

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-038415- -00000-0000

Fecha: 2011-03-29 17:00:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 53



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

11-38415

54. TITULO

PRODUCTO FUENTE DE HIERRO EN FORMA DE CÁPSULAS

Y PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

AB-BIOTICS, S.A.

DOMICILIO

CERDANYOLA DEL VALLÈS, ESPAÑA

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C.

ped, s
08-09-2011



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-038415- -00000-0000

Fecha: 2011-03-29 17:00:13
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 53FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: AB-BIOTICS, S.A.

Dirección: Viver d'Empreses de la UAB, Parc
Tecnològic del Vallès, Masia Can Fatjó del Molí,
s/n (AB-Biotics), E-08290 Cerdanyola del
Vallès, España.

Nacionalidad o Domicilio: España.

Lugar de Constitución: España.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Calle 70 A #4-41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de
Propiedad Industrial, sírvase indicar el numero de radicación (del poder). _____

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: DRUDIS SOLÉ, Galí.

Dirección: C. Bertrán, 112, bxs 1ª, E-08023 Barcelona, España.

Nacionalidad o Domicilio: España.

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/063059

Fecha 07.10.2009

Publicación Internacional No. WO/2010/040789 A1

Fecha 15.04.2010

6 Título (54): PRODUCTO FUENTE DE HIERRO EN FORMA DE CÁPSULAS Y PROCEDIMIENTO
PARA SU PREPARACIÓN

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

EP

08.10.2008

08166052.4

US

13.11.2008

61/114,261

9 Comprobante de pago No. 11-13,146, 11-2741

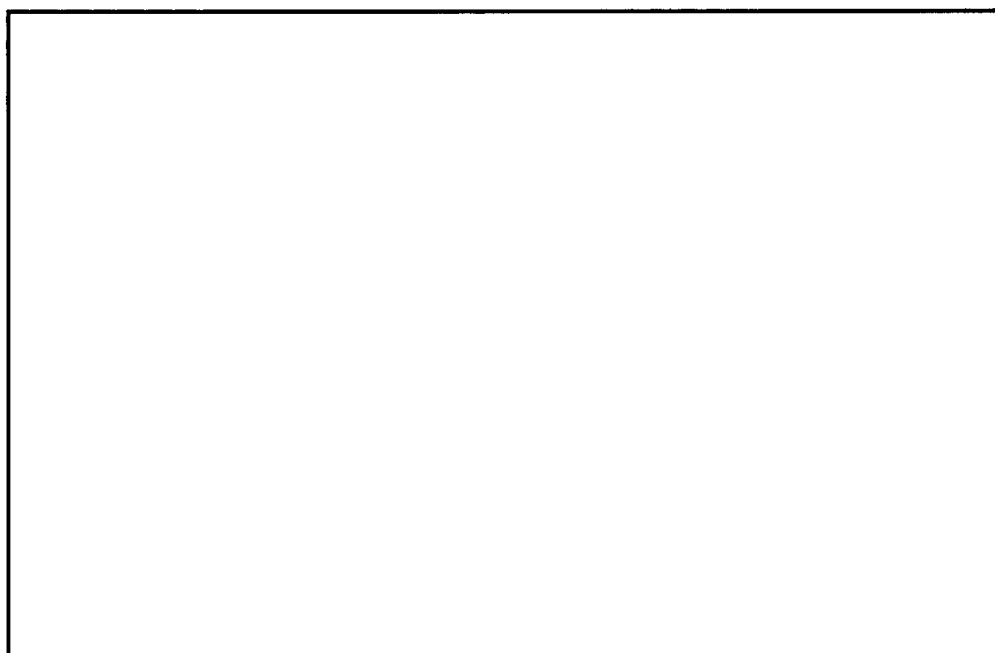
Fecha 28-03-2011

10

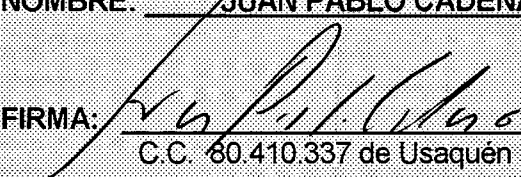
ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 571.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no esté inscrita en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☐ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Fotocopia autenticada.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional bajo el Art. 19.
- ☒ Otros: - Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 54.000 (2 *\$27.000).

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-038415- -00000-0000

Fecha: 2011-03-29 17:00:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 53

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 11 - 13,146
FECHA : FEBRERO 11 DE 2011

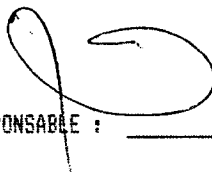
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	324973213	10/02/2011	58,580,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	571,000.00
		TOTAL :	\$ 571,000.00

SON: QUINIENTOS SETENTA Y UNO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

116.486

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 002741

Bogotá D.C., 13 de 2011 - 07:45:52

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391765861	12/01/2011	61.870.100.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	54.000.00	54.000.00
				\$54.000.00

=====

SON: **CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-038415- -00000-0000

Fecha: 2011-03-29 17:00:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 53

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Enero 13 de 2011 - 07:46:08

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

JANÉ, Montserrat
ZBM Patents, S.L.
Plaza Cataluña no. 1
E-08002 Barcelona
ESPAGNE

Date of mailing (day/month/year) 16 February 2011 (16.02.2011)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P1145PC00	
International application No. PCT/EP2009/063059	International filing date (day/month/year) 07 October 2009 (07.10.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address AB-BIOTICS PRODUCCIONES INDUSTRIALES DE MICROBIOTAS, S. L. Viver d'Empreses de la UAB Parc Tecnològic del Vallès Masia Can Fatjó del Molí, s/n (AB-Biotics) E-08290 Cerdanyola del Vallès Spain	State of Nationality ES	State of Residence ES
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address AB-BIOTICS, S.A. Viver d'Empreses de la UAB Parc Tecnològic del Vallès Masia Can Fatjó del Molí, s/n (AB-Biotics) E-08290 Cerdanyola del Vallès Spain	State of Nationality ES	State of Residence ES
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Rochaix Thomas e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
---	--

Facsimile No. +41 22 338 89 70

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 April 2010 (15.04.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/040789 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 9/50 (2006.01) A23L 1/304 (2006.01)
A23C 9/152 (2006.01) A61K 33/00 (2006.01)
A23L 1/00 (2006.01) A61P 7/06 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2009/063059

(22) International Filing Date:

7 October 2009 (07.10.2009)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

08166052.4 8 October 2008 (08.10.2008) EP
61/114,261 13 November 2008 (13.11.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **AB-BI-OTICS PRODUCCIONES INDUSTRIALES DE MICROBIOTAS, S. L.** [ES/ES]; Viver d'Empreses de la UAB, Parc Tecnològic del Vallès, Masia Can Fatjó del Molí, s/n (AB-Biotics), E-08290 Cerdanyola del Vallès (ES).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **DRUDIS SOLÉ, Galí** [ES/ES]; C. Bertrán, 112, bxs. 1ª, E-08023 Barcelona (ES).

(74) Agent: **JANÉ, Montserrat**; ZBM Patents, S.L., Plaza Cataluña no. 1, E-08002 Barcelona (ES).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

(54) Title: IRON SOURCE PRODUCT IN THE FORM OF CAPSULES AND PROCESS FOR THEIR PREPARATION

(57) Abstract: It is provided an iron-fortified food stuff comprising an iron source product in form of solid capsules, wherein the capsules comprise a core comprising iron alginate, and an outer layer comprising calcium alginate. The capsules are suitable both for fortifying hydrated and dehydrated food stuff and are characterized by an excellent loading capacity, as well as having a good stability under standard local conditions of storage and use. The iron-fortified food stuff of the invention serves to prevent the occurrence of iron deficiency or to reduce an iron deficiency in a human.

(19) Organización Mundial de Propiedad
Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
15 de abril de 2010 (15.04.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/040789 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 9/50 (2006.01) A23L 1/304 (2006.01)
A23C 9/152 (2006.01) A61K 33/00 (2006.01)
A23L 1/00 (2006.01) A61P 7/06 (2006.01)
- (21) Numero de Solicitud Internacional:
PCT/EP2009/063059
- (22) Fecha de Presentación Internacional:
07 de octubre de 2009 (07.10.2009)

CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (25) Lenguaje de entrega: Inglés
- (26) Lenguaje de Publicación: Inglés
- (30) Datos de la Prioridad:
08166052.4 08 de octubre 2008 (08.10.2008) EP
61/114,261 13 de noviembre 2008 (13.11.2008) US

- (84) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (71) Solicitante (para todos los Estados designados menos los Estados Unidos: AB-BIOTICS PRODUCCIONES INDUSTRIALES DE MICROBIOTAS, S.L. [ES/ES]; Viver d'Empreses de la UAB, Parc Tecnològic del Vallès, Masía Can Fatjó del Molí, s/n (AB-Biotics), E-08290 Cerdanyola del Vallès (ES)
- (72) Inventor; e
- (75) Inventores/Solicitante (solo para los Estados Unidos): DRUDIS SOLÉ, Galí [ES/ES]; C. Bertrán, 112, bxs 1ª, E-08023 Barcelona (ES).
- (74) Agente: JANÉ, Montserrat; ZBM Patents, S.L., Plaza Cataluña no. 1, E-08002 Barcelona (ES).
- (81) Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,

Declaraciones bajo la Regla 4.17:

- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que se le conceda una patente (Regla 4.17(ii).)

Publicado:

- con el informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes del vencimiento de la fecha limite para modificar las reivindicaciones y a ser publicada nuevamente en el evento de recibir las modificaciones (Regla 48.2(h)).

(54) Título: PRODUCTO FUENTE DE HIERRO EN FORMA DE CÁPSULAS Y PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN

(57) Resumen: Se proporciona un alimento fortificado con hierro que comprende una fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas, en donde las cápsulas comprenden un núcleo que comprende alginato de hierro, y una capa exterior que comprende alginato de calcio. Las cápsulas son adecuadas para fortificar tanto alimentos hidratados como deshidratados y se caracterizan por una excelente capacidad de carga, junto con una buena estabilidad bajo condiciones locales de almacenamiento y uso estándares. El alimento fortificado con hierro de la invención sirve para prevenir la aparición de deficiencia de hierro o para reducir una deficiencia de hierro en un humano.

PRODUCTO FUENTE DE HIERRO EN FORMA DE CÁPSULAS Y PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional U.S. No. 61/114,261, presentada el 13 de noviembre de 2008, y la solicitud de patente europea EP08166052.4, las cuales se incorporan aquí como referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un alimento fortificado con hierro y a su uso para prevenir la aparición de deficiencia de hierro o para reducir una deficiencia de hierro en humanos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La deficiencia de hierro es una de las enfermedades de deficiencia más frecuentes en países en desarrollo y es también la principal enfermedad de deficiencia en países industrializados. La fortificación con hierro de ciertos productos alimentarios es una manera de prevenir la aparición de la deficiencia de hierro. Sin embargo, para que los alimentos fortificados sean eficaces en la reducción de la deficiencia de hierro, el hierro añadido debe ser suficientemente biodisponible.

Para que un compuesto fortificante de hierro sea adecuado, debe satisfacer un número de requisitos. Primero, debe ser inocuo para los humanos. Además, debe ser insoluble en medio acuoso neutro o moderadamente ácido, lo cual es decisivo para que posea buenas propiedades de almacenamiento. Debe presentar también una alta absorción en el cuerpo humano, es decir, una buena biodisponibilidad (lo cual significa una buena solubilidad en el tracto gastrointestinal). También debe tener una buena estabilidad y ser químicamente definible y se debe poder producir de un modo reproducible, es decir, debe tener garantizadas unas propiedades constantes y controlables.

La biodisponibilidad del hierro es función de su forma química, de la cual depende su solubilidad, y de la presencia de ciertos componentes de los alimentos que facilitan o inhiben su absorción. La biodisponibilidad está muy vinculada a los cambios sensoriales. Las fuentes de hierro libremente solubles en agua, como el

sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso, y citrato férrico de amonio, presentan una biodisponibilidad relativamente alta, no obstante, presentan la desventaja de causar decoloración y cambios en el sabor de los productos fortificados al reaccionar con otros componentes del alimento. El fumarato ferroso, succinato ferroso y sacarato férrico se disuelven lentamente en agua pero son fácilmente solubles en ácidos diluidos como el jugo gástrico. Aunque estos compuestos pueden parecer mejores que el sulfato ferroso respecto a su efecto en la oxidación de grasas o decoloración, su interacción con la comida puede reducir la absorción del hierro. La falta de interacción con los alimentos durante el almacenamiento de las fuentes de hierro muy poco solubles, como el pirofosfato férrico, ortofosfato férrico y hierro elemental, las convierte en fortificantes atractivos desde un punto de vista comercial, y muchos cereales para niños contienen actualmente dichas formas de hierro. Sin embargo, la biodisponibilidad de estas fuentes de hierro es siempre baja.

Por lo tanto, los compuestos de hierro comúnmente usados a nivel comercial parecen ser o suficientemente solubles en agua para causar problemas técnicos o tan difíciles de disolver que su absorción en el cuerpo humano es baja.

Se han realizado varios intentos para proporcionar una fuente estable de hierro biodisponible para fortificar alimentos encapsulándola con un compuesto inerte para protegerlo de la oxidación y minimizar su efecto organoléptico. Sin embargo, la encapsulación de varias sales de hierro con aceite de soya hidrogenado, monoglicéridos, diglicéridos o celulosa de etilo, ha resultado no ser adecuada para la fortificación de ciertos alimentos, aunque estos compuestos proporcionan cierta protección a la sal de hierro (cf. 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, pp. 1274).

EP-A-1694312 describe partículas de sulfato ferroso monohidratado recubiertas con una capa de alginato sódico. Para obtener las partículas, se pulveriza una solución de alginato sódico sobre la superficie de partículas de sulfato ferroso en agitación. Una capa fina de la solución de alginato se deposita en las partículas, favoreciendo de este modo la formación de una película de alginato de hierro cubriendo el núcleo de sulfato ferroso sin modificar. Cuando las partículas están en contacto con agua se disuelven lentamente, liberando el sulfato ferroso al medio. Por consiguiente, estas partículas pueden ser incorporadas a alimentos deshidratados, como la harina de trigo y otros cereales, pero no son adecuadas

para fortificar alimentos que contengan agua, como yogures o zumos.

Además, se ha demostrado la efectividad de ciertos agentes quelantes para incrementar la biodisponibilidad de sales férricas y ferrosas. La combinación de hierro y sal sódica de EDTA se considera un fortificante de hierro prometedor. El enlace de EDTA con hierro se encuentra favorecido en el entorno ácido del estómago, pero en el duodeno, cuyo medio es más alcalino, el hierro es intercambiado, en parte, con otros metales. En algunos estudios basados en experimentos con animales y humanos ha sido propuesto que el hierro se disocia del complejo con EDTA en el lumen intestinal antes de ser absorbido, por lo que puede ser transportado por el transportador de metales transcelular DMT-1. Se ha descrito también como la combinación de hierro con EDTA lo protege de los efectos de diversos inhibidores de absorción del hierro, como fitatos o polifenoles. Su potencial como fortificantes de hierro ha sido confirmado en cinco ensayos de fortificación de gran extensión 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, como el ácido tartárico, ácido málico, ácido succínico, y ácido fumárico, han mostrado incrementar la biodisponibilidad de compuestos de hierro 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, p. 6233). El mecanismo de acción propuesto es análogo al del EDTA. El agente quelante se enlaza al catión de hierro, Fe(II) o Fe(III), y lo protege de la precipitación a pH básico o de cualquier otro compuesto que pueda atrapar y precipitar al hierro. De este modo, el hierro en su forma soluble puede difundir hasta los enterocitos, donde puede ser absorbido.

Aunque ya se conocen varias fuentes de hierro para fortificar alimentos, continua habiendo la necesidad de encontrar un agente fortificante de hierro que pueda ser usado en alimentos hidratados, que tenga una buena fuerza mecánica, que posea una alta biodisponibilidad en humanos y que asegure una buena estabilidad del producto fortificado durante su almacenamiento.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado un producto fuente de hierro biodisponible con propiedades físicas mejoradas, el cual no es soluble en agua ni en medios ácidos débiles, de manera que cuando es añadido a un alimento, el alimento fortificado

resultante no sufre cambios de color ni se vuelve rancio, incluso si el alimento posee un alto contenido en agua. Al mismo tiempo, el nuevo producto fuente de hierro es suficientemente soluble al pH del estómago (el cual puede llegar a bajar incluso hasta 1 en un estómago vacío), por lo que se tiene una buena biodisponibilidad. Este producto fuente de hierro es fácil de manipular, tiene una buena fuerza mecánica, y es consistentemente reproducible.

De este modo, según un aspecto de la presente invención, se proporciona un alimento fortificado con hierro que comprende un producto de fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas, donde las cápsulas comprenden un núcleo que comprende alginato de hierro y una capa exterior que comprende alginato de calcio.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un alimento fortificado de hierro como se ha definido arriba para prevenir la aparición de deficiencia de hierro o para reducir una deficiencia de hierro en un humano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los términos “biodisponibilidad” y “biodisponible” se refieren al grado en el cual un nutriente o micronutriente puede ser absorbido y utilizado por el cuerpo. Para los propósitos de la invención, la sal de hierro utilizada para preparar el producto fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas usadas en el alimento fortificado 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” usados aquí, se refieren a cualquier sal de hierro que sea libremente soluble en agua, como el sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso y citrato férrico de amonio, así como también a cualquier sal de hierro que se disuelva lentamente en agua pero fácilmente en ácidos diluidos, como el fumarato ferroso, succinato ferroso y sacarato férrico.

Las sales de alginato solubles en agua, como el alginato sódico, potásico, magnésico o amónico, son polisacáridos lineales naturales que provienen de algas marinas marrones. Están compuestos de dos tipos de monómeros, residuos de ácidos beta-D-manurónico (M) y alfa-L-gulurónico (G), que se agrupan en forma de bloques no regulares a lo largo de la cadena. El biopolímero que tiene grupos carboxílicos es capaz de formar complejos con iones metálicos polivalentes.

Cuando una sal de hierro soluble en agua entra en contacto con una sal de alginato soluble en agua, se produce una reacción entre los grupos carboxílicos del alginato y los cationes de hierro, dando lugar a una gelación iónica.

Se ha encontrado que cuando un núcleo que comprende alginato de hierro se pone en contacto con una solución acuosa de una sal de calcio, se forma una cápsula (formada por el núcleo recubierto con una capa exterior que comprende alginato de calcio) por 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 medio a la vez que incrementa la fuerza mecánica de las cápsulas. Este producto fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas es adecuado para fortificar alimentos hidratados.

Generalmente hablando, el alimento que va a ser fortificado con el producto fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas mencionado arriba es comida o bebida, particularmente comida o bebida sensible a la oxidación, al desarrollo de sabores desagradables o a la decoloración en presencia de hierro libre. Particularmente, el producto fuente de hierro libre puede ser usado para fortificar alimentos hidratados, tales como yogures, leche, caldos, salsas, zumos, y otras bebidas, así como también alimentos fortificados comúnmente, como productos en polvo, harina de trigo y otros cereales y alimentos preparados a partir de ellos, tales como pan, pasta y pasteles. Las emulsiones de carne, como las salchichas, son ejemplos adicionales de alimentos adecuados para ser fortificados de acuerdo con la presente invención.

Cuando se forma el núcleo, si la cantidad de sal de hierro es más alta que la necesaria para reaccionar con todos los monómeros de sal de alginato, la sal de hierro queda atrapada en el gel formado. Por el contrario, si la cantidad de sal de alginato soluble en agua es más alta que 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 al menos una sal de hierro biodisponible. En otra realización del mismo aspecto de la invención, el núcleo comprende al menos una sal de alginato soluble en agua, como el alginato sódico, potásico, magnésico o amónico. Preferiblemente, la sal de alginato soluble en agua es alginato sódico.

Las sales de hierro solubles en agua mejoran la biodisponibilidad del hierro y son por tanto preferidas. De este modo, preferiblemente, la sal de hierro biodisponible es una sal de hierro libremente soluble en agua, como el sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso y citrato férrico de amonio, o una sal de hierro que se disuelva lentamente en agua pero fácilmente en ácidos diluidos, como el fumarato ferroso, succinato ferroso y sacarato férrico. Preferiblemente, la sal de hierro biodisponible seleccionada es el sulfato ferroso o el sacarato férrico. Más preferiblemente, la sal de hierro biodisponible es sacarato férrico.

Además, como se menciona anteriormente, los agentes quelantes han mostrado su efectividad para incrementar 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 es seleccionado de un grupo consistente en ácido tartárico, ácido málico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido láctico y ácido 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 de acuerdo con la presente invención mejora la biodisponibilidad del hierro, mientras que es capaz de mantenerlo aislado del medio fuera del tracto gastrointestinal, evitando la degradación de la matriz que contiene el hierro y el mal gusto asociado con las sales de hierro usadas en la fortificación de alimentos. Como se menciona arriba, el sacarato férrico está incluido dentro de las sales de hierro solubles en agua usadas en la presente invención, aunque estrictamente hablando es un complejo de hidróxido de hierro (III) con sacarosa. El uso del sacarato férrico como sal de hierro incorpora las ventajas del agente quelante por la presencia de la sacarosa.

El producto de fuente de hierro mencionado se fabrica por el siguiente procedimiento que comprende los pasos 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 solución acuosa de una sal de calcio de una concentración comprendida entre 0.025M y una concentración por debajo del 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. También, preferiblemente, la al menos una sal de

alginato usada para formar el núcleo es alginato sódico.

El núcleo usado para obtener la cápsula puede formarse depositando al menos una sal de alginato soluble en agua en la superficie de partículas de al menos una sal de hierro. Cualquier operación que permita la deposición de una película de alginato en las partículas de sal de hierro puede ser utilizada. Preferiblemente, es llevado a cabo pulverizando la solución de sal de alginato a través de una boquilla pulverizadora sobre las partículas de sal de hierro, manteniéndolas en constante agitación en un equipo convencional para la agitación de sólidos. Equipos de agitación indicados para esta operación podrían ser de placas inclinadas o de tambor, los cuales pueden o no poseer veletas de agitación auxiliares de lecho fluidizado, la temperatura de los cuales esté controlada, donde las partículas se mantienen en movimiento hacia arriba y hacia abajo por una corriente de aire que permea a través del lecho de partículas.

El producto fuente de hierro se prepara preferiblemente (i) formando el núcleo mediante disolución o suspensión de al menos una sal de hierro biodisponible en una solución acuosa de al menos una sal de alginato soluble en agua para obtener un gel, (ii) añadiendo lentamente el gel obtenido sobre una solución acuosa de una sal de calcio de una concentración comprendida entre 0.025M y una concentración por debajo del punto de saturación de la solución, bajo vigorosa agitación, y (iii) filtrando y lavando con agua las cápsulas sólidas obtenidas.

Cuando el núcleo interior que comprende el alginato de hierro es formado disolviendo o suspendiendo al menos una sal de hierro en una solución acuosa de al menos una sal de alginato, se produce la reticulación del alginato con los cationes de hierro por todo el núcleo, lo que hace que el núcleo en sí mismo sea menos soluble en agua y que tenga una fuerza mecánica más alta. Para formar el núcleo, es necesaria una concentración de alginato de sodio por encima de 0.6%(p/p) (o la concentración equivalente cuando se usa otra sal de alginato soluble en agua). De este modo, preferiblemente la al menos una sal de alginato es alginato sódico y su concentración en la solución acuosa es al menos 0.6%(p/p). Concentraciones más bajas conducirían a soluciones viscosas, pero no a la formación de cápsulas sólidas. El límite superior para la concentración de sal de alginato usada es fijado por su solubilidad en agua y la viscosidad de la solución de alginato resultante.

La concentración de la sal de hierro usada en la fabricación del núcleo puede ser

elegida a voluntad. Concentraciones más bajas de hierro comportarán cápsulas pobres en hierro, mientras que concentraciones más altas comportarán cápsulas con un alto contenido de hierro. El límite superior para la concentración de la sal de hierro usada viene fijado por su solubilidad en agua. Se lograron resultados completamente satisfactorios utilizando tanto sales férricas como ferrosas, en rangos de concentración de hasta 1M. La mezcla de la sal de hierro con la solución acuosa de alginato es llevada a cabo bajo vigorosa agitación para evitar que la mezcla resultante sea muy viscosa o que se forme algún precipitado.

Cuando, posteriormente, la mezcla en forma de gel de la sal de hierro y alginato es lentamente añadida sobre una solución que comprende la sal de calcio, se forma el núcleo con la capa externa de alginato cálcico, obteniéndose cápsulas con una fuerza mecánica particularmente buena. Para formar las cápsulas es necesaria una concentración mínima de calcio por encima de 0.025M. La concentración máxima no es crítica, mientras esté por debajo del punto de saturación de la solución. Cualquier persona experta en la materia entenderá fácilmente que el punto de saturación de la solución, es decir el punto de máxima concentración, depende tanto de la temperatura del líquido como de la naturaleza química de las sustancias implicadas.

La concentración de calcio durante la preparación puede ser usada para ajustar la concentración final de calcio en las cápsulas. Mientras se añade el núcleo de la cápsula de hierro/alginato sobre la solución de la sal de calcio, se puede utilizar algún equipo de trituración para reducir el tamaño de las cápsulas. En los ejemplos posteriores se utilizó un homogenizador de escala laboratorio para convertir las cápsulas sólidas en una pasta arenosa.

Finalmente, las cápsulas obtenidas se filtran y se lavan rigurosamente con agua para eliminar cualquier catión metálico libre en solución.

El producto fuente de hierro definido arriba debe tener un tamaño de partícula suficientemente pequeño para que pueda mezclarse con facilidad y no causar segregación del mismo cuando se añade al alimento que se desea fortificar, y también para que tenga el menor impacto organoléptico en el alimento fortificado final. Por consiguiente, el tamaño de partícula preferido de las cápsulas de la presente invención dependerá del alimento que se desea fortificar.

El procedimiento para la preparación del producto fuente de hierro usado para

fortificar alimentos hidratados permite controlar el tamaño de partícula de las cápsulas obtenidas gracias al equipo de trituración utilizado (cuanto más fino es el equipo, más finas las cápsulas). Durante el procedimiento de fabricación se pueden formar agregados macroscópicos de las cápsulas, cuyos tamaños oscilan entre 0.1 y 1 mm, aunque también se obtienen entidades mucho más pequeñas correspondientes a agregados de un reducido número de cápsulas, o cápsulas aisladas. Así, adicionalmente, se puede llevar a cabo una clasificación de las cápsulas mediante la exploración del producto acabado para poder eliminar las más gruesas. El procedimiento de fabricación de las cápsulas permite producir un polvo muy fino con cápsulas apenas visibles. Preferiblemente, el tamaño medio de las partículas del producto fuente de hierro, que puede estar en forma de cápsulas o de pequeños agregados de las cápsulas, está comprendido entre 5 y 20 μm , aunque se pueden formar cápsulas incluso más pequeñas.

Las cápsulas que definen el producto fuente de hierro usadas para fortificar alimentos hidratados están caracterizadas por una excelente capacidad de carga. Además, tienen una buena estabilidad bajo condiciones locales de almacenamiento y uso estándares. Por lo tanto, afectan a la apariencia, gusto y conservación del alimento fortificado de un modo insignificante. Adicionalmente, se ha demostrado que las cápsulas son inocuas para el cuerpo humano, es decir no son tóxicas administradas oralmente, y su citotoxicidad es incluso más pequeña que la sal de hierro que contienen. Por lo tanto estas cápsulas son adecuadas para la fortificación de alimentos, ya que son estables durante un largo período de tiempo en la matriz del 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 solubilizándolas en primer lugar y a continuación sometiendo la solución a técnicas de espectroscopia atómica para su cuantificación. El alto contenido de hierro en las cápsulas permite una fortificación del alimento tal que asegura la absorción deseada del hierro por el organismo incluso añadiendo pequeñas cantidades del producto fortificante.

El producto fuente de hierro usada para fortificar alimentos puede ser añadida como un agente fortificante de hierro tanto para alimentos deshidratados, tales como harina de trigo y otros cereales y alimentos derivados de los mismos (como pan, pasta y pasteles), como también para alimentos hidratados, tales como yogur, leche, caldos, salsas, zumos y otras bebidas.

La fuerza mecánica particularmente buena de las cápsulas, junto con su insolubilidad en agua o ácidos débiles, hace que el producto fuente de hierro sea particularmente adecuado para fortificar alimentos sometidos a procedimientos de fabricación agresivos y/o a condiciones agresivas de los propios alimentos, tales como un alto contenido en agua o un entorno ácido, como sería el caso de la fortificación de yogur.

La posible incorporación de las cápsulas a un alimento portador fue probada utilizando yogur. El yogur está bien aceptado por la mayoría de grupos de población con elevada propensión a la deficiencia de hierro. Por lo tanto, la fortificación de yogures sería una manera excelente de combatir la anemia por deficiencia de hierro. Las condiciones adversas que las cápsulas encuentran en un yogur sirven de indicativo de su capacidad de proteger el entorno de la presencia de una fuente de hierro soluble. Uno de los problemas encontrados en alimentos ricos en grasas fortificados con una alta concentración de hierro es la oxidación de las grasas y el desarrollo de un gusto rancio. Esto no sólo disminuye la aceptación del alimento por parte del consumidor, sino que también reduce su valor nutricional.

Como se describe en los ejemplos siguientes, se preparó un yogur fortificado usando la fuente de hierro en forma de cápsulas de la presente invención. Las cápsulas de hierro se añadieron a la leche, y seguidamente, se llevó a cabo la pasteurización, homogenización y fermentación incorporando un cultivo fermentador. Los resultados de los experimentos llevados a cabo mostraron que las cápsulas eran capaces de superar las dificultades encontradas en la fortificación de yogur (tanto en el procedimiento de fabricación como por las propiedades del portador en sí mismo), ya que el producto final fue tanto visualmente (ni cambios relevantes de color ni de apariencia) como organolépticamente (ni gusto rancio ni metálico apreciable) comparable a un yogur sin fortificar. Adicionalmente, se ha demostrado que el yogur fortificado obtenido, que comprende el producto fuente de hierro de la presente invención, tiene una buena estabilidad durante su almacenamiento. Por tanto, matrices alimentarias más suaves plantearían un desafío más fácil.

Por consiguiente, en una realización preferida, el alimento fortificado con hierro de acuerdo a la invención es yogur.

En otra realización preferida, el alimento fortificado con hierro de acuerdo a la invención es leche.

En otra realización preferida, el alimento fortificado con hierro de acuerdo a la invención es una bebida.

En otra realización preferida, el alimento fortificado con hierro de acuerdo a la invención es una emulsión de carne.

En una más preferida realización, el alimento fortificado con hierro de acuerdo a la invención es una salchicha.

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

Los rangos dados de temperaturas, tiempos, tamaños y similares, deberían considerarse aproximados, a no ser que se indiquen específicamente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GRÁFICOS

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

Fig. 2 muestra la evolución de la ingesta de comida en gramos por día y jaula para el grupo del blanco (B) y el grupo que tomaba cápsulas (C).

Fig. 3 muestra la evolución de la ingesta de agua por día y jaula para el grupo del blanco (B) y el grupo que tomaba cápsulas (C).

Fig. 4 muestra el porcentaje de liberación del hierro (% Fe) en cuatro condiciones de almacenamiento diferentes, donde RT= temperatura ambiente de almacenamiento, 37C=almacenamiento a 37°C, w= almacenamiento en solución acuosa, d= almacenamiento sin solvente. El eje de abscisas representa el tiempo en meses.

Fig. 5 muestra el porcentaje de calcio (%Ca) en las cuatro condiciones de almacenamiento mencionadas anteriormente. El eje de abscisas representa el

tiempo en meses.

Fig.6 muestra la proporción de cationes metálicos liberados al medio (%Fe/%Ca) después de medio mes y un mes en las cuatro condiciones de almacenamiento mencionadas anteriormente.

Fig. 7 Representación esquemática de la liberación de metales de la región cercana a la superficie de: (A) las cápsulas con un núcleo interno conteniendo alginato de hierro, y una capa externa conteniendo alginato de calcio (representado por el área discontinua), y (B) una partícula en la cual ambos metales están distribuidos homogéneamente en la matriz de alginato.

Fig. 8 muestra los períodos de amamantamiento, inducción de la anemia y recuperación de la anemia a los que fueron sometidos los animales en el estudio *in vivo* de biodisponibilidad.

Fig. 9 muestra el incremento de peso durante el período de recuperación de la anemia. El eje de las abscisas representa el tiempo en días y el eje de las ordenadas el peso en gramos. Grupos: M= macho, F= hembra, - = control negativo, + = control positivo, c = cápsulas

Objetos adicionales, ventajas y nuevas características de la invención se indicarán en parte en la descripción y en parte resultarán evidentes para aquellos expertos en la materia al examinar la descripción, o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y gráficos se proporcionan a modo ilustrativo, pero no pretenden limitar la presente invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1- Procedimiento de preparación de cápsulas Fe/Ca

En una solución de 1.5g de alginato sódico en 100 mL de agua se disolvieron 7.98 g de sacarato férrico (aproximadamente 35% Fe). Se utilizó un embudo de extracción para añadir gota a gota la mezcla de alginato sódico/sacarato férrico sobre 300 mL de una solución acuosa 0.5M de CaCl_2 . Durante la adición gota a gota, se agitó la suspensión de cápsulas formada mediante un homogenizador de laboratorio (Diax 900, Heidolph Instruments GmbH). Las cápsulas sólidas obtenidas fueron separadas por filtración al vacío, resuspendidas en agua

destilada para eliminar cualquier sal soluble y filtradas de nuevo al vacío, tres veces consecutivas. Se obtuvieron 30g de cápsulas húmedas (Cápsula 0).

El mismo procedimiento fue llevado a cabo utilizando cloruro férrico o sulfato ferroso heptahidratado como sal de hierro, en lugar del sacarato férrico. Las siguientes cápsulas se prepararon exitosamente utilizando una de las tres sales de hierro mencionadas anteriormente y 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) 1M, CaCl_2 0.1M, alginato de sodio 1.5%

Cápsula 2: Sacarato férrico (35% de hierro) 1M, CaCl_2 0.1M, alginato de sodio 3.0%

Cápsula 3: Sacarato férrico (35% de hierro) 1M, CaCl_2 1M, alginato de sodio 1.5%

Cápsula 4: Sacarato férrico (35% de hierro) 1M, CaCl_2 1M, alginato de sodio 3.0%

Cápsula 5: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M, CaCl_2 0.1M, alginato de sodio 1.5%

Cápsula 6: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M, CaCl_2 0.1M, alginato de sodio 3.0%

Cápsula 7: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M, CaCl_2 1M, alginato de sodio 1.5%

Cápsula 8: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M, CaCl_2 1M, alginato de sodio 3.0%

Cápsula 9: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1M, CaCl_2 0.1M, alginato de sodio 1.5%

Cápsula 10: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1M, CaCl_2 0.1M, alginato de sodio 3.0%

Cápsula 11: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1M, CaCl_2 1M, alginato de sodio 1.5%

Cápsula 12: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1M, CaCl_2 1M, alginato de sodio 3.0%

Cápsula 13: FeCl_3 0.1M, CaCl_2 0.1M, alginato de sodio 1.5%

Cápsula 14: FeCl_3 0.1M, CaCl_2 1M, alginato de sodio 1.5%

Las cápsulas obtenidas presentaron diferentes colores dependiendo de la sal de hierro empleada. La baja liberación de los cationes de las cápsulas las hizo insípidas y les permitió ser suspendidas en agua.

EJEMPLO 2. Tamaño de partícula de la fuente de hierro

Para estimar el tamaño de las cápsulas preparadas en el Ejemplo 1 (Cápsulas 1-14) se utilizó un microscopio óptico calibrado para medir longitudes. En todos los casos los agregados macroscópicos de las cápsulas eran claramente visibles incluso a simple vista, y más claramente usando el microscopio. Aunque estos agregados tenían tamaños del orden de 0.1-1mm se pudieron observar entidades

mucho más pequeñas, probablemente agregados de un reducido número de cápsulas o cápsulas aisladas.

Se colocó una pequeña, apenas visible, porción de muestra de cápsulas en un portaobjetos de microscopio etiquetado. Se añadió una gota de agua en las cápsulas. La suspensión se agitó suavemente con la ayuda de un cuchillo metálico, y una tapa de cristal fue colocada encima de cada portaobjetos. Se observó cada muestra utilizando un microscopio óptico (Nikon Eclipse E800, Nikon Corp., Tokio, Japan) con un objetivo de 20x y un ocular de 10x. Se seleccionó de cada muestra una región donde se pudieran observar cápsulas individuales o los grupos de cápsulas más pequeños posibles. Esta región se fotografió utilizando una cámara digital (Soft Imaging Systems, Colorview II) conectada a un PC el cual a su vez estaba ejecutando un analizador de imágenes (analySIS3.0, SoftImaging System Corp., Lakewood Co.). Se superpuso en cada imagen una escala calibrada como referencia de tamaño.

Las imágenes registradas mostraron que el tamaño de las cápsulas y de algunos de los agregados más pequeños normalmente era alrededor de 20 μm , llegando a ser en algunos casos menos de 5 μm . También se pudieron obtener cápsulas más grandes utilizando un equipo de trituración más grueso, aunque usualmente se prefieren cápsulas más finas para la fortificación de alimentos.

EJEMPLO 3. Caracterización de las cápsulas

Se digirieron 0.3 g de cápsulas húmedas en ácido nítrico concentrado en un horno microondas. La concentración de hierro y calcio fue determinada utilizando un ICP-OES (espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente).

La cantidad de hierro y calcio en las cápsulas fue prácticamente independiente del lote de cápsulas analizado. Se prepararon dos lotes de cápsulas siguiendo el Ejemplo 1 (Cápsula 0). La Tabla 1 muestra las concentraciones de hierro y calcio expresadas como porcentaje en peso ($\pm$ desviación estándar) en los dos lotes

Tabla 1

	Lote 1	Lote 2
% Fe	8.6 (± 0.49)	7.93 (± 0.071)
% Ca	0.84 (± 0.021)	1.23 (± 0.0074)

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

EJEMPLO 4. Citotoxicidad de las cápsulas

Para comprobar la ausencia de toxicidad de las cápsulas de la invención conteniendo una sal de hierro se realizó un ensayo *in vitro*. El ensayo implicaba incubar células de la línea HELA con las sustancias para las cuales la citotoxicidad iba a ser estudiada, siendo este tipo de ensayo muy común para comprobar la toxicidad. Los compuestos estudiados incluyeron las cápsulas, junto con sus componentes separadamente: la sal de hierro utilizada en las cápsulas (sacarato férrico), y alginato sódico. Se preparó también un control negativo, el cual sólo contenía medio de cultivo para células HELA, y se utilizó como referencia del crecimiento.

Todos los medios del ensayo fueron preparados bajo 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). Utilizando material estéril, se disolvieron separadamente 72 mg de cápsulas (medio de cápsulas), 17 mg de sacarato férrico (medio de sal de hierro) y 18 mg de alginato sódico (medio de alginato) en 50 mL de medio de cultivo para HELA. Las cápsulas eran insolubles y permanecieron como una suspensión. Se prepararon diluciones 1:1, 1:10 y 1:100 de cada uno de los medios de ensayo diluyendo las siguientes cantidades de medio de cápsulas, de sal de hierro o de alginato con medio de cultivo fresco para HELA:

1:1 20 µL+0 µL medio fresco para HELA

1:10 2 µL +18 µL medio fresco para HELA

1:100 0.2 µL +19.8 µL medio fresco para HELA

Las soluciones 1:1 de cápsulas y de sal de hierro tenían casi la misma concentración de hierro (0.285 mg hierro/ml y 0.297 mg hierro/ml respectivamente). Lo mismo es válido para sus diluciones 1:10 y 1:100.

Se cultivaron 3500 células HELA en 36 pocillos de dos placas de 96 pocillos: 9 pocillos control y 27 para 3 concentraciones de 3 productos por triplicado. Se añadió medio de cultivo a cada pocillo hasta un volumen de 100 µL. Las células se incubaron a 37°C durante 24h. Se añadieron a cada pocillo 20 µL de medio de

ensayo y 80 µL de medio de cultivo fresco. Una de las placas fue incubada durante 24h y la otra durante 72h. La viabilidad de las células se midió después de 24 y 72h de incubación usando el ensayo de proliferación de células no radioactivo EZ4U y ensayo de citotoxicidad (Biomedica Medizinproducte GmbH).

Los resultados se expresaron como porcentaje de crecimiento respecto a los controles, es decir como el porcentaje de viabilidad, el cual se calcula como el número de células vivas en cualquiera de los medios de ensayo (cápsulas, sacarato férrico o alginato sódico) dividido por el número de células vivas en el control negativo, y expresado como porcentaje. Los resultados, mostrados en la siguiente Tabla 2, revelan que la citotoxicidad del hierro encapsulado es más pequeña que la del hierro libre. Teniendo en cuenta que el sacarato férrico es un aditivo alimentario seguro, también lo es su forma encapsulada. Tampoco se observó toxicidad para el alginato sódico.

Tabla 2

%Viabilidad 24h			
	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 sódico	87.9% ± 6.6	85.8% ± 6.6	79.9% ± 1.7
%Viabilidad 72h			
	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 sódico	74.2% ± 6.7	91.7% ± 16.4	80.2% ± 14.7

EJEMPLO 5. Toxicidad aguda de las cápsulas

Se realizó un ensayo *in vivo* para determinar la ausencia de toxicidad en ratas utilizando una dosis 100 veces superior a la esperada en humanos. La dosis de referencia en humanos fue tomada como dos terceras partes de la CDR (Cantidad Diaria Recomendada) para una persona de 70 Kg (0.14 mg Fe/Kg de peso corporal). Por tanto, se utilizó una dosis de 14 mg Fe/kg de peso corporal para el estudio de toxicidad aguda en ratas.

Las cápsulas de hierro utilizadas en este ensayo fueron producidas como en el Ejemplo 1 (Cápsula 0; lote 2 del Ejemplo 3). Las cápsulas fueron fabricadas en

condiciones estériles para evitar su contaminación por microorganismos patógenos, ya que las cápsulas debían ser ingeridas por animales vivos.

Los animales que fueron utilizados están descritos a continuación:

- Especie y raza: Rata, Sprage–Dawley (SD), cepa Crl:CD, proporcionadas por Charles River Laboratories, France.
- Número y tipo de animales: 12 ratas hembras nulíparas y no gestantes.
- Edad (cuando se trataron): 2 semanas.
- Peso (cuando se trataron): 172–193 g.
- Criterios de inclusión: $\pm 20\%$ del peso medio al principio del estudio.
- Grupos: Los animales fueron distribuidos en dos grupos (control y ensayo) basados en una distribución uniforme de pesos en los dos grupos.

La planificación temporal del estudio fue la siguiente:

- Día -5: Las ratas entran en las instalaciones. Empieza la cuarentena en la sala de cuarentena.
- Día -3: Final de la cuarentena. El período de aclimatación empieza en la sala definitiva.
- Día 0: Administración de las soluciones de control y de ensayo. Empieza el estudio.
- Día 14: Final del estudio. Eutanasia utilizando pentobarbital y necropsia.

Las ratas pasaron dos días en la sala de cuarentena, y tres días más en la sala definitiva para aclimatación. Las condiciones de estabulación estándar fueron 20–24°C, 30–70% de humedad relativa (HR) y sobre 15 cambios de aire por hora. La temperatura y la humedad estaban constantemente monitorizadas. Se aplicó un ciclo de 12h de luz fluorescente y 12h de oscuridad. Los animales (dos por jaula) fueron alimentados y se les proporcionó agua (agua de grifo descalcificada, filtrada e irradiada con luz UV) *ad libitum*.

La administración de las cápsulas y del blanco, y las observaciones llevadas a cabo se describen a continuación:

Volumen administrado: 2 mL/kg de peso corporal se administró una vez (día 0 del estudio). El grupo de control recibió sólo el medio de transporte (agua destilada) mientras que el grupo de ensayo recibió una suspensión de las cápsulas de concentración 87 mg/mL (14 mg Fe/Kg de peso corporal).

Intervalo de administración: El tiempo transcurrido entre el principio de la

administración al primer animal y el final del último fue 45 minutos.

Mortalidad y morbilidad: Ambas fueron comprobadas a tiempo 0, 5, 15, 30, 90 minutos, 2, 4, 6 y 8 horas después de la administración, y diariamente hasta el día 14.

Peso corporal: Se registró diariamente desde el día 3. El día 0 se pesó a todos los animales antes de la administración.

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

Síntomas clínicos: Se comprobó a 5, 15, 30, 90 minutos, 2, 4, 6 y 8 horas después de la administración, y diariamente durante 13 días más.

Todos los procedimientos están basados (y siguen estrictamente) la siguiente legislación: Directiva de la Comisión Europea 2003/63/EC, 25 de junio del 2003, la cual modifica 2001/83/EC relacionada con productos médicos para uso humano. Los procedimientos y las instalaciones del estabulario concuerdan estrictamente con los requisitos para la protección de animales usados en experimentación:

- Directiva de la Comisión Europea 2003/63/EC
- Directiva Europea 89/609/EEC
- Real Decreto Español 1201/2005
- Guías de FELASA
- OECD documento ENV/JM/MONO (2000)7

Los parámetros mencionados anteriormente fueron comprobados para cada una de las ratas, y se comparó al grupo blanco y suplementado utilizando un test t de student con $\alpha < 0.05$ (si aplica). No se observó mortalidad espontánea en ninguno de los animales. Tampoco hubo síntomas clínicos significativos indicando la necesidad de un sacrificio en ninguno de los animales durante el período de observación de 14 días. No se observaron diferencias significativas ni en el peso corporal (ver Tabla 3, donde los valores medios fueron obtenidos de los resultados con 6 animales; Fig. 1) ni en la ingesta de comida y agua (ver Tabla 4, donde los valores medios fueron obtenidos de los resultados con 3 grupos de animales (3 jaulas); Fig. 2 y Fig. 3, respectivamente) entre los grupos suplementado y no suplementado. Valores entre paréntesis indican desviación estándar. Las observaciones macroscópicas postmórtem fueron similares en los grupos suplementado y no suplementado.

Tabla 3. Evolución del peso corporal en gramos de los animales en el grupo del blanco (Blanco) y aquellos 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 comida en gramos por día y jaula para el grupo del blanco (Blanco) y para el grupo que tomaba 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 del blanco (Blanco) y para el grupo que tomaba 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 estos resultados se puede concluir que debido a la falta de mortalidad o cualquier otro síntoma clínico relevante, el producto estudiado no causa toxicidad aguda ni es tóxico si se administra oralmente una dosis equivalente de hierro de 14 mg/Kg de peso corporal a ratas hembras Sprage-Dawley de ocho semanas de edad.

EJEMPLO 6. Estabilidad de las cápsulas

La capacidad de las cápsulas de evitar la liberación de su carga durante el almacenamiento fue estudiada en diferentes condiciones, similares a aquellas que se pueden encontrar en las posibles matrices a suplementar con las cápsulas. Las cápsulas se dividieron en cuatro grupos, y cada grupo fue sometido a diferentes condiciones:

- 1. Almacenamiento a temperatura ambiente (RT), solución acuosa
- 2. Almacenamiento a temperatura ambiente, cápsulas sólidas
- 3. Almacenamiento a 37°C, solución acuosa
- 4. Almacenamiento a 37°C, cápsulas sólidas

Se escogieron dos condiciones diferentes respecto al contenido de agua para simular los dos entornos extremos a los que las cápsulas probablemente se deberán enfrentar: alimentos líquidos o alimentos con un alto contenido de agua, y alimentos secos o alimentos con un bajo contenido de agua. Como los alimentos o los suplementos alimentarios se almacenan normalmente a temperatura ambiente o inferior, y como cuánto más alta sea la temperatura más agresivo es el entorno,

los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente. También se escogió trabajar a una temperatura más alta para extrapolar tiempos más largos a temperaturas más bajas y simular el comportamiento de las cápsulas en condiciones más estrictas de las que probablemente se vayan a encontrar.

Las cápsulas de hierro utilizadas fueron producidas como en el Ejemplo 1 (Cápsula 0; lote 2 del Ejemplo 3). Se dejó sumergido toda la noche en una solución de ácido nítrico o clorhídrico al 10% (p/p) todo el material de plástico o vidrio que se iba a utilizar en los experimentos para eliminar cualquier traza de hierro existente, y se lavó después 5-6 veces con abundante agua mili-Q. Se prepararon dos muestras y un blanco para cada análisis en condiciones estériles, pesando unos 120 mg de cápsulas (excepto en los blancos) y añadiendo 15 mL de agua destilada (excepto en los experimentos “cápsulas sólidas”). Cada muestra fue sellada y se mantuvo a temperatura ambiente o a 37°C durante 0, 0.5 o 1 mes. Después de cada uno de estos períodos de tiempo se añadieron 15 mL de agua destilada a las muestras “cápsulas sólidas”. Todas las muestras fueron filtradas antes de ser analizadas para eliminar el sólido, y el hierro y el calcio liberados de las cápsulas fueron cuantificados en el sobrenadante mediante ICP-OES.

La liberación de hierro y calcio de las cápsulas fue utilizado como indicador de la estabilidad de las mismas. Cuanto menos hierro se libere, mejor capacidad tienen las cápsulas de mantener la carga en su interior, y de proteger al medio de ser degradado por el hierro y al hierro de ser capturado por el medio. La liberación de hierro (valor promedio de las dos muestras) en las cuatro condiciones diferentes de almacenamiento se muestra en la Tabla 6 (ver también Fig. 4). Los valores entre paréntesis indican desviación estándar.

Tabla 6. Liberación de hierro

Meses	%Fe liberado			
	37C, w	RT, w	37C, d	RT, 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)

RT=almacenamiento a temperatura ambiente, 37C=almacenamiento a 37°C, w=almacenamiento en solución acuosa, d= almacenamiento sin disolvente.

A partir de los anteriores valores de liberación de la carga de hierro de las cápsulas se puede deducir que la estabilidad de las cápsulas es excelente. Para las condiciones más duras, tan sólo se liberó menos del 1.4% del hierro encapsulado. Si se compara el porcentaje de liberación en diferentes condiciones, se puede apreciar como la presencia de agua y la temperatura elevada afectan a la estabilidad de las cápsulas. La tendencia es bastante clara dentro de los cuatro grupos. El incremento de temperatura (37°C en lugar de temperatura ambiente, que es aproximadamente 20-25°C) incrementa el porcentaje liberado, y lo mismo sucede cuando se pone agua en contacto con las cápsulas. De los resultados previos se puede deducir que el efecto de añadir agua a las cápsulas o mantenerlas en un ambiente con una alta actividad de agua, afecta más fuertemente a la liberación de hierro que elevar la temperatura hasta 37°C. Los porcentajes de liberación logrados al mantener las cápsulas en solución acuosa a 37°C son buenos, pero incluso se mejoran cuando la temperatura se baja a otra más realista. A temperatura ambiente el porcentaje máximo de liberación es de sólo 0.5410%±0.0050 después del primer mes. El rendimiento de las cápsulas es casi excelente si 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 fue inferior a 0.017%) y sólo el 0.037%±0.011 de la carga se perdió en el medio después de un mes de almacenamiento. El resultado es en cierta forma diferente para la cantidad de calcio liberada, como se muestra en la Tabla 7 (ver también Fig. 5). Los valores entre paréntesis indican desviación estándar.

Tabla 7. Liberación de calcio

Meses	%Ca liberado			
	37C, w	RT, w	37C, d	RT, 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)

RT=almacenamiento a temperatura ambiente, 37C=almacenamiento a 37°C, w=almacenamiento en solución acuosa, d= almacenamiento sin disolvente.

La fracción de calcio liberada en el medio es más de 10 veces superior a la del hierro, mostrando que la capacidad de las cápsulas para mantener los metales en su interior es mejor para el hierro que para el calcio. La liberación del calcio indica que las cápsulas probablemente se desgastan con el tiempo, pero como el calcio es más accesible que el hierro, primero se libera el calcio al medio. Si las cápsulas estuvieran preparadas sólo con hierro, sería el hierro y no el calcio el que fuera liberado al medio.

EJEMPLO 7. Estructura de las cápsulas

Se escogió preparar las cápsulas con dos cationes metálicos diferentes, hierro y calcio, para proveer a las cápsulas de una capa extra de protección, mejor que la que ofrecía el polímero de alginato solo. El orden en el cual los cationes metálicos son añadidos durante la preparación de las cápsulas fue elegido específicamente para favorecer la formación de un núcleo interno conteniendo alginato de hierro (es decir, rico en hierro) y una capa exterior conteniendo alginato de calcio (es decir, rica en calcio). Esto asegura que si las cápsulas se van gastando durante su almacenamiento o tratamiento, las regiones ricas en calcio serán liberadas a la matriz, retrasando la liberación de hierro del núcleo que contiene alginato de hierro.

Como se puede a partir de los datos obtenidos en el estudio de estabilidad de las cápsulas, para todas las condiciones estudiadas, la fracción de calcio liberada es mucho mayor que la fracción de hierro (ver Tabla 6 y 7 y Fig. 6). Este hecho está en perfecta concordancia con la estructura de las cápsulas propuesta, con un núcleo interior conteniendo alginato de hierro y una capa exterior conteniendo alginato de calcio. La liberación de metales de las cápsulas se debe a la solubilización química de sus componentes, o al desgaste físico de las cápsulas. En ambos casos, la región más cercana a la superficie es la que se libera primero. Como las cápsulas son mucho más ricas en hierro que en calcio (7.93% Fe vs 1.23% Ca), la mayoría del calcio debe estar localizado cerca de la superficie de la cápsula, mientras que la mayoría del hierro debe estar localizado lejos de ella, como está representado en la Fig. 7(A). Si la distribución de ambos metales en las cápsulas fuese completamente homogénea, como se representa en Fig. 7(B), cabría esperar una relación hierro/calcio liberado cercana o igual a la relación de

los metales en las cápsulas, y que la relación %Fe liberado/%Ca liberado fuese cercana a 1. La relación observada es unas 23 veces más pequeña que la relación predicha por este modelo. Por tanto, esto corrobora la estructura en capas de las cápsulas, donde la región interior es rica en hierro y la zona exterior es rica en calcio.

EJEMPLO 8. Biodisponibilidad – ensayos de solubilidad

La absorción del hierro tiene lugar en el tracto gastrointestinal. El pH del estómago varía durante todo el día, dependiendo de la cantidad de comida que haya en él. En general, es bastante ácido. En un estómago vacío el pH puede bajar incluso a 1, aumentando hasta cerca de pH 5 después de una comida completa.

Realizar un ensayo de biodisponibilidad en humanos es muy complicado y requiere tiempo, por lo que primero se evaluó la biodisponibilidad de la fuente de hierro de la presente invención a partir de su solubilidad en un entorno gástrico artificial.

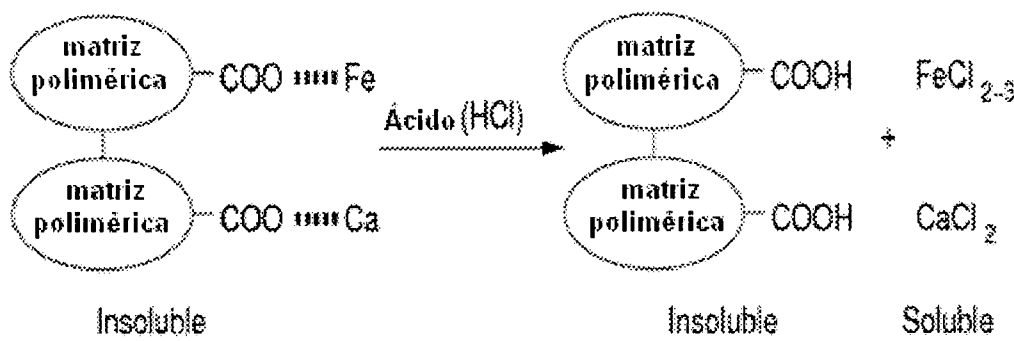
La biodisponibilidad de las cápsulas de hierro depende de su capacidad para liberar la carga. Si las cápsulas son tan estables que soportan el tracto gastrointestinal sin liberar su contenido, la biodisponibilidad del hierro será prácticamente nula, ya que las cápsulas son demasiado grandes para ser absorbidas en el intestino. Por otro lado, si las cápsulas se desestabilizan durante su paso a través del tracto gastrointestinal, la carga será liberada como una sal soluble de hierro y será absorbida por el intestino, proporcionando una elevada biodisponibilidad para el hierro encapsulado. El experimento *in vitro* diseñado para estimar la liberación de la carga durante la digestión ácida tiene el objetivo de identificar si existe liberación de hierro de las cápsulas después de ser digeridas por ácido clorhídrico a pH=2, cercano al pH del estómago.

Se pesaron 10 mg de cápsulas de sacarato férrico preparadas como en el Ejemplo 1 (Cápsula 1) en un eppendorf de 10 mL, y a continuación se añadieron 9 mL de agua. El eppendorf se agitó vigorosamente a mano para facilitar la resuspensión de las cápsulas. La mayoría de ellas fueron fácilmente resuspendidas, aunque algunos agregados grandes de cápsulas permanecieron en la base del tubo. Se colocó una gota de la suspensión en un portaobjetos de microscopio para ser observada. Las cápsulas, así como algunos agregados más grandes, eran visibles utilizando un aumento de 100x (Olympus CH-2, ocular de 10x, objetivo de 10x). Se

añadió 1 mL de HCL 0.1M (en agua) en el eppendorf y se agitó vigorosamente. Se colocó también en un portaobjetos una segunda gota de la suspensión ácida y se comparó con la primera gota. No se observaron grandes diferencias entre las dos gotas. Después de 30 minutos de digestión ácida, se colocó una gota de las cápsulas en el portaobjetos. Antes de ser observada en el microscopio, una gota de NaOH 1M se puso en contacto con la anterior gota, y la mezcla fue observada en el microscopio. La disolución de las cápsulas fue casi instantánea, ya que el NaOH difundió a través de la suspensión de cápsulas.

Se colocó una pequeña muestra de cápsulas frescas en un portaobjetos limpio. Una gota de NaOH 1M se colocó encima de las cápsulas. No se pudieron observar cambios en la estructura de las cápsulas, y permanecieron estables durante el tiempo que fueron observadas (hasta que la gota se evaporó dejando un precipitado de NaOH con cápsulas atrapadas).

El experimento de liberación consta de dos fases. En la primera fase las cápsulas están suspendidas en un medio ácido a pH aproximadamente 2. Este pH es similar al pH encontrado en el estómago. No se pudieron observar cambios visibles en la estructura de las cápsulas bajo tales condiciones, como fue revelado por dos microfotografías observadas con un aumento de 100x. Esta falta de cambios al suspender las cápsulas en agua destilada o en HCl 0.01M no es sorprendente si tenemos en cuenta las especies químicas esperadas en estas soluciones. En agua destilada las cápsulas son estables, formando un precipitado de alginato de hierro y alginato de calcio. La interacción del hierro y del calcio con el alginato es fuerte, debido a la presencia de grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) en el polímero de alginato. Acidificando la suspensión por debajo del pK_a del ácido algínico ($\text{pK}_a > 4$), los grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) se convierten en grupos carboxílico ($-\text{COOH}$), los cuales presentan una interacción mucho más débil con los cationes. Éste es el paso crucial que permite la liberación de la carga de las cápsulas. Aunque la forma no protonada del alginato ($-\text{COO}^-$) es relativamente soluble en agua, la forma protonada es insoluble. Esto explica la falta de cambios visibles, ya que la matriz polimérica continua insoluble, aunque químicamente diferente, como se puede observar en el siguiente esquema de reacción:



Una vez convertido el alginato a ácido algínico, la liberación de los metales se determinó indirectamente, solubilizando el ácido algínico en un medio básico. Si los cationes hubiesen sido liberados, nos quedarían cloruros de calcio y hierro solubles y ácido algínico insoluble. Basificando el medio, por ejemplo con NaOH 1M, se disolvería el precipitado de ácido algínico. Esta rápida disolución se explica por la conversión del ácido algínico de vuelta a alginato de sodio. El hierro y el calcio están presentes en una concentración demasiado baja para volver a formar un precipitado con el alginato de sodio, por lo que éste permanece soluble.

Por otro lado, si los cationes estuvieran todavía enlazados a la matriz de alginato, cuando la basificación convirtiese al ácido algínico de vuelta a alginato, éste sería insoluble en caso de estar enlazado al hierro o al calcio. Por tanto, si se basifican cápsulas sin digestión ácida previa no se deberían observar cambios, ya que los grupos carboxílico presentes en las cápsulas ya están en forma de carboxilato (COO^-) e interaccionando fuertemente con ambos cationes, hierro y calcio. La pequeña fracción de cápsulas no digeridas suspendidas en NaOH 1M también fue fotografiada bajo el microscopio. La imagen permaneció sin cambios todo el tiempo, lo que reveló, tal y como se esperaba, que las cápsulas eran estables en NaOH 1 M si no se digerían previamente.

La liberación de metales observada indirectamente usando este experimento reveló que después de que las cápsulas entren en el estómago, el pH ácido convierte las cápsulas insolubles en ácido algínico insoluble y sales de hierro y calcio solubles. Como las sales de hierro solubles tienen una elevada biodisponibilidad, también esperamos una elevada biodisponibilidad de las cápsulas. Por consiguiente, las cápsulas de la presente invención son adecuadas para la fortificación de alimentos, ya que son estables durante un largo período de tiempo en la matriz alimentaria, y además son capaces de liberar los metales cuando entran en el tracto gastrointestinal.

EJEMPLO 9. Biodisponibilidad – estudio *in vivo*

Este estudio de biodisponibilidad tiene el objetivo de comparar la biodisponibilidad del hierro microencapsulado con la del sulfato ferroso. Se escogió el sulfato ferroso como control positivo porque es utilizado habitualmente como fuente de hierro estándar en este tipo de estudios debido a su elevada biodisponibilidad.

El estudio fue diseñado para medir la capacidad de recuperación de hierro que presentaban ratas anémicas, usando tres fuentes de hierro diferentes:

- Grupo de control negativo: dieta basal pobre en hierro, sin fortificar
- Grupo de control positivo: dieta basal pobre en hierro fortificada con 10 ppm de hierro, a partir de sulfato ferroso soluble
- Grupo de ensayo: dieta basal pobre en hierro fortificada con 10 ppm de hierro, a partir de microcápsulas (sacarato férrico encapsulado)

Las tres dietas fueron formuladas basándose en las recomendaciones de la dieta AIN-93G para experimentación con roedores sin hierro añadido (que contiene entre 2 y 6 ppm de hierro). La dieta basal fue usada como control negativo. La dieta de control positivo se preparó suplementando la dieta basal con 50 mg/kg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, correspondientes a 10 ppm de hierro. La dieta de ensayo se preparó suplementando la dieta basal con 125 mg/kg de microcápsulas (conteniendo 7.93% (p/p) de hierro en forma de sacarato férrico), correspondientes a 10 ppm de hierro. Las dietas y el agua destilada se administraron *ad libitum* durante todo el estudio.

Se utilizaron 40 ratas Sprage Dawley (20 machos, 20 hembras) de 4 camadas diferentes. Las ratas fueron destetadas a la edad de 21 días (día 0, inicio del estudio) y divididas aleatoriamente en jaulas de acero inoxidable. Se asignaron dos animales del mismo sexo por cada jaula. Los animales fueron estabulados en un entorno controlado (20-22°C, 30-50% RH, ciclo de luz: 08:00h–20:00h).

Se indujo anemia en los tres grupos de animales, los cuales fueron alimentados con la dieta basal pobre en hierro durante los primeros 22 días (hembras) o 23 días (machos) del estudio, como se muestra en Fig. 8. Después del período de inducción de anemia, se cambiaron las dietas de los tres grupos:

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

- Control positivo: 3 jaulas de machos y 3 de hembras (6+6 animales). Este grupo recibió la dieta basal fortificada con 10 ppm de hierro en forma de sulfato ferroso
- Grupo de ensayo: 4 jaulas de machos y 4 de hembras (8+8 animales). Este grupo recibió la dieta basal fortificada con 10 ppm de hierro en forma de hierro microencapsulado (sacarato férrico encapsulado).

Se permitió a los animales recuperarse de la anemia durante 2 semanas (14 días). Después de ese período se les anestesió con isoflurano inhalado (dosis de inducción: 3%, dosis de mantenimiento: 1.5-2%) y se les practicó eutanasia mediante la extracción de sangre por punción intracardiaca. Se pesaron todos los animales periódicamente durante todo el procedimiento. También se registró la cantidad de comida que consumieron.

La evolución del peso corporal durante el período de recuperación se muestra en las Tablas 8 y 9 (ver también Fig. 9).

Tabla 8. Evolución del peso corporal de los machos, calculado como peso(día_n)-peso(día₀). El período de recuperación de la anemia empezó el día 22 (ver también Fig. 9)

Día	Control negativo x (SD)	Control positivo x (SD)	Grupo de ensayo x (SD)
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 SD = desviación estándar

Tabla 9. Evolución del peso corporal de las hembras, calculado como peso(día_n)- peso(día₀). El período de recuperación de la anemia empezó el día 23 (ver también Fig. 9)

Día	Control negativo x (SD)	Control positivo x (SD)	Grupo de ensayo x (SD)
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 SD = desviación estándar

Los resultados mostraron una clara diferencia dentro de los tres grupos, con un similar y muy superior incremento de peso corporal en los grupos fortificados, quedando el grupo con la dieta basal muy por debajo de los otros dos grupos. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos fortificados durante el período de recuperación de la anemia. Por otro lado, los pesos de los dos grupos fortificados (control positivo y grupo de ensayo) fueron significativamente más altos que los pesos del control negativo.

Se llega a las mismas conclusiones si se estudia la eficiencia de la alimentación, definida como:

$$\text{eficiencia de la alimentación} = \frac{\text{incremento de peso (g)}}{\text{ingesta de comida (g)}}$$

Este parámetro informa de si los alimentos ingeridos se transforman bien a tejido corporal. Las eficiencias de alimentación calculadas para los tres grupos durante el período de recuperación de anemia se muestran en la Tabla 10. Los valores entre paréntesis indican desviación estándar.

Tabla 10. Eficiencia de alimentación para machos y hembras durante el período de recuperación de la anemia

Eficiencia de alimentación	Control negativo x (SD)	Control positivo x (SD)	Grupo de ensayo x (SD)
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 SD = desviación estándar

Dentro de los grupos de machos y hembras las diferencias son sólo significativas entre el control negativo y cualquiera de los grupos suplementados, pero no hay diferencias entre los dos grupos suplementados. Por tanto, se puede concluir que las diferencias entre sulfato ferroso y las microcápsulas de hierro son estadísticamente no significativas, pero que sí son estadísticamente significativas entre el control negativo y las microcápsulas de hierro. Por consiguiente, la biodisponibilidad del hierro microencapsulado tiene que ser similar a la del sulfato ferroso, sin presentar ninguno de los inconvenientes de una sal soluble de hierro.

EJEMPLO 10. Yogur fortificado

Se estudió la incorporación de la fuente de hierro en forma de cápsulas de la presente invención a un yogur como alimento portador. Se escogió probar las cápsulas en un yogur por las siguientes razones:

- El pH de un yogur es ácido, lo cual es suficiente agresivo para destruir la fuente de hierro en forma de cápsulas descritas previamente. Esto liberaría el contenido de las cápsulas y dañaría el yogur.
- El yogur presenta un alto contenido en agua, lo cual también supone un medio agresivo para otras fuentes de hierro ya conocidas. El contenido de agua, junto con su acidez, facilita la solubilización del hierro, dificultando su fortificación.
- El hierro acelera la oxidación de las grasas, lo cual produce un gusto rancio en la comida. Un yogur puede contener cerca de un 3% de grasa, lo cual significa un considerable sustrato para ser oxidado en caso de ponerse directamente en contacto con el componente de hierro del agente fortificante.

Se preparó yogur fortificado a partir de las cápsulas producidas como en el Ejemplo 1 (Cápsula 0; lote 1 del Ejemplo 3). Se preparó también un segundo lote de yogur sin añadir cápsulas de hierro y fue usado como control.

La preparación de los yogures se realizó según el siguiente procedimiento:

1. Acondicionamiento y estandarización de 25L de leche, añadiendo leche en polvo bajo constante agitación hasta su completa disolución, finalizando esta etapa con un contenido en grasa de 2.5-3%.
2. Adición y dispersión de 50 g de cápsulas de hierro bajo agitación continua (excepto en el yogur de control).
3. Pasteurización a 95°C durante 90 segundos.
4. Homogenización a 180 kg/cm².
5. Incorporación del cultivo fermentador a 45°C.
6. Fermentación a 44°C durante 4 horas hasta alcanzar un pH de 4.7-4.8.
7. Conservación del yogur a 4.5°C hasta un máximo de 1.5 meses.

Uno de los objetivos de la fabricación de yogur fortificado era evaluar la presencia o ausencia de gusto metálico y comparar visualmente el producto fortificado con el yogur de control. El yogur fue catado por un panel de cinco hombres no entrenados, y ninguno de ellos fue capaz de detectar ni siquiera un ligero gusto metálico en el yogur fortificado, aunque el análisis de los yogures reveló que tenían 42.5 ± 4.1 ppm de hierro. También se realizó una comparación visual de los yogures fortificados y control, y sólo se pudo detectar un color ligeramente más oscuro en el yogur fortificado. La ligera coloración podría deberse al uso de una sal muy oscura de hierro, y sólo se podía apreciar si se colocaba los yogures uno al lado del otro.

EJEMPLO 11. Estabilidad de las cápsulas en el yogur

Se estudió la oxidación de lípidos en yogures fabricados con la fuente de hierro en forma de cápsulas de la presente invención y yogures control (sin adición de cápsulas de hierro). Para ello, las condiciones de almacenamiento fueron más estrictas de lo habitual. Los yogures fueron analizados al 150% de su vida útil, medio mes más tarde de su fecha de caducidad, establecida en un mes. Después de este almacenamiento prolongado, se evaluó el nivel de ranciedad usando cromatografía de gases. El hexanal es un marcador de ranciedad utilizado habitualmente, ya que es uno de los productos generados por la oxidación de lípidos. La capacidad de un ser humano para detectar trazas de hexanal es bastante alta, siendo capaz de notar el sabor rancio si los niveles de hexanal están por encima de 10 ppm (partes por millón, mg/kg del portador). Para analizar los yogures y determinar si presentaban rancidez detectable o niveles de hexanal por debajo del umbral de detección de los seres humanos, se utilizó la técnica GC/MS

(cromatografía de gases/espectrometría de masas). Este método es capaz de cuantificar trazas de hexanal hasta 50 ppb (partes por billón, ng/kg), casi tres órdenes de magnitud por debajo del umbral de detección de los humanos.

La preparación de los yogures se hizo como en el Ejemplo 10 y se realizó el análisis del yogur por GC/MS en busca de trazas de hexanal.

Ambas muestras analizadas tenían niveles de hexanal por debajo de 50 ppb, muy por debajo de umbral de rancidez, el cual es cerca de 10 ppm (partes por millón, ng/g). Las cápsulas son, por tanto, una buena manera de proteger las grasas del yogur de la fuente de hierro soluble y evitar su oxidación.

EJEMPLO 12. Preparación de carne fortificada y estabilidad

La posible incorporación de las microcápsulas a un alimento portador fue estudiada para salchichas de pavo y para una emulsión de carne, como la salchicha de Frankfurt. La presencia de hierro en estas muestras podría conducir a la oxidación de su grasa si el hierro se liberara de las microcápsulas.

Para la preparación de las salchichas de Frankfurt fortificadas con hierro se utilizaron los siguientes ingredientes y cantidades relativas: lomo de cerdo (40%); panceta (20%); una mezcla de aditivos, especias y aromas (paymfurt ST-1800, Grupo Carinsa; 3.4%); proteína vegetal (paymprotein ST-91, Grupo Carinsa; 3%); sal (1.5%); agua/hielo (27.3%); aroma ahumado (0.2%); y almidón de patata (5%).

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

El procedimiento que se siguió para preparar las salchichas de Frankfurt fue el siguiente:

1. Picar todos los ingredientes para reducir la carne a una pasta fina. Usar hielo para prevenir que la carne se caliente.
2. Colocar la emulsión en los envases (bolsas de plástico).
3. Cocer en una caldera a 75°C durante 45 minutos.
4. Envasar al vacío y almacenar a 4°C.

Para la preparación de las salchichas de pavo fortificadas con hierro se utilizaron los siguientes ingredientes y cantidades relativas: pechuga de pavo (69%); agua

(24%); una mezcla de aditivos y aromas (Carinsa formula CMA-1251#1; 6%); fécula de maíz (1%). Las microcápsulas de hierro (1 g/kg final) se añadieron junto con el Carinsa formula CMA-1251#1.

El siguiente protocolo fue utilizado para la preparación de las salchichas de pavo:

- 1. Preparar la salmuera mezclando el agua con la fécula de maíz y el Carinsa formula CMA-1251#1.
- 2. Picar la carne.
- 3. Mezclar al vacío la carne picada con la salmuera y macerarlo durante 24 horas.
- 4. Preparar una pasta fina picando una parte de la carne hasta que se obtenga una pasta muy fina.
- 5. Colocar la carne en los envases (bolsas de plástico).
- 6. Cocer en una caldera a 75°C hasta que la temperatura interior alcance 72°C.
- 7. Envasar al vacío y almacenar a 4°C.

La cantidad de hierro de las muestras se cuantificó mediante ICP-OES (espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente), después de digerir las muestras en ácido nítrico concentrado en un horno microondas. Los resultados de la determinación expresados en ppm (partes por millón, mg/kg) se muestran en la Tabla 11. Los valores entre paréntesis indican desviación estándar en porcentaje.

Tabla 11

Muestra	Sin hierro añadido Fe (ppm)	Fortificada con hierro Fe (ppm)
Salchicha de Frankfurt	12.9 (2.5%)	145 (3.3%)
Salchicha de pavo	6.8 (4.4%)	112 (4.7%)

Se estudió la capacidad de las microcápsulas de evitar la oxidación de las grasas cuantificando la cantidad de hexanal presente en las muestras. El hexanal es un marcador de la oxidación de grasas utilizado habitualmente, ya que es uno de los mayores productos resultantes de esta reacción. Su concentración fue medida al principio y al final de la vida útil de las salchichas (día 0 y día 60) y se comparó su valor entre muestras fortificadas con hierro (>100 ppm de hierro) y muestras sin fortificar (~10 ppm de hierro). Las muestras se mantuvieron en la nevera durante su vida útil y después fueron congeladas a -80°C hasta que fueron analizadas. Se

cuantificó el hexanal mediante HS-GC-MS (espacio de cabeza-cromatografía de gases-espectrometría de masas). Los resultados, expresados como ppm de hexanal (mg/kg), se muestran en la Tabla 12. Los valores entre paréntesis indican desviación estándar en porcentaje.

Tabla 12

Salchicha	Día	Sin hierro añadido Hexanal (ppm)	Fortificada con hierro Hexanal (ppm)
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 a día 0 revela que, aunque la cantidad de hexanal pueda parecer a simple vista más alta en las muestras con hierro, estadísticamente no puede ser considerada diferente. Por consiguiente, la microcápsula es un método efectivo para prevenir la oxidación de grasas debido a la presencia de hierro durante las etapas más agresivas de la fabricación de las salchichas, es decir cociéndolas. Las mismas conclusiones se obtuvieron para los resultados del final de la vida útil, cuando las muestras tenían ya 2 meses. La diferencia entre los resultados de las muestras fortificadas con hierro y aquellas sin fortificar no fue estadísticamente significativa. Además, si se compara la misma muestra al principio y final de la vida útil, las diferencias tampoco son significativas. Por tanto, se puede concluir que la presencia de hierro en forma de microcápsulas no alteró significativamente el procedimiento de oxidación de grasas de las muestras de carne estudiadas.

EJEMPLO 13. Resistencia de las microcápsulas a la homogenización

Una de las etapas clave en la fabricación de muchos alimentos, y en particular de los productos lácteos, es una etapa de homogenización, en la cual un líquido o suspensión es sometido a una elevada tensión de cizalladura. Como resultado, se destruyen o reducen las partículas en suspensión, como los glóbulos grasos, convirtiéndose en una suspensión mucho más homogénea. Esta tensión de cizalladura también podría provocar la destrucción de las microcápsulas, liberando su contenido de hierro al sobrenadante, y dejando de ser útil la protección que ofrecían.

Se realizó un estudio para determinar hasta qué punto la homogenización liberaba el contenido de las microcápsulas al sobrenadante. Para ello se prepararon 7.9 L de una suspensión acuosa que contenía 10.38 ppm de hierro microencapsulado (equivalentes a 1.025 g de microcápsulas). La muestra fue agitada minuciosamente y alimentaba continuamente un homogenizador de etapa simple, estableciendo las presiones entre 20 MPa y 100 MPa. Después de alcanzar la presión deseada y de que el sistema se estabilizara, se recogían 100 mL de muestra. Las presiones escogidas fueron: 20 MPa, 35 MPa, 50 MPa y 100 MPa. Después de la etapa de homogenización se dejaron las muestras en recipientes cerrados durante 8 días, sin agitación. Justo antes del análisis las muestras se microfiltraron (filtro de 0.45 µm) y se les añadió HNO₃ concentrado hasta llegar a una concentración final del 0.5% (p/p) para estabilizar el hierro en suspensión. El hierro presente en el sobrenadante acidificado se cuantificó mediante ICP-OES.

La Tabla 13 muestra la cantidad de hierro en el sobrenadante y la correspondiente cantidad de hierro liberado de las microcápsulas a diferentes presiones de homogenización. La muestra de la Tabla 13 correspondiente a homogenización a 0 MPa no fue en realidad homogenizada, y la muestra llamada “20 (blanco)” fue homogenizada a 20 MPa pero contenía sólo agua desionizada, sin microcápsulas.

Tabla 13

Homogenización (MPa)	Fe(ppm)	%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%

Como se puede ver en los resultados previos, la estabilidad de las microcápsulas durante el procedimiento de homogenización es excelente. Incluso utilizando las presiones más elevadas posibles, sólo una pequeña fracción del hierro total se libera de las microcápsulas.

EJEMPLO 14. Preparación de leche fortificada y estabilidad

Se estudió la incorporación de la fuente de hierro en forma de cápsulas de la presente invención a la leche como alimento portador. Se escogió incorporar las cápsulas a la leche por las siguientes razones:

- La leche es un alimento líquido, lo cual facilita la liberación de otras fuentes de hierro ya conocidas. Esto hace la fortificación de leche entera más difícil, en comparación con la leche desnatada, ya que la presencia de hierro oxida las grasas presentes en la leche, produciendo un gusto rancio.
- La leche, siendo un líquido, no se puede fortificar fácilmente con aditivos sólidos ya que tienden a precipitar en la base de la botella.

Se mantuvo refrigerada (a 4°C) leche de vaca entera de un granjero local hasta el momento de iniciar el tratamiento. Se dispersaron 35 g de microcápsulas húmedas (75% humedad) en 600 mL de agua destilada. Se procesaron 50 L de leche sin añadir ninguna fuente de hierro, y 50 L de leche mezclados con los 600 mL de suspensión de cápsulas. Se añadió E-339 para lograr una concentración final de 1 g/L a ambos tipos de leche. Primero se trataron los 50 L de leche sin fortificar y después los 50 L de leche con el hierro microencapsulado, según las siguientes etapas: (a) la leche fue calentada gradualmente y cuando alcanzó 75°C fue homogenizada usando un homogenizador de doble etapa (18 MPa para la primera etapa, 4 MPa para la segunda); (b) cuando la leche alcanzó 90°C se dejó a esta temperatura durante 1 minuto de tiempo; (c) la leche fue procesada a ultra alta temperatura (UHT) durante 15 segundos a 135°C; y (d) la leche fue enfriada a temperatura ambiente y fue embotellada en botellas de cristal de 0.5 L sin esterilizar.

Después de ser embotelladas, ambas leches fueron catadas y no se detectó en absoluto gusto metálico. Para prevenir el deterioro microbiológico de la leche se autoclavó a 121°C durante 15 minutos. Después de ser enfriada, la leche se almacenó a 4°C. Al final de la vida útil (1 mes) se cuantificó el hexanal presente en la leche.

Al principio y al final de la vida útil de la leche se comprobó visualmente su apariencia física. No se observaron restos de precipitación, pero se pudo distinguir un color ligeramente más oscuro en la leche fortificada con hierro. El gusto y el olor de la leche fueron comprobados después de su manufacturación. No se notaron gustos ni olores rancios ni metálicos en ninguna de las dos leches. De hecho, no se encontraron diferencias de ningún tipo en olor y gusto entre la leche fortificada y la que no lo estaba. La falta de olor o gusto rancio concuerda con la

concentración de hexanal determinada en ambas clases de leche al final de su vida útil: no se detectaron restos de hexanal en las muestras, y en el caso de que las hubiera tendrían una concentración por debajo de 10 µg/L.

EJEMPLO 15. Producción de microcápsulas utilizando acetato de calcio

La elevada concentración de calcio utilizada para preparar las microcápsulas puede causar problemas de corrosión si se utiliza como sal el cloruro cálcico. El motivo es que los aniones cloruro son muy agresivos para el acero, un material de uso común en recipientes industriales, tuberías y agitadores. Para evitar estos problemas, y aprovechando el hecho que los aniones cloruro no participan en el procedimiento de fabricación de las microcápsulas, se preparó un lote de microcápsulas utilizando otra sal de calcio, en particular acetato de calcio.

En comparación con el cloruro cálcico, que es extremadamente soluble en agua, el acetato cálcico es menos soluble. Por tanto, la concentración inicial de 5M en calcio no se pudo lograr. En su lugar se utilizó una concentración más baja (1.8 M).

El protocolo utilizado para preparar las microcápsulas apenas difería del utilizado para preparar las cápsulas con cloruro cálcico:

Se disolvieron 16 g de sacarato férrico (aproximadamente 35% de hierro) en una solución de 1.5 g de alginato sódico en 100 mL de agua. Utilizando un embudo de extracción, la mezcla alginato sódico/sacarato férrico fue añadida gota a gota en 70 mL de solución $\text{Ca}(\text{AcO})_2$ 1.8 M. Durante la adición gota a gota, la suspensión de cápsulas formada se agitó con un homogenizador de laboratorio (Diox 900, Heidolph Instruments GmbH). Las cápsulas sólidas obtenidas se separaron por filtración al vacío, y a continuación se lavaron en agua destilada para eliminar cualquier sal soluble y se filtraron de nuevo al vacío, tres veces consecutivas. Se obtuvieron 35.6 g de cápsulas húmedas.

Los contenidos de hierro y calcio se midieron según el procedimiento descrito en el Ejemplo 3. La estabilidad de las cápsulas fue determinada midiendo la liberación de hierro y calcio a día 0 según el procedimiento descrito en el Ejemplo 6. El % de humedad y el % de residuo sólido se determinaron de la siguiente manera:

1. Pesar un vaso de precipitados de cristal ($\text{peso}_{\text{vacío}}$).
2. Pesar aproximadamente 1 g de microcápsulas en el vaso de precipitados.

Pesar el vaso de nuevo ($\text{peso}_{\text{húmedo}}$).

3. Colocar el vaso de precipitados en una estufa a 110-120°C durante dos horas.
4. Dejar enfriar el vaso de precipitados con las microcápsulas secas a temperatura ambiente durante 30 minutos.
5. Pesar de nuevo el vaso de precipitados con las microcápsulas ($\text{peso}_{\text{seco}}$).
6. Repetir el ciclo secar/enfriar/pesar hasta que el peso sea constante.
7. Calcular el contenido de humedad como:

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

Los resultados obtenidos fueron:

- Contenido de hierro: 15.0% de hierro (p/p) en microcápsulas húmedas, 45.4% de hierro (p/p) en microcápsulas secas.
- Contenido de calcio: 0.6% de calcio (p/p) en microcápsulas húmedas, 1.9% de calcio (p/p) en microcápsulas secas.
- Humedad: 66.9% de humedad (33.1% de residuo seco)
- Liberación de hierro y calcio: 0.2% de hierro liberado y 8.2% de calcio liberado.

EJEMPLO 16. Resistencia térmica

La conveniencia de utilizar las microcápsulas para fortificar alimentos fue comprobada también a nivel térmico. Se realizó un estudio para ver si las altas temperaturas utilizadas al cocer o esterilizar los alimentos podían afectar a la capacidad de las microcápsulas de mantener la carga de hierro en su interior.

Se pesó aproximadamente 1 g de microcápsulas en dos vasos de precipitados de cristal, previamente pesados. Se colocaron los vasos en una estufa a 125°C. Uno de ellos estuvo en la estufa 30 minutos, mientras que el otro permaneció 180 minutos. Los vasos de precipitados se pesaron nuevamente después de enfriarse a temperatura ambiente. De estas muestras secas se pesaron 40 mg de microcápsulas y se suspendieron en 100 mL de agua desionizada, agitando la suspensión a mano. De cada suspensión se diluyó 1 mL en 10 mL (añadiendo 9 mL de agua desionizada). A continuación se filtraron las muestras para eliminar los sólidos en suspensión. Por último se añadieron 50 μL de ácido nítrico concentrado a cada muestra para estabilizar el hierro en suspensión y las muestras se analizaron mediante ICP-OES para cuantificar el hierro y el calcio

liberados.

La suspensión de microcápsulas justo antes de la filtración tenía una concentración total de 11 ppm de hierro. El sobrenadante después de la filtración sólo contenía el hierro liberado de las microcápsulas, el cual fue cuantificado por ICP-OES para obtener los siguientes resultados:

30 min, 125°C: 0.04 ppm de hierro

180 min, 125°C: 0.03 ppm de hierro

En ambos casos los resultados suponen que menos del 1% del hierro presente en las microcápsulas fue liberado por el efecto de calentarlas. Por tanto, las microcápsulas pueden ser consideradas estables, incluso después de tratamientos mucho más agresivos que los que se realizan habitualmente en alimentos (3h a 125°C).

REIVINDICACIONES

1. Un alimento fortificado con hierro que comprende un producto fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas, donde las cápsulas comprenden un núcleo que comprende alginato de hierro, y una capa exterior que comprende alginato de calcio.
2. Alimento fortificado con hierro según la reivindicación 1, donde el núcleo comprende además al menos una sal de hierro biodisponible.
3. Alimento fortificado con hierro según la reivindicación 2, donde la al menos una sal de hierro biodisponible es sacarato férrico.
4. Alimento fortificado con hierro según la reivindicación 1, donde el núcleo comprende además alginato de sodio.
5. Alimento fortificado con hierro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el núcleo comprende además un agente quelante.
6. Alimento fortificado con hierro según la reivindicación 5, donde el agente quelante es sacarosa.
7. Alimento fortificado con hierro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el cual es un yogur.
8. Alimento fortificado con hierro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el cual es leche.
9. Alimento fortificado con hierro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el cual es una bebida.
10. Alimento fortificado con hierro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el cual es una emulsión de carne.
11. Alimento fortificado con hierro según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el cual es una salchicha.
12. Uso de un alimento fortificado con hierro tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para prevenir la aparición de deficiencia de hierro o para reducir una deficiencia de hierro en un humano.

RESUMEN

Alimento fortificado con hierro

Se proporciona un alimento fortificado con hierro que comprende una fuente de hierro en forma de cápsulas sólidas, en donde las cápsulas comprenden un núcleo que comprende alginato de hierro, y una capa exterior que comprende alginato de calcio. Las cápsulas son adecuadas para fortificar tanto alimentos hidratados como deshidratados y se caracterizan por una excelente capacidad de carga, junto con una buena estabilidad bajo condiciones locales de almacenamiento y uso estándares. El alimento fortificado con hierro de la invención sirve para prevenir la aparición de deficiencia de hierro o para reducir una deficiencia de hierro en un humano.

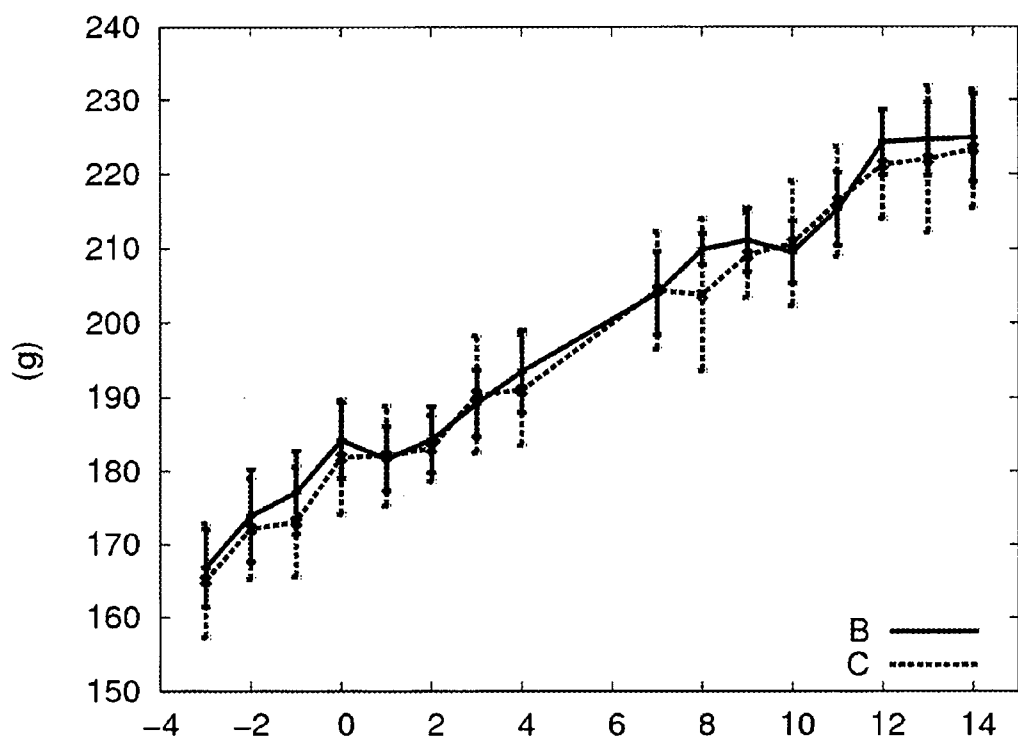


Fig. 1

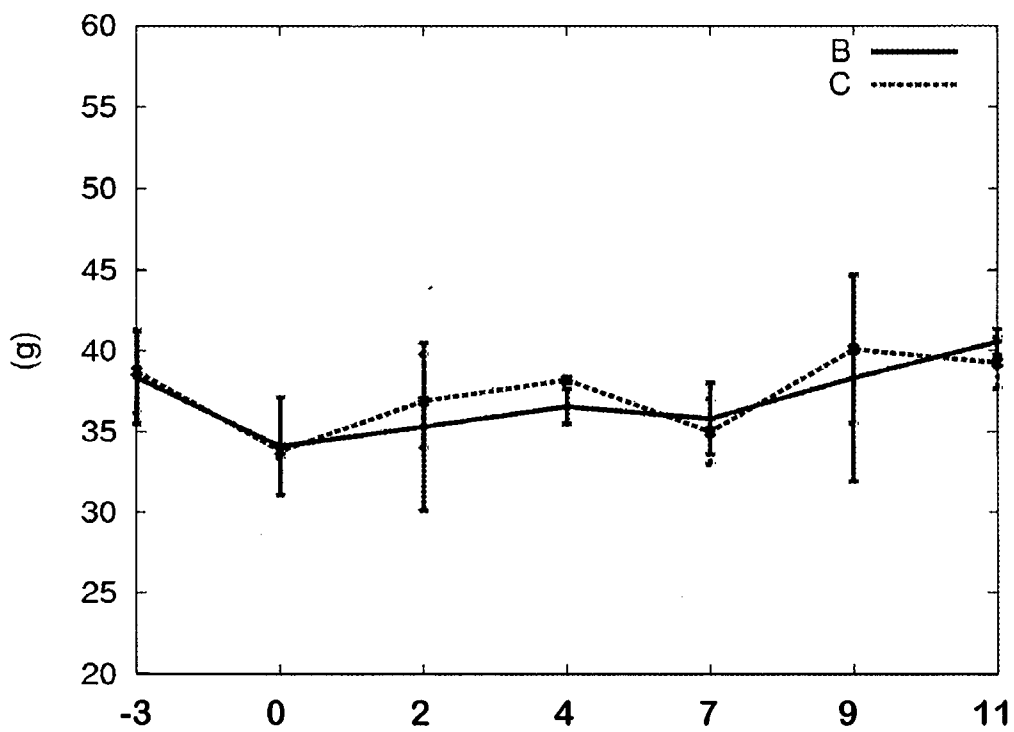


Fig. 2

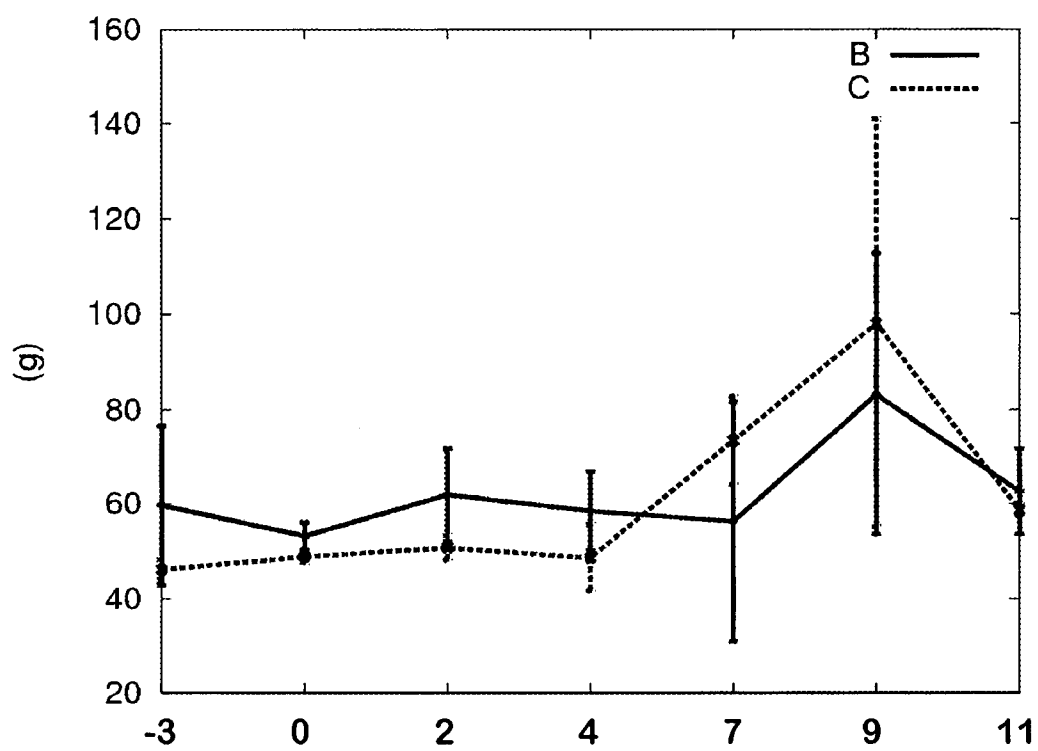


Fig. 3

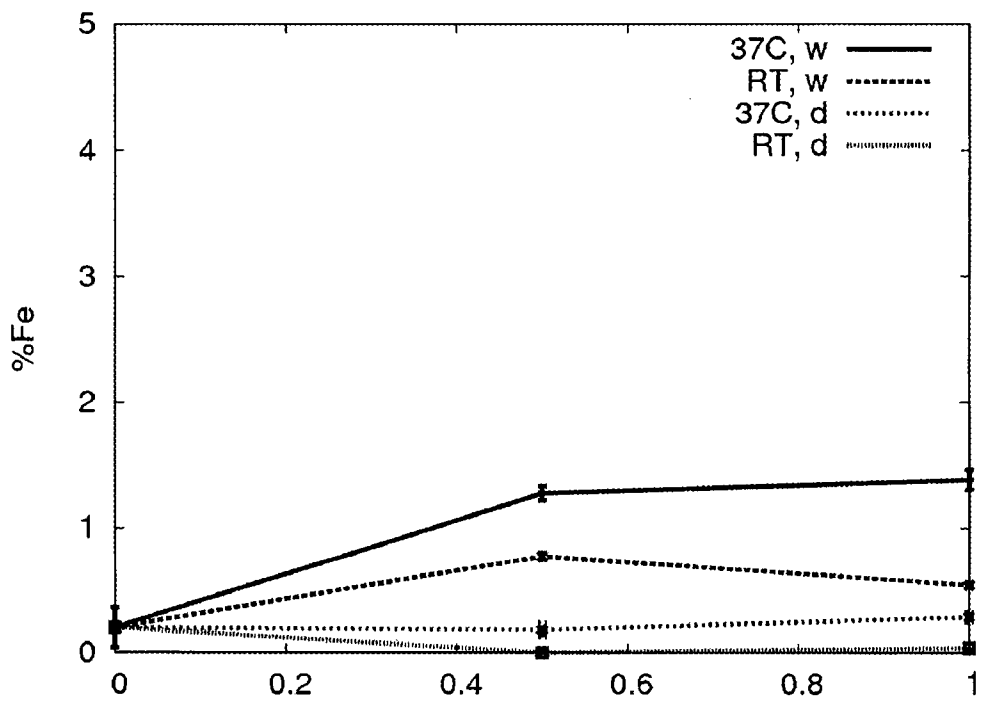


Fig. 4

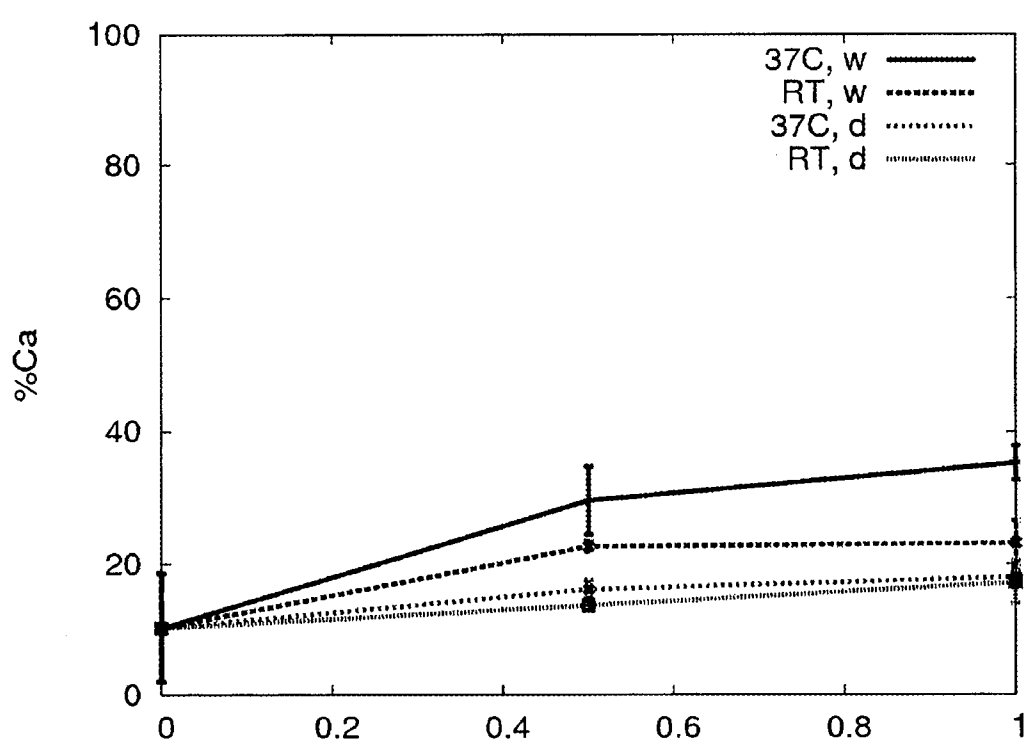


Fig. 5

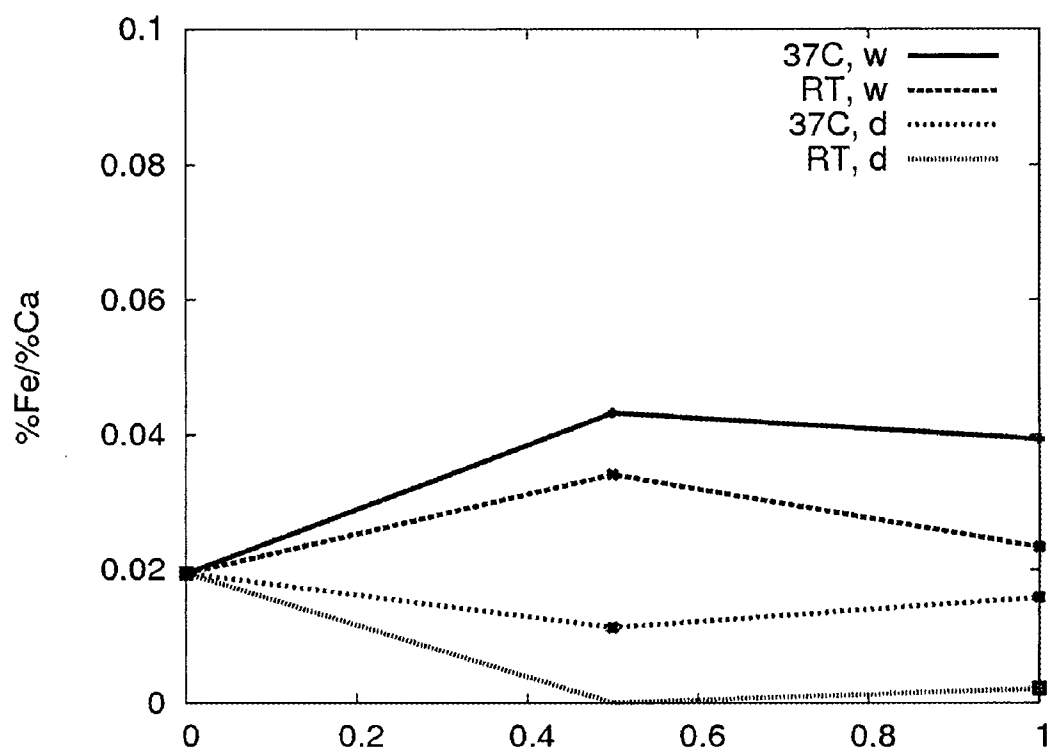


Fig. 6

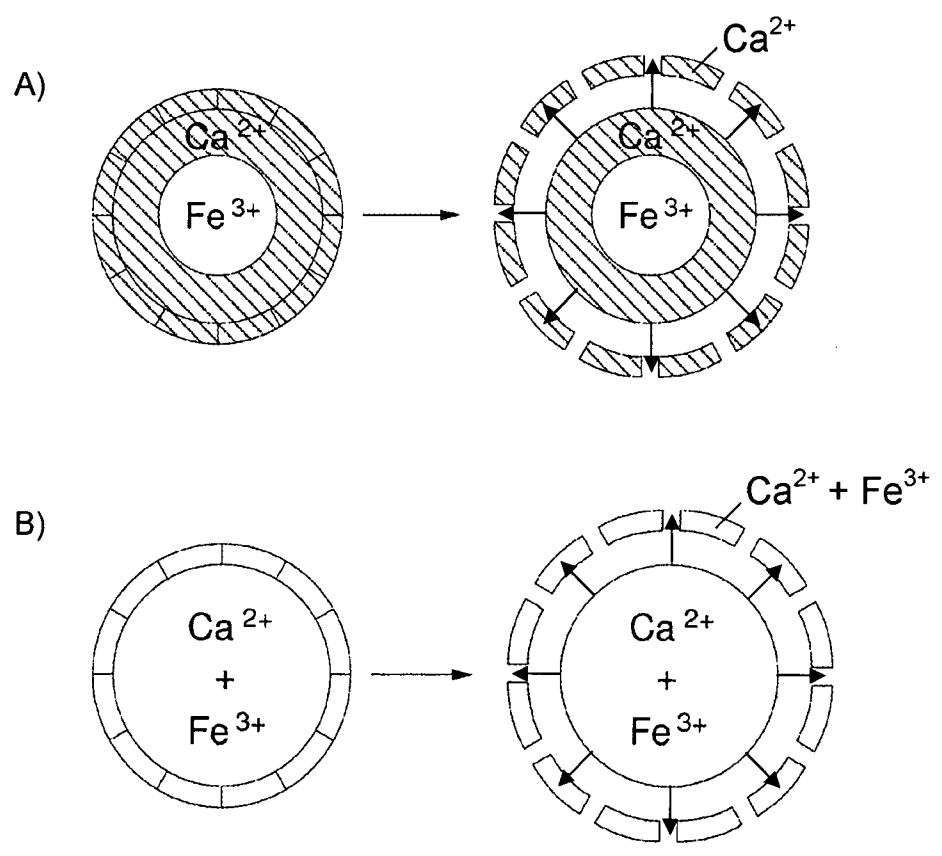


Fig. 7

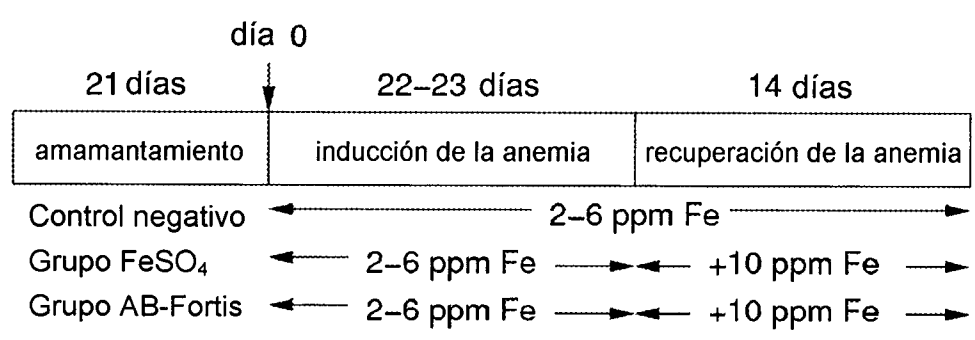


Fig. 8

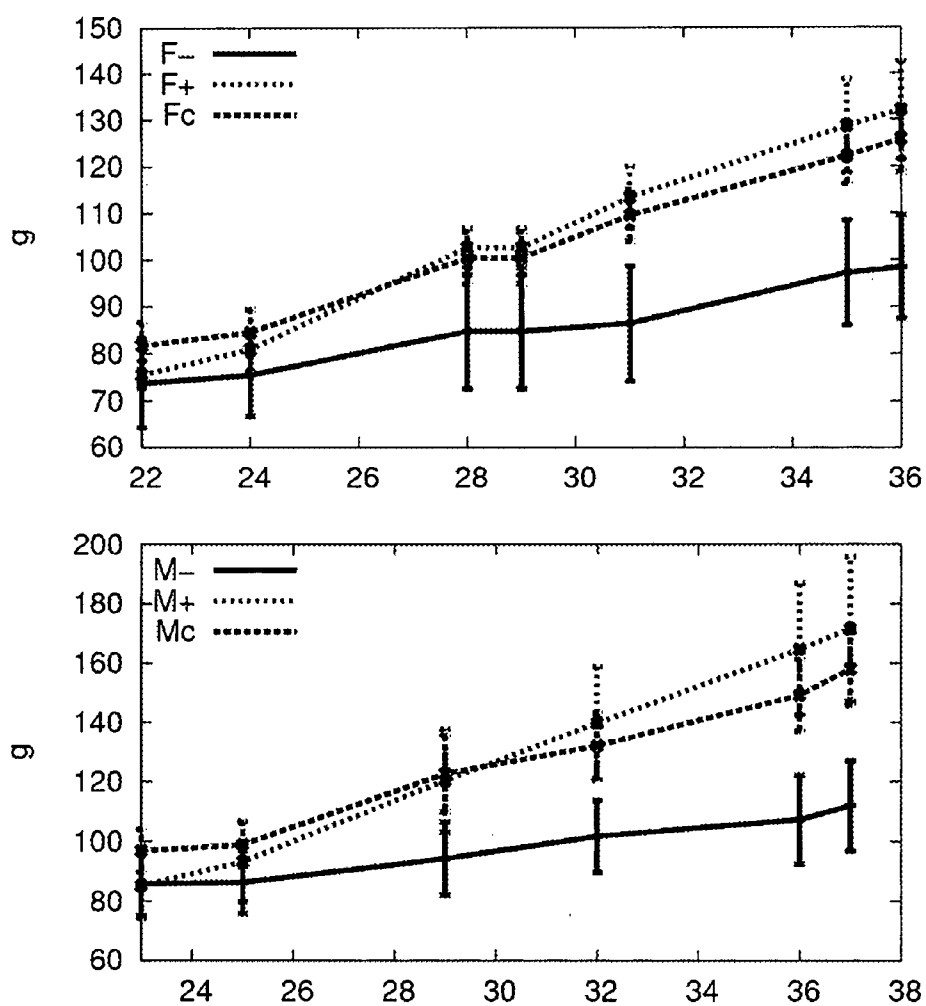


Fig. 9



No. 11-038415- -00000-0000

Fecha: 2011-03-29 17:00:13 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 53

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO D

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
AB-BIOTICS, S.A.

REFERENCIA	Radicación No.	11 038415
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/63059
	Fecha inicio fase nacional	08/05/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	08212

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 20 MAYO 2011.
adpa11