República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0920228-5 A2

(22) Data do Depósito: 07/10/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 18/08/2020

(54) Título: PRODUTO FONTE DE FERRO NA FORMA DE CÁPSULAS E PROCESSO PARA SUA PREPARAÇÃO

(51) Int. Cl.: A61K 9/50; A23C 9/152; A23L 1/00; A23L 1/304; A61K 33/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 08/10/2008 EP 08 166052.4; 13/11/2008 US 61/114,261.

(71) Depositante(es): AB-BIOTICS, S.A.

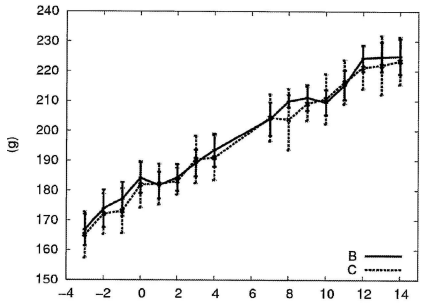
(72) Inventor(es): GALÍ DRUDIS SOLÉ.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009063059 de 07/10/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/040789 de 15/04/2010

(85) Data da Fase Nacional: 07/04/2011

(57) Resumo: PROCESSO PARA OBTER ALIMENTO FORTIFICADO COM FERRO, ALIMENTO FORTIFICADO COM FERRO E USO DO MESMO. A presente invenção refere-se a um alimento fortificado com ferro compreendendo um produto fonte de ferro na forma de cápsulas sólidas, onde as cápsulas compreendem um núcleo compreendendo alginato de ferro, e uma camada externa compreendendo alginato de cálcio. As cápsulas são adequadas tanto para fortificar alimento hidratado quanto alimento desidratado e são caracterizadas por uma excelente capacidade de carga, bem como por terem uma boa estabilidade sob condições locais padrão de armazenagem e uso. O alimento fortificado com ferro da invenção serve para evitar a ocorrência de deficiência de ferro ou reduzir a deficiência de ferro em um ser humano.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO PARA OBTER ALIMENTO FORTIFICADO COM FERRO, ALIMENTO FORTIFICADO COM FERRO E USO DO MESMO".**

Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório nº 61/114.261, depositado em 13 de novembro de 2008, e do Pedido de Patente Europeia EP08166052.4, que estão aqui incorporadas como referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um alimento fortalecido com ferro, e ao seu uso para evitar a ocorrência de deficiência de ferro ou reduzir uma deficiência de ferro em um ser humano.

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

A deficiência de ferro é uma das doenças de deficiência mais frequentes que ocorre na maioria dos países em desenvolvimento e é também a principal doença de deficiência em países industrializados. O fortalecimento do ferro em certos produtos alimentícios é uma forma de evitar a ocorrência de deficiência de ferro. Entretanto, para os alimentos fortificados serem eficazes na redução da deficiência de ferro, o ferro adicionado deve ser suficientemente biodisponível.

Um agente adequado de fortificação com ferro deve satisfazer um número de requisitos. Inicialmente, ele deve ser inócuo ao corpo humano. Além disso, ele deve ser insolúvel em água em ambiente neutro ou moderadamente ácido, o que é decisivo de boas propriedades de armazenagem. Ele deve ter também alta capacidade de absorção no corpo humano, isto é, uma boa biodisponibilidade (que significa boa solubilidade no trato gastrointestinal). Ele deve ter também uma boa estabilidade e ser quimicamente definível e produzível de forma reproduzível, isto é, ele deve ter propriedades garantidas constantes e controláveis.

A biodisponibilidade do ferro é uma função de sua forma química, de cuja solubilidade depende, e da presença de componentes alimentícios que promovam ou inibam sua absorção. A biodisponibilidade está fortemente ligada às mudanças sensoriais. Fontes de ferro livremente solúveis

em água, tais como sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso, e citrato férrico de amônio, apresentam uma biodisponibilidade relativamente alta, no entanto, elas sofrem das desvantagens de provocar a descoloração e mudanças no gosto dos produtos fortalecidos quando elas reagem com outros componentes no alimento. Fumarato ferroso, succinato ferroso e sacarato férrico são lentamente solúveis em água, mas prontamente solúveis em ácido diluído tal como suco gástrico. Embora eles possam parecer superiores ao sulfato ferroso em termos de seu efeito na oxidação de gordura e descoloração, sua interação com o alimento pode reduzir a absorção de ferro. A falta de qualquer interação com o alimento durante a armazenagem de fontes de ferro pobremente solúveis, tais como pirofosfato férrico, ortofosfato férrico e ferro elementar, os tem tornado fortificantes menos atrativos de um ponto de vista comercial, e muitos cereais infantis atualmente contêm tais formas de ferro. No entanto, a biodisponibilidade dessas fontes de ferro é sempre baixa.

Assim, os compostos de ferro comum usados comercialmente parecem ser ou suficientemente solúveis em água para provocar problemas técnicos ou tão difíceis de dissolver que a capacidade de absorção no corpo humano é baixa.

Várias tentativas foram feitas para fornecer uma fonte de ferro biodisponível estável para fortificar pela suar encapsulação com um composto inerte para protegê-la da oxidação e minimizar o efeito organoléptico. No entanto, a encapsulação de vários sais de ferro com óleo de soja hidrogenado, mono e diglicerídeos ou etil celulose, embora forneçam alguma proteção para o sal de ferro, se tornaram inadequados para a fortificação de certos produtos alimentícios (conforme R.F. Hurrell e outros, "Iron fortification of infant cereals; a proposal for the use of ferrous fumarate or ferrous succinate", AM. J. Clin. Nutr., 1989, vol.49, p. 1274).

A EP-A-1694312 descreve partículas de sulfato ferroso monohidratado revestidas com uma camada de alginato de sódio. Para obter as partículas, uma solução de alginato de sódio é pulverizada na superfície das partículas de sulfato ferroso sólido sob agitação. Uma camada fina da solu-

ção de alginato é depositada nas partículas, favorecendo assim a formação de uma película de alginato de ferro revestindo o núcleo de sulfato de ferro não modificado. Quando em contato com a água, as partículas se dissolvem lentamente, liberando o núcleo de sulfato ferroso no meio. Consequentemente, essas partículas podem ser incorporadas aos alimentos desidratados, tais como farinha de trigo e outros cereais, mas eles não são adequados para fortificar produtos alimentícios que contenham água, tais como iogurtes ou sucos.

Adicionalmente, quelantes mostraram sua eficácia em aumentar a biodisponibilidade de sais férricos e ferrosos. A combinação de ferro e sais de sódio de EDTA é considerado um fortificante de ferro promissor. A ligação de EDTA com ferro é favorecida no meio ácido do estômago, mas no meio mais alcalino do duodeno o ferro é trocado, em parte, por outros metais. Em outros estudos com base em estudos animais e humanos, foi proposto que o ferro se dissocia do complexo EDTA no lúmen intestinal antes de ser absorvido, de forma que possa ser transportado pelo caminho DMT-1 transcelular altamente regulado. A combinação de ferro e EDTA tem também sido relatada como protegendo o ferro dos efeitos de outros inibidores de absorção de ferro, tais como fitatos ou polifenóis. Seu potencial como fortificante de ferro foi confirmado em cinco experiências de fortificação estendida executadas em países em desenvolvimento (L. Zhu e outros, "Iron dissociates from the NaFeEDTA complex prior to or during intestinal absorption in rats", J. Agric. Food Chem. 2006, vol 54, 7929-34). Alguns ácidos orgânicos de cadeia curta, tais como ácido tartárico, ácido málico, ácido succínico, e ácido fumárico mostraram aumento da biodisponibilidade de compostos de ferro de até 40 vezes mais em ensaios *in vitro* usando-se células CACO-2 (S. Salovaara e outros, "Organic acids influence iron uptake in the human epithelial Dell line Caco-2", J. Agric. Food Chem. 2002, vol 50, p. 6233). O mecanismo de ação proposto é análogo àquele do EDTA. O quelante se liga ao cátion de ferro, Fe(II) ou Fe(III), e evita sua precipitação devido a um pH básico ou a qualquer outro composto que armazene e precipite ferro. O ferro pode então se difundir para os enterócitos, onde pode ser absorvido.

Enquanto várias fontes de ferro já são conhecidas para fortificar alimentos, continua a ser necessário um agente de fortalecimento do ferro para produtos alimentícios que possam ser usados com produtos alimentícios hidratados e que tenham uma boa resistência mecânica, enquanto garantem uma alta biodisponibilidade em seres humanos e uma boa estabilidade do produto fortalecido durante sua armazenagem.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os inventores descobriram um produto fonte de ferro biodisponível com propriedades físicas melhoradas, que não é solúvel em água ou em meio ácido fraco, de forma que quando ele é adicionado a um alimento não sofra mudança de cor e não se torne rançoso, mesmo se contiver um alto teor de água. Ao mesmo tempo, o novo produto fonte de ferro é suficientemente solúvel no pH do estômago (que pode ser baixo da ordem de 1 em um estômago vazio), de modo a dar uma boa biodisponibilidade. Esse produto fonte de ferro é fácil de manusear, tem uma boa resistência mecânica, e é consistentemente reproduzível.

Assim, de acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecido um alimento fortificado compreendendo um produto fonte de ferro em forma de cápsulas sólidas, onde as cápsulas compreendem um núcleo compreendendo alginato de ferro, e uma camada externa compreendendo alginato de cálcio.

Outro aspecto da presente invenção é o uso de alimento fortificado com ferro conforme definido acima para evitar a ocorrência de deficiência de ferro ou reduzir a deficiência de ferro em um ser humano.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os termos "biodisponibilidade" e "biodisponível" se referem a uma extensão na qual um nutriente ou micronutriente pode ser absorvido e utilizado pelo corpo. Para o propósito da invenção, o sal de ferro usado para preparar o produto fonte de ferro na forma de cápsulas sólidas usadas no alimento fortificado com ferro da presente invenção deve ter uma boa biodisponibilidade, o que significa uma boa solubilidade do trato gastrointestinal. Consequentemente, os termos "sal de ferro biodisponível", "sal de ferro bio-

disponível solúvel em água" e "sal de ferro solúvel em água", conforme usados aqui, se referem a qualquer sal de ferro que seja livremente solúvel em água, tal como sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso e citrato férrico de amônio, bem como a qualquer sal de ferro que seja lentamente solúvel em água mas prontamente solúvel em ácidos diluídos, tais como fumarato ferroso, succinato ferroso e sacarato férrico.

Sais alginato solúveis em água, tais como alginato de sódio, potássio, magnésio ou amônio são polissacarídeos lineares naturais de algas marinhas marrons compostas de dois tipos de monômeros, resíduos de ácido beta-D-manurônico (M) e ácido alfa-L-gulurônico (G) arranjados em uma forma irregular e em blocos ao longo da carreira. O biopolímero que transporta grupos carboxílicos é capaz de formar complexos com íons polivalentes metálicos.

Quando um sal de ferro solúvel em água entra em contato com um sal alginato solúvel em água, ocorre encadeamento cruzado e gelificação de grupos carboxílicos do alginato pela reação com os cátions de ferro, tais como Fe^{2+} ou Fe^{3+}.

Foi descoberto que quando um núcleo compreendendo alginato de ferro é colocado em contato com uma solução aquosa de um sal de cálcio, uma cápsula (formada pelo núcleo coberto com uma camada externa compreendendo alginato de cálcio) é formada pela reação do sal alginato com os cátions de cálcio. A camada externa, não sendo solúvel em água ou em ácidos fracos, evita o contato do ferro com o ambiente enquanto aumenta a resistência mecânica das cápsulas. Esse produto fonte de ferro na forma de cápsulas sólidas é adequado para fortificar alimentos hidratados.

De modo geral, o alimento que deve ser fortificado com o produto fonte de ferro acima mencionado na forma de cápsulas sólidas é um alimento ou bebida, particularmente um alimento ou bebida que seja sensível à oxidação, desenvolvimento de sabor insípido, ou descoloração na presença de ferro livre. Particularmente, o produto fonte de ferro pode ser usado para fortificar alimentos hidratados, tais como iogurte, leite, caldos, molhos, sucos, e outras bebidas, bem como alimentos comumente fortificados, tais co-

mo produtos em pó, farinha de trigo e outro cereais e alimentos daí preparados, tais como pães, massas e bolos. Exemplos adicionais de alimentos adequados para serem fortificados de acordo com a invenção são emulsões à base de carne, tais como salsichas.

Quando da formação do núcleo, se a quantidade de sal de ferro for maior que a necessária para reagir com todos os monômeros de sal alginato, o sal de ferro ficará preso no gel formado. Por outro lado, se a quantidade de sal alginato solúvel em água for maior que a necessária para reagir com todos os cátions polivalentes disponíveis, o sal alginato solúvel em água também formará parte do gel obtido. Consequentemente, em uma configuração do primeiro aspecto da presente invenção, o núcleo também compreende pelo menos um sal de ferro biodisponível. Em outra configuração do mesmo aspecto da invenção, o núcleo também compreende pelo menos um sal alginato solúvel em água, tal como alginato de sódio, potássio, magnésio ou amônio. Preferivelmente, o sal alginato solúvel em água é alginato de sódio.

Sais de ferro solúveis em água melhoram a biodisponibilidade do ferro e são, portanto, preferidos. Assim, preferivelmente o sal de ferro biodisponível é um sal de ferro livremente solúvel em água, tal como sulfato ferroso, gluconato ferroso, lactato ferroso, e citrato férrico de amônio, ou um sal de ferro lentamente solúvel em água, mas prontamente solúvel em ácidos diluídos, tais como fumarato ferroso, succinato ferroso, e sacarato férrico. Preferivelmente, o sal de ferro biodisponível é selecionado entre sulfato ferroso e sacarato férrico. Mais preferivelmente, o sal de ferro biodisponível é sacarato férrico.

Adicionalmente, conforme mencionado acima, quelantes mostraram sua eficácia em aumentar a biodisponibilidade de sais férricos e ferrosos.

Consequentemente, em uma configuração do primeiro aspecto da presente invenção, o núcleo também compreende um quelante. Preferivelmente, o quelante é selecionado do grupo consistindo de ácido tartárico, málico, succínico, fumárico, cítrico, láctico e oxálico, ou um de seus sais,

EDTA e sacarose. Mais preferivelmente o agente quelante é sacarose. A combinação de um sal ferroso ou férrico e um quelante para formar um núcleo compreendendo alginato de ferro com uma camada externa compreendendo alginato de cálcio conforme a presente invenção melhora a biodisponibilidade do ferro, enquanto sendo capaz de mantê-lo isolado de seu ambiente fora do trato gastrointestinal, evitando a degradação da matriz contendo o ferro e o gosto ruim associado com os sais de ferro usados na fortificação. Conforme mencionado acima, o sacarato férrico está incluído entre os sais de ferro solúveis em água usados na presente invenção, embora estritamente falando seja um complexo de sacarose hidróxido férrico. O uso de sacarato férrico como sal de ferro incorpora as vantagens do quelante pela presença de sacarose.

O produto fonte de ferro mencionado é produzido pelo processo a seguir compreendendo as etapas de (i) formar um núcleo compreendendo alginato de ferro pelo contato com pelo menos um sal de ferro solúvel em água biodisponível e pelo menos um sal alginato solúvel em água, (ii) contatar o núcleo com uma solução aquosa de um sal de cálcio de uma concentração compreendida entre 0,025 M e uma concentração abaixo do ponto de saturação da solução, e (iii) isolar as cápsulas sólidas obtidas. Preferivelmente, o pelo menos um sal de ferro biodisponível usado para formar o núcleo é sacarato férrico. Também, preferivelmente, o pelo menos um sal alginato usado para formar o núcleo é alginato de sódio.

O núcleo usado para se obter a cápsula pode ser formado depositando-se o pelo menos um sal alginato solúvel em água na superfície das partículas do pelo menos um sal de ferro. Qualquer operação que permita a deposição de uma película de alginato nas partículas de sal de ferro pode ser empregada. Preferivelmente, é executado pulverizando-se a solução de sal alginato através de um bocal de pulverização nas partículas de sal de ferro mantidas sob agitação em um equipamento convencional para agitar sólidos. Equipamentos tais como chapas inclinadas ou cilindros giratórios, que podem ou não ser fornecidos com hélices de agitação auxiliares de leito fluidizado, cuja temperatura é controlada, onde as partículas são mantidas

movendo para cima e para baixo por uma corrente de ar que permeia o leito de partículas são indicados nessa operação.

O produto fonte de ferro é preferivelmente preparado por (i) formar o núcleo pela dissolução ou suspensão de pelo menos um sal de ferro biodisponível em uma solução aquosa de pelo menos um sal alginato solúvel em água para obter um gel, (ii) adicionar lentamente o gel obtido em uma solução aquosa de um sal de cálcio de uma concentração compreendida entre 0,025 M e uma concentração abaixo do ponto de saturação da solução, sob vigorosa agitação, e (iii) filtrar e lavar com água as cápsulas sólidas obtidas.

Quando o núcleo interno compreendendo alginato de ferro é formado pela dissolução ou suspensão de pelo menos um sal de ferro em uma solução aquosa de pelo menos um sal alginato, o encadeamento cruzado do alginato pelos cátions de ferro é produzido através do núcleo, o que torna o próprio núcleo sendo menos solúvel em água e tendo uma maior resistência mecânica. Para formar o núcleo, uma concentração de alginato de sódio acima de 0,6% (w/w) é necessária (ou a concentração equivalente quando é usado outro sai alginato solúvel em água). Assim, preferivelmente o pelo menos um sal alginato é alginato de sódio e sua concentração na solução aquosa é de pelo menos 0,6% (w/w). Menores concentrações levam a soluções viscosas, mas não à formação de cápsulas sólidas. O limite superior para a concentração de sal alginato usado é fixado pela sua solubilidade na água e pela viscosidade da solução alginato resultante.

A concentração do sal de ferro usado na produção do núcleo pode ser escolhida à vontade. Menores concentrações de ferro levarão a cápsulas pobres em ferro, enquanto concentrações maiores levarão a cápsulas com uma maior carga de ferro. O limite superior para a concentração de sal de ferro usado é fixado pela sua solubilidade em água. Resultados completamente satisfatórios foram alcançados usando-se ambos os sais ferroso e férrico, em faixas de concentração de até 1 M. A mistura do sal de ferro com a solução aquosa de alginato é executada sob vigorosa agitação para evitar que a mistura resultante se torne muito viscosa ou a formação de

precipitados.

Quando, subsequentemente, a mistura em forma de um gel do ferro e sal de alginato é lentamente adicionada em uma solução compreendendo o sal de cálcio para fornecer o núcleo com a camada externa compreendendo alginato de cálcio, são obtidas cápsulas com uma resistência mecânica particularmente boa. Uma concentração mínima de cálcio acima de 0,025M é necessária para formar as cápsulas. A concentração máxima não é crítica, uma vez que é uma concentração abaixo do ponto de saturação da solução. Será facilmente entendido por qualquer pessoa versada na técnica que o ponto de saturação da solução, isto é, o ponto de concentração máxima, depende da temperatura do líquido bem como a natureza química das substâncias envolvidas.

A concentração de cálcio durante a preparação pode ser usada para ajustar a concentração final de cálcio nas cápsulas. Enquanto se adiciona o núcleo da cápsula de ferro/alginato na solução de sal de cálcio, um equipamento de moagem pode ser usado para reduzir o tamanho das cápsulas. Nos exemplos abaixo, um homogenizador em escala de laboratório foi usado para tornar as cápsulas sólidas em uma pasta arenosa. Finalmente as cápsulas obtidas são filtradas e completamente lavadas com água para remover qualquer cátion metálico livre.

O produto fonte de ferro definido acima pode ter um amanho de partícula suficientemente pequeno para permitir uma boa mistura e não provocar sua segregação quando adicionado ao alimento a ser fortificado, bem como ter o menor impacto organoléptico no alimento final fortificado. Assim, o tamanho de partícula preferido das cápsulas da invenção dependerá do alimento a ser fortificado.

O processo para a preparação do produto fonte de ferro usado para fortificar alimentos hidratados permite controlar o tamanho de partícula das cápsulas obtidas pelo equipamento de moagem, usado (quanto mais fino o equipamento de moagem, mais finas as cápsulas). No processo de produção, agregados macroscópicos das cápsulas podem ser formados, tais como aglomerados tendo tamanhos da ordem de 0,1 – 1 mm, embora enti-

dades muito menores sejam também obtidas correspondendo a agregados de um número reduzido de cápsulas, ou cápsulas isoladas. Assim, adicionalmente a classificação do tamanho de partícula das cápsulas pode ser executada através de peneiração do produto acabado, para eliminar as partículas brutas. O processo de produção das cápsulas permite produzir um pó muito fino com cápsulas dificilmente visíveis. Preferivelmente, o tamanho médio do produto fonte de ferro, que pode estar na forma de cápsulas ou de algum pequeno agregado das cápsulas, está compreendido na faixa de 5 a 20 μm, embora cápsulas ainda menores possam ser formadas.

As cápsulas que definem o produto fonte de ferro usado para fortificar alimento hidratado são caracterizadas por uma excelente capacidade de carga. Além disso, elas têm uma boa estabilidade sob condições locais padrão de armazenagem e uso. Assim, elas afetam significativamente a aparência, o gosto e as qualidades o alimento fortificado. Adicionalmente, elas provaram ser inócuas ao corpo humano, isto é, elas não são tóxicas quando administradas oralmente, sendo sua citotoxicidade ainda menor que aquela do sal de ferro livre que elas compreendem. Portanto, essas cápsulas são bem adequadas para fortificação de alimentos uma vez que elas são estáveis por um longo período de tempo na matriz de alimentos, e são capazes de liberar o componente de ferro solúvel em água quando eles entram no trato gastrointestinal.

A quantidade de ferro e cálcio presente nas cápsulas pode ser obtida inicialmente solubilizando as cápsulas e submetendo a solução a técnicas de espectroscopia atômica para quantificação. Os altos níveis de ferro nas cápsulas permitem a fortificação de alimentos para garantir a absorção desejada de ferro pelo organismo mesmo pela adição de pouca quantidade de produto fortificante.

O produto fonte de ferro usado para fortificar alimentos pode ser adicionado como um agente de fortificação com ferro tanto para alimentos desidratados, tal como farinha de trigo e outros cereais e alimentos preparados a partir deles, tais como pães, massas e bolos, e alimento hidratado, tal como iogurte, leite, caldos, molhos, sucos, e outras bebidas.

A resistência mecânica particularmente boa juntamente com a não solubilidade em água ou em meio ácido fraco das cápsulas, torna o produto fonte de ferro particularmente adequado para fortificar alimentos que são submetidos a processos de produção agressivos e/ou a condições agressivas no próprio alimento, tal como alto teor de água e um ambiente ácido, como seria o caso de fortificação de iogurte.

A possível incorporação de cápsulas a um transportador de alimentos foi testada usando-se iogurte. O iogurte é bem aceito pela maioria dos grupos de população com uma maior inclinação para deficiência em ferro. Portanto, fortificar iogurtes seria uma excelente forma de combater a anemia por deficiência de ferro. As condições adversas que as cápsulas podem encontrar no iogurte servem como uma indicação da capacidade das cápsulas para proteger o ambiente da presença de uma fonte de ferro solúvel. Um dos problemas em alimentos ricos em gordura fortificados com uma alta concentração de ferro e a oxidação da gordura e o desenvolvimento de um gosto rançoso. Isto não apenas reduz a aceitação do consumidor do alimento, mas também diminui seu valor nutricional.

Conforme descrito nos exemplos abaixo, um iogurte fortificado foi preparado usando-se o produto fonte de ferro na forma de cápsulas da presente invenção. As cápsulas de ferro foram adicionadas ao leite, e então foram executadas a pasteurização, a homogeneização e a fermentação pela incorporação de um fermento. Os resultados dos ensaios executados mostraram que as cápsulas foram capazes de superar as dificuldades descobertas na fortificação do iogurte (tanto no processo de produção quanto nas propriedades do próprio transportador), uma vez que o produto final era tanto visualmente (nem mudanças relevantes na cor ou na aparência) quanto organolepticamente (nenhum ranço ou gosto metálico foi notado) comparável a um iogurte não fortificado. Adicionalmente, o iogurte fortificado compreendendo o produto fonte de ferro da presente invenção, provou ter uma boa estabilidade durante sua armazenagem. Consequentemente, transportadores mais suaves proporiam um desafio mais fácil.

De acordo com uma configuração preferida, o alimento fortifica-

do com ferro conforme a invenção é iogurte.

Em outra configuração preferida, o alimento fortificado com ferro conforme a invenção é leite.

Em uma outra configuração preferida, o alimento fortificado com ferro conforme a invenção é uma bebida.

Em uma outra configuração preferida, o alimento fortificado com ferro conforme a invenção é uma emulsão à base de carne.

Em uma outra configuração preferida, o alimento fortificado com ferro conforme a invenção é salsicha.

Além disso, a presente invenção cobre todas as possíveis combinações de grupos particulares e preferidos descritos acima.

Dadas faixas, tais como temperaturas, tempos, tamanhos e similares, devem ser consideradas como aproximadas, a menos que expressas especificamente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra a evolução do peso corporal em gramas dos animais no grupo placebo (B) e aqueles que tomaram as cápsulas (C). O eixo x representa o tempo em dias e o eixo y o peso em gramas.

A figura 2 mostra a evolução de entrada do alimento em gramas por dia e a gaiola para o grupo placebo (B) e o grupo que tomou a cápsula (C),

A figura 3 mostra a evolução da entrada de água em gramas/dia e a gaiola para o grupo placebo (B) e o grupo que tomou as cápsulas (C).

A figura 4 mostra o percentual de liberação de ferro (% de Fe) em quatro diferentes condições de armazenagem, onde RT = armazenagem à temperatura ambiente, 37°C = armazenagem a 37°C, w = armazenagem em solução aquosa, d = armazenagem sem solvente. O eixo x representa o tempo em meses.

A figura 5 mostra a porcentagem de liberação de cálcio (% de Ca) nas quatro condições diferentes de armazenagem conforme mencionadas acima. O eixo x representa o tempo em meses.

A figura 6 mostra a razão de cátions metálicos liberados no meio

(%Fe/%Ca) após meio mês e um mês nas quatro diferentes condições de armazenagem conforme mencionadas acima.

A figura 7 descreve esquematicamente a liberação de metais da região próxima à superfície de: (A) as cápsulas tendo um núcleo interno compreendendo alginato de ferro, e uma camada externa compreendendo alginato de cálcio (representado pela área embarras diagonais) e (B) uma partícula na qual ambos os metais são homogeneamente distribuídos na matriz alginato.

A figura 8 mostra os períodos de amamentação, indução de anemia e recuperação de anemia para os quais os animais foram testados no estudo *in vivo* de biodisponibilidade.

A figura 9 mostra o aumento de peso durante o período de recuperação de anemia. O tempo em dias é mostrado no eixo horizontal, e o peso em gramas no eixo vertical. Grupos: M = Macho, F = Fêmea, - = controle negativo, + = controle positivo, c = cápsulas.

Objetivos adicionais, vantagens e características novas da invenção serão apresentadas em parte na descrição, e em parte se tornarão aparentes para as pessoas versadas na técnica no exame da descrição ou podem ser descobertas pela prática da invenção. Os exemplos e desenhos a seguir são fornecidos apenas como ilustração, e não pretendem limitar a presente invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 – Processo de preparação de cápsulas Fe/Ca

Em uma solução de 1,5 g de alginato de sódio em 100 ml de água foram dissolvidas 7,96 g de sacarato férrico (aprox. 35% de Fe). Usando-se um funil de extração, a mistura alginato de sódio/sacarato férrico foi adicionada em gotas a 300 ml de uma solução aquosa 0,5M de $CaCl_2$. Durante a adição em gotas, a suspensão de cápsula formada foi agitada usando-se um homogenizador de laboratório (Diax 900, Heidolph Instruments GmbH). As cápsulas sólidas obtidas foram separadas por filtração sob vácuo. As cápsulas foram suspensas três vezes em água destilada para remover qualquer sal solúvel e filtradas novamente sob vácuo. Foram obtidas 30

g de cápsulas úmidas (cápsula 0),

O mesmo processo foi executado usando-se ou cloreto férrico ou sulfato ferroso hept-hidrato como sal de ferro, em vez de sacarato férrico. As cápsulas seguintes foram preparadas com sucesso usando qualquer um dos três diferentes sais de ferro mencionados e também diferentes concentrações dos três componentes principais (isto é, sal de ferro, sal alginato e sal de cálcio):

Cápsula 1: Sacarato férrico (35% de ferro) 1M, $CaCl_2$ 0,1M, alginato de sódio 1,5%

Cápsula 2: Sacarato férrico (35% de ferro) 1M, $CaCl_2$ 0,1M, alginato de sódio 3,0%

Cápsula 3: Sacarato férrico (35% de ferro) 1M, $CaCl_2$ 1M, alginato de sódio 1,5%

Cápsula 4: Sacarato férrico (35% de ferro) 1M, $CaCl_2$ 1M, alginato de sódio 3,0%

Cápsula 5: $FeSO_4.7H_2O$ 1M, $CaCl_2$ 0,1M, alginato de sódio 1,5%

Cápsula 6: $FeSO_4.7H_2O$ 1M, $CaCl_2$ 0,1M, alginato de sódio 3,0%

Cápsula 7: $FeSO_4.7H_2O$ 1M, $CaCl_2$ 1M, alginato de sódio 1,5%

Cápsula 8: $FeSO_4.7H_2O$ 1M, $CaCl_2$ 1M, alginato de sódio 3,0%

Cápsula 9: $FeSO_4.7H_2O$ 0,1M, $CaCl_2$ 0,1M, alginato de sódio 1,5%

Cápsula 10: $FeSO_4.7H_2O$ 0,1M, $CaCl_2$ 0,1M, alginato de sódio 3,0%

Cápsula 11: $FeSO_4.7H_2O$ 0,1M, $CaCl_2$ 1M, alginato de sódio 1,5%

Cápsula 12: $FeSO_4.7H_2O$ 0,1M, $CaCl_2$ 1M, alginato de sódio 3,0%

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

Cápsula 14: $FeCl_4$ 0,1M, $CaCl_2$ 1M, alginato de sódio 1,5%.

As cápsulas obtidas tiveram uma cor dependente do sal de ferro empregado. A baixa liberação de cátions das cápsulas os torna insípidos e suspensivos em água.

Exemplo 2. Tamanho de partícula do produto fonte de ferro

Para estimar o tamanho das cápsulas preparadas no exemplo 1 (Cápsulas 1-14), foi usado um microscópio ótico calibrado para medir comprimentos. Em todos os casos, agregados macroscópicos das cápsulas fo-

ram claramente visíveis mesmo a olho nu, e mais claramente usando-se o ,microscópio. Embora esses agregados tenham tamanhos da ordem de 0,1-1 mm, entidades muito menores puderam ser observadas, provavelmente agregados de um número reduzido de cápsulas, ou de cápsulas isoladas.

Uma porção pequena, dificilmente visível, da amostra da cápsula foi colocada em uma lâmina de microscópio rotulada. Uma gota de água foi adicionada às cápsulas. A suspensão foi suavemente agitada com a ajuda de uma faca metálica, e um vidro de cobertura foi colocado no topo de cada lâmina do microscópio. Cada amostra foi observada usando-se um microscópio ótico (Nikon Eclipse E800, Nikon Corp., Tokio, Japan) com uma objetiva 20x e uma ocular 10x. Foi selecionada uma região para cada amostra onde ou cápsulas individuais ou grupos menores de cápsulas puderam ser observadas. Essa região foi fotografada usando-se uma câmera digital (Soft Imaging Systems, Colorview II) conectada a um PC que executa um analisador de imagens (analySIS3.0, Softimaging System Corp., Lakewood Co.). Uma régua calibrada foi superposta em cada imagem para referência de tamanho.

As imagens registradas mostraram que o tamanho das cápsulas e de alguns dos agregados menores estava geralmente próximo de 20 μm, em alguns casos descendo a menos de 5 μm. Cápsulas maiores podem também ser obtidas usando-se equipamento de moagem mais bruto, embora cápsulas mais finas sejam usualmente preferidas para fortificação de alimentos.

EXEMPLO 3. Caracterização da cápsula

0,3 g de cápsulas úmidas foram dissolvidas em um forno de micro-ondas em ácido nítrico concentrado. A concentração de ferro e cálcio foi quantificada usando-se ICP-OES (Espectroscopia de Emissão de Plasma Ótico Acoplado Indutivamente).

A quantidade de ferro e cálcio nas cápsulas foi raramente dependente do grupo nas cápsulas analisadas. Dois grupos de cápsulas foram preparados de acordo com o exemplo 1 (Cápsula 0). As concentrações de ferro e cálcio expressas como percentual em peso (± desvio padrão) nos

dois grupos estão mostradas na tabela 1 abaixo.

Tabela 1

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

Em ambos os grupos não apenas foram alcançados resultados muito semelhantes, mas também foi observada uma excelente capacidade de carga das cápsulas.

EXEMPLO 4. Citotoxicidade da cápsula

Um teste *in vitro* foi usado para verificar a ausência de toxicidade das cápsulas da invenção contendo um sal de ferro. O teste envolveu a incubação de células da linha de células HELA com as substâncias contra as quais a citotoxicidade ia ser testada, esse teste sendo comumente usado como forma de verificar a toxicidade. Os compostos testados incluíram as cápsulas, bem como seus principais constituintes separadamente: o sal de ferro usado nas cápsulas (sacarato férrico), e alginato de sódio. Um controle negativo, que conteve apenas o crescimento médio HELA, foi também preparado e usado como crescimento de referência.

O meio de teste foi preparado sob condições estéreis. Cápsulas preparadas como no exemplo 1 (Cápsula 0; grupo 2 do Exemplo 3) foram esterilizadas em um autoclave (20 min, 110°C). Usando material esterilizado, 72 mg de cápsulas (,meio de cápsulas) , 17 mg de sacarato férrico (meio de sal de ferro) e 18 mg de alginato de sódio (meio de alginato) foram dissolvidos cada um em 50 ml de meio de crescimento HELA. As cápsulas foram insolúveis e permaneceram como uma suspensão. Diluições de 1:1, 1:10;e 1:100 de cada um dos meios de teste foram preparados pela diluição das quantidades de cápsulas a seguir; sal de ferro ou meio alginato com meio de crescimento HELA novo:

1:1 20 μl de meio HELA novo

1:10 2 μl + 18 μl de meio HELA novo

1:100 0,2 μl + 19,8 μl de meio HELA novo

As cápsulas 1:1 e as soluções de sal de ferro tiveram quase a mesma concentração de ferro |(0,285 mg ferro/ml e 0,297 mg ferro]ml respectivamente). O mesmo é válido para suas diluições 1:10 e 1:100.

3500 células HeLa foram cultivadas em 36 poços de duas placas de 96 poços: o controle de poço 9 e 27 para triplicação da concentração 3 de três produtos. O meio foi adicionado a cada poço até 100 µl. As células foram incubadas a 37°C por 24 horas. 20 µl de cada meio de teste e 80 µl de meio novo foram adicionados a cada poço. Nos controles apenas 100 µl de meio novo foram adicionados. Uma das chapas foi incubada por 24 horas e a outra por 72 horas. A viabilidade das células foi medida após 24 horas e 72 horas de incubação usando-se a proliferação de células não radiativas EZ4U e o ensaio de toxicidade (Biomédica Medizinproducte GmbH).

Os resultados foram expressos em percentual de crescimento em relação aos controles, isto é, como percentual de viabilidade, que é computado como o número de células vivas em qualquer das soluções do teste (cápsulas, sacarato férrico ou alginato de sódio) dividido pelo número de células vivas no controle negativo, e expresso como porcentagem. Os resultados, mostrados na tabela 2 abaixo, revelam que a citotoxicidade do ferro encapsulado é menor que a do ferro livre. Levando em conta que o sacarato férrico é um suplemento alimentar seguro, também o é na forma encapsulada. Nenhuma toxicidade foi observada também para o alginato de sódio.

Tabela 2

	% de Viabilidade 24h		
	1:1	1:10	1:100
Cápsulas	82,5% □ 2,8	98,7 ± 12,4	100,5 ± 7,5
Sal de ferro	76,3% ± 9,7	101,7 ± 8,5	95,7 ± 3,2
Alginato de sódio	87,9 ± 6,6	85,8 ± 6,6	79,9 ± 1,7
	% de Viabilidade 72 h		
Cápsulas	65,7 ± 8,8	85,2 ± 12,7	80,9 ± 18,6
Sal de ferro	66,8 ± 23,0	62,0 ± 15,7	68,7 ± 15,3
alginato de sódio	74,2 ± 6,7	91,7 ± 16,4	80,2 ± 14,7

EXEMPLO 5. Toxicidade aguda da cápsula

Um teste *in vivo* foi usado para acessar a ausência de toxicidade em ratos em uma dose 100 vezes maior que a esperada em seres humanos. A dose de referência nos humanos foi tomada como dois terços da RDI (Dosagem diária recomendada) para um ser humano de 70 kg (0,14 mg Fe/kg de peso corporal). Portanto, uma dose de 14 mg Fe/kg de peso corporal foi usada no estudo de toxicidade aguda em ratos.

As cápsulas de ferro usadas nesse teste foram produzidas como no exemplo 1 (cápsula 0; grupo 2 do Exemplo 3). Como as cápsulas foram feitas para serem ingeridas por animais vivos, elas foram produzidas em condições estéreis, para evitar a contaminação das cápsulas pelos microorganismos patogênicos.

Os animais usados estão descritos abaixo:

- espécie e linhagem: Rato, Sprage-Dawley (SD), Crl:CD fornecido por Charles River Laboratories, França

- Número e tipo de animais: 12 fêmeas de rato nulíparas e não gestantes.

- Idade (quando tratadas): 2 semanas

- Peso (quando tratadas): 172 – 193 g

- Critério de inclusão: ± 20% do peso médio no inicio do estudo.,

- Grupos: Os animais foram distribuídos em dois grupos (controle e teste) com base em uma distribuição igual de peso nos grupos.

A linha de tempo do estudo foi como segue:

- Dia -5: Os ratos entram nas dependências. Início da quarentena na sala de quarentena.

- Dia -3: Fim da quarentena. Período de aclimatação começa na sala definitiva.

- Dia 0: Administração do placebo ou das soluções de teste. Início do estudo.

- Dia 14: Fim do estudo. Eutanásia usando pentobarbital e necrópsia.

Os ratos passaram dois dias na sala de quarentena, e depois

três dias na sala definitiva para aclimatação. As condições padrão de tabulação foram 20-24°C, 30-70% de umidade relativa (RH) e mais de 15 mudanças de ar por hora. A temperatura e a umidade foram constantemente monitoradas. Foi aplicado um ciclo de luz de 12 horas de luz fluorescente e 12 horas de escuridão. Os animais (dois por gaiola) foram alimentados e providos de água (água de torneira descalcificada, filtrada e irradiada com luz UV) *ad libitum*.

A administração das cápsulas e placebo, e as observações executadas estão descritas abaixo:

Volume administrado: 2 mg/kg de peso corporal foram administrados uma vez (dia 0 do estudo). O grupo de controle recebeu apenas o meio de transporte (água destilada) enquanto o grupo de teste recebeu 87 mg/ml de uma suspensão das cápsulas (14 mg/kg corporal de ferro).

Intervalo de administração: O tempo passado entre o início da administração de um primeiro animal e o fim da última foi de 45 minutos.

Mortalidade e morbidez: Ambos foram verificados diariamente até o dia 0, 5, 15, 30 minutos e 2, 4, 6 e 8 horas após a administração, e diariamente até o dia 14.

Peso corporal: Registrado diariamente desde o dia 3. No dia 0 os animais foram pesados antes de serem administrados.

Entrada de alimentos e água: Registradas três vezes por semana (nas segundas, quartas e sextas), começando no dia 3.

Sintomas clínicos: Checados após 5, 15, 30 e 90 minutos, 2, 4, 6 e 8 horas após a administração, e diariamente por outros 13 dias.

Todos os procedimentos usados nesse estudo estão baseados em, e seguem estritamente, a seguinte legislação: European Commission Directive 2003/63/EC, 25 de junho de 2003, que modifica a 2001/83/EC relativa a produtos médicos para uso em seres humanos. Os procedimentos e a instalação estabulária estão em estrita concordância com os requisitos para a proteção dos animais usados na experiência.

- European Commission Directive 2003/63/EC
- European Directive 89/609/EEC

- Spanish *Real Decreto* 1201/2005
- FELASA guides
- Documento OECD ENV/JM/MONO (2ppp)7

Os parâmetros mencionados anteriormente foram verificados para cada um dos ratos, e os grupos suplementados e placebo comparados usando-se um teste-t de estudante com alfa < 0,05 (se aplicado). Nenhuma mortalidade espontânea foi observada em qualquer um dos animais. Nenhum sinal clínico significativo indicando a necessidade de sacrifício foi observado em qualquer um dos animais durante o período de observação de 14 dias. Nenhuma diferença significativa foi observada ou no peso corporal (vide a tabela 3 abaixo, onde os valores médios são obtidos dos resultados com 6 animais; A figura 1) ou na entrada de água e alimento (vide tabela 4 abaixo, onde os valores médios são obtidos dos resultados com 3 grupos de animais (3 gaiolas), a figura 2 e a figura 3 respectivamente entre os grupos suplementado e não suplementado. Valores entre parênteses indicam, desvio padrão. As observações microscópicas *post-mortem* foram similares nos grupos suplementados e não suplementados.

Tabela 3

Evolução do peso corporal em gramas dos animais no grupo placebo (placebo) e naqueles que tomaram as cápsulas (cápsulas)

Dia	Placebo	Cápsulas
	Meio (g)	Meio (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)

Dia	Placebo	Cápsulas
	Meio (g)	Meio (g)
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)

Tabela 4

Evolução da entrada de alimentos em gramas por dia e gaiola para o grupo placebo (placebo) e para o grupo que tomou as cápsulas (cápsulas)

Dia	Placebo	Cápsulas
	Meio (g)	Meio (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)

Tabela 5

Evolução da entrada de água em gramas por dia e gaiola para o grupo placebo (placebo) e o grupo que toma as cápsulas (cápsulas)

Dia	Placebo	Cápsulas
	Meio (g)	Meio (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)

Dos resultados mencionados anteriormente, pode ser concluído que devido à falta de mortalidade ou quaisquer sinais clínicos relevantes, o produto testado não causa toxicidade aguda e não é tóxico quando administrado oralmente a ratos fêmeas Sprage-Dawley com oito semanas de vida a uma dose de ferro equivalente de 14 mg/kg corporal.

EXEMPLO 6. Estabilidade da cápsula

A capacidade das cápsulas de evitarem a liberação de sua carga útil durante a armazenagem foi testada em diferentes condições, próximas daquelas que podem ser encontradas em diferentes meios para ser suplementada com as cápsulas. As cápsulas foram divididas em quatro grupos, e cada grupo submetido a diferentes condições.

1. Armazenagem à temperatura ambiente (TA); solução aquosa
2. Armazenagem à temperatura ambiente; cápsulas sólidas
3. Armazenagem a 37°C; solução aquosa
4. Armazenagem a 37°C; cápsulas sólidas

As duas condições diferentes em relação ao teor de água foram escolhidas para simular os dois ambientes extremos que as cápsulas são mais passíveis de encarar: alimentos líquidos ou alimentos com um alto teor de água, e alimentos secos ou alimentos com um baixo teor de água. Como alimentos ou suplementos alimentícios são geralmente armazenados à temperatura ambiente ou inferior, e como quanto mais alta a temperatura mais agressivo é o ambiente, as experiências foram executadas à temperatura ambiente. Uma temperatura mais alta foi também escolhida para extrapolar tempos mais longos a uma temperatura mais baixa e para simular o comportamento das cápsulas em condições mais estritas que aquelas que elas são passíveis de encontrar.

As cápsulas de ferro usadas foram produzidas como no exemplo 1 (Cápsula 0; grupo 2 do Exemplo 3). Qualquer traço de ferro do material plástico ou de vidro usado nas experiências foi removido deixando-se os mesmos submersos durante a noite em uma solução a 10% (v/v) de ácido clorídrico concentrado ou ácido nítrico, e lavando-se 5 a 6 vezes com abundante água mili-Q. Duas amostras e um placebo foram preparados para ca-

da análise nas condições estéreis, pesando-se cerca de 120 mg de cápsulas (exceto nos placebos) e adicionando-se 15 ml de água destilada (exceto nas experiências com "cápsulas sólidas"). Cada amostra foi mantida selada à temperatura ambiente ou a 37°C por 0, 0,5 ou 1 mês. Após 0, 0,5 ou 1 mês, 15 ml de água destilada foram adicionados às amostras de "cápsulas sólidas". Todas as amostras analisadas foram então filtradas para remover o sólido, e o ferro e o cálcio liberados foram quantificados no material sobrenadante usando-se ICP-AOS.

A liberação de ferro e cálcio das cápsulas foi usada como um indicador da estabilidade das cápsulas. Quanto menos ferro for liberado, melhor a capacidade das cápsulas de manter a carga útil dentro das cápsulas, e proteger tanto o ambiente de ser degradado pelo ferro quanto o ferro de ser capturado pelo ambiente. A liberação de ferro (valor médio das duas amostras) nas quatro diferentes condições de armazenagem está mostrada na tabela 6 abaixo (veja também a figura 4). Valores entre parênteses indicam desvio padrão.

Tabela 6 – Liberação de ferro

	% de Fe liberado			
Meses	***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 (0,0068)	-
6,0	-	0,288 ()	-	0,050 ()
12,0	-	0,337 (0,134)	-	0,376 (0,062)

TA = armazenagem à temperatura ambiente, 37C = armazenagem a 37°C, w = solução aquosa, d = armazenagem sem solvente.

Dos valores da liberação da carga útil de ferro das cápsulas mostrados acima pode ser visto que a estabilidade das cápsulas é excelente. Para as condições mais difíceis, apenas menos de 1,4% do ferro encapsulado é liberado. Comparando-se a taxa de liberação em diferentes condi-

ções pode ser visto como a presença de água e a temperatura de armazenagem afetam a estabilidade das cápsulas. A tendência é muito clara entre os quatro grupos. O aumento da temperatura (37°C em vez da temperatura ambiente, aproximadamente 20-25°C) aumenta a taxa de liberação, uma vez que ele tem mais água em contato com as cápsulas. Dos resultados anteriores pode também ser visto que o efeito de adicionar água às cápsulas ou mantê-las em um ambiente com uma alta atividade de água tem um efeito mais forte na taxa de liberação de ferro que o aumento da temperatura da temperatura ambiente para 37°C. As boas taxas de liberação alcançadas mantendo as cápsulas em solução aquosa e a 37°C são ainda melhoradas quando a temperatura é reduzida para temperaturas mais realísticas. À temperatura ambiente, a taxa máxima de liberação é de apenas 0,5410% ± 0,0050 após o primeiro mês. O desempenho das cápsulas se torna próxima da excelente se elas forem mantidas também à temperatura ambiente, mas em um ambiente de baixa atividade aquática: nenhuma liberação de ferro foi detectada para as primeiras duas semanas (liberação de ferro foi abaixo de 0,017%) e apenas 0,037% ± 0,011 da carga útil foram perdidos no ambiente após um mês de armazenagem.

O resultado é um pouco diferente para a quantidade de cálcio liberada, como está mostrado na tabela 7 abaixo (vide também a figura 5). Valores entre parênteses indicam desvio padrão.

Tabela 7. Liberação de cálcio

	% de Ca liberado			
Meses	***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)

TA = armazenagem à temperatura ambiente, 37C = armazena-

gem a 37°C, w = solução aquosa, d = armazenagem sem solvente.

A fração de cálcio liberada no ambiente é mais que dez vezes maior que a do ferro, mostrando que a capacidade das cápsulas de manterem os metais dentro é muito melhor para o ferro do que para o cálcio. A liberação de cálcio indica que mais provavelmente as cápsulas se tornam gastas com o tempo, mas como o cálcio é mais acessível que o ferro, o cálcio PE liberado primeiro no ambiente. Fossem as cápsulas preparadas usando-se apenas ferro, seria o ferro e não o cálcio o que seria liberado no ambiente.

EXEMPLO 7. Estrutura da cápsula]

A preparação das cápsulas usando dois cátions metálicos diferentes, ferro e cálcio, foi escolhida para prover as cápsulas com uma camada extra de proteção do que a oferecida sozinha pelo polímero alginato. A ordem na qual os cátions metálicos são adicionados durante a preparação das cápsulas é também escolhida especificamente para favorecer a formação de um núcleo interno compreendendo alginato de ferro (isto é, rico em ferro) e uma camada externa compreendendo alginato de cálcio (isto é, rico em cálcio). Isto garante que se as cápsulas forem gastas durante sua armazenagem ou manuseio, as regiões ricas em cálcio serão liberadas para o meio circundante, atrasando a liberação do ferro do núcleo compreendendo alginato de ferro.

Como pode ser visto dos dados obtidos no estudo da estabilidade das cápsulas, em todas as condições testadas, a fração de cálcio liberada é muito maior que a fração de ferro (vide as tabelas 6 e 7 e a figura 6). Este fato está em perfeita concordância com a estrutura de cápsula proposta, com um núcleo interno compreendendo alginato de ferro e uma camada externa compreendendo alginato de cálcio. A liberação dos metais das cápsulas é devida à solubilização química de seus componentes, ou ao desgaste físico das cápsulas. Em ambos os casos, é a região próxima à superfície das cápsulas a primeira a ser liberada. Como as cápsulas são muito mais ricas em ferro que em cálcio (7,93% Fe VS 1,23% Ca) a maioria do cálcio deve estar localizada próximo da superfície da cápsula, enquanto a maioria

do ferro deve estar localizado longe dela, como está descrito na figura 7 (A). Se a distribuição de ambos os metais nas cápsulas tivesse que ser completamente homogênea, como seria conforme descrito na figura 7 (B), seria esperado haver uma razão de ferro/cálcio liberado muito próxima ou igual àquela das cápsulas, e tendo % Fe liberado / % de Ca liberado próximo de 1. A razão observada é mais de 23 vezes menor que a razão prevista para esse modelo. Então isto corrobora a estrutura em camadas das cápsulas, tendo uma região interna rica em ferro e uma concha externa rica em cálcio.

EXEMPLO 8. Testes de biodisponibilidade – solubilidade

A absorção de Fe ocorre no trato gastrointestinal. O pH do estômago varia através do dia, dependendo da quantidade de alimento que ele retém. No total, é preferivelmente ácido. Em um estômago vazio, o pH pode ser tão baixo quanto 1, aumentando para próximo de 5 após uma refeição completa.

Uma vez que um teste de biodisponibilidade completo em seres humanos é muito complicado e consome muito tempo, a biodisponibilidade do produto fonte de ferro conforme a invenção foi avaliada inicialmente usando-se como referência a solubilidade em um ambiente gástrico artificial.

A biodisponibilidade das cápsulas de ferro depende da sua capacidade de liberar a carga útil. Se as cápsulas forem tão estáveis que suportem o trato gastrointestinal sem liberar seu conteúdo, a biodisponibilidade do ferro será próxima de zero, uma vez que as cápsulas são muito grandes para serem absorvidas no intestino. Por outro lado, se as cápsulas são desestabilizadas durante sua passagem através do trato gastrointestinal, a carga útil será liberada como um sal de ferro solúvel que será absorvido no intestino, fornecendo uma alta biodisponibilidade para o ferro encapsulado. A experiência *in vitro* executada para estimar a liberação da carga útil durante a digestão ácida é almejada para identificar a liberação do ferro das cápsulas após ser digerida pelo ácido clorídrico a um pH = 2, próximo do pH do estômago.

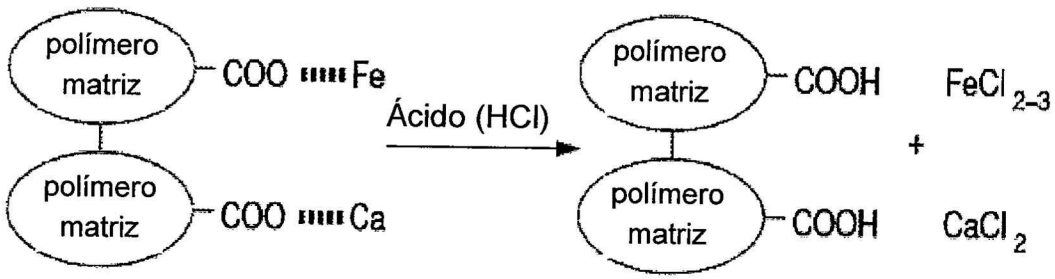
Em um tubo eppendorf, 10 mg de cápsulas de sacarato férrico preparadas como no exemplo 1 (Cápsula 1) foram pesadas, e então 9 ml de

água foram adicionadas. O tubo eppendorf foi agitado vigorosamente a mão para facilitar a ressuspensão das cápsulas. A maioria das cápsulas foi facilmente ressuspensa, embora alguns agregados grandes de cápsulas tenham permanecido no fundo do tubo. Uma gota da suspensão foi colocada em uma lâmina de microscópio para observação. As cápsulas, bem como alguns agregados maiores, foram visíveis usando-se uma ampliação de 100 x. (Olympus CH-2, 10x ocular, 10x objetiva). Para o tubo eppendorf, 1 ml de HCl a 0,1M em água foi adicionado e foi vigorosamente agitado. Uma segunda gota da suspensão ácida foi também colocada em uma lâmina de microscópio e comparada com a anterior. Nenhuma grande diferença foi observada entre as duas gotas. Após 30 minutos de digestão ácida, uma gota das cápsulas foi colocada em uma lâmina de microscópio. Antes de ser observada com o microscópio, uma gota de 1 M de NaOH foi colocada em contato com a primeira gota, e a mistura foi observada sob o microscópio. A dissolução das cápsulas foi quase instantânea, uma vez que o NaOH difundiu através da suspensão da cápsula.

Uma pequena amostra de cápsulas novas foi colocada em uma lâmina de microscópio limpa. Uma gota de 1M de NaOH foi colocada no topo das cápsulas. Nenhuma mudança na estrutura das cápsulas pode ser observada, e as cápsulas permaneceram estáveis pelo tempo que eram observadas (até a gota evaporar deixando um precipitado de NaOH com cápsulas presas).

A experiência de liberação consiste em duas fases. Na primeira fase, as cápsulas são suspensas em um meio ácido a um pH aproximado de 2 Esse pH está próximo do pH descoberto no estômago. Nenhuma mudança visível na estrutura das cápsulas pode ser observada sob tais condições, como foi revelado pelas duas microfotografias, observadas a uma ampliação de 100x. Essa falta de mudanças quando da suspensão das cápsulas em água destilada ou em 0,01M de HCl não é surpresa de levarmos em conta as espécies químicas esperadas para essas soluções. Em água destilada, as cápsulas são estáveis, formando um precipitado de alginato de ferro e alginato de cálcio. A interação do ferro e do cálcio com alginato é forte devi-

do à presença de grupos carboxilato (-COO^-) no polímero alginato. Acidificar a suspensão abaixo da pKa do ácido algínico (pKa > 4) converte os grupos carboxilato (-COO^-) em grupos carboxila (-COOH), que tem uma interação muito mais fraca com cátions. Esta é a etapa crucial que leva à liberação da carga útil das cápsulas. Embora a forma não protonada de alginatos (-COO^-) seja relativamente solúvel em água, a forma protonada é insolúvel. Isso explica a falta de mudanças visíveis, uma vez que o polímero matriz é deixado insolúvel, embora quimicamente diferente, como pode ser mostrado no esquema de reação a seguir:



Tendo convertido alginato para ácido algínico, a liberação dos metais é medida indiretamente, solubilizando-se o ácido algínico em um meio básico. Se os cátions tiverem sido liberados, o que é deixado é ferro solúvel e cloretos de cálcio e ácido algínico insolúvel. Basificando o meio, por exemplo com NaOH a 1M, dissolverá o ácido algínico precipitado. Essa rápida dissolução é explicada pela conversão de ácido algínico de volta para alginato de sódio, Ferro e cálcio estão presentes em uma concentração muito baixa para formar um precipitado com o alginato de sódio, que está na forma de alginato é solúvel.

Por outro lado, se os cátions estão ainda ligados à matriz alginato, a basificação converteria o ácido algínico de volta para alginato, que é insolúvel quando ligado ao ferro e cálcio. Então, a basificação das cápsulas executada em cápsulas não digeridas deve deixá-las inalteradas, uma vez que os grupos carboxila presentes nas cápsulas já estão na forma de carboxilato (-COO^-) e interage fortemente com ambos os cátions, ferro e cálcio. A pequena fração de cápsulas não digeridas suspensas em 1M de NaOH foi

também fotografado sob um microscópio, permanecendo a imagem inalterada com o tempo, o que, como esperado, revela que as cápsulas são estáveis se não digeridas e mantidas em 1M de NaOH.

A liberação indireta de metais observada usando-se essa experiência revela que, após entrar no estômago, o pH ácido converte as cápsulas insolúveis em ácido algínico insolúvel e sais solúveis de cálcio e ferro. Como sais solúveis de ferro têm uma alta biodisponibilidade, a biodisponibilidade esperada dessas cápsulas é também alta. Portanto, essas cápsulas são bem adequadas para fortificação de alimentos uma vez que elas são estáveis por um longo período de tempo na matriz do alimento, e são capazes de liberar os metais quando entram no trato gastrointestinal.

EXEMPLO 9. Biodisponibilidade – teste *in vivo*

Esse estudo da biodisponibilidade visa comparar a biodisponibilidade do ferro encapsulado àquela do sulfato ferroso. O sulfato ferroso foi escolhido como um controle positivo uma vez que não apenas é comumente usado como estudos padrão da biodisponibilidade do ferro, mas também tem uma alta biodisponibilidade.

O estudo foi designado para medir a capacidade de repleção do ferro de ratos anêmicos usando três fontes de ferro diferentes.

- Grupo de controle negativo: dieta básica pobre em ferro sem ferro adicionado

- Grupo de controle positivo: dieta básica pobre em ferro fortificada com 10 ppm de ferro a partir de sulfato de ferro solúvel

- Grupo de teste: dieta básica pobre em ferro fortificado com 10 ppm de ferro das micro cápsulas de ferro (sacarato férrico encapsulado)

As três dietas foram formuladas com base nas recomendações da dieta AIN-93G para ratos de laboratório sem ferro adicionado (relatado como tendo 2 a 6 ppm de Fe). A dieta básica foi usada como controle negativo. A dieta de controle positivo foi preparada suplementando-se a dieta básica com 10 ppm de Fe usando-se 50 mg/kg de $FeSO_4.7H_2O$. A dieta de teste foi preparada suplementando-se a dieta básica com 10 ppm de Fe usan-

do-se 125 mg/kg de ferro em micro cápsulas (7,93% w/w de Fe nas micro cápsulas na forma de sacarato férrico). As dietas e água desionizada foram administradas *ad libitum* durante o estudo.

Foram usados 40 ratos Sprage Dawley (20 machos, 20 fêmeas) de 4 diferentes lixos. Os ratos foram desmamados na idade de 21 dias (dia 0, início do estudo), e divididos aleatoriamente em gaiolas de aço inoxidável. Dois animais do mesmo sexo foram designados para cada gaiola. Os animais foram estabulados em um ambiente controlado (20-22°C, 30-50% de RH, ciclo de luz: 08:00 h – 22:00 h).

Anemia foi induzida nos três grupos de animais, que foram alimentados com a dieta básica sem ferro durante os primeiros 22 dias (fêmeas) ou 23 dias (machos) do estudo, conforme mostrado na figura 8. Após o período de indução da anemia, as dietas dos três grupos foram mudadas para:

- Controle negativo: 3 gaiolas de machos e 3 gaiolas de fêmeas (6+6 animais). Esse grupo foi mantido recebendo a dieta básica sem suplementação de ferro.

- Controle positivo: 3 gaiolas de machos e 3 gaiolas de fêmeas (6+6 animais). Esse grupo recebeu a dieta básica fortificada com 10 ppm de Fe na forma de sulfato ferroso.

Grupo de teste: 4 gaiolas de machos e 4 gaiolas de fêmeas (8+8 animais). Esse grupo recebeu a dieta básica fortificada com 10 ppm de Fe na forma de ferro microencapsulado (sacarato férrico encapsulado).

Os animais foram deixados recuperar da anemia por 2 semanas (14 dias). Após esse período eles foram anestesiados com isoflurano inalado (dose de indução: 3%, dose de manutenção: 1,5-2%) e feita a eutanásia pela extração de sangue através de punção intra cardíaca. Os animais foram pesados periodicamente durante o procedimento. A quantidade de alimento consumida foi também medida. A evolução do peso corporal durante o período de recuperação está mostrada nas tabelas 8 e 9 (vide também a figura 9).

Tabela 8

Evolução do peso corporal dos machos, computado como peso (dia_n) – peso (dia_0). O período de recuperação da anemia começou no dia 22 (veja também a figura 9)

Dia	Controle negativo *x* (SD)	Controle positivo *x* (SD)	Grupo de teste *x* (SD)
4	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 (3,6)
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)

5 *X* = valor médio SD = desvio padrão.

Tabela 9

Evolução do peso corporal das fêmeas, computado como peso (dia_n) – peso (dia_0); O período de recuperação da anemia começou no dia 23 (vide também a figura 9).

Dia	Controle negativo *X* (SD)	Controle positivo *X* (SD)	Grupo de teste *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)

Dia	Controle negativo X (SD)	Controle positivo X (SD)	Grupo de teste X (SD)
18	61,3 (7,4)	63,9 (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 médio SD = desvio padrão.

Os resultados mostraram uma clara diferença entre os três diferentes grupos, com um amento de peso corporal muito maior e similar nos grupos fortificados, deixando o grupo com a dieta básica muito abaixo dos outros dois grupos. Estatisticamente não existiram diferenças significativas entre os dois grupos fortificados durante o período de recuperação da anestesia. Por outro lado, os pesos de qualquer dos dois grupos fortificados (controle positivo e grupo de teste) foram significativamente maiores que os pesos do controle negativo.

A mesma imagem aparece se for estudada a eficiência de alimentação. A eficiência de alimentação é definida como:

$$\text{Eficiência de alimentação} = \frac{\text{Aumento de peso (g)}}{\text{Entrada de alimento (g)}}$$

e se refere a quão bem o alimento é convertido em tecido corporal. As eficiências de alimentação computadas para os três grupos durante o período de recuperação da anemia estão mostradas na tabela 10. Valores entre parênteses indicam o desvio padrão.

Tabela 10

Eficiência de alimentação para machos e fêmeas durante a recuperação da anemia

Eficiência da alimentação	Controle negativo *x* (SD)	Controle positivo *x* (SD)	Grupo de teste *x* (SD)
Machos	0,19 (0,03)	0,43 (0,08)	0,36 (0,04)
Fêmeas	0,19 (0,02)	0,32 (0,04)	0,28 (0,03)

X = valor médio SD = desvio padrão.

Entre os grupos de machos e fêmeas, as diferenças são apenas significativas entre o controle negativo e qualquer um os grupos suplementados, mas não entre os grupos suplementados. Pode, portanto, ser concluído que as diferenças entre sulfato ferroso e as microcápsulas de ferro são estatisticamente insignificantes, mas elas são estatisticamente significativas entre o controle negativo e as microcápsulas de ferro, Portanto, a biodisponibilidade do ferro microencapsulado deve ser similar àquela do sulfato de ferro, mas sem muitas das desvantagens de um sal de ferro solúvel;

EXEMPLO 10. Iogurte fortificado

Foi testada a incorporação do produto fonte de ferro na fórmula de cápsulas da presente invenção para um iogurte como transportador de alimento. O teste das cápsulas pela incorporação das mesmas em iogurte foi escolhido pelas razões a seguir:

- O pH no iogurte é ácido, o que é suficientemente agressivo para destruir produtos fonte de ferro na forma de cápsulas já descrito na técnica anterior. Isto liberaria o teor das cápsulas e estragaria o iogurte.

- O iogurte tem um alto teor de água, também um meio agressivo para outros produtos fonte de ferro já conhecidos. O teor de água juntamente com sua acidez facilita a solubilidade do ferro, tornando sua fortificação mais difícil.

- O ferro acelera a oxidação da gordura, o que aumenta o gosto rançoso do alimento. No iogurte, perto de 3% do seu teor pode ser gordura, o que significa muito substrato a ser oxidado no caso se estar diretamente em contato com o componente ferro do agente de fortificação.

Um iogurte fortificado foi preparado usando-se cápsulas preparadas como no exemplo 1 (Cápsula 0; grupo 1 do Exemplo 3). Um segundo grupo de iogurte foi preparado sem a adição das cápsulas de ferro e foi usado como controle. A preparação do iogurte foi feita de acordo com o seguinte processo:

1. Condicionamento e padronização de 25 l de leite pela adição de leite em pó sob agitação até sua completa dissolução, terminando com 2,5 – 3% de gordura

2. Adição e dispersão de 50 g de cápsulas de ferro sob agitação contínua (exceto no iogurte de controle)

3. Pasteurização por 90 segundos a 95°C

4. Homogeneização a 180 kg/cm^2

5. Incorporação do fermento a 45°C

6. Fermentação a 44°C por 4 horas, até o pH do iogurte atingir 4,7 – 4,8

7. Conservação dos iogurtes a 4,5°C por até 1,5 meses.

Um dos objetivos da produção de iogurte fortificado foi avaliar a falta de gosto metálico, e comparar visualmente o produto fortificado com o iogurte de controle. O iogurte foi provado por um júri de cinco homens não treinados, nenhum dos quais era capaz de detectar nem mesmo um leve gosto metálico no iogurte fortificado, embora uma análise dos iogurtes revelasse que eles tinham 42,5 ± 4,1 ppm de ferro. Uma comparação visual dos iogurtes fortificado e de controle foi também executada, e apenas uma leve cor mais escura do iogurte fortificado pode ser detectada. A leve coloração poderia ser devida ao uso de um sal de ferro muito escuro, e poderia apenas ser apreciado se os iogurtes fossem colocados lado a lado.

EXEMPLO 11. Estabilidade da cápsula no iogurte

Iogurtes produzidos com o produto fonte de ferro na forma de cápsulas da presente invenção, e iogurtes de controle (sem adição de cápsulas de ferro) foram testados quanto à oxidação de lipídeos, tornando as condições de armazenagem mais estritas que o usual. Os iogurtes foram analisados a 150% de seu prazo de validade, meio mês mais tarde que o

prazo de validade estabelecido de um mês. Após essa armazenagem prolongada, o nível de ranço foi avaliado usando-se cromatografia gasosa. O Hexanal é um balizador comumente usado para ranço, uma vez que ele é um dos produtos da oxidação de lipídeos. A capacidade de um ser humano detectar traços de hexanal é muito alta, sendo capaz de sentir ranço se os níveis de hexanal estiverem acima de 10 ppm (partes por milhão, mg/kg do transportador). Para alcançar o objetivo de ou mão ter ranço detectável ou ter níveis de hexanal bem abaixo do limite de detecção do ser humano, GC/MS (Cromatografia gasosa/espectrometria de massa) foi usado para analisar os iogurtes. Esse método é capaz de quantificar traços de hexanal até 50 ppb (partes por bilhão, ng/kg), quase três ordens de grandeza abaixo do limite de detecção de seres humanos.

A preparação dos iogurtes foi feita como no exemplo 10. Então, na busca de traços de hexanal, foi executada a análise do iogurte por CG/MS.

Ambas as amostras analisadas tinham níveis de hexanal abaixo de 50 ppb, bem abaixo do limite de ranço, que é próximo de 10 ppm (partes por milhão, ng/g). As cápsulas são, portanto, uma boa forma de isolar a gordura do iogurte da fonte de ferro solúvel e evitar sua oxidação.

EXEMPLO 12 . Preparação e estabilidade da carne fortificada

A possível incorporação de microcápsulas a um transportador de alimento foi testada usando-se salsichas de carne de peru, e uma emulsão à base de carne, tal como salsichas Frankfurt. A presença de ferro nessas amostras pode levar à oxidação de suas gorduras se o ferro for liberado das micro cápsulas.

Para a preparação de salsichas Frankfurt, foram usados a lista de ingredientes e quantidades relativas a seguir: lombo de porco (40%); bacon (20%); uma mistura de aditivos, temperos e sabores (paymfurt ST-1800, Carinsa Group; 3,4%); proteína vegetal (paymprotein ST-91, Carinsa Group; 3%); sal (1,5%); água/gelo (27,3%); aroma defumado (0,2%); e amido de batata (5%).

Microcápsulas de ferro (1g/kg final) foram adicionadas junto com

o paymfurt ST-1800.

O processo seguido para preparar as salsichas Frankfurt foi o seguinte:

1. Cortar todos os ingredientes, para reduzir a carne a uma pasta fina. Usar gelo para evitar que a carne aqueça.

2. Colocar a emulsão nos recipientes (Sacos plásticos)

3. Cozinhar em uma caldeira a 75°C por 45 minutos

4. Embalar a vácuo e armazenar a 4°C

Para a preparação de salsichas de peru fortificadas com ferro, foram usadas a lista de ingredientes e as quantidades relativas a seguir: peito de peru (69%); água (24%); uma mistura de aditivos e sabores (Carinsa formula CMA-1251#1; 6%); amido de milho (1%); micro cápsulas de ferro (1 g/kg final) foram adicionadas juntamente com Carinsa formula CMA-1251#1.

O seguinte protocolo foi usado para preparar as salsichas:

1. Preparar a salmoura, misturando a água com o amido de milho e Carinsa formula CMA-1251#1

2. Cortar a carne

3. Misturar sob vácuo a carne cortada com a salmoura e macerar por 24 horas

4. Preparar uma pasta fina cortando uma parte da carne até uma pasta fina ser obtida

5. Colocar a carne nos recipientes (sacos plásticos)

6. Cozinhar em uma caldeira a 75°C até a temperatura interna atingir 72°C

7. Embalar a vácuo e armazenar a 4°C

A quantidade de ferro nas amostras foi quantificada usando-se ICP-OES (plasma acoplado indutivamente – espectroscopia de emissão ótica), após dissolver as amostras em HNO_3 concentrado em um forno de micro-ondas. Os resultados da quantificação expressos como ppm (partes por milhão, mg/kg) estão mostrados na tabela 11. Valores entre parênteses indicam desvio padrão como percentual.

Tabela 11

Amostra	Sem adição de ferro ppm Fe	Fortificado com ferro ppm Fe
Salsicha Frankfurt	12,9 (2,5%)	145 (3,3%)
Salsicha de peru	6,8 (4,4%)	112 (4,7%)

A capacidade das microcápsulas de evitar a oxidação das gorduras foi testada pela quantificação da quantidade de hexanal presente nas amostras. O hexanal é um balizador comumente usado da oxidação de gorduras, uma vez que é um dos principais produtos da oxidação de gorduras. Sua concentração foi medida no início e no fim do prazo de validade das salsichas (dia 0 e dia 60), e comparado entre as amostras fortificadas com ferro (> 100 ppm de Fe) e as amostras sem adição de ferro (-10 ppm de Fe). As amostras foram mantidas refrigeradas durante seu prazo de validade, e foram congeladas a -80°C até serem analisadas. O hexanal foi quantificado por HS-GC-MS (Cromatografia gasosa HeadSpace - Espectrometria de massa). Os resultados, expressos como ppm de hexanal (mg/kg) estão mostrados na tabela 12. Valores entre parênteses indicam desvio padrão como porcentagem.

Tabela 12

Salsicha	Dia	Sem adição de ferro ppm de hexanal	Fortificado com ferro ppm de hexanal
Frankfurt	Dia 0	0,21 (0,07)	0,35 (0,12)
Frankfurt	Dia 60	< 0,20	0,22 (0,07)
Peru	Dia 0	0,45 (0,16)	0,69 (0,24)
Peru	Dia 60	0,55 (0,19)	0,96 (0,33)

A comparação desses resultados no dia 0 revela que, embora a quantidade de hexanal possa aparentemente parecer maior nas amostras com ferro, estatisticamente a quantidade de hexanal não pode ser considerada como diferente. Portanto a microcápsula é eficaz para evitar a oxidação de gordura pela presença de ferro durante as etapas mais agressivas na produção de salsichas, a saber, seu cozimento. O mesmo é verdade para os

resultados no final do prazo de validade, após ter mantido as amostras por 2 meses. A diferença nos resultados entre as amostras fortificadas com ferro, aquelas sem qualquer adição de ferro é estatisticamente não significativa. Além disso, se a mesma amostra for comparada no início e no fim do prazo de validade, as diferenças também não são significativas. Portanto, pode ser concluído que a presença de ferro na forma de micro cápsulas de ferro não altera significativamente a taxa de oxidação das gorduras nas carnes testadas.

EXEMPLO 13. Resistência das microcápsulas à homogeneização

Uma das etapas chave na produção de muitos alimentos, em particular alimentos que contenham leite, é a etapa de homogeneização, na qual um líquido ou suspensão é submetido a um alto esforço cisalhante. Como resultado, as partículas em suspensão, tais como glóbulos de gordura, são destruídas tornando a suspensão muito mais homogênea. Esse esforço cisalhante pode também ser responsável pela destruição das microcápsulas liberando seu conteúdo (ferro) ao sobrenadante, e portanto produzindo a proteção inútil.

Para testar até que ponto a homogeneização das microcápsulas liberou seu conteúdo para o sobrenadante, 7,9 l de uma suspensão com 10,38 ppm de Fe microencapsulado foram preparados usando-se 7,.9 l de água desionisada e 1,025 g de microcápsulas. A amostra foi agitada completamente e continuamente alimentada a um homogeneizador de etapa única, ajustado para uma pressão entre 20 MPa e 100 MPa. 100 ml de amostra foram conectados após ter ajustado a pressão para um valor desejado, e após deixar o sistema estabilizar. As pressões escolhidas foram: 20 MPa, 35 MPa, 50 MPa, e 100 MPa. Após ser homogeneizada, cada amostra foi deixada 8 dias sem agitar em um recipiente fechado. Imediatamente antes da análise, as amostras foram microfiltradas (filtro de 0,45 μm). HNO_3 concentrado foi adicionado a cada amostra microfiltrada até uma concentração final de 0,5% (v/v) para estabilizar o ferro na suspensão. O ferro no sobrenadante acidificado foi quantificado usando-se ICP-OES.

A quantidade de ferro no sobrenadante e a quantidade corres-

pondente de ferro liberada das microcápsulas sob as diferentes pressões de homogeneização estão mostradas na tabela 13 abaixo. A amostra marcada como homogeneizada a 0 MPa não foi homogeneizada, e aquela marcada como 20 (placebo) foi homogeneizada a 20 MPa mas continha apenas água desionizada.

Tabela 13

Homogeneização (MPa)	Fe (ppm)	% Fe liberado
0	0,15	1,44%
20	0,.16	1,54%
35	0,18	1,73%
50	0,18	173%
100	0,19	1.83%
20 (placebo)	0,013	0,125%

Como pode ser visto dos resultados anteriores, a estabilidade das microcápsulas para homogeneização é excelente. Mesmo usando-se as mais altas pressões, apenas uma pequena fração do ferro total é liberada das microcápsulas.

EXEMPLO 14. Preparação e estabilidade do leite fortificado

Foi testada a incorporação do produto fonte de ferro na forma de cápsulas da presente invenção a um leite como transportador de alimento. Foi escolhido testar as cápsulas pela incorporação das mesmas ao leite pelas seguintes razões:

- O leite é um alimento líquido, que facilita a liberação de outros produtos fonte de ferro já conhecidos. Isto torna o fortalecimento do leite integral mais difícil, em contraste com o leite desnatado, uma vez que a presença de ferro oxida a gordura presente no leite deixando um gosto rançoso.

- Sendo um líquido, o leite não pode ser fortificado com um alimento sólido, uma vez que ele tenderá a precipitar para o fundo do recipiente.

O leite de vaca integral obtido de um fazendeiro local foi mantido refrigerado (4°C até ser tratado). 35 g de microcápsulas úmidas (75% de umidade) foram dispersas em 600 ml de água destilada. 50 l de leite foram

processados sem qualquer ferro adicionado, e 50 l de leite foram misturados com os 600 ml de suspensão de microcápsulas. Para ambos os tipos de leite 1 g/l de E-339 foi adicionado. Inicialmente com os 50 l de leite sem adição de ferro, e posteriormente com os 50 l de leite com microcápsulas de ferro adicionadas: (a) o leite foi gradativamente aquecido e quando alcançou 75°C foi homogeneizado usando-se um homogeneizador de duas etapas (18 MPa para a primeira etapa, 4 MPa para a segunda etapa); (b) quando o leite alcançou 90°C foi deixado àquela temperatura por 1 minuto; (c) o leite foi processado a temperatura ultra alta (UHT) por 15 segundos a 135°C; e (d) o leite foi resfriado até a temperatura ambiente e engarrafado em garrafas de vidro de 0,5 l não esterilizadas.

Após ser engarrafado, ambos os leites foram testados e nenhum gosto metálico pode ser detectado. Para evitar estrago microbiológico do leite, o mesmo foi colocado em uma autoclave a 121°C por 15 minutos. Após ser resfriado, o leite foi armazenado a 4°C. No final do prazo de validade (1 mês) o hexanal presente no leite foi quantificado.

No início e no fim do prazo de validade a aparência física do leite foi verificada visualmente. Nenhum traço de precipitação pode ser observado, mas uma cor levemente mais escura pode ser distinguida no leite fortificado com ferro. O gosto e o cheiro do leite foram verificados após serem produzidos, nenhum ranço ou cheiro metálico puderam ser sentidos em qualquer um dos leites. De fato, nenhuma diferença no gosto ou no cheiro foi descoberta entre o leite fortificado com ferro e o leite não fortificado. A falta de cheiro ou gosto rançoso concorda plenamente com a concentração quantificada de hexanal em ambos os tipos de leite no final do prazo de validade: o hexanal não pode ser detectado nas amostras, então se presente ele teve uma concentração abaixo de 10 μg/l.

EXEMPO 16. Produção de microcápsulas usando acetato de cálcio

A alta concentração de cálcio usada para preparar as microcápsulas pode levar a problemas de corrosão se o sal usado for cloreto de cálcio. A razão é que os ânions de cloreto são muito agressivos ao aço, um material comumente usado nos recipientes industriais, tubos, e agitadores. Para

evitar esses problemas, e tirando vantagem do fato de que os ânions cloreto não desempenham nenhum papel durante a produção das microcápsulas, um grupo de microcápsulas foi preparado usando-se outro sal de cálcio, em particular acetato de cálcio.

Em contraste ao cloreto de cálcio, que é extremamente solúvel em água, o acetato de cálcio é menos solúvel, de forma que a concentração inicial de 5M no cálcio não pode ser alcançada. Em vez disso, uma menor concentração foi usada (1,8M).

O protocolo usado para preparar as microcápsulas dificilmente diferiu do usado para preparar as cápsulas com cloreto de cálcio:

Em uma solução de 1,5 g de alginato de sódio em 100 ml de água, 16 g de sacarato férrico (aprox. 35% de Fe) foram dissolvidos. Usando-se um funil de extração, a mistura alginato de sódio/sacarato férrico foi adicionada em gotas em 70 ml de solução 1,8M Ca (Aco)2. Durante a adição em gotas, a suspensão da cápsula formada foi agitada usando-se um homogeneizador de laboratório (Diax 900, Heldolph Instruments GmbH). As cápsulas sólidas obtidas foram separadas por filtração sob vácuo. As cápsulas foram suspensas três vezes em água destilada para remover qualquer sal solúvel e filtrada novamente sob vácuo. 35,6 g de cápsulas úmidas foram obtidas.

Os teores de Fe e Ca foram medidos seguindo o processo do Exemplo 3. A estabilidade das cápsulas fol determinada medindo-se as liberações de Fe e Ca no dia 0 seguido do processo do Exemplo 6. O % de umidade e o % de resíduos sólidos foram medidos pelo processo a seguir.

1, Pesar uma proveta de vidro ($peso_{vazio}$)

2. Pesar aprox. 1 g de microcápsulas na proveta. Pesar a proveta novamente ($peso_{úmido}$)

3. Colocar a proveta no forno a 110-120°C por duas horas

4. Deixar a proveta com as microcápsulas secas resfriar até a temperatura ambiente por 30 minutos.

5. Pesar novamente a proveta com as microcápsulas ($peso_{seco}$)

6. Repetir a secagem / resfriamento / pesagem até o peso ser

constante

7. Computar o teor de umidade como:

$$\% \text{ umidade} \frac{\text{peso}_{\text{úmido}} - \text{peso}_{\text{seco}}}{\text{peso}_{\text{úmido}} - \text{peso}_{\text{vazio}}} = 100$$

Os resultados obtidos são>

- teor de Fe: 15,0% de Fe (w/w) microcápsulas úmidas; 45,4% de Fe (w/w) microcápsulas secas

- teor de Ca: 0,6% de Ca (w/w) microcápsulas úmidas; 1,9% de Ca (w/w) microcápsulas secas

- Umidade: 66,9% de umidade (33,1% de resíduo seco)

- Liberação de Fe e Ca: 0,2% de Fe liberado e 8m2% de Ca liberado.

EXEMPLO 16. Resistência ao calor

A adequabilidade das microcápsulas para alimentos foi também testada pela verificação se a alta temperatura usada no cozimento ou esterilização de alimentos afetou sua capacidade de manter a carga útil (ferro) dentro das microcápsulas.

1 g das microcápsulas foi pesado em cada uma das duas provetas de vidro pesadas. Em um forno ajustado a 125°C, uma das amostras foi mantida por 30 minutos, enquanto a outra ficou no forno por 180 minutos. Após as cápsulas terem resfriado até a temperatura ambiente, cada proveta foi pesada novamente. 40 mg de microcápsulas secas foram suspensas em 100 ml de água desionisada e a suspensão foi agitada a mão. 1 ml de cada suspensão foi diluído para 10 ml com 9 ml de água desionisada. As amostras foram filtradas para remover os sólidos em suspensão. Então, 50 µl de ácido nítrico concentrado foram adicionados a cada amostra para estabilizar o ferro em suspensão, e as amostras foram submetidas a ICP-OES para quantificar o ferro e o cálcio liberados.

A suspensão de microcápsulas imediatamente antes da filtração teve uma concentração total de 11 ppm de Fe. O sobrenadante após a filtração continha apenas o ferro que tinha sido liberado das microcápsula, o que foi quantificado pelo ICP-OES para produzir os seguintes resultados:

30 minutos, 125°C: 0,04 ppm de Fe

180 minutos, 125°C: 0,03 ppm de Fe

Em ambos os casos, menos de 1% do ferro presente nas microcápsulas foi liberado para eles pelo efeito de aquecimento das microcápsulas. Portanto, as microcápsulas podem ser consideradas como estáveis, mesmo após tratamentos muito mais agressivos que aqueles que comumente se descobre nos alimentos (3 h a 125°C).

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para obter um alimento fortificado com ferro, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) preparar um produto fonte de ferro através de um processo compreendendo as seguintes etapas:

i) formar um núcleo compreendendo alginato de ferro pelo contato com pelo menos um sal de ferro solúvel em água biodisponível e pelo menos um sal alginato solúvel em água,

(ii) contatar o núcleo com uma solução aquosa de um sal de cálcio de uma concentração compreendida entre 0,025 M e uma concentração abaixo do ponto de saturação da solução, e

(iii) isolar o sólido obtido.

b) adicionar o produto fonte de ferro resultante ao alimento.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um sal de ferro biodisponível é sacarato férrico.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um sal alginato é alginato de sódio.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o núcleo é formado depositando-se o pelo menos um sal alginato solúvel em água na superfície das partículas do pelo menos um sal de ferro.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que:

i) o núcleo é formado pela dissolução ou suspensão de pelo menos um sal de ferro biodisponível em uma solução aquosa de pelo menos um sal alginato para obter um gel;

ii) o gel obtido é adicionado lentamente em uma solução aquosa de um sal de cálcio de uma concentração compreendida entre 0,025 M e uma concentração abaixo do ponto de saturação da solução, sob vigorosa agitação, e

iii) o sólido obtido é filtrado e lavado com água.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pe-

lo fato de que o pelo menos um sal alginato é alginato de sódio e sua concentração na solução aquosa é de pelo menos 0,6 % (p/p).

7. Alimento fortificado com ferro, caracterizado pelo fato de que compreende um produto fonte de ferro, o produto fonte de ferro sendo obtido pelo processo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Alimento fortificado com ferro, caracterizado pelo fato de que compreende um produto fonte de ferro na forma de cápsulas sólidas, em que as cápsulas compreendem um núcleo compreendendo alginato de ferro, e uma camada externa compreendendo alginato de cálcio.

9. Alimento fortificado com ferro, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o núcleo também compreende pelo menos um sal de ferro biodisponível.

10. Alimento fortificado com ferro, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, caracterizado pelo fato de que é iogurte, leite, uma bebida, uma emulsão à base de carne ou uma salsicha.

11. Alimento fortificado com ferro, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, caracterizado pelo fato de que é para uso em um método para profilaxia e/ou tratamento do corpo humano por terapia para prevenir a ocorrência de deficiência de ferro ou reduzir uma deficiência de ferro em um ser humano.

12. Uso de um alimento fortificado com ferro como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de ser para fortificar alimento.

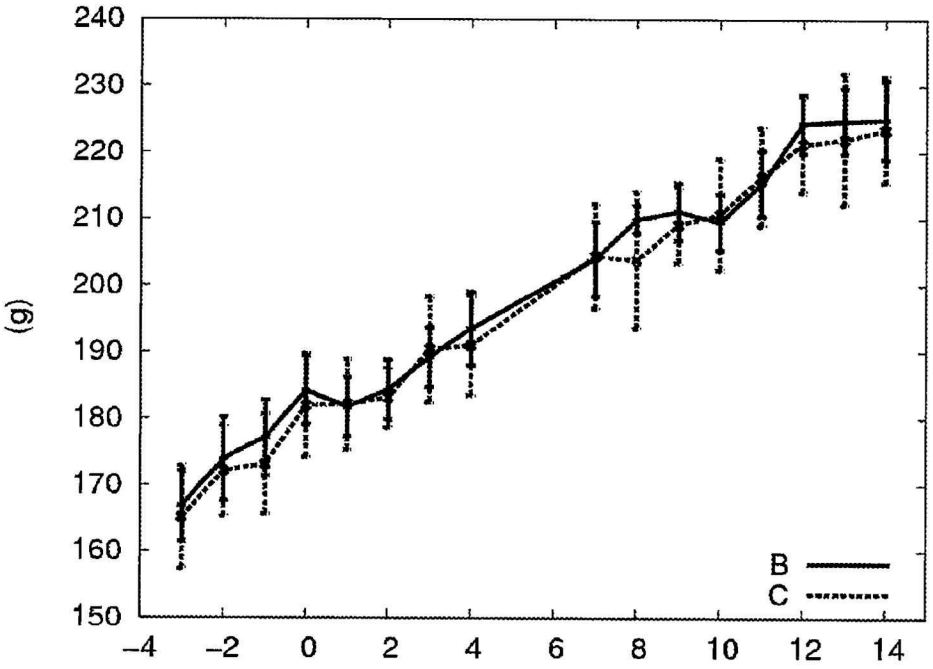

240
230
220
210
200
190
180
170
160
150
(g)
–4
–2
0
2
4
6
8
10
12
14
B
C

Fig. 1

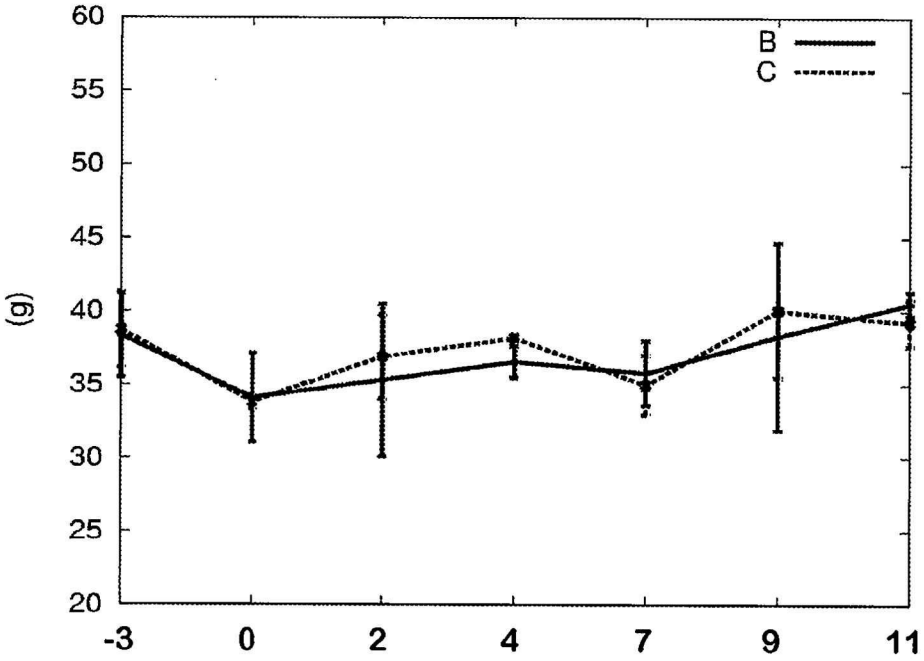

60
55
50
45
40
35
30
25
20
(g)
-3
0
2
4
7
9
11
B
C

Fig. 2

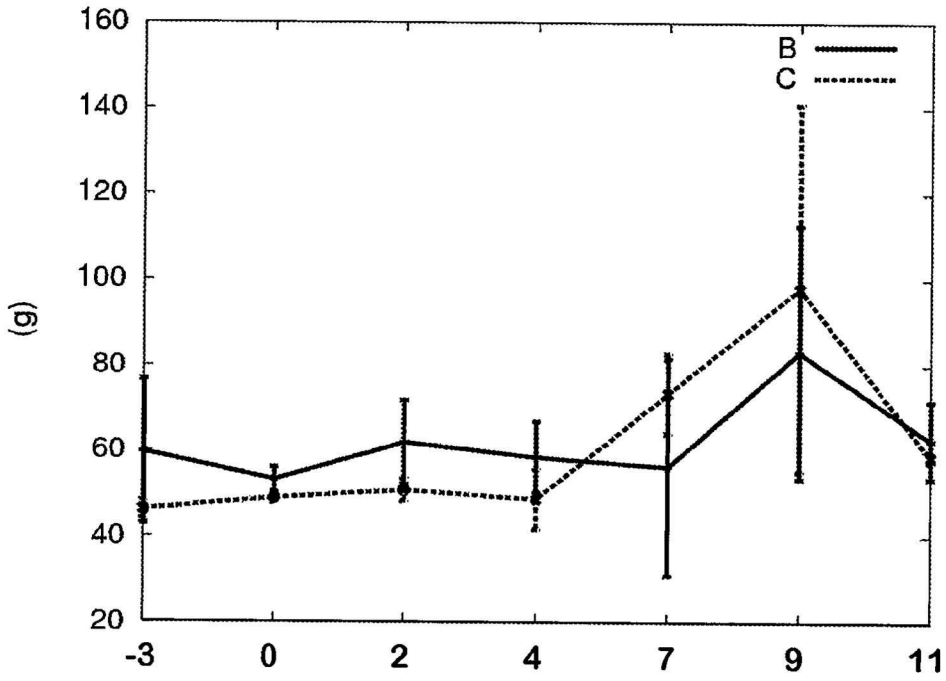

160
140
120
100
80
60
40
20
(g)
-3
0
2
4
7
9
11
B
C

Fig. 3

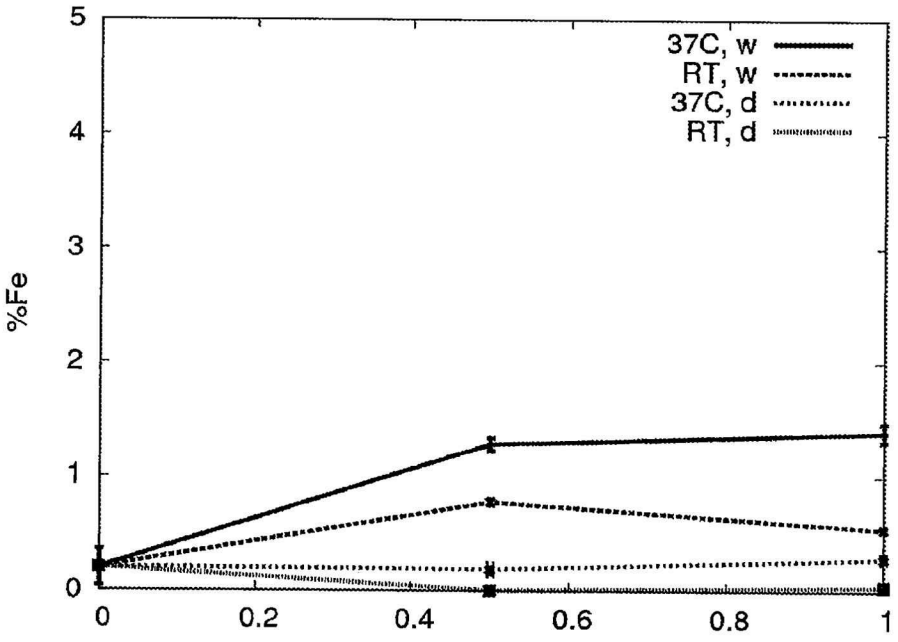

5
4
3
2
1
0
%Fe
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
37C, w
RT, w
37C, d
RT, d

Fig. 4

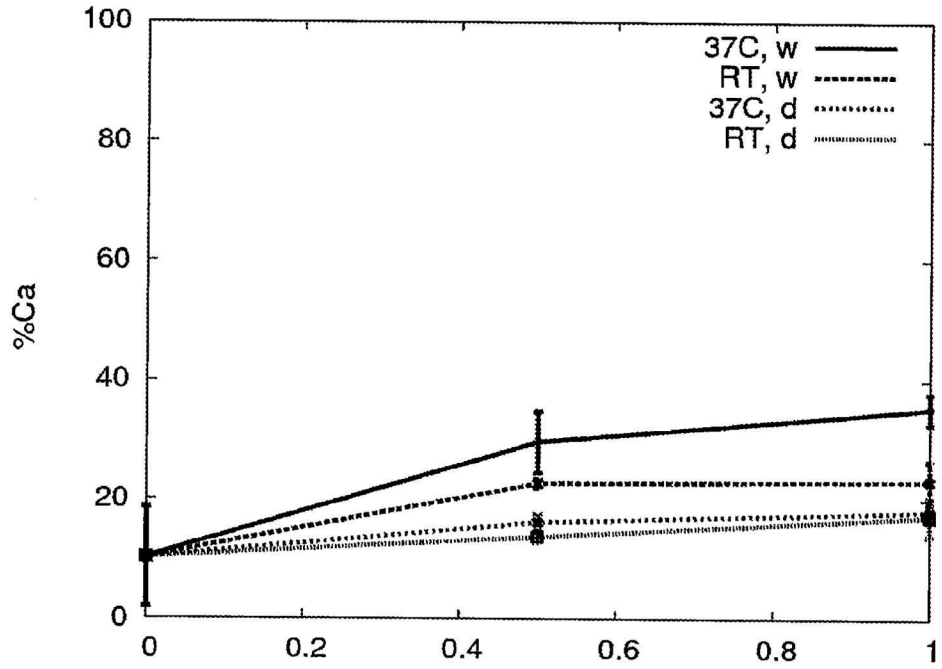

100
80
60
40
20
0
%Ca
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
37C, w
RT, w
37C, d
RT, d

Fig. 5

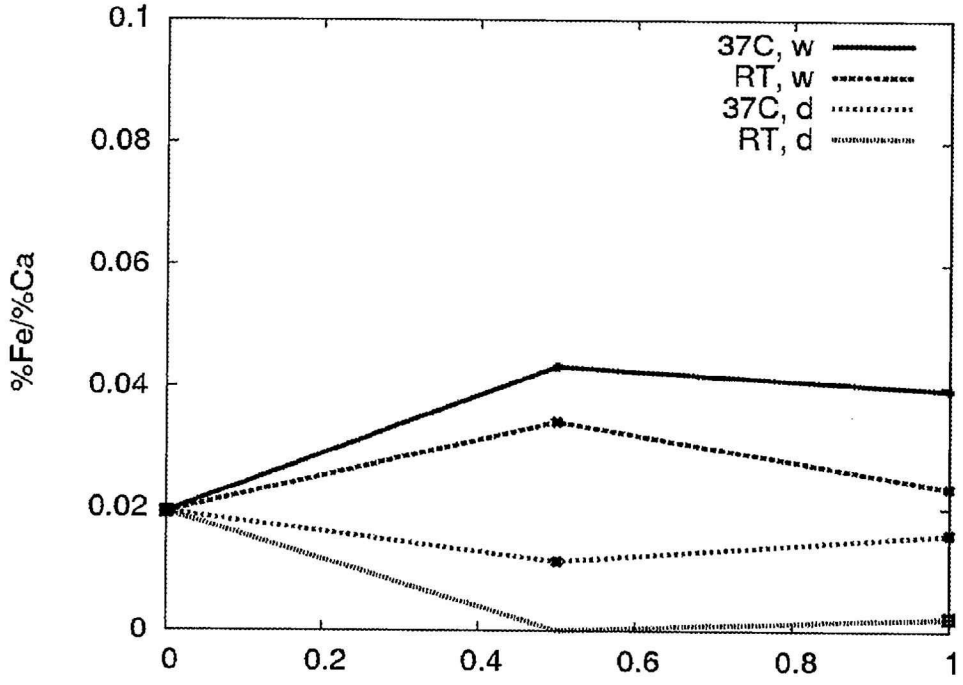

0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
%Fe/%Ca
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
37C, w
RT, w
37C, d
RT, d

Fig. 6

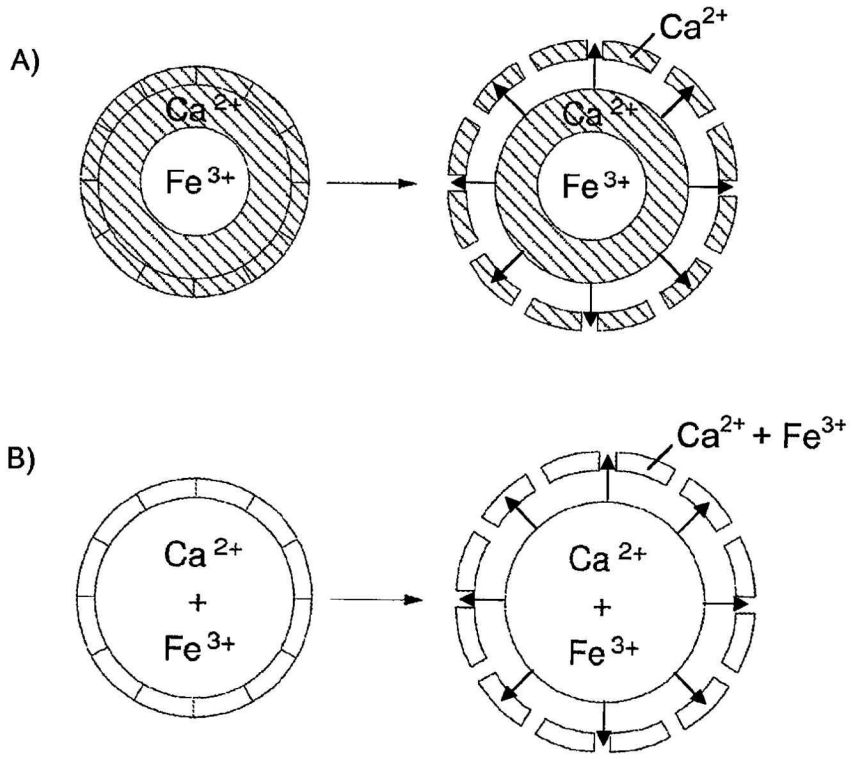

A)
Ca 2+
Fe 3+
Ca2+
Ca 2+
Fe 3+
B)
Ca 2+
+
Fe 3+
Ca2+ + Fe3+
Ca 2+
+
Fe 3+

Fig. 7

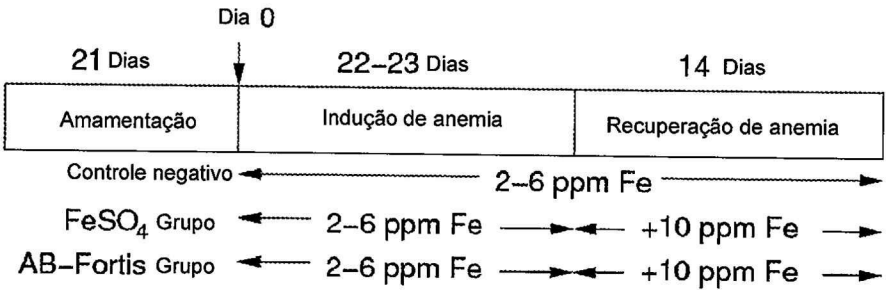

Dia 0
21 Dias
22–23 Dias
14 Dias
Amamentação
Indução de anemia
Recuperação de anemia
Controle negativo
2–6 ppm Fe
FeSO4 Grupo
2–6 ppm Fe
+10 ppm Fe
AB–Fortis Grupo
2–6 ppm Fe
+10 ppm Fe

Fig. 8

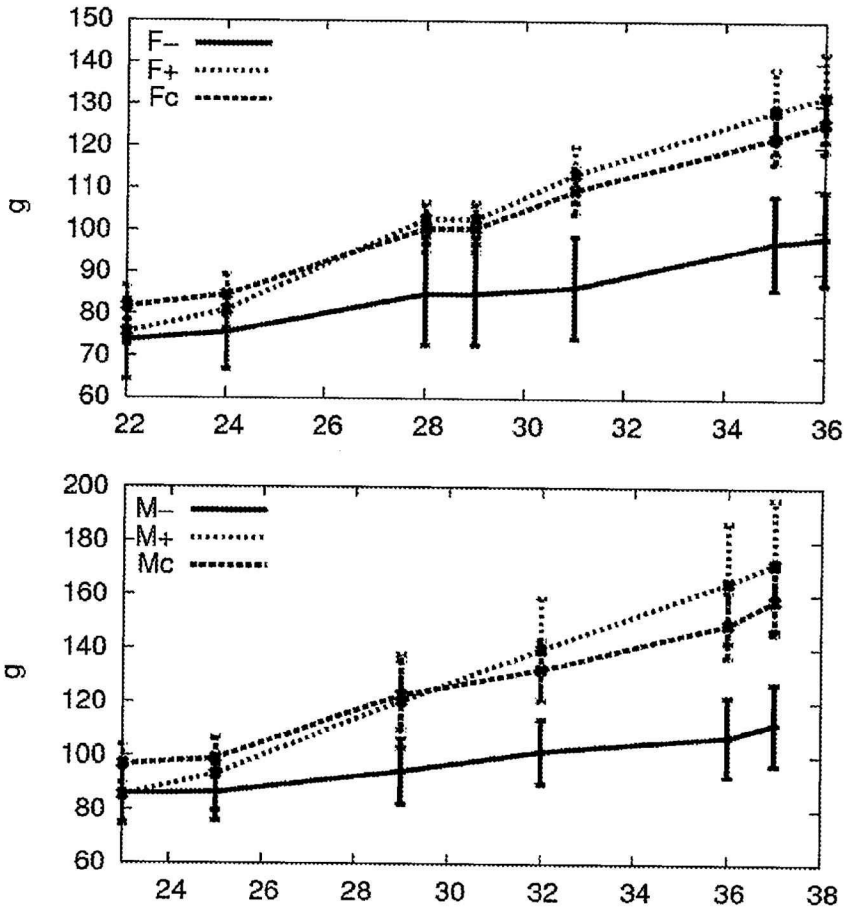

F–
F+
Fc
g
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
22
24
26
28
30
32
34
36
M–
M+
Mc
g
200
180
160
140
120
100
80
60
24
26
28
30
32
34
36
38

Fig. 9

RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSO PARA OBTER ALIMENTO FORTIFICADO COM FERRO, ALIMENTO FORTIFICADO COM FERRO E USO DO MESMO".**

A presente invenção refere-se a um alimento fortificado com ferro compreendendo um produto fonte de ferro na forma de cápsulas sólidas, onde as cápsulas compreendem um núcleo compreendendo alginato de ferro, e uma camada externa compreendendo alginato de cálcio. As cápsulas são adequadas tanto para fortificar alimento hidratado quanto alimento desidratado e são caracterizadas por uma excelente capacidade de carga, bem como por terem uma boa estabilidade sob condições locais padrão de armazenagem e uso. O alimento fortificado com ferro da invenção serve para evitar a ocorrência de deficiência de ferro ou reduzir a deficiência de ferro em um ser humano.