

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 093**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/16** (2006.01)

**A23L 2/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2014 PCT/EP2014/077442**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2014 E 14811880 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 3079484**

54 Título: **Composición de agua mineral que contiene hierro biodisponible**

30 Prioridad:

**11.12.2013 GB 201321923**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**27.06.2018**

73 Titular/es:

**SNOWDONIA RESEARCH SARL (100.0%)  
11b boulevard Joseph II  
1840 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**OLDKNOW, CHRIS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 674 093 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

Composición de agua mineral que contiene hierro biodisponible

La presente invención se refiere a una composición de agua mineral que contiene hierro biodisponible. Más particularmente, se refiere a una composición de agua mineral artificial o sintética que proporciona hierro oral biodisponible que tiene uso como suplemento al hierro de la dieta.

El hierro es un nutriente mineral esencial para la mayoría de las formas de vida. En el cuerpo humano, el hierro es, *entre otros*, un componente de la hemoglobina que transporta oxígeno de los pulmones a los tejidos, un componente de la mioglobina que almacena y difunde oxígeno en las células musculares y un componente de las proteínas de hierro y azufre que participan en las reacciones redox del transporte de electrónico mitocondrial.

En la dieta humana, el hierro se presenta en dos formas: hemo y no hemo. El hierro hemo, típicamente en forma de productos animales de carne roja, es mejor absorbido por el cuerpo que el hierro no hemo. Las fuentes de hierro no hemo incluyen cereales y vegetales. Las bebidas que comprenden hierro suplementario se han descrito en, por ejemplo, DE 197 00 368; WO2013/109516; y CN101731627. La deficiencia de hierro en un humano surge cuando las necesidades humanas de hierro no se satisfacen con la ingesta dietética normal. Los hombres, por lo general, pierden aproximadamente 1 mg de hierro por día y esta pérdida normalmente se sustituye por hierro dietético solo. Los niños tienen requisitos de hierro relativamente altos debido a la demanda creada por el rápido crecimiento. En las mujeres, el parto y la menstruación crean importantes demandas de hierro, con pérdidas de hierro en las mujeres que típicamente son de aproximadamente 2 mg por día. Tal pérdida, normalmente tiene que ser sustituida por hierro dietético.

Se encuentran disponibles muchas fórmulas de suplementos orales que contienen hierro, ya sea como suplementos alimenticios generales o como tratamientos de hierro específicos. Los tratamientos orales convencionales para la anemia usan sales ferrosas, por ejemplo, sulfato ferroso, fumarato ferroso y gluconato ferroso. Un problema con tales formulaciones de hierro ferroso, que se proporcionan típicamente en forma de comprimidos, es que muestran una biodisponibilidad variable. En consecuencia, tales formulaciones ferrosas pueden no ser absorbidas fácilmente por el cuerpo. Además, la ingestión de sales ferrosas puede causar, en algunos pacientes, una variedad de síntomas, como náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento y/o dolor abdominal.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que pueden fabricarse ciertas composiciones de agua mineral que tienen altos niveles de hierro biodisponible.

La presente invención proporciona una composición de agua mineral artificial no tóxica que contiene hierro biodisponible, consistiendo dicha composición en una disolución acuosa que tiene un pH de 1 a 5 que contiene iones ferrosos a una concentración de 100 a 300 mg/l y una cantidad no tóxica de cada uno de iones  $\text{Ca}^{2+}$  e iones  $\text{Mg}^{2+}$ , y en el que la composición, cuando se diluye a una concentración de hierro de 20  $\mu\text{M}$ , tiene una absorción de hierro, medida como ferritina intracelular, superior a 120 ng/mg de proteína, donde los iones  $\text{Ca}^{2+}$  están presentes en la composición a una concentración en el intervalo de 100 a 200 mg/l, donde los iones  $\text{Mg}^{2+}$  están presentes a una concentración en el intervalo de 20 a 60 mg/l y donde la absorción de hierro se determina incubando células de Caco-2 epiteliales intestinales humanas de acuerdo con el método proporcionado en los Ejemplos.

Como se ha indicado anteriormente, la composición de agua mineral artificial contiene iones ferrosos a una concentración de 100 a 300 mg/l. Preferiblemente, la concentración de ión ferroso es al menos 150 mg/l. De acuerdo con una realización diferente, la concentración de ión ferroso en la composición no es superior a 250 mg/l. De acuerdo con una realización más preferida, la concentración de ión ferroso está en el intervalo de 175-225 mg/l y especialmente aproximadamente 200 mg/l. Una fuente preferida de ión ferroso es el sulfato ferroso.

La composición de agua mineral de la invención contiene una cantidad no tóxica de cada uno de iones  $\text{Ca}^{2+}$  e iones  $\text{Mg}^{2+}$ . La composición de agua mineral contiene iones  $\text{Ca}^{2+}$  en una concentración en el intervalo de 100 a 200 mg/l, preferiblemente de 150 a 190 mg/l. Se prefiere particularmente una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de aproximadamente 170 mg/l. Una fuente de calcio preferida es  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  que puede disolverse en agua o disolución mineral acidificada mediante la adición de ácido sulfúrico.

Los iones  $\text{Mg}^{2+}$  están presentes en la composición en una concentración en el intervalo de 20 a 60 mg/l, preferiblemente 30 a 50 mg/l, y lo más preferiblemente aproximadamente 40 mg/l. Una fuente de magnesio preferida es sulfato de magnesio.

La composición de agua mineral sintética de la presente invención puede contener una cantidad no tóxica de iones  $\text{Zn}^{2+}$ . Preferiblemente, si hay presentes iones  $\text{Zn}^{2+}$  en la composición, típicamente están presentes en una concentración que no es superior a 60 mg/l y, preferiblemente, a una concentración que no supera los 50 mg/l. De acuerdo con una realización preferida de la invención, la composición de agua mineral sintética contiene aproximadamente 40 mg/l de iones  $\text{Zn}^{2+}$ . Una fuente de zinc preferida es el sulfato de zinc.

La composición de agua mineral sintética puede contener una cantidad no tóxica de iones  $\text{K}^+$ . Una fuente típica de potasio es el sulfato de potasio. De acuerdo con una realización preferida, se proporciona potasio en forma de la sal

de potasio del ácido sórbico (ácido hexa-2,4-dienoico) debido a las propiedades conservantes del sorbato de potasio. Típicamente, el sorbato de potasio estará presente en la composición de agua mineral sintética a una concentración que no exceda 1800 mg/l y preferiblemente no sea mayor de 1600 mg/l. Más preferiblemente, el sorbato de potasio estará presente en la composición a una concentración dentro del intervalo de 1000 a 1500 mg/l.

5 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la composición de agua mineral sintética tiene un contenido de sorbato de potasio de 1300 a 1400 mg/l.

La composición de agua mineral sintética de la invención puede contener hierro en forma de iones  $\text{Fe}^{3+}$ . Se ha encontrado que si hay presentes iones férricos (es decir,  $\text{Fe}^{3+}$ ), pueden estar presentes en la composición a una concentración no superior a 70 mg/l y preferiblemente no superior a 50 mg/l. Típicamente, la concentración de iones  $\text{Fe}^{3+}$ , si están presentes en la composición, será del 5 al 20% de la concentración de iones  $\text{Fe}^{2+}$ . La concentración de iones  $\text{Fe}^{3+}$  en la composición de la presente invención puede ser aproximadamente 10% de la concentración de iones  $\text{Fe}^{2+}$ . Por lo tanto, la composición de agua mineral artificial de la presente invención puede contener iones férricos a una concentración tal que la relación de la concentración de iones ferrosos a la concentración de iones férricos en la disolución es aproximadamente 10:1. De acuerdo con una realización, la composición de agua mineral artificial contiene iones férricos e iones de calcio de modo que la relación de la concentración de iones ferrosos a las concentraciones de cada uno de los iones férricos e iones de calcio ( $\text{Fe}^{2+}.\text{Fe}^{3+}.\text{Ca}^{2+}$ ) es aproximadamente 10:1:8-9. De acuerdo con una realización diferente, la composición de agua mineral artificial contiene iones férricos e iones de magnesio de manera que la relación de la concentración de iones ferrosos a las concentraciones de cada uno de los iones férricos e iones de magnesio ( $\text{Fe}^{2+}.\text{Fe}^{3+}.\text{Mg}^{2+}$ ) es aproximadamente 10:1:2. Según una realización diferente más, la composición de agua mineral sintética de la invención contiene iones férricos e iones de zinc de manera que la relación de la concentración de iones ferrosos a las concentraciones de cada uno de los iones férricos e iones de zinc ( $\text{Fe}^{2+}.\text{Fe}^{3+}.\text{Zn}^{2+}$ ) es aproximadamente 10:1:2.

Las composiciones de agua mineral sintéticas de la presente invención pueden contener uno o más de otros cationes metálicos en cantidades no tóxicas y que no tienen un efecto perjudicial sobre la absorción de hierro. Los ejemplos de tales otros cationes metálicos incluyen sodio y manganeso. Una fuente típica de iones de sodio es el cloruro de sodio. Una fuente típica de iones de manganeso es el sulfato de manganeso.

De acuerdo con una realización, la composición de la invención contiene uno o más conservantes. Un conservante preferido para uso en la invención es el sorbato de potasio. Sin embargo, se pueden usar uno o más conservantes adicionales en lugar de, o además de, sorbato de potasio.

30 La composición de la invención también contendrá uno o más contraiones inorgánicos adecuados. Tales contraiones inorgánicos, para ser adecuados, serán no tóxicos a las concentraciones utilizadas y serán solubles para mantener los iones metálicos esenciales y preferidos discutidos anteriormente en disolución. El contraión inorgánico preferido para uso en la composición de la invención es el anión sulfato, aunque pueden estar presentes otros aniones, tales como el anión fosfato y/o el anión cloruro, en la composición de agua mineral.

35 La composición de agua mineral artificial tiene un valor de pH en el intervalo de 1 a 5, como se ha indicado anteriormente. Preferiblemente, el pH de la composición estará en el intervalo de 2 a 5, más preferiblemente de 2 a 4 y lo más preferiblemente dentro del intervalo de 2,5 a 3,5. Típicamente, el pH de la composición se ajustará mediante la adición de un ácido adecuado, por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido málico, ácido cítrico y mezclas de los mismos.

40 A la composición de agua mineral artificial se le puede dar sabor usando aditivos conocidos en la técnica. Los aditivos de sabor preferidos incluyen uno o más zumos de frutas, tales como zumo de manzana o cítrico, y/o vitamina C. Típicamente, se proporcionará saborizante de manzana mediante la adición de concentrado de manzana, por ejemplo un concentrado obtenido por maceración y prensado de manzanas y deshidratando después el zumo obtenido para concentrarlo. Opcionalmente, el zumo expulsado por las manzanas prensadas puede tratarse para eliminar el almidón y la pectina antes de la concentración. Los zumos y concentrados de frutas contendrán azúcares naturales. También es posible incluir uno o más azúcares y/u otro agente edulcorante en la composición de agua mineral.

La composición de agua mineral artificial de la presente invención se puede preparar mediante la adición a agua estéril de una cantidad apropiada de una disolución madre concentrada estéril de sal ferrosa y cantidades apropiadas de una o más de disoluciones madre concentradas estériles de otras sales deseadas y de otros aditivos deseados. Preferiblemente, el agua a la que se agregan las disoluciones madre se acidifica, antes de la adición de una cantidad de ácido sulfúrico para disminuir el pH a un valor inferior a 4,0, preferiblemente a pH 3,5 o inferior, para ayudar a la estabilidad de la disolución preparada. Esto es especialmente útil ya que la composición de agua mineral artificial contiene iones de calcio. En vista de la baja solubilidad del sulfato de calcio, no es posible preparar disoluciones madre concentradas de esta sal. Se prefiere, por lo tanto, añadir sulfato de calcio dihidratado sólido a una disolución acidificada, como se ha descrito anteriormente, y permitir que se disuelva en la misma. La adición del sulfato de calcio dihidratado a la disolución acidificada se puede llevar a cabo antes, durante o después de la adición de las disoluciones madre concentradas de las otras sales y aditivos opcionales. El pH de la disolución obtenida puede, si es necesario, ajustarse al valor de pH deseado mediante la adición de una cantidad adicional de ácido sulfúrico, o mediante la adición de ácido málico y/o ácido cítrico.

La composición de agua mineral artificial de la presente invención contiene hierro biodisponible, es decir hierro en una forma que es absorbida fácilmente por el cuerpo después de la ingestión de la composición. La composición, cuando se diluye a una concentración de hierro de 20 µm, tiene una absorción de hierro, medida como ferritina intracelular, superior a 120 ng/mg de proteína.

5 Se sabe que la absorción de hierro en el cuerpo tiene lugar en la región del duodeno del intestino delgado. La absorción de hierro, de acuerdo con la presente invención, se puede determinar por un método *in vitro* que emplea células Caco-2 para simular la absorción duodenal. Las células Caco-2 se asemejan a las células epiteliales intestinales humanas que recubren las superficies internas del intestino delgado que absorben los nutrientes de los alimentos ingeridos. Las células Caco-2, que expresan la mayoría de las proteínas para la absorción y el transporte  
10 de hierro en humanos, son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica para estudios de absorción de fármacos. Un método para predecir la disponibilidad de hierro en una muestra de alimento que utiliza la formación de ferritina en células Caco-2 como indicador se describe en el documento US 6.017.713. Esta patente divulga un modelo de digestión/cultivo celular *in vitro* utilizando células Caco-2.

15 De acuerdo con el método utilizado en la presente memoria, que se describe con más detalle en los Ejemplos, las células Caco-2 se incuban en presencia de la composición de agua mineral artificial después de haber sido sometidas a condiciones simuladas de digestión estomacal y luego las células se recogen y se lisan para liberar la ferritina producida. La cantidad de ferritina se puede someter a ensayo después utilizando, por ejemplo, una técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima ferritina (ELISA). Tales técnicas son bien conocidas en la técnica y los kits de ELISA para ferritina están disponibles comercialmente. Una técnica típica puede utilizar anti-ferritina de conejo para la inmovilización en fase sólida (pocillos de microtitulación) y anti-ferritina de conejo en la disolución de conjugado anticuerpo-enzima (fosfatasa alcalina). Se permite que la muestra de ensayo reaccione simultáneamente con los anticuerpos, lo que resulta en moléculas de ferritina intercaladas entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a la enzima. Después de un período de incubación, seguido de lavado, el complejo de ferritina-anticuerpo inmovilizado se somete a un desarrollo de color que se mide espectrofotométricamente. La concentración de ferritina  
20 en la muestra analizada es directamente proporcional a la intensidad de color medida.

25 Como se indicó anteriormente, la composición de agua mineral artificial de la presente invención, cuando se diluye a una concentración de hierro de 20 µM, tiene una absorción de hierro, medida como ferritina intracelular, que es superior a 120 ng/mg de proteína. Preferiblemente, la absorción de hierro es superior a 150 ng/mg de proteína. Se ha podido, por ejemplo, preparar composiciones de agua mineral artificiales que demuestran valores de absorción de hierro superiores a 190 ng/mg de proteína como se muestra en la presente memoria en los Ejemplos. Los expertos en la técnica saben que cuanto mayor es la absorción de hierro, mayor es la posibilidad de una mayor absorción para su utilización en el cuerpo.

30 Las composiciones de agua mineral artificial de la invención se almacenarán, después de la preparación, en recipientes herméticos al aire, previamente esterilizados, tales como botellas o bolsitas de plástico.

35 Las composiciones de agua mineral de la invención tienen uso como suplementos a la ingesta de hierro en la dieta. También pueden usarse en mezcla con otros suplementos dietéticos.

**EJEMPLOS**

Se prepararon diversas disoluciones de hierro acuosas diferentes de acuerdo con la presente invención para tener las formulaciones 1 a 5 como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

40 Se usó agua pura (grado de ósmosis inversa) para preparar todas las formulaciones. Después, se acidificó el agua con ácido sulfúrico a un valor de pH de 3,5. Se prepararon disoluciones madre estériles de todas las adiciones de minerales (con la excepción del sulfato de calcio) y de otros aditivos y se añadieron en cantidades apropiadas para alcanzar las concentraciones establecidas en la Tabla 1. Dado que el sulfato de calcio es insoluble en agua, las formulaciones que contienen iones Ca<sup>2+</sup> se prepararon agregando la cantidad apropiada de CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O sólido puro a la disolución mineral acidificada y permitiendo que se disolviera. Después de la preparación de cada formulación de disolución de hierro, el pH se ajustó a un valor de 3,0 usando ácido sulfúrico y después cada disolución se esterilizó por filtración (a través de filtros de membrana de poro de 0,2 µm) en una botella esterilizada por calor y se almacenó.

TABLA 1

Componente	Concentración (mg/l)				
	1	2	3	4	5
Hierro ferroso	200	200	200	200	200

Componente	Concentración (mg/l)				
	1	2	3	4	5
Hierro férrico	20	20	20	20	20
Calcio	170	0	170	170	170
Magnesio	0	40	40	40	40
Sodio	0	0	0	12	12
Manganeso	0	0	0	1,6	1,6
Potasio	0	0	0	0,4	0,4
Zinc	0	0	0	0,2	0,2
Concentrado de manzana	0	0	0	156.000	156.000
Ácido ascórbico	0	0	0	0	9.000
Sorbato de potasio	0	0	0	1.320	1.320
pH	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0

#### Ensayo de captación de hierro

##### Resumen

- 5 La absorción de hierro se determinó midiendo la cantidad de ferritina intracelular producida por células de Caco-2 epiteliales intestinales humanas incubadas con la muestra a ensayar. Después de la incubación, las células se recogieron y se midió la cantidad de ferritina usando una técnica de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que implica el ensayo espectrofotométrico de la disolución resultante. La concentración de ferritina es directamente proporcional a la intensidad de color de la solución.

##### Absorción de hierro de Caco-2 - Protocolo experimental

- 10 1. Se sembraron células Caco-2 (50.000/cm<sup>2</sup>) en placas de cultivo celular de 6 pocillos (2 ml de medio/pocillo). Los medios se reponían cada 48 horas.
- 15 2. Las células se diferenciaron completamente el día 14 después de la siembra. Por lo tanto, los experimentos se llevaron a cabo entre los días 14-18 posteriores a la siembra. El día 13 tras la siembra se eliminó el medio de crecimiento y las células se lavaron dos veces con disolución de lavado (disolución salina tamponada de Hank (HBSS) a 37°C o usando NaCl 140 mM, KCl 5 mM y tampón piperazina-N, N'-bis (2-ácido etanosulfónico) (PIPES) 10 mM, pH 6,7, 37°C) y se incubaron en Medio Esencial Mínimo (MEM) libre de suero durante 24 horas.
- 20 3. Los medios de ensayo se prepararon en medios controlados libres de hierro (MEM libre de suero). El pH del medio de ensayo se ajustó a 5,8 (usando HCl 1M y NaOH 1M). Las formulaciones de hierro para el ensayo se prepararon sometiendo a cada una a condiciones simuladas de disolución del estómago (HCl 0,1 M, pH 1,8, 37°C, 2-6 horas con agitación magnética). Se retiró una alícuota de la muestra para el ensayo (equivalente a hierro elemental 20 µm) para su adición a las células Caco-2.
4. Se añadió medio aspirado (células lavadas con disolución de lavado) y medio de ensayo para cada condición por triplicado a una placa de 6 pocillos. El volumen de las muestras de ensayo y testigo se añadieron a los medios de ensayo a una concentración final de hierro elemental de 20 µm.

5. La mezcla que contiene células se incubó durante 2-24 horas a 37 ° C en un agitador rotatorio (6 RPM). Después del final del período de incubación, el medio se aspiró y las células se lavaron dos veces con disolución de lavado. Se añadió medio de crecimiento (MEM libre de suero, pH 5,8) a las células y las células se incubaron después toda la noche (24 horas de tiempo de incubación total).
- 5 6. Recogida de células: se aspiró el medio, se lavaron las células con disolución de lavado y luego con solución de eliminación (solución de lavado + hidrosulfito de Na 5 µm y bathofenantrolina de 1 µm, sal de sodio sulfonada (sal disódica del ácido 4,7-difenil-1,10-fenantrolinodisulfónico (BPDS)) para eliminar el hierro unido a la superficie. Las células se lavaron de nuevo con disolución de lavado.
- 10 7. Las células, recogidas según el punto 6. anterior, se trataron mediante la adición de 350 µl de tampón de lisis a cada pocillo y las placas se incubaron en un balancín de placas (8 RPM) durante 40 minutos (en bandejas de hielo).
8. El lisado celular se recogió y se pipeteó en un tubo de microcentrifuga (Eppendorf).
9. El lisado celular se pasó al menos cinco veces a través de una jeringa de 1 ml equipada con una aguja 25G.
10. El tubo de microcentrifuga que contiene el lisado celular se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se recogió y se almacenó a -20 ° C.
- 15 Las formulaciones de hierro identificadas en la Tabla 1 anterior se trataron e incubaron con células Caco-2 de acuerdo con el protocolo anterior. Además, una disolución testigo que contiene 200 mg/l de Fe<sup>2+</sup> y 20 mg/l de Fe<sup>3+</sup>, pH 3,0, también se trató e incubó de la misma manera que las formulaciones de hierro en la Tabla 1. El lisado celular obtenido en cada caso se sometió a ELISA de ferritina para determinar cuantitativamente la cantidad de ferritina.
- 20 El análisis cuantitativo de la ferritina se determinó usando un kit 'Spectro Ferritin' (Ramco Laboratories, Inc., EE.UU.) De acuerdo con el procedimiento experimental que se expone a continuación.

#### Procedimiento ELISA de ferritina

1. Las muestras para el ensayo se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 ° C.
2. Se pipetearon 30µl de cada estándar, cada blanco y cada muestra para el ensayo en micropocillos duplicados recubiertos con ferritina de bazo antihumano de conejo. No se realizaron adiciones a los micropocillos utilizados para medir la unión no específica (NSB).
- 25 3. Se añadieron a todos los pocillos 200µl de ferritina de bazo antihumano de conejo conjugada con fosfatasa alcalina.
4. Los micropocillos con el contenido se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en una mesa giratoria ajustada a 195 rpm.
- 30 5. Los micropocillos se lavaron con agua desionizada llenando cada micropocillo con agua y agitando después para decantar. Este procedimiento de lavado se repitió 3 veces. Después del lavado final, las partes superiores de los micropocillos se golpearon con un material absorbente durante aproximadamente 30 segundos para drenar.
6. Se pipetearon 200µm de disolución de sustrato (fenilfosfato disódico y 4-aminoantipirina en dietanolamina al 10%) en cada micropocillo.
- 35 7. Los micropocillos que contienen la disolución de sustrato se incubaron después durante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Se añadieron 100µl de ferricianuro de potasio al 0,24% a cada micropocillo para provocar el desarrollo del color y los contenidos de los micropocillos se mezclaron completamente.
- 40 9. Las absorbancias se midieron espectrofotométricamente a 490 nm y a una longitud de onda de corrección de 630 nm. La densidad óptica es directamente proporcional a la concentración de ferritina en la muestra. Las concentraciones de ferritina se calcularon según las instrucciones del fabricante del kit.
- La absorción de hierro por las células Caco-2 (como ferritina) obtenida para cada una de las formulaciones de hierro identificadas en la Tabla 1 anterior (promedio de tres valores) se establece en la Tabla 2 a continuación. La tabla también muestra la absorción de hierro por células Caco-2 (como%) normalizadas frente al testigo de Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>
- 45 descrito anteriormente (tomado como 100%).

TABLA 2

Formulación de hierro	1	2	3	4	5
Absorción de hierro como ferritina (ng/mg de proteína)	164	218	268	234	250
% basado en el testigo de Fe <sup>2+</sup> / Fe <sup>3+</sup>	103	138	170	149	160

**Ejemplo 10**

5 Se preparó una composición de agua mineral según la invención para tener la formulación: 220 mg/l de ion ferroso, 170 mg/l de ion calcio, 40 mg/l de ion magnesio, 1.320 mg/l de sorbato de potasio, con el pH ajustado usando ácido sulfúrico. Se evaluó la biodisponibilidad de hierro por comparación de la formación de ferritina, como se describió anteriormente. La composición mostró un alto nivel de hierro biodisponible.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de agua mineral artificial no tóxica que contiene hierro biodisponible, consistiendo dicha composición en una disolución acuosa que tiene un pH de 1 a 5 que contiene iones ferrosos a una concentración de 100 a 300 mg/l y una cantidad no tóxica de cada uno de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  e iones  $\text{Mg}^{2+}$ , y donde la composición, cuando se diluye a una concentración de hierro de 20  $\mu\text{M}$ , tiene una absorción de hierro, medida como ferritina intracelular, superior a 120 ng/mg de proteína, donde los iones  $\text{Ca}^{2+}$  están presentes en la composición a una concentración en el intervalo de 100 a 200 mg/l, donde los iones  $\text{Mg}^{2+}$  están presentes a una concentración en el intervalo de 20 a 60 mg/l y en los que la absorción de hierro se determina incubando células Caco-2 epiteliales intestinales humanas de acuerdo con el método proporcionado en los Ejemplos.
- 5 2. Una composición de agua mineral según la reivindicación 1, en la que la concentración de iones ferrosos está en el intervalo de 150 a 250 mg/l.
- 10 3. Una composición de agua mineral de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que contiene además iones férricos a una concentración no superior a 70 mg/l, preferiblemente no superior a 50 mg/l.