

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 729 839

51 Int. Cl.:

A23L 33/165 (2006.01) A23L 2/52 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01) A23C 9/152 (2006.01) A23L 2/02 (2006.01) A61K 9/107 (2006.01) A61K 33/26 (2006.01) A23P 10/30 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 27.05.2013 PCT/IB2013/054365
- (87) Fecha y número de publicación internacional: 05.12.2013 WO13179206
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 27.05.2013 E 13734855 (3)
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: 27.03.2019 EP 2854561
 - (54) Título: Suplementación con minerales de bebidas
 - (30) Prioridad:

01.06.2012 EP 12170516

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: **06.11.2019**

(73) Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%) Het Overloon 1 6411 TE Heerlen, NL

(72) Inventor/es:

LI, FENG; BREMER, LEONARDUS GERARDUS BERNARDUS y TUINIER, REMCO

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

DESCRIPCIÓN

Suplementación con minerales de bebidas

5 La presente invención se refiere al campo de la suplementación con metales de bebidas. Más particularmente, se refiere a una micela central de coacervado complejo que contiene metal que comprende un agente quelante cargado negativamente, un catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular y agua. También se refiere a un proceso para producir dicha micela central de coacervado complejo que contiene metal, y al uso de dicha micela central de coacervado complejo que contiene metal para suplementar bebidas con una fuente de metal altamente biodisponible. También se refiere a una bebida que comprende dicha micela central de coacervado 10 complejo que contiene metal.

Entre los déficits de metal, la anemia por carencia de hierro es un problema de salud relacionado con la nutrición grave, que afecta a más de 3 mil millones de personas en el mundo. Aunque la carencia de hierro es una de las causas directas de la anemia, también es la causa de otros trastornos fisiológicos diversos como la carencia energética, un crecimiento y un desarrollo escasos. Los programas de enriquecimiento de alimentos se consideran habitualmente el enfoque más rentable y sostenible para combatir la carencia de hierro (Fe). Sin embargo, el éxito de un programa de enriquecimiento con hierro depende en gran medida de la elección cuidadosa del compuesto de Fe y de la matriz de alimento.

20

Hay problemas ampliamente reconocidos asociados con la adición de suplementos minerales a alimentos y bebidas. Por ejemplo, muchos de tales suplementos minerales tienden a ser bastante insolubles, y, por tanto, no son muy útiles en bebidas, o tienden a tener un mal sabor (sabor metálico) o sensación en boca inaceptable. Además, los suplementos de hierro tienden a cambiar el color de los productos alimenticios, o a ser organolépticamente inadecuados. También es particularmente difícil formular bebidas que contienen suplementos de hierro ya que los compuestos de hierro tienden a formar polímeros de hidróxido de hierro insolubles en disolución e interaccionan con otros minerales y otros materiales. Esta interacción no solo afecta a las propiedades organolépticas y estéticas de las bebidas, sino que también afecta de manera no deseable a la biodisponibilidad nutricional de los suplementos de

30

25

15

El documento WO 2011/159665 da a conocer sales nutritivas encapsuladas que comprenden partículas de sal nutritivas encapsuladas con un complejo de quitosano-ácido esteárico insoluble en agua. Sin embargo, esta encapsulación se basa en una microemulsión que requiere una fase oleosa y no es estable durante el almacenamiento a largo plazo en una bebida.

35

El documento WO 2009/029407 da a conocer el suministro y la liberación controlada de aromatizantes insolubles en aqua encapsulados. Se basa en un coacervado compleio que comprende proteína de suero y polisacárido para formar un complejo basándose en atracción electrostática. Sin embargo, el tamaño de partícula está en todos los casos por encima de 500 nm, lo que cuando se usa en disolución da como resultado turbidez.

40

El documento WO 2010/116379 da a conocer un té enriquecido con hierro un forma seca que comprende del 99,5 al 99,88% de té, del 0,1 al 0,3% de sal de hierro y del 0,02 al 0,2% de base de almidón. Este té enriquecido se produce pulverizando la disolución de hierro sobre té seco. Sin embargo, esta tecnología no permite producir bebidas líquidas enriquecidas con hierro debido a la precipitación de la sal de hierro.

45

50

El documento US 2006/240151 da a conocer bebidas aromatizadas, a base de leche, enriquecidas con hierro, que tienen un color mejorado, comprendiendo las bebidas (A) grasa; (B) proteína de la leche que representa desde aproximadamente el 10 por ciento hasta el 100 por ciento en peso de proteína total; (C) carbohidrato que comprende desde aproximadamente el 75 por ciento hasta el 100 por ciento en peso de al menos una de (i) desde aproximadamente el 0,1 por ciento hasta aproximadamente el 10 por ciento de sacarosa, trehalosa, o una combinación de las mismas, en peso de la bebida, y (iii) desde aproximadamente el 0,1 por ciento hasta aproximadamente el 20 por ciento de maltodextrina en peso del líquido nutricional, teniendo la maltodextrina un valor DE desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10, y (iii) combinaciones de (i) y (ii); (D) un material que contiene hierro, y (E) un aromatizante.

55

El documento US 2009/124572 da a conocer un suplemento nutricional y, particularmente, un suplemento nutricional oral que contiene un enriquecedor de hierro que comprende un quelato de pirofosfato férrico. El suplemento nutricional también puede incluir vitaminas, minerales no ferrosos y otros ingredientes.

60

El documento WO 2008/028264 da a conocer un proceso de producción para microcápsulas con nanopartículas magnéticas para la liberación controlada de sustancias activas, así como productos relacionados con este proceso y métodos para la liberación controlada de sustancias activas a través de la aplicación de un campo magnético oscilante.

65 Los inventores de la presente solicitud han encontrado ahora sorprendentemente una nueva composición útil para el enriquecimiento con metales de bebidas. Esta composición es rentable, usa una mezcla de homopolímeros, se

prepara a partir de productos que se consideran todos de calidad para alimentos a nivel global, son estables en el tiempo como tal y cuando se mezclan con bebidas, no se degrada durante la pasteurización, no reacciona con polifenoles, proporciona una biodisponibilidad de metal excelente, no da color a la bebida suplementada y no produce un sabor metálico. Además, esta composición a base de componentes solubles acuosos se autoensambla para dar partículas. Además, estas partículas de coacervado complejo de calidad para alimentos permiten usar una concentración muy alta de metal (por ejemplo: hierro) en disolución acuosa, al tiempo que mantiene la disolución estable y transparente.

Por tanto, la presente invención proporciona una micela central de coacervado complejo que contiene metal que comprende del 80 al 99% en peso de un agente quelante cargado negativamente, del 0,2 al 10% en peso de un catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular, del 0,5 al 10% en peso de un catión metálico y agua, significando el % en peso el porcentaje en peso seco basado en el peso total de la micela central de coacervado complejo, y estando el tamaño medio de partícula medido mediante dispersión de luz dinámica entre 10 y 150 nm, siendo el metal hierro en la forma Fe²⁺.

10

15

30

35

40

A menos que se especifique lo contrario, todos los porcentajes en la presente solicitud se expresan como porcentaje en peso seco basado en el peso total de la micela central de coacervado complejo.

Un coacervado complejo es una gota esférica diminuta de moléculas orgánicas variadas que se mantiene junta mediante fuerzas hidrófobas con respecto a un líquido circundante. La coacervación es un proceso de separación de fases espontánea que se produce cuando se mezclan dos polielectrolitos cargados de manera opuesta en una disolución acuosa. La interacción electrostática entre las dos especies de micromoléculas da como resultado la separación de un coacervado (fase rica en polímero) del sobrenadante (fase pobre en polímero). Este fenómeno puede usarse para formar nanoesferas y encapsular una variedad de compuestos. El proceso de encapsulación puede realizarse en su totalidad en disolución acuosa y a bajas temperaturas sin proporcionada nada de energía.

Por definición, las nanoesferas o partículas ultrafinas tienen un tamaño de entre 1 y 150 nanómetros. La ventaja de las nanoesferas es que son posibles suspensiones transparentes, dado que la interacción de la superficie de las partículas con el disolvente es suficientemente fuerte para superar las diferencias de densidad, que de lo contrario dan como resultado habitualmente un material que o bien se hunde o bien flota en un líquido.

Una micela es un agregado de moléculas de tensioactivo dispersadas en un coloide líquido. Una micela típica en disolución acuosa forma un agregado con las regiones "de cabeza" hidrófilas en contacto con el disolvente circundante, secuestrando las regiones de cola individuales hidrófobas en el centro de la micela. Las micelas centrales de coacervado complejo tienen la propiedad de autoensamblarse cuando se mezclan las materias primas (catión polimérico y agente quelante) de una manera definida y en una relación definida.

La quelación es la formación o presencia de dos o más enlaces coordinados independientes entre un ligando polidentado (con múltiples enlaces) y un único átomo central. Habitualmente, estos ligandos son compuestos orgánicos, y se denominan quelantes, agente de quelación, agente quelantes o agentes secuestrantes. Para la presente invención puede usarse cualquier agente quelante cargado negativamente seleccionado de compuestos orgánicos comunes. Más preferiblemente, el agente quelante tiene una estructura de tipo anillo (que tiene la forma de un anillo) e incluso más preferiblemente es hexametafosfato de sodio.

- 45 El hexametafosfato de sodio (SHMP) es un hexámero de composición (NaPO₃)₆. El hexametafosfato de sodio comercial es normalmente una mezcla de metafosfatos poliméricos, de los que el hexámero es uno, y es habitualmente el compuesto al que se hace referencia con este nombre. Más correctamente se denomina polimetafosfato de sodio. Se prepara fundiendo ortofosfato de monosodio, seguido de enfriamiento rápido.
- El catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular se define como cualquier material polimérico que se considera por la US Food and Drug Administration seguro para su uso en productos alimenticios y de bebida. El catión polimérico de calidad para alimento natural adecuado para la presente invención incluye, pero no se limita a, proteínas lácteas incluyendo proteínas de suero, y caseínas, gelatina, albúmina de huevo, proteínas vegetales, proteínas microbianas, proteínas de legumbres y quitosano. El catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular preferido según la presente invención es quitosano con un grado de polimerización de entre 5 y 100, más preferiblemente, con un grado de polimerización de entre 10 y 50, incluso más preferiblemente, con un grado de polimerización de entre 10 y 20. El quitosano es un polisacárido lineal compuesto por D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) unidas en β-(1-4) distribuidas aleatoriamente. El quitosano se produce comercialmente mediante la desacetilación de quitina, que es el elemento estructural en el exoesqueleto de crustáceos.

El metal encapsulado dentro de tal micela central de coacervado complejo se estabiliza debido a la protección de la corona polimérica, y se aumenta la eficiencia antioxidante debido a la presencia del agente quelante.

Debido a que el SHMP interacciona parcialmente con el quitosano, se reduce la eficiente quelante de metal. La interacción de SHMP y quitosano se determina mediante la concentración de estas dos moléculas y las condiciones

ambientales, como el pH y la temperatura. Esto significa que el potencial de interacción o quelación del SHMP y el hierro puede ajustarse por parte del experto en la técnica influyendo en la interacción del SHMP y el quitosano. Como resultado puede controlarse la biodisponibilidad del hierro. Además, estas partículas de micela autoensambladas son objetos huecos, y pueden encapsularse otros ingredientes alimenticios, por ejemplo, moléculas saborizantes, vitaminas.

En otra realización, la presente invención se refiere a una micela central de coacervado complejo que contiene metal según la invención tal como se describió anteriormente y que comprende además un agente aromatizante alimenticio y/o vitamina soluble en agua en la fase acuosa, o un agente aromatizante alimenticio y/o vitamina soluble en grasa en la envuelta de la micela. Preferiblemente, comprende entre el 0 y el 10% en peso de un agente saborizante y/o vitamina soluble en agua o grasa basado en el peso total de la micela central de coacervado complejo.

Aunque los términos "saborizante" o "aromatizante" en el lenguaie común indican las sensaciones químicas combinadas de sabor y olor, los mismos términos se usan habitualmente en la industria de las fragancias y los sabores para hacer referencia a productos químicos y extractos comestibles que alteran el sabor de alimentos y productos alimenticios a través de la sensación del olor. Debido al alto coste o la falta de disponibilidad de extractos saborizantes naturales, la mayoría de los aromatizantes comerciales son de naturaleza idéntica, lo que significa que son el equivalente químico de sabores naturales, pero sintetizados químicamente en vez de haberse extraídos de los materiales de fuente. Puede usarse cualquier agente saborizante de calidad para alimento común en la composición según la presente invención. Los saborizantes preferidos se seleccionan de almendra, amaretto, anisete, brandy, cappuccino, menta, canela, almendra con canela, crema de menta, Grand Mariner, palo de menta, pistacho, Sambuca, manzana, manzanilla, especia de canela, crema, crema de menta, vainilla, vainilla francesa, crema irlandesa, Kahlúa, menta, menta piperita, limón, nuez de macadamia, naranja, hoja de naranja, melocotón, fresa, uva, frambuesa, cereza, café, chocolate, cacao, moca y similares, y cualquier mezcla de los mismos; así como aromatizantes/potenciadores del aroma tales como diacetilacetaldehído, acetato de isoamilo, benzaldehído, cinamaldehído, propionato de etilo, antranilato de metilo, limoneno, 2,4-decadienoato de etilo, hexanoato de alilo, etilmaltol, etilvainillina, salicilato de metilo o mezclas de los mismos, hierbas, especias, así como cualquier mezcla de las mismas.

30

5

10

15

20

25

Las vitaminas solubles en agua según la presente invención pueden seleccionarse de vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B6 (piridoxina), niacina (ácido nicotínico), vitamina B12, ácido fólico, ácido pantoténico, biotina y vitamina C.

35 Las vitaminas solubles en grasa según la presente invención se seleccionan de vitaminas A, D, E, y K.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a una micela central de coacervado complejo que contiene metal que comprende

40 del 85 al 99% en peso de hexametafosfato de sodio,

del 0,4 al 8% en peso de quitosano con un grado de polimerización de entre 10 y 20,

del 0,6 al 6% en peso de Fe²⁺,

45

50

del 0 al 10% en peso de un agente saborizante y/o vitamina soluble en agua o grasa,

y agua, significando el % en peso el porcentaje en peso seco basado en el peso total de la micela central de coacervado complejo, y estando el tamaño medio de partícula medido mediante dispersión de luz dinámica entre 10 y 150 nm.

En una preferida más realización, la presente invención se refiere a una micela central de coacervado complejo que contiene metal que comprende

del 85 al 99% en peso de hexametafosfato de sodio,

del 0,4 al 8% en peso de quitosano con un grado de polimerización de entre 10 y 20,

del 0,6 al 6% en peso de Fe²⁺,

60

65

del 0 al 10% en peso de un agente saborizante y/o vitamina soluble en agua o grasa,

y agua, estando el hexametafosfato de sodio a una concentración comprendida entre 5 y 350 mg/ml, significando el % en peso el porcentaje en peso seco basado en el peso total de la micela central de coacervado complejo, y estando el tamaño medio de partícula medido mediante dispersión de luz dinámica entre 10 y 150 nm.

La micela central de coacervado complejo que contiene metal según la presente invención tiene un tamaño medio de partícula de entre 10 y 150 nm, más preferiblemente, un tamaño medio de partícula de entre 50 y 100 nm. El tamaño de partícula puede ajustarse mediante el peso molecular de la polimerización de calidad para alimento natural, por ejemplo: un tamaño de partícula comprendido entre 10 y 150 nm se obtendrá cuando se use quitosano con un grado de polimerización de menos de 15. El tamaño de partícula se mide mediante dispersión de luz dinámica en un aparato de dispersión de luz ALV.

En otra realización, la presente invención proporciona también un proceso para la fabricación de una micela central de coacervado complejo que contiene metal tal como se describió anteriormente que comprende las etapas de:

i) preparar una disolución acuosa de un agente quelante cargado negativamente A),

ii) preparar una disolución acuosa de una sal de metal B),

5

10

20

25

35

40

45

- iii) mezclar 100 partes de A) con 20 partes de B) a concentración equimolar, e incubar la mezcla resultante a temperatura ambiente, para producir la disolución de metal quelado resultante C),
 - iv) preparar una disolución acuosa de un catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular en una disolución tampón de ácido cítrico a pH de entre 4 y 6, D),
 - v) añadir gota a gota la disolución de metal quelado D) a 880 partes de la disolución C) mientras se agita.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un proceso para la fabricación de una micela central de coacervado complejo que contiene metal tal como se describió anteriormente que comprende las etapas de:

- i) preparar una disolución acuosa de un agente quelante cargado negativamente A) a de 1 a 500 mM,
- ii) preparar una disolución acuosa de una sal de metal B) a de 1 a 500 mM,
- 30 iii) mezclar 100 partes de A) con 20 partes de B) a concentración equimolar, e incubar la mezcla resultante durante de 5 minutos a 5 días a temperatura ambiente, para producir la disolución de metal quelado resultante C),
 - iv) preparar una disolución acuosa de un catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular a una concentración de 0,1 a 1 mg/ml en una disolución tampón de ácido cítrico a pH de entre 4 y 6, D),
 - v) añadir gota a gota la disolución de metal quelado D) a 880 partes de la disolución C) mientras se agita.
 - Más preferiblemente, el tiempo de incubación de la etapa iii) es de al menos 20 minutos, preferiblemente al menos 50 minutos, más preferiblemente, al menos 90 minutos, y no más de 5 días, preferiblemente no más de 24 horas, más preferiblemente, no más de 8 horas, incluso más preferiblemente, no más de 5 horas.
 - Incluso más preferiblemente, para el proceso según la presente invención, el agente quelante cargado negativamente es hexametafosfato de sodio, la sal de metal es FeSO₄, y el catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular es quitosano con un grado de polimerización de entre 10 y 20. Más preferiblemente, las disoluciones de hexametafosfato de sodio y FeSO₄ de las etapas i) y ii) están cada una a una concentración de entre 50 y 150 mM, y el quitosano de la etapa iv) está a una concentración de entre 0,4 y 0,8 mg/ml. Incluso más preferiblemente, las disoluciones de hexametafosfato de sodio y FeSO₄ están cada una a una concentración de 100 mM, y el quitosano está a una concentración de 0,6 mg/ml.
- 50 Es crítico en la etapa v) del presente proceso añadir gota a gota la disolución D) a la disolución C). La carga superficial y el mecanismo de estabilización serán completamente diferentes si se hace al revés, y daría como resultado precipitados de tamaño micrométrico en lugar de nanopartículas muy solubles y estables como en la presente invención.
- En otra realización, la presente invención proporciona el uso de una micela central de coacervado complejo que contiene metal según la presente invención, para suplementar una bebida con de 1 a 60 mg de metal/litro. Para la presente invención, la bebida, es un líquido que se prepara específicamente para el consumo humano. Para el propósito de la presente invención, la bebida son bebidas listas para beber, concentrados de bebida, jarabes, bebidas estables en almacenamiento, bebidas refrigeradas, bebidas congeladas, y similares, e incluye también agua y agua saborizada. En una realización preferida, las bebidas se seleccionan de zumo, refrescos no carbonatado, leche y zumo de fruta. Los productos de bebida pueden pasteurizarse usando tecnologías comunes, tales como tratamiento a temperatura ultraalta (UHT) y/o tratamiento de tiempo breve a alta temperatura (HTST).
- La presente invención se refiere también a una bebida que comprende una micela central de coacervado complejo que contiene metal según cualquiera de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos:

Figura 1: Medición de DLS de la estabilidad de las partículas en función del tiempo (a) el triángulo pertenece al radio de partícula promedio medido según ajuste cumulante y el cuadrado pertenece a la intensidad de luz dispersada promedio (b) la distribución del tamaño de partícula en función del tiempo de incubación (1, 10 y 24 horas) según análisis CONTIN.

Figura 2: Medición de DLS de la estabilidad de las partículas en función de la temperatura (a) el triángulo pertenece al radio de partícula promedio medido según ajuste cumulante y el cuadrado pertenece a la intensidad de luz dispersada promedio (b) la distribución del tamaño de partícula en función de la temperatura de incubación (5, 25 y 50 grados Celsius) según análisis CONTIN.

Figura 3: Medición por valoración de la estabilidad de las partículas en función del pH (a) el círculo pertenece al radio de partícula promedio medido según ajuste cumulante y el cuadrado pertenece a la intensidad de luz dispersada promedio (b) potencial ζ en función del pH.

Figura 4: Medición por valoración de la estabilidad de las partículas en función del pH (a) el círculo pertenece al radio de partícula promedio medido según ajuste cumulante y el cuadrado pertenece a la intensidad de luz dispersada promedio (b) potencial ζ en función del pH.

Figura 5: Espectros UV de mezclas que contienen polifenol y hierro.

Figura 6: El diagrama Zimm de SLS de la partícula

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

5

10

15

20

30

35

40

45

60

Ejemplo 1: Preparación de micela centra de coacervado complejo que contiene hierro

Preparación de muestras:

Se adquirieron sulfato de hierro (II) y quitosano de bajo peso molecular (grado de polimerización, n<15) de Sigma-Aldrich. Se adquirió hexametafosfato de sodio (SHMP) de J.T. Baker. Se prepararon tres disoluciones madre en disolución acuosa a las siguientes concentraciones: (A) SHMP 100 mM, (B) FeSO₄ 100 mM y (C) quitosano 20 mg/ml con pH<3. Se diluyó adicionalmente tampón de ácido acético 0,5 M a pH 5 y se usó como disolución tampón para preparar la muestra. Inicialmente, se añadieron 100 µl de A a 20 µl de B, y el tiempo de reacción entre A y B se correlaciona con la eficiencia de unión de hierro y agente quelante SHMP. Este tiempo de reacción puede variar de minutos a días. En los presentes ejemplos, el tiempo de incubación fue de 1 hora. Cuanto mayor es el tiempo de reacción, más fuertemente se unirá el hierro a SHMP. Mientras tanto, se diluyeron 25 µl de C con 755 µl de agua miliQ en presencia de 100 µl de tampón de ácido acético. Una vez que ambas mezclas están listas, se añadió una disolución de hierro y SHMP gota a gota a la disolución de quitosano diluida con agitación. El porcentaje en peso de la mezcla final es el siguiente: SHMP 6 mg/ml, Fe²⁺ 0,4 mg/ml, quitosano 0,5 mg/ml. Estos porcentajes en peso pueden aumentarse hasta: SHMP 325 mg/ml, Fe²⁺ 2,6 mg/ml y quitosano 1,3 mg/ml para elaborar partículas autoensambladas estables.

Caracterización de la micela central de coacervado complejo:

Se llevó a cabo una dispersión de luz dinámica (DLS) en un aparato de dispersión de luz ALV (ALV, Langen, Alemania). Todos los experimentos se realizaron a un ángulo de dispersión de 90°. Se controló la temperatura usando un termostato Haake C35. Se calculó el radio hidrodinámico a partir de ajustes cumulantes o un ajuste multiexponencial CONTIN. Se obtuvo la intensidad relativa según la relación de intensidad de las muestras y el tolueno. Se realizó una medición de dispersión de luz estática (SLS) en el mismo aparato ALV, y el ángulo de detector varía desde 24° hasta 140°. Se realizaron una medición por valoración y mediciones de potencial ζ en un Zetasizer (Malvern, Reino Unido). También se tomó la intensidad de la luz de dispersión para las muestras de valoración de las mediciones en el Zetasizer.

Se realizaron mediciones de microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio electrónico JEOL 1200 EX que funciona a 100 kV. Se registraron imágenes con una cámara CCD 1k. Se secó la muestra sobre una rejilla de cobre durante la noche antes de la medición.

Se realizó una medición del espectro UV en UV-2450 (Shimadzu) con ácido acético 0,05 M como referencia. La concentración de ácido tánico, el polifenol usado en este estudio es 0,15 mg/ml.

Se diluyeron muestras preparadas a una concentración relativamente baja (SHMP 6 mg/ml, Fe²⁺ 0,4 mg/ml, quitosano 0,5 mg/ml) diez veces y se midieron con DLS a 20°C durante 24 horas. Tanto el tamaño medio de

partícula, aproximadamente 70 nm, intensidad de luz dispersada, tal como se muestra en la Figura 1a, y la distribución del tamaño de partícula, tal como se muestra en la Figura 1b, no cambia significativamente en el plazo del tiempo de medición indicado. Esto indica que las partículas permanecen muy estables a temperatura constante, 20°C.

5

10

Para comprobar si la estabilidad de la partícula es sensible a la temperatura, se realizó una medición de DLS a diferentes temperaturas. Se prepararon las mismas muestras que las usadas para los estudios de estabilidad y se midieron cada 5°C con DLS entre 5°C y 50°C. Los resultados se muestran en la Figura 2. El tamaño medio de partícula, intensidad de luz dispersada, Figura 2a, y la distribución del tamaño de partícula, Figura 2b, disminuyeron ligeramente tras aumentar temperatura. La diferencia entre 5°C y 50°C es bastante pequeña. Esto demuestra que el tamaño y la forma de las partículas permanecen relativamente constantes dentro del intervalo de temperatura de 5 a 50°C.

15

Estas partículas son estables a lo largo del tiempo y razonablemente constantes dentro de la temperatura de 5° C a 50° C. Para tener una mejor compresión de la sensibilidad al pH de estas partículas y para tener un conocimiento profundo sobre la composición de las mismas, se realizaron mediciones de valoración de pH con un Zetasizer. Entretanto se siguió el cambio de potencial ζ en función del pH. Se diluyeron las muestras preparadas a una concentración relativamente baja (SHMP 6 mg/ml, Fe²⁺ 0,4 mg/ml, quitosano 0,5 mg/ml) diez veces y se valoraron con NaOH 0,1 M. Los resultados se muestran en la Figura 3. El tamaño de partícula así como la intensidad de luz dispersada aumentan tras el aumento de pH, Figura 3a. Sin embargo, el potencial ζ de la partícula permanece aproximadamente constante, -40 mV, dentro del intervalo de pH de 3-8.

25

30

20

El potencial ζ negativo de las partículas indica que el SHMP es el grupo funcional estabilizador en el exterior de la partícula y los grupos SHMP están ubicados (parcialmente) en la superficie de la partícula. Para verificar adicionalmente esta observación e identificar si el SHMP y el quitosano pueden autoensamblarse para dar partículas estables sin adición de hierro, se preparó la siguiente muestra y se realizaron las mediciones de valoración posteriormente. Se prepararon muestras que contenían SHMP 6 mg/ml y quitosano 0,5 mg/ml en primer lugar, se añadió Fe²⁺ gota a gota hasta alcanzar la concentración de 0,4 mg/ml al final. Se diluyó esta muestra diez veces y se realizó una medición de valoración en el muestreador diluido con el Zetasizer. En comparación con la medición de valoración previa, tanto los tamaños de partícula como la intensidad de luz dispersada aumentan significativamente: Dh a pH 5 aumenta de 63 nm a 90 nm, mientras tanto la intensidad de luz dispersada casi se triplicó, de 700 kHz a 2000 kHz (véanse la Figura 3a y la Figura 4a). Este cambio indica que el orden de adición de hierro a la mezcla influye enormemente en la morfología y/o la composición de las partículas autoensambladas. Además, el potencial ζ de la muestra disminuye gradualmente de -20 mV al principio de la valoración a -40 mV, tal como se muestra en la Figura 4b. La fluctuación inicial del potencial ζ puede superarse si la muestra se equilibra más de una hora antes de realizar mediciones de valoración, el potencial ζ medido se mantendrán entonces aproximadamente a -40 mV. Esto puede explicarse por el hecho de que se necesita tiempo para permitir la reorganización del complejo hasta alcanzar

40

el equilibrio tras la adición de hierro.

35

Estos resultados indican que tras la adición de hierro a la mezcla de SHMP y quitosano, una segunda capa de complejo de SHMP y quitosano se asociará con la mayor probabilidad a la partícula. Esto explica el aumento de tamaño de partícula así como el aumento de luz dispersada tras la adición de hierro. Parece que el hierro se usa como puente catiónico en este caso para unir el "núcleo" de la partícula con la capa adicional del complejo de SHMP y quitosano.

45

Además de la estabilidad y la sensibilidad al pH de las partículas, el hierro encapsulado de esta manera proporcionará un problema de alteración de color mucho menor, y la fuerza de unión de hierro y agente quelante, SHMP, puede controlarse cinéticamente. En la práctica, esto significa que el aumento del tiempo de incubación de SHMP con hierro antes de la adición de guitosano reforzará la eficiencia de unión.

50

55

60

65

La alteración de color está relacionada habitualmente con la reacción de hierro con polifenol. Se asume comúnmente que el hierro forma un complejo con polifenol y el complejo tiene un aspecto azul oscuro que da problemas en la mayoría de las aplicaciones alimentarias (Perron et al. 2010, Dalton Trans 39, 9982). Una vez que el hierro se une fuertemente al SHMP, la probabilidad de formación de un complejo con polifenol es pequeña. Por tanto, la alteración de color se suprime gravemente. Se usa espectrofotometría UV para sondar la formación de complejo de hierro-polifenol y comparar el espectro de absorción UV con muestras de referencia, los resultados se muestran en la Figura 5. El hierro y el polifenol, ácido tánico, forman un complejo rápidamente, y el pico de absorción UV característico del complejo de hierro-polifenol aparece alrededor de 550 nm. Debe observarse que el estado estacionario de absorción UV máxima solo puede alcanzarse más de diez horas tras preparar la muestra en las condiciones experimentales actuales. Se observó que el efecto cinético se asocia aparentemente con la formación del complejo de hierro-polifenol. A diferencia de la mezcla de hierro y ácido tánico, cuando el hierro se une en primer lugar al SHMP y entonces se combina con ácido tánico, apenas se forma nada de complejo de hierropolifenol, lo que se indica por el hecho de que no aparece ninguna absorción UV detectable a 550 nm (Figura 5). La mezcla de muestra que contiene SHMP 0,6 mg/ml, Fe²⁺ 0,04 mg/ml y quitosano 0,05 mg/ml con acido tánico proporciona ligeramente más absorción UV en comparación con la muestra de referencia compuesta por solo hierro, SHMP y ácido tánico. Esta diferencia explica la fuerza de unión de hierro y SHMP se ve influenciada por la presencia

de quitosano. La fuerza de unión se refiere a la biodisponibilidad del hierro, que puede controlarse ahora mediante el momento de introducción de quitosano en la mezcla de SHMP y hierro.

Con este fin, se ha mostrado la sensibilidad al pH y la temperatura de la partícula. También se ha mostrado el potencial de manipulación de la biodisponibilidad de hierro mediante el diseño cuidadoso del procedimiento de preparación de muestras. A partir de las mediciones de potencial ζ se dedujo que el SHMP está presente en la superficie de la partícula. Además, no hay ninguna imagen sobre la morfología interna de estas partículas. Para caracterizar adicionalmente estas partículas, se realizaron estudios de SLS en una muestra que contenía SHMP 0,6 mg/ml, Fe²⁺ 0,04 mg/ml y quitosano 0,05 mg/ml. Los resultados de la intensidad dispersada medida para diversos ángulos de dispersión y las concentraciones de partícula se muestran en la Figura 6. El radio de giro y el radio hidrodinámico resultantes se han determinado y su relación es 0,97, lo que indica que se ha formado una estructura vesicular. Además, el peso molecular promedio de la partícula es 4478 kDa, lo que dice, en promedio, que cada partícula está compuesta de aproximadamente 7000 moléculas de SHMP, 1500 moléculas de hierro y 120 moléculas de quitosano.

15

20

10

5

También se han realizado estudios de TEM para tener una vista directa de la morfología de estas partículas. Parece (imágenes no mostradas) que las partículas son esféricas con un núcleo hueco. Esto está en línea con la indicación de los estudios de SLS de que estas partículas son estructuras vesiculares. Se secaron las muestras de TEM sobre una rejilla de cobre, y se condensaron iones hierro y se asociaron alrededor de las partículas durante el secado, sin embargo la concentración de hierro dentro de la partícula no puede cambiar tras el secado (están protegidas por la bicapa vesicular). Como resultado, se ve que el "núcleo" de estas partículas tiene menos densidad en comparación con el entorno.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una micela central de coacervado complejo que contiene metal que comprende
- 5 del 80 al 99% en peso de un agente quelante cargado negativamente,
 - del 0,2 al 10% en peso de un catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular,
- del 0,5 al 10% en peso de un catión metálico, y agua, significando el % en peso el porcentaje en peso seco basado en el peso total de la micela central de coacervado complejo, y estando el tamaño medio de partícula medido mediante dispersión de luz dinámica entre 10 y 150 nm, y siendo el metal hierro en la forma Fe²⁺.
 - 2.- La micela central de coacervado complejo que contiene metal según la reivindicación 1, en la que el agente quelante cargado negativamente es hexametafosfato de sodio.
 - 3.- La micela central de coacervado complejo que contiene metal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular es quitosano con un grado de polimerización de entre 5 y 100.
- 4.- La micela central de coacervado complejo que contiene metal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular es quitosano con un grado de polimerización de entre 10 y 20.
- 5.- La micela central de coacervado complejo que contiene metal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que
 comprende además un agente aromatizante alimenticio y/o vitamina soluble en agua, o un agente aromatizante alimenticio y/o vitamina soluble en grasa en la envuelta de la micela.
 - 6.- La micela central de coacervado complejo que contiene metal según la reivindicación 1, que comprende
- del 85 al 99% en peso de hexametafosfato de sodio,
 - del 0,4 al 8% en peso de quitosano con un grado de polimerización de entre 10 y 20,
 - del 0,6 al 6% en peso de Fe²⁺,

15

35

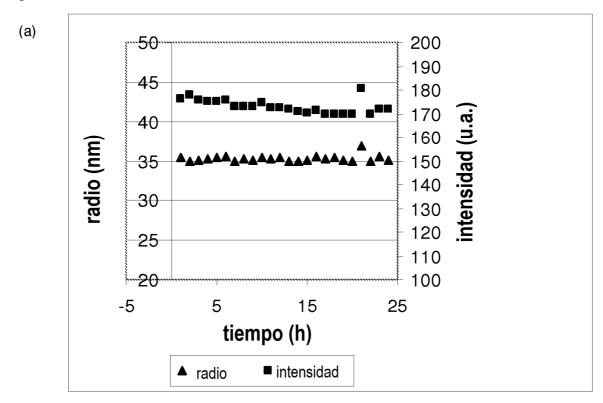
- del 0 al 10% en peso de un agente saborizante y/o vitamina soluble en agua o grasa,
- y agua, estando el hexametafosfato de sodio a una concentración comprendida entre 5 y 350 mg/ml, significando el % en peso el porcentaje en peso seco basado en el peso total de la micela central de coacervado complejo, y estando el tamaño medio de partícula medido mediante dispersión de luz dinámica entre 10 y 150 nm.
 - 7.- La micela central de coacervado complejo que contiene metal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el tamaño medio de partícula está entre 50 y 100 nm.
- 45 8.- Proceso para la fabricación de una micela central de coacervado complejo que contiene metal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas de:
 - i) preparar una disolución acuosa de un agente quelante cargado negativamente A),
- 50 ii) preparar una disolución acuosa de una sal de metal B),
 - iii) mezclar 100 partes de A) con 20 partes de B) a concentración equimolar, e incubar la mezcla resultante a temperatura ambiente, para producir la disolución de metal quelado resultante C),
- 55 iv) preparar una disolución acuosa de un catión polimérico de calidad para alimento natural de alto peso molecular en una disolución tampón de ácido cítrico a pH de entre 4 y 6, D),
 - v) añadir gota a gota la disolución de metal quelado D) a 880 partes de la disolución C) mientras se agita.
- 9.- Proceso según la reivindicación 8, en el que la disolución A) está a una concentración de entre 1 y 500 mM, la disolución B) está a una concentración de entre 1 y 500 mM, la incubación de la etapa iii) se realiza durante de 5 minutos a 5 días, y la disolución D) está a una concentración de entre 0,1 y 1 mg/ml.
- 10.- Proceso según la reivindicación 8 o 9, en el que el agente quelante cargado negativamente es hexametafosfato de sodio, la sal de metal es FeSO₄, y el catión polimérico de calidad para alimento natural de bajo peso molecular es quitosano con un grado de polimerización de entre 10 y 20.

- 11.- Proceso según la reivindicación 10, en el que las disoluciones de hexametafosfato de sodio y FeSO4 de las etapas i) y ii) están en cada caso a una concentración de 100 mM, y el quitosano de la etapa iv) está a una concentración de 0,6 mg/ml.
- 12.- Uso de micela central de coacervado complejo que contiene metal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para suplementar una bebida con de 1 a 60 mg de metal/litro.
- 13.- Uso según la reivindicación 12, en el que la bebida se selecciona de zumo, refresco no carbonatado, leche y
 zumo de fruta.
 - 14.- Una bebida que comprende una micela central de coacervado complejo que contiene metal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

15

5

Figura 1:



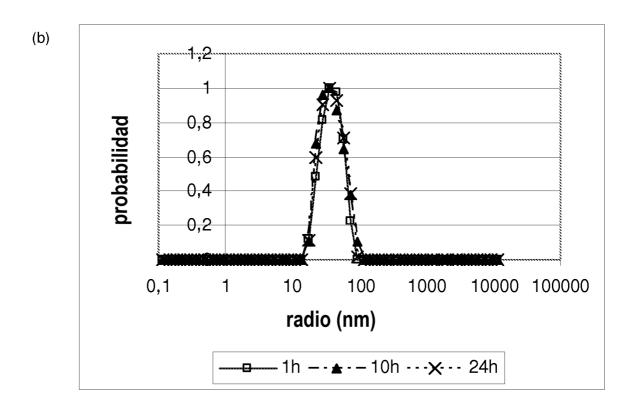
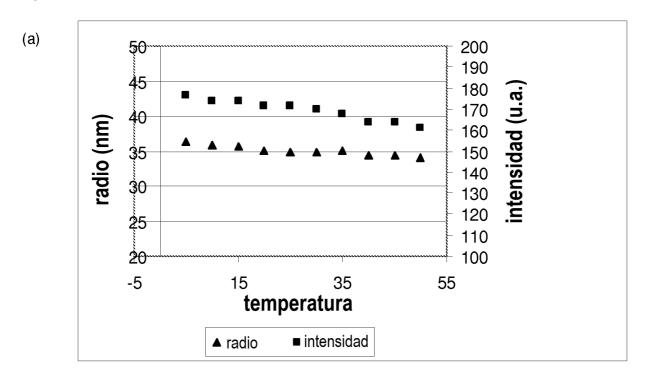


Figura 2:



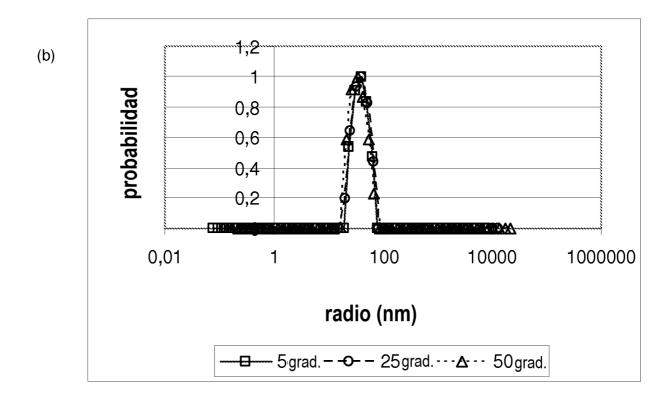
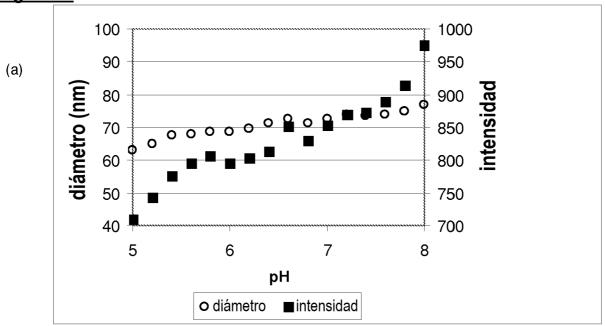


Figura 3:



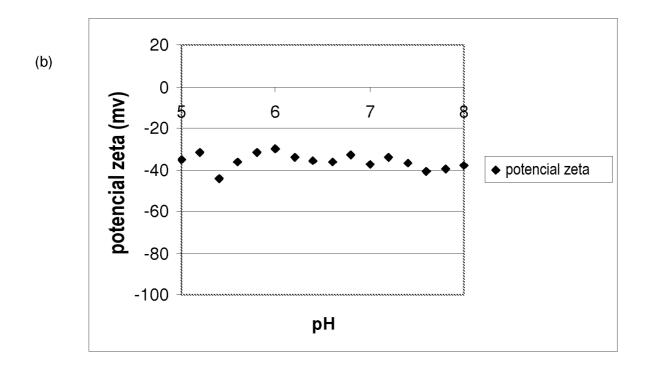
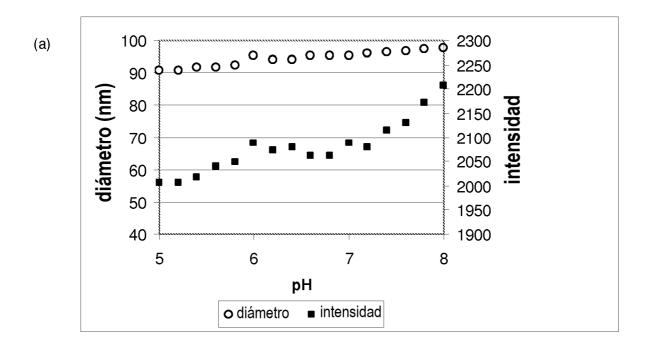


Figura 4:



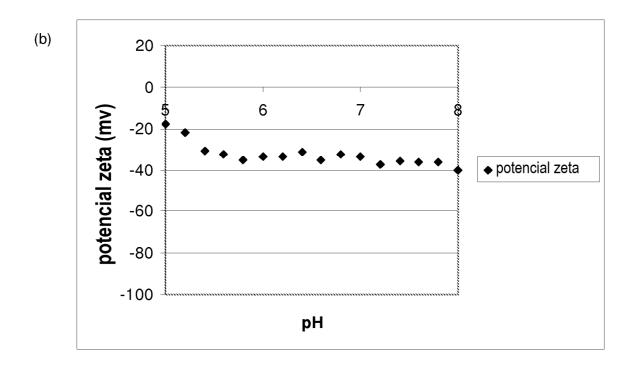


Figura 5:

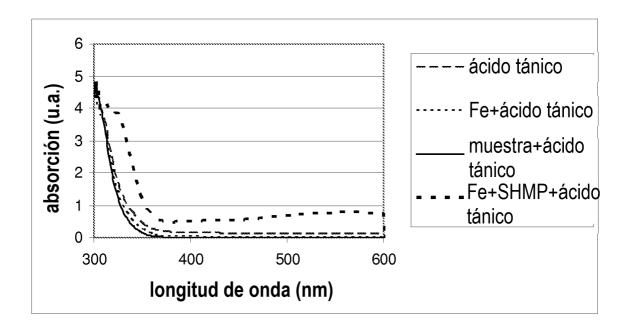


Figura 6:

