estadísticamente significativas entre el control negativo y las microcápsulas de hierro. Por tanto, la biodisponibilidad del hierro microencapsulado debe ser similar a la de sulfato ferroso, pero sin muchos de los inconvenientes de una sal de hierro soluble.

EJEMPLO 10. Yogur enriquecido

Se sometió a prueba la incorporación del producto de fuente de hierro en forma de cápsulas de la presente invención en un yogur como vehículo alimenticio. Se eligió someter a prueba las cápsulas incorporándolas en yogur por los siguientes motivos:

- El pH en el yogur es ácido, lo cual es lo suficientemente agresivo como para destruir productos de fuente de hierro en forma de cápsulas ya divulgados en la técnica anterior. Eso liberaría el contenido de las cápsulas y estropearía el yogur.

- El yogur tiene un alto contenido de agua, también un medio agresivo para otros productos de fuente de hierro ya conocidos. El contenido de agua junto con su acidez facilita la solubilización de hierro, haciendo que su enriquecimiento sea más difícil.

- El hierro acelera la oxidación de la grasa, lo que aumenta el sabor rancio del alimento. En el yogur, casi el 3 % de su contenido puede ser grasa, lo que significa mucho sustrato para oxidarse en caso de que esté directamente en contacto con el componente de hierro del agente de enriquecimiento.

Se preparó yogur enriquecido usando cápsulas preparadas como en el ejemplo 1 (cápsula 0; lote 1 del ejemplo 3). Se preparó un segundo lote de yogur sin la adición de las cápsulas de hierro y se usó como control. La preparación de los yogures se realizó según el siguiente procedimiento:

1. Acondicionamiento y normalización de 25 l de leche, añadiendo leche en polvo con agitación hasta su completa disolución, terminando con el 2,5-3 % de grasa.

2. Adición y dispersión de 50 g de cápsulas de hierro con agitación continua (excepto en el yogur de control)

3. Pasteurización durante 90 segundos a 95 °C

4. Homogeneización a 180 kg/cm$^2$

5. Incorporación del fermento a 45 °C

6. Fermentación a 44 °C durante 4 horas hasta que el pH del yogur alcanza 4,7-4,8.

7. Conservación de los yogures a 4,5 °C durante hasta 1,5 meses.

Uno de los objetivos de la fabricación de yogur enriquecido era evaluar la ausencia de sabor metálico y comparar visualmente el producto enriquecido con el yogur de control. El yogur lo cató un panel de cinco hombres sin formación, ninguno de los cuales pudo detectar ni siquiera un ligero sabor metálico en el yogur enriquecido, aunque un análisis de los yogures reveló que tenían 42,5 ± 4,1 ppm de hierro. También se realizó una comparación visual de los yogures enriquecido y de control, y solo pudo detectarse un color ligeramente más oscuro del yogur enriquecido. La ligera coloración pudo deberse al uso de una sal de hierro muy oscura y solo pudo apreciarse si se colocaban los yogures uno al lado del otro.

EJEMPLO 11. Estabilidad de cápsulas en yogur

Se sometieron a prueba yogures fabricados con el producto de fuente de hierro en forma de cápsulas de la presente invención y yogures de control (sin adición de cápsulas de hierro) para determinar la oxidación de lípidos, haciendo que las condiciones de almacenamiento fueran más estrictas de lo habitual. Se analizaron los yogures al 150 % de su periodo de validez, medio mes después de su periodo de validez establecido de un mes. Tras este almacenamiento prolongado, se evaluó el nivel de rancidez usando cromatografía de gases. El hexanal es un marcador comúnmente usado para determinar la rancidez, ya que es uno de los productos de la oxidación de lípidos. La capacidad de un ser humano para detectar trazas de hexanal es bastante alta, al poder detectar rancidez si los niveles de hexanal están por encima de aproximadamente 10 ppm (partes por millón, mg/kg de vehículo). Con el fin de alcanzar el objetivo de o bien no tener rancidez detectable o bien tener niveles de hexanal muy por debajo del umbral de detección de seres humanos, se usó CG/EM (cromatografía de gases/espectrometría de masas) para analizar los yogures. Este método es capaz de cuantificar trazas de hexanal de hasta 50 ppmm (partes por mil millones, ng/kg), casi tres órdenes de magnitud por debajo del umbral de detección de humanos.

La preparación de los yogures se realizó como en el ejemplo 10. Después, buscando trazas de hexanal, se realizó el análisis del yogur mediante CG/EM.

Ambas muestras analizadas tenían niveles de hexanal por debajo de 50 ppmm, muy por debajo del umbral de rancidez, que es próximo a 10 ppm (partes por millón, ng/g). Por tanto, las cápsulas son una buena manera de aislar la grasa del yogur a partir de la fuente de hierro soluble y evitar su oxidación.

EJEMPLO 12. Preparación de carne enriquecida y estabilidad

Se sometió a prueba la posible incorporación de las microcápsulas a un vehículo alimenticio usando salchichas de carne de pavo y una emulsión de carne, tal como una salchicha de Frankfurt. La presencia de hierro en estas muestras puede conducir a la oxidación de su grasa si se libera hierro desde las microcápsulas.

Para la preparación de salchichas de Frankfurt enriquecidas con hierro, se usaron la siguiente lista de ingredientes y cantidades relativas: lomo de cerdo (40 %); beicon (20 %); una mezcla de aditivos, especias y aromatizantes (paymfurt ST-1800, Carinsa Group; 3,4 %); proteína vegetal (paymprotein ST-91, Carinsa Group; 3 %); sal (1,5 %);

agua/hielo (27,3 %); aroma a ahumado (0,2 %); y almidón de patata (5 %).

Se añadieron microcápsulas de hierro (1 g/kg final) junto con paymfurt ST-1800.

El procedimiento seguido para preparar las salchichas de Frankfurt fue el siguiente:

1. Cortar todos los ingredientes, para reducir la carne hasta dar una pasta fina. Usar hielo para impedir que se caliente la carne.

2. Rellenar la emulsión en los recipientes (bolsas de plástico).

3. Cocinar en una caldera a 75 °C durante 45 minutos.

4. Envasar a vacío y almacenar a 4 °C.

Para la preparación de salchichas de pavo enriquecidas con hierro, se usaron la siguiente lista de ingredientes y cantidades relativas: pechuga de pavo (69 %); agua (24 %); una mezcla de aditivos y aromatizantes (fórmula de Carinsa CMA-1251#1; 6 %); almidón de maíz (1 %). Se añadieron microcápsulas de hierro (1 g/kg final) junto con fórmula de Carinsa CMA-1251#1.

Se usó el siguiente protocolo para preparar las salchichas:

1. Preparar la salmuera mezclando el agua con el almidón de maíz y la fórmula de Carinsa CMA-1251#1.

2. Cortar la carne.

3. Mezclar a vacío la carne cortada con la salmuera y macerarla durante 24 h.

4. Preparar una pasta fina cortando una parte de la carne hasta que se obtenga una pasta fina.

5. Rellenar la carne en los recipientes (bolsas de plástico).

6. Cocinar en una caldera a 75 °C hasta que la temperatura interna alcance 72 °C.

7. Envasar a vacío y almacenar a 4 °C.

Se cuantificó la cantidad de hierro en las muestras usando ICP-OES (espectroscopía de emisión óptica con plasma acoplado por inducción), tras digerir las muestras en $HNO_3$ concentrado en un horno microondas. Los resultados de la cuantificación expresados como ppm (partes por millón, mg/kg) se muestran en la tabla 11. Lo valores entre paréntesis indican la desviación estándar como porcentaje.

Tabla 11

| Muestra | Sin hierro añadido, ppm de Fe | Enriquecido con hierro, ppm de Fe |
|---|---|---|
| Salchicha de Frankfurt | 12,9 (2,5 %) | 145 (3,3 %) |
| Salchicha de pavo | 6,8 (4,4 %) | 112 (4,7 %) |

Se sometió a prueba la capacidad de las microcápsulas para evitar la oxidación de las grasas cuantificando la cantidad de hexanal presente en las muestras. El hexanal es un marcador comúnmente usado de la oxidación de grasas, ya que es uno de los principales productos de la oxidación de grasas. Se midió su concentración al comienzo y al final del periodo de validez de las salchichas (día 0 y día 60) y se comparó entre las muestras enriquecidas con hierro (>100 ppm de Fe) y las muestras sin hierro añadido (-10 ppm de Fe). Se mantuvieron las muestras refrigeradas durante su periodo de validez y se congelaron a -80 °C hasta que se analizaron. Se cuantificó el hexanal mediante HS-CG-EM (cromatografía de gases-espectrometría de masas por espacio de cabeza). Los resultados, expresados como ppm de hexanal (mg/kg), se muestran en la tabla 12. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar como porcentaje.

Tabla 12

| Salchicha | Día | Sin hierro añadido, ppm de hexanal | Enriquecido con hierro, ppm de hexanal |
|---|---|---|---|
| Frankfurt | día 0 | 0,21 (0,07) | 0,35 (0,12) |
| Frankfurt | día 60 | <0,20 | 0,22 (0,07) |
| Pavo | día 0 | 0,45 (0,16) | 0,69 (0,24) |
| Pavo | día 60 | 0,55 (0,19) | 0,96 (0,33) |

La comparación de estos resultados en el día 0 revela que, aunque la cantidad de hexanal puede parecer aparentemente superior en las muestras con hierro, estadísticamente la cantidad de hexanal no puede considerarse diferente. Por tanto, la microcápsula está previniendo eficazmente la oxidación de grasa mediante la presencia de hierro durante las etapas más agresivas en la fabricación de las salchichas, concretamente su cocción. Lo mismo es cierto para los resultados al final del periodo de validez, tras haber mantenido las muestras durante 2 meses. La diferencia en los resultados entre las muestras enriquecidas con hierro y aquellas sin nada de hierro añadido no es estadísticamente significativa. Además, si se compara la misma muestra al comienzo y al final del periodo de validez, las diferencias tampoco son significativas. Por tanto, puede concluirse que la presencia de hierro en forma de microcápsulas de hierro no altera significativamente la tasa de oxidación de las grasas en las carnes sometidas a prueba.

EJEMPLO 13. Resistencia de las microcápsulas a la homogenización

Una de las etapas clave en la fabricación de muchos alimentos, en particular alimentos lácteos, es una etapa de homogenización, en la que se somete un líquido o una suspensión a una tensión de corte alta. Como resultado, las partículas en suspensión, tales como glóbulos de grasa, se destruyen haciendo que la suspensión sea mucho más homogénea. Esta tensión de corte también puede ser responsable de destruir las microcápsulas, liberando su contenido (hierro) al sobrenadante, y por tanto haciendo que la protección sea inútil.

Para someter a prueba hasta qué grado homogeneizar las microcápsulas liberó su contenido al sobrenadante, se prepararon 7,9 l de una suspensión con 10,38 ppm de Fe microencapsulado usando 7,9 l de agua desionizada y 1,025 g de microcápsulas. Se agitó exhaustivamente la muestra y se alimentó de manera continua a un homogeneizador de una única etapa, establecido a presiones de entre 20 MPa y 100 MPa. Se recogieron 100 ml de muestra tras haber establecido la presión al valor deseado y tras dejar estabilizarse el sistema. Las presiones elegidas fueron: 20 MPa, 35 MPa, 50 MPa y 100 MPa. Tras haberse homogeneizado se dejó cada muestra 8 días sin agitación en un recipiente cerrado. Justo antes del análisis, se sometieron las muestras a microfiltración (filtro de 0,45 $\mu$m). Se añadió $HNO_3$ concentrado a cada muestra sometida a microfiltración hasta una concentración final del 0,5 % (v/v) para estabilizar el hierro en suspensión. Se cuantificó el hierro en el sobrenadante acidificado usando ICP-OES.

La cantidad de hierro en el sobrenadante y la cantidad correspondiente de hierro liberado desde las microcápsulas a las diferentes presiones de homogenización se muestran en la tabla 13 a continuación. La muestra marcada como homogeneizada a 0 MPa no se homogeneizó y la marcada como 20 (blanco) se homogeneizó a 20 MPa pero solo contenía agua desionizada.

Tabla 13

| Homogenización (MPa) | Fe (ppm) | % de Fe liberado |
|---|---|---|
| 0 | 0,15 | 1,44 % |
| 20 | 0,16 | 1,54 % |
| 35 | 0,18 | 1,73 % |
| 50 | 0,18 | 1,73 % |
| 100 | 0,19 | 1,83 % |
| 20 (Blanco) | 0,013 | 0,125 % |

Tal como puede observarse a partir de los resultados anteriores, la estabilidad de las microcápsulas frente a la homogenización es excelente. Incluso usando las presiones más altas, solo se libera una fracción muy pequeña del hierro total desde las microcápsulas.

EJEMPLO 14. Preparación de leche enriquecida y estabilidad

Se sometió a prueba la incorporación del producto de fuente de hierro en forma de cápsulas de la presente invención a una leche como vehículo alimenticio. Se eligió someter a prueba las cápsulas incorporándolas en leche por los siguientes motivos:

- La leche es un producto alimenticio líquido, lo que facilita la liberación de otros productos de fuente de hierro ya conocidos. Esto hace que el enriquecimiento de leche entera sea más difícil, a diferencia de leche desnatada, ya que la presencia de hierro oxida la grasa presente en la leche dejando un sabor rancio.

- Al ser un líquido, la leche no puede enriquecerse fácilmente con un producto alimenticio sólido, ya que tenderá a precipitar en el fondo del recipiente.

Se mantuvo leche de vaca entera obtenida de una explotación local refrigerada (4 °C hasta que se trató). Se dispersaron 35 g de microcápsulas húmedas (humedad del 75 %) en 600 ml de agua destilada. Se procesaron 50 l de leche sin nada de hierro añadido y se mezclaron 50 l de leche con los 600 ml de suspensión de microcápsulas. A

ambos tipos de leche se les añadió 1 g/l de E-339. Primero con los 50 l de leche sin hierro añadido y después con los 50 l de leche con microcápsulas de hierro añadidas: (a) se calentó gradualmente la leche y cuando alcanzó 75 °C se homogeneizó usando un homogeneizador de dos etapas (18 MPa para la primera etapa, 4 MPa para la segunda); (b) cuando la leche alcanzó 90 °C se dejó a esa temperatura durante 1 min; (c) se sometió la leche a procesamiento a ultraalta temperatura (UHT) durante 15 segundos a 135 °C; y (d) se enfrió la leche hasta temperatura ambiente y se embotelló en botellas de vidrio no estériles de 0,5 l.

Tras embotellarse, se sometieron a prueba ambas leches y no pudo detectarse ningún sabor metálico en absoluto. Para prevenir el deterioro microbiológico de la leche, se sometió a tratamiento en autoclave a 121 °C durante 15 min. Tras enfriarse, se almacenó la leche a 4 °C. Al final del periodo de validez (1 mes) se cuantificó el hexanal presente en la leche.

Al comienzo y al final del periodo de validez se comprobó visualmente el aspecto físico de la leche. No pudo observarse ninguna traza de precipitación, pero pudo distinguirse un color ligeramente más oscuro en la leche enriquecida con hierro. Se comprobaron el sabor y el olor de la leche tras fabricarse. No pudo detectarse ningún olor o sabor rancio o metálico en ninguna de las leches. De hecho, no se encontró ninguna diferencia en el sabor o el olor entre la leche enriquecida con hierro y no enriquecida. La ausencia de olor o sabor rancio concuerda completamente con la concentración cuantificada de hexanal en ambas clases de leche al final del periodo de validez: no pudo detectarse hexanal en las muestras, por lo que si estaba presente tenía una concentración inferior a 10 $\mu$g/l.

EJEMPLO 15. Fabricación de las microcápsulas usando acetato de calcio

La alta concentración de calcio usada para preparar las microcápsulas puede conducir a problemas de corrosión si la sal usada es cloruro de calcio. El motivo es que los iones cloruro son muy agresivos frente al acero, un material comúnmente usado en recipientes industriales, tuberías y agitadores. Con el fin de evitar estos problemas y aprovechando el hecho de que los aniones cloruro no desempeñan ningún papel durante la fabricación de las microcápsulas, se preparó un lote de microcápsulas usando otra sal de calcio, en particular acetato de calcio.

A diferencia del cloruro de calcio, que es extremadamente soluble en agua, el acetato de calcio es menos soluble, por lo que no pudo lograrse la concentración inicial de 5 M de calcio. En vez de eso, se usó una concentración inferior (1,8 M).

El protocolo usado para preparar las microcápsulas apenas difirió del usado para preparar las cápsulas con cloruro de calcio:

En una disolución de 1,5 g de alginato de sodio en 100 ml de agua, se disolvieron 16 g de sacarato férrico (Fe a aproximadamente el 35 %). Usando un embudo de extracción, se añadió la mezcla de alginato de sodio/sacarato férrico gota a gota sobre 70 ml de una disolución de $Ca(AcO)_2$ 1,8 M. Durante la adición gota a gota, se agitó la suspensión de cápsulas formada usando un homogeneizador de laboratorio (Diax 900, Heidolph Instruments GmbH). Se separaron las cápsulas sólidas obtenidas mediante filtración a vacío. Se suspendieron las cápsulas tres veces en agua destilada para eliminar cualquier sal soluble y se filtraron de nuevo a vacío. Se obtuvieron 35,6 g de cápsulas húmedas.

Se midieron los contenidos de Fe y Ca siguiendo el procedimiento del ejemplo 3. Se determinó la estabilidad de las cápsulas midiendo la liberación de Fe y Ca el día 0 siguiendo el procedimiento del ejemplo 6. Se midieron el % de humedad y el % de residuo sólido mediante el siguiente procedimiento:

1. Pesar un vaso de precipitados de vidrio ($peso_{vacío}$).

2. Pesar aproximadamente 1 g de microcápsulas en el vaso de precipitados. Pesar el vaso de precipitados de nuevo ($peso_{húmedo}$).

3. Colocar el vaso de precipitados en el horno a 110 °C-120 °C durante dos horas.

4. Dejar enfriar el vaso de precipitados con las microcápsulas secas hasta temperatura ambiente durante 30 min.

5. Pesar de nuevo el vaso de precipitados con las microcápsulas. ($peso_{seco}$).

6. Repetir el secado/enfriamiento/pesado hasta que el peso sea constante.

7. Calcular el contenido en humedad como:

$$\%\ \text{de humedad} = 100\,\frac{\text{peso}_{\text{húmedo}} - \text{peso}_{\text{seco}}}{\text{peso}_{\text{húmedo}} - \text{peso}_{\text{vacío}}}$$

Los resultados obtenidos son:

- Contenido de Fe: el 15,0 % de Fe (p/p) en microcápsulas húmedas, el 45,4 % de Fe (p/p) en microcápsulas secas

- Contenido en Ca: el 0,6 % de Ca (p/p) en microcápsulas húmedas, el 1,9 % de Ca (p/p) en microcápsulas secas

- Humedad: el 66,9 % de humedad (el 33,1 % de residuo seco)

- Liberación de Fe y Ca: el 0,2 % de Fe liberado y el 8,2 % de Ca liberado

EJEMPLO 16. Resistencia al calor

Se sometió adicionalmente a prueba la idoneidad de las microcápsulas para productos alimenticios comprobando si las altas temperaturas usadas en la cocción o esterilización de alimentos afectaron a su capacidad para mantener la carga útil (hierro) dentro de las microcápsulas.

Se pesó 1 g de las microcápsulas en cada uno de dos vasos de precipitados de vidrio pesados. En un horno ajustado a 125 °C, se mantuvo una de las muestras durante 30 min, mientras que la otra permaneció en el horno durante 180 min. Tras haberse enfriado las cápsulas hasta temperatura ambiente, se pesó de nuevo cada vaso de precipitados. Se suspendieron 40 mg de las microcápsulas secas en 100 ml de agua desionizada y se agitó la suspensión manualmente. Se diluyó 1 ml de cada suspensión hasta 10 ml con 9 ml de agua desionizada. Se filtraron las muestras para eliminar los sólidos en suspensión. Después, se añadieron 50 $\mu$l de ácido nítrico concentrado a cada muestra para estabilizar el hierro en suspensión y se sometieron las muestras a ICP-OES para cuantificar el hierro y calcio liberados.

La suspensión de microcápsulas justo antes de la filtración tenía una concentración total de 11 ppm de Fe. El sobrenadante tras la filtración contenía solo el hierro que se había liberado desde las microcápsulas, que se cuantificó mediante ICP-OES para proporcionar los siguientes resultados:

30 min, 125 °C: 0,04 ppm de Fe

180 min, 125 °C: 0,03 ppm de Fe

En ambos casos, menos del 1 % del hierro presente en las microcápsulas se liberó desde las mismas mediante el efecto de calentar las microcápsulas. Por tanto, puede considerarse que las microcápsulas son estables, incluso tras tratamientos mucho más agresivos que los encontrados comúnmente en alimentos (3 h a 125 °C).

## REIVINDICACIONES

1. Producto alimenticio enriquecido con hierro que comprende un producto de fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas, en el que las cápsulas comprenden un núcleo que comprende alginato de hierro, y una capa exterior que comprende alginato de calcio, en el que el tamaño promedio de las cápsulas está comprendido en el intervalo de 5 a 20 $\mu$m, y en el que las cápsulas están opcionalmente formando agregados macroscópicos que tienen un tamaño de hasta 1 mm.

2. Producto alimenticio enriquecido con hierro según la reivindicación 1, en el que el núcleo comprende además al menos una sal de hierro biodisponible.

3. Producto alimenticio enriquecido con hierro según la reivindicación 2, en el que la al menos una sal de hierro biodisponible es sacarato férrico.

4. Producto alimenticio enriquecido con hierro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es yogur.

5. Producto alimenticio enriquecido con hierro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es leche.

6. Producto alimenticio enriquecido con hierro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es una bebida.

7. Producto alimenticio enriquecido con hierro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es una emulsión de carne.

8. Producto alimenticio enriquecido con hierro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es una salchicha.

9. Producto alimenticio enriquecido con hierro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en la prevención de la aparición de una carencia de hierro o en la reducción de una carencia de hierro en un humano.

10. Procedimiento para obtener un producto alimenticio enriquecido con hierro que comprende las siguientes etapas:

(i) formar un núcleo que comprende alginato de hierro disolviendo o suspendiendo al menos una sal de hierro soluble en agua biodisponible en una disolución acuosa de al menos una sal de alginato para obtener un gel, en el que la concentración de la al menos una sal de alginato es de al menos el 0,6 % p/p cuando la al menos una sal de alginato es alginato de sodio, o la concentración equivalente cuando se usa otra sal de alginato soluble en agua,

(ii) añadir lentamente el gel obtenido a una disolución acuosa de una sal de calcio de una concentración comprendida entre 0,025 M y una concentración inferior al punto de saturación de la disolución, con agitación vigorosa,

(iii) filtrar las cápsulas sólidas obtenidas y lavar con agua y,

(iv) añadir el producto de fuente de hierro resultante en forma de cápsulas sólidas al producto alimenticio,

en el que el tamaño promedio de las cápsulas está comprendido en el intervalo de 5 a 20 $\mu$m, y en el que las cápsulas están opcionalmente formando agregados macroscópicos que tienen un tamaño de hasta 1 mm.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la al menos una sal de hierro biodisponible es sacarato férrico.

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que la al menos una sal de alginato es alginato de sodio.

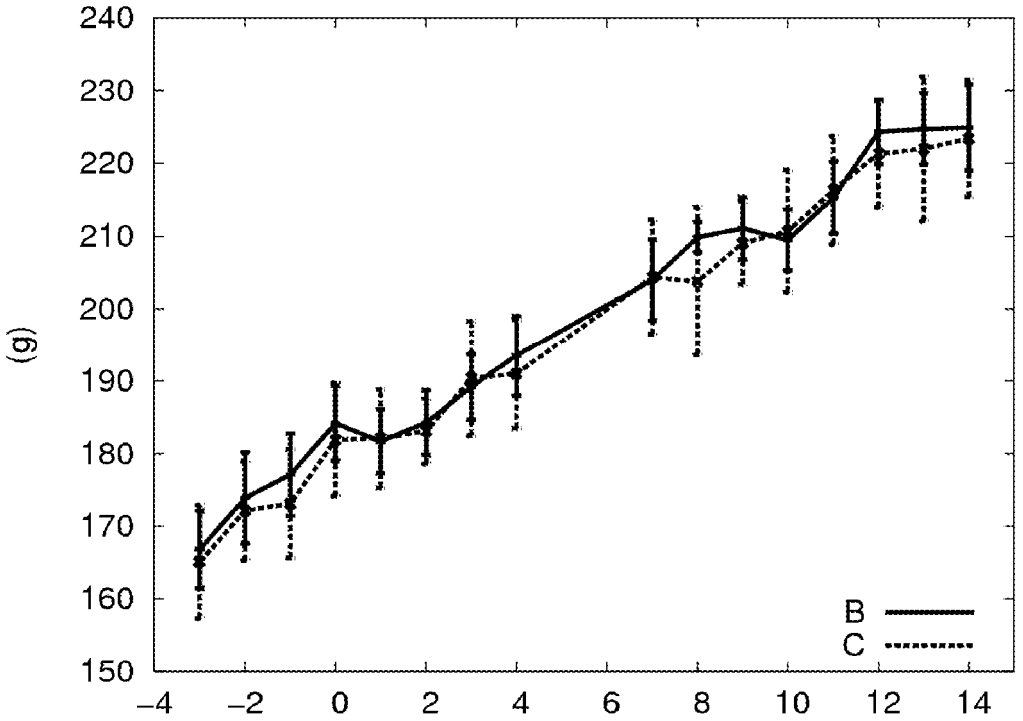

240
230
220
210
200
190
180
170
160
150
(g)
–4
–2
0
2
4
6
8
10
12
14
B
C

**Fig. 1**

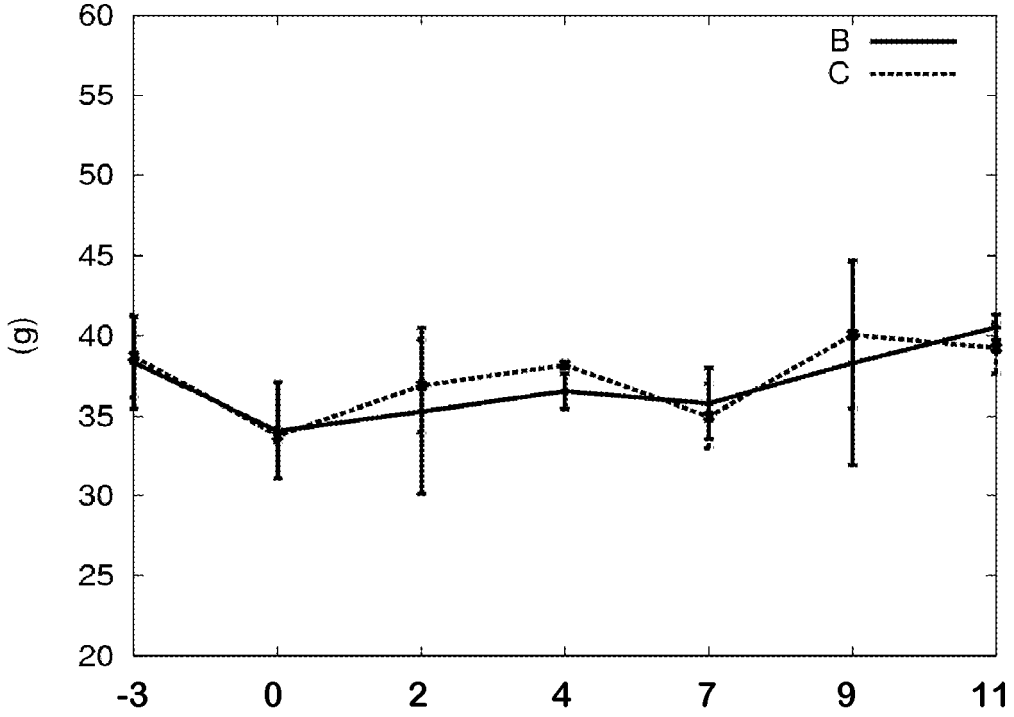

60
55
50
45
40
35
30
25
20
(g)
-3
0
2
4
7
9
11
B
C

**Fig. 2**

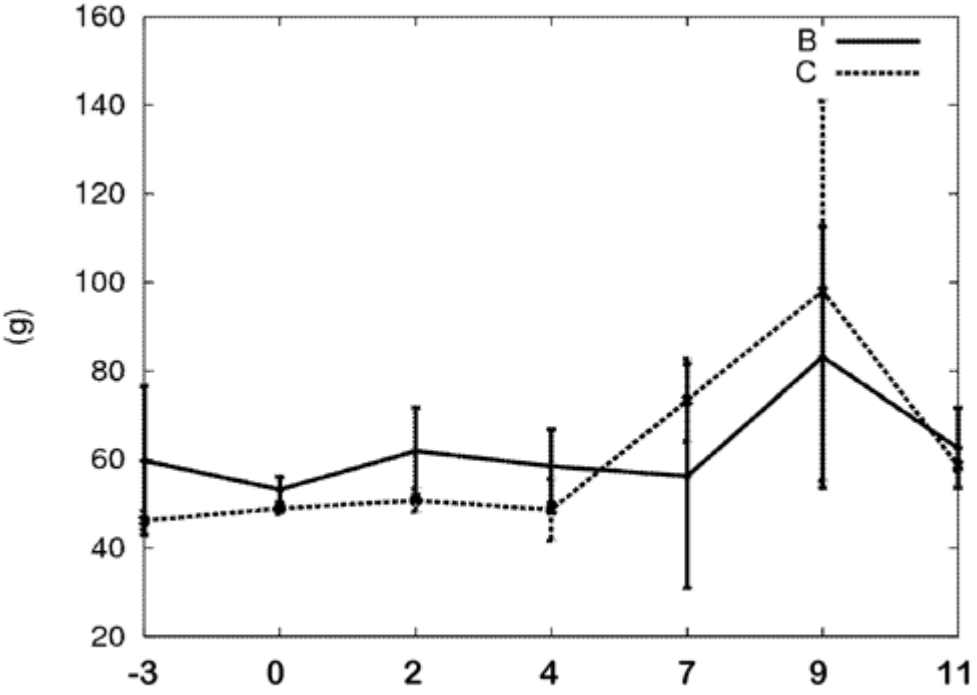

160
140
120
100
80
60
40
20
(g)
-3
0
2
4
7
9
11
B
C

Fig. 3

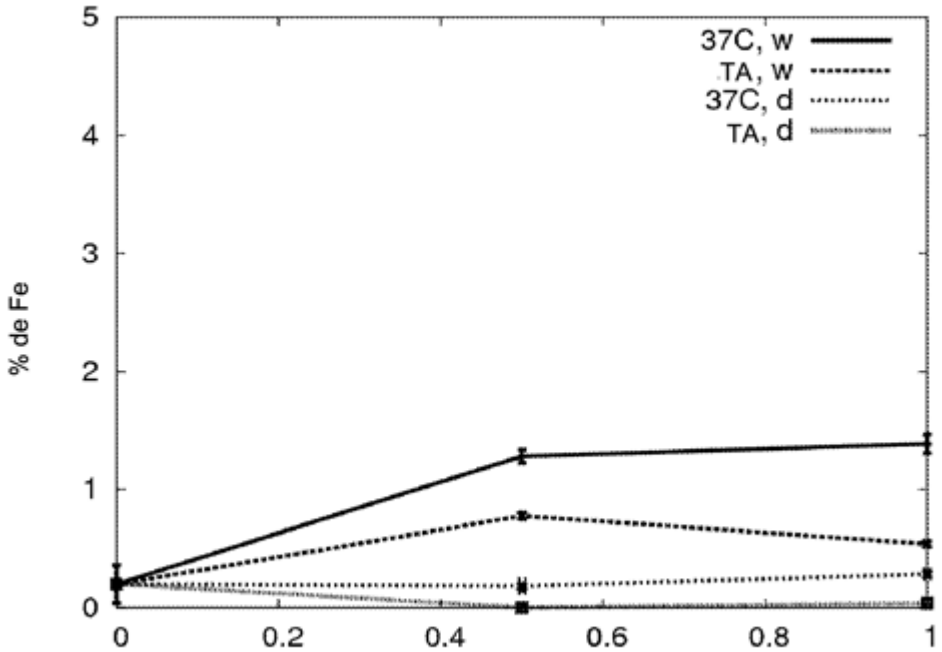

5
4
3
2
1
0
% de Fe
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
37C, w
TA, w
37C, d
TA, d

Fig. 4

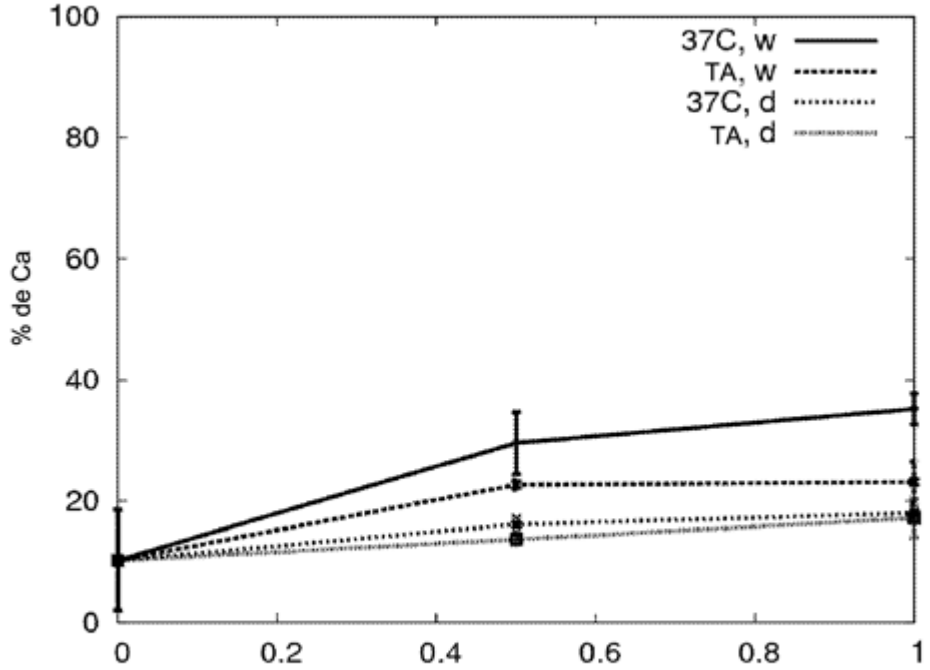

100
80
60
40
20
0
% de Ca
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
37C, w
TA, w
37C, d
TA, d

**Fig. 5**

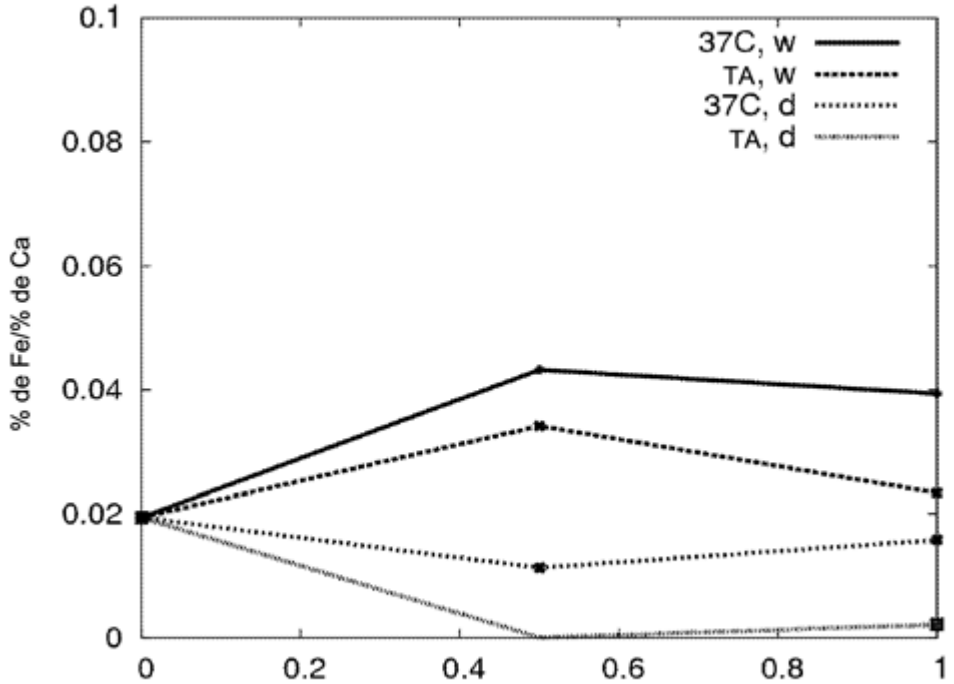

0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
% de Fe/% de Ca
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
37C, w
TA, w
37C, d
TA, d

**Fig. 6**

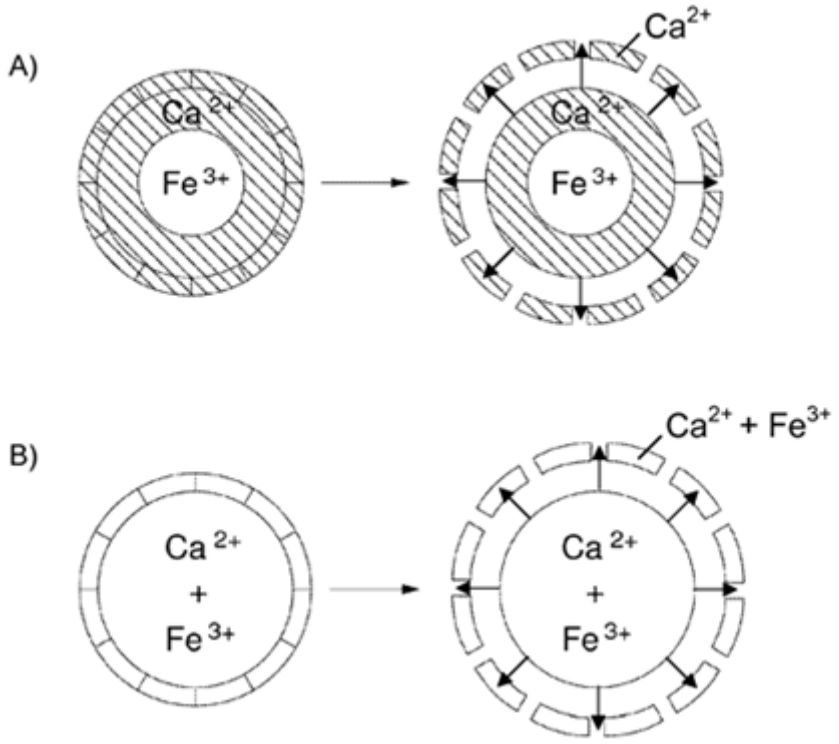

A)
Ca 2+
Fe 3+
Ca2+
Ca 2+
Fe 3+
B)
Ca 2+
+
Fe 3+
Ca2+ + Fe3+
Ca 2+
+
Fe 3+

**Fig. 7**

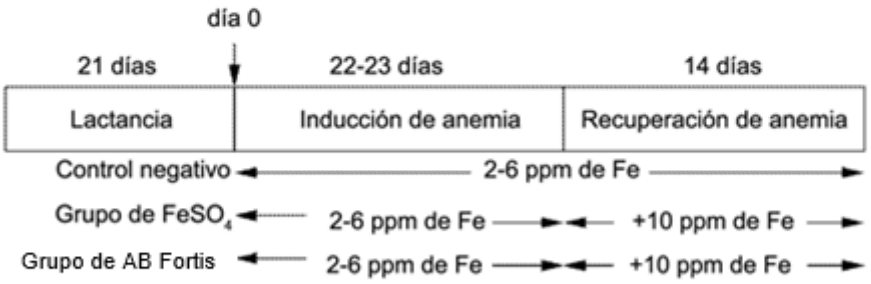

día 0
21 días
22-23 días
14 días
Lactancia
Inducción de anemia
Recuperación de anemia
Control negativo
2-6 ppm de Fe
Grupo de FeSO4
2-6 ppm de Fe
+10 ppm de Fe
Grupo de AB Fortis
2-6 ppm de Fe
+10 ppm de Fe

**Fig. 8**

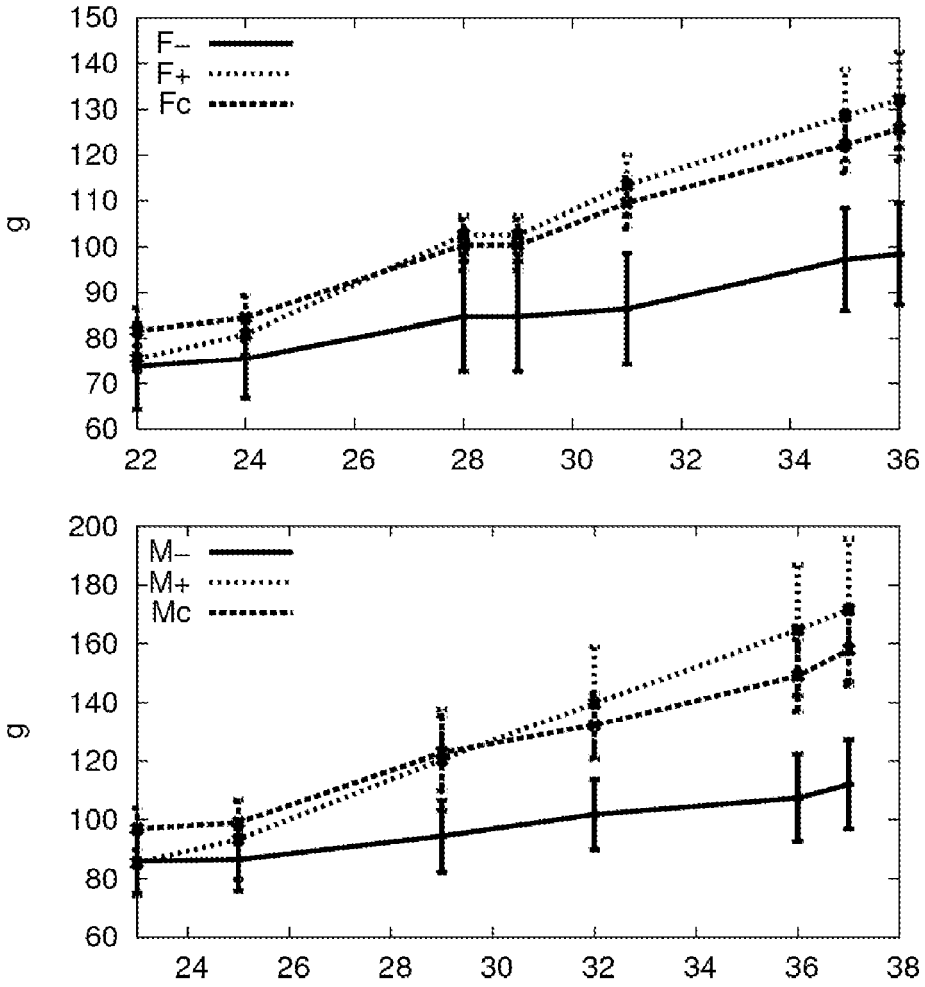

F−
F+
Fc
g
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
22
24
26
28
30
32
34
36
M−
M+
Mc
g
200
180
160
140
120
100
80
60
24
26
28
30
32
34
36
38

**Fig. 9**