



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ENCAPSULACIÓN DE HIERRO HEMÍNICO EN CÁPSULAS DE
ALGINATO DE SODIO COMO UN SUPLEMENTO ORAL PARA
CERDOS NEONATOS: ESTUDIOS *IN VITRO***

Valesca Solange Hernández Gálvez

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: CAROLINA PAZ VALENZUELA VENEGAS
Universidad de Chile

Proyecto Inserción de Capital Humano Avanzado en la Academia 7912010043

SANTIAGO, CHILE
2015



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ENCAPSULACIÓN DE HIERRO HEMÍNICO EN CÁPSULAS DE
ALGINATO DE SODIO COMO UN SUPLEMENTO ORAL PARA
CERDOS NEONATOS: ESTUDIOS *IN VITRO***

Valesca Solange Hernández Gálvez

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: CAROLINA PAZ VALENZUELA VENEGAS
Universidad de Chile

Proyecto Inserción de Capital Humano Avanzado en la Academia 7912010043

Nota Final	
Prof. Guía: Carolina Paz Valenzuela V.
Profesor Corrector: María Sol Morales S.
Profesor Corrector: Andrónico Neira C.

SANTIAGO, CHILE
2015

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Agradezco a Dios por bendecir cada día de mi vida, sin Él nada sería posible.

Agradezco y dedico este trabajo a mi familia por brindarme constantemente su apoyo y compañía durante este enriquecedor proceso de mi vida; pero en especial a mi madre Griselda Gálvez Medina y abuelita Gricelda Medina Filippi ambas han sido siempre pilares fundamentales en mi formación personal y profesional, porque con su amor incondicional hicieron que alcanzar esta meta fuera más simple.

A mi maestra y profesora guía Dra. Carolina Valenzuela Venegas, que con su entereza y empatía depositó toda su confianza en mí y me brindó su máximo apoyo personal y profesional, para el desarrollo de este innovador y próspero proyecto. Con esto además, permitirme adquirir y cultivar nuevos conocimientos en ciencia e investigación gracias a su admirable vocación docente.

Al cuerpo docente y profesionales asociados del Departamento de Fomento de la Producción Animal de la Universidad de Chile, especialmente la Dra. María Sol Morales, Sra. Gemita Saavedra, Srta. Verónica Peña y Sra. Norma San Marín. Personas de gran valor a quienes estimo profundamente, por su ayuda, paciencia y el grato tiempo compartido mientras desarrollé una de las partes más importante de este proyecto, la etapa experimental en el laboratorio.

No me queda más que agradecer a mis amigas y a todos quienes se hicieron partícipes en algún momento de mi vida universitaria brindándome sincero apoyo para lograr culminar esta bella etapa.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CAPÍTULOS	i
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1.- Materiales.....	6
2.2.- Análisis químico y contenido de Fe de eritrocitos bovinos deshidratados por atomización (EBDA).....	6
2.3.- Solución de alginato de sodio (AS).....	7
2.4.- Solución reticulante de cloruro de calcio (CaCl ₂).....	7
2.5.- Preparación de mezclas entre AS y EBDA.....	7
2.6.- Formación de cápsulas.....	7
2.7.- Contenido de Fe y eficiencia de encapsulación (EE%) de las cápsulas.....	8
2.8.- Caracterización de las cápsulas.....	8
2.9.- Perfil de liberación <i>in vitro</i> de Fe desde las cápsulas en condiciones digestivas simuladas de cerdos neonatos.....	9
2.10.- Análisis estadístico.....	10
3.- RESULTADO Y DISCUSIÓN	11
3.1.- Caracterización de EBDA.....	11
3.2.- Caracterización de las cápsulas.....	11
3.2.1.- Contenido de Fe total de las cápsulas.....	12
3.2.2.- EE% de las cápsulas.....	13
3.2.3.- Aspecto y morfología de las cápsulas.....	14
3.2.4.- Color de las cápsulas.....	17
3.2.5.- Tamaño de las cápsulas.....	18
3.2.6.- Contenido de la humedad de las cápsulas.....	19
3.2.7.- Resistencia de las cápsulas.....	19
3.3.- Perfil de liberación <i>in vitro</i> de Fe desde las cápsulas.....	20
3.3.1.- Perfil de liberación gástrico.....	20

3.3.2.- Perfil de liberación intestinal.....	23
4.- CONCLUSIONES	26
5.- BIBLIOGRAFÍA	27

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Parámetros fisicoquímicos de las cápsulas.....	18
Figura 1	Contenido de Fe total de cápsulas de alginato de sodio (AS) y eritrocitos de bovinos deshidratados por atomización (EBDA).....	12
Figura 2	Eficiencia de encapsulación (EE%) de las cápsulas de alginato de sodio (AS) y eritrocitos de bovinos deshidratados por atomización (EBDA).....	13
Figura 3	Fotografía digital de cápsulas de alginato de sodio (AS) y eritrocitos de bovinos deshidratados por atomización (EBDA).....	15
Figura 4	Imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido de cápsulas de alginato de sodio (AS) y eritrocitos de bovinos deshidratados por atomización (EBDA).....	16
Figura 5	(A) Perfil de liberación gástrica durante 60 minutos. Y (B) Perfil de liberación intestinal de Fe <i>in vitro</i> de las cápsulas de (AS) y (EBDA) durante 12 minutos.....	21

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue elaborar y caracterizar cápsulas de alginato de sodio (AS) que encapsulen hierro hemínico (FeHem) y estudiar sus perfiles de liberación en condiciones gastrointestinales *in vitro* simuladas de cerdo lechón. Como fuente de FeHem se utilizaron eritrocitos bovinos deshidratados por aspersión (EBDA). El material encapsulante fue AS. Se preparó una solución de AS al 2% p/v, en la cual se suspendieron distintas proporciones de EBDA: 2,5, 5, 10, 20 y 30% p/v, las que se gotearon sobre una solución reticulante de CaCl₂. Se obtuvieron 5 tipos de cápsulas por gelación iónica, con diferentes proporciones entre AS:EBDA: 1:1,25, 1:2,5, 1:05, 1:10 y 1:15 (p/p) y cápsulas control (sin EBDA). Las cápsulas se caracterizaron según: contenido de Fe, eficiencia de encapsulación (EE%), tamaño, humedad, resistencia, color, apariencia, y morfología por microscopía electrónica de barrido equipada con espectrometría de energía dispersiva. Se aplicó un ANDEVA y prueba de Tukey ($p < 0,05$) o Kruskal-Wallis con una comparación de múltiples rangos ($p < 0,05$) (Stadistix 8). El contenido de FeHem de EBDA fue 242,2 mg/100g. El Fe total de las cápsulas fluctuó entre $0,47 \pm 0,05$ (1:1,25) a $5,50 \pm 0,76$ (1:15) $\mu\text{g Fe/cápsula}$. La EE% fue alta para todas las cápsulas y significativamente mayor para las cápsulas 1:05 alcanzando un 75%. El tamaño de las cápsulas aumentó significativamente a mayor contenido de EBDA de $0,83 \pm 0,01$ mm (1:1,25) hasta $1,57 \pm 0,05$ mm (1:15). Los valores de humedad disminuyeron significativamente a mayor contenido de EBDA de $92,60 \pm 0,16\%$ (1:1,25) a $81,14 \pm 0,72\%$ (1:15). Se observó que las cápsulas en proporción 1:1,25 mostraron un color marrón más claro que las otras proporciones (con mayor valor de los parámetros de color a* y b*, y un menor valor de L*). La resistencia osciló entre $2,5 \pm 0,2$ N (1:1,25) a $5,3 \pm 2,7$ N (1:15), siendo significativamente superior para las proporciones 1:10 y 1:15. La morfología de las cápsulas fue de forma esférica, regular, de superficie lisa, y a mayor contenido de EBDA se hizo más irregular (1:10 y 1:15). El Fe se distribuyó homogéneamente en las cápsulas. La liberación de Fe desde las cápsulas en condiciones gástricas *in vitro* evidenció que aquellas que contenían las dos concentraciones menores de EBDA, liberaron significativamente más Fe (23% en promedio), que las proporciones con mayor contenido de EBDA (11% en promedio). La liberación de Fe en condiciones intestinales *in vitro*, también resultó mayor en aquellas cápsulas 1:1,25 y 1:2,5 (71% promedio) hasta el minuto 120, respecto al resto de las

proporciones (65% promedio). Sin embargo, a los 135 minutos no se detectaron diferencias significativas entre los porcentajes de liberación de las cápsulas. Se obtuvieron 5 tipos de cápsulas, que encapsularon FeHem eficientemente, y con una distribución homogénea del Fe en su interior. Las cápsulas 1:15 presentaron la mayor concentración de Fe, una alta EE%, y liberaron un mínimo porcentaje de Fe en condiciones gástricas, y un alto porcentaje en intestino, características apropiadas para su selección como un suplemento de Fe oral.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and characterize sodium alginate (AS) capsule that encapsulate heme iron (FeHem), and study their release profiles *in vitro* at simulated gastrointestinal conditions for pig. Spray-dried bovine erythrocytes (EBDA) was used as FeHem source. The encapsulating material was AS. AS solutions was prepared at 2% w/v, and different concentrations of EBDA were suspended into AS solution: 2.5, 5, 10, 20 and 30% w/v, dropped over a CaCl₂ crosslinking solution. Five types of capsules were obtained by ionic gelation with ratios between AS:EBDA: 1:1.25, 1:2.5, 1:05, 1:10 y 1:15 (w/w) and control capsules (without EBDA). The capsules were characterized by: Fe content, encapsulation efficiency (EE%), size, moisture, resistance, color, appearance and morphology by scanning electron microscopy equipped with energy dispersive X-ray spectroscopy. Statistical analysis ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$) or Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) and comparison of multiple ranges (Stadistix 8) was used. The content of FeHem of EBDA was 242.2 mg/100g. The total Fe of the capsules ranged from 0.47 ± 0.05 (1:1.25) to 5.50 ± 0.76 (1:15) $\mu\text{g Fe/capsule}$. The EE% was high and significantly higher for the capsules 1:05 (75%). The size of the capsules was increasing significantly to higher EBDA content from 0.83 ± 0.01 mm (1:1.25) to 1.57 ± 0.05 mm (1:15). The moisture values was decreasing significantly to higher EBDA content from $92.60 \pm 0.16\%$ (1:1.25) to $81.14 \pm 0.72\%$ (1:15). It was observed that the capsules at 1:1.25 ratio showed a lighter brown color than the other ratios (with a higher value the color parameters a^* and b^* , and lower value of L^*). The resistance ranged from 2.5 ± 0.2 N (1:1.25) to 5.3 ± 2.7 N (1:15), being significantly higher to 1:10 and 1:15 ratios. The morphology of the capsules was spherical, regular with a smooth surface, but with a higher EBDA content became more irregular (1:10 and 1:15). Fe is homogeneously distributed in the capsules. The release of Fe from the capsules at *in vitro* gastric conditions, showed that the capsules at the two lower concentrations of EBDA, release significantly more Fe (23% average), than the ratios with higher EBDA content (11% average). The Fe release at *in vitro* intestinal conditions was also higher in 1:1.25 and 1:2.5 capsules (71% average) at 120 minutes of incubation, compared to others ratios (65% average). However, at 135 minutes not were detect significant differences between the capsules. Five types of capsules were obtained, which efficiently encapsulated FeHem. The Fe showed a homogeneous distribution in the capsules. The

capsules 1:15 had a high Fe content and EE%, and presented a low percentage of Fe release at gastric conditions, and high at intestinal conditions. These features are appropriate for its selection as a Fe oral supplement.

1.- INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es el principal mineral precursor de la formación de hemoproteínas como la hemoglobina y mioglobina, actúa como cofactor de citocromos, catalasas, peroxidasas y también en varias reacciones de óxido-reducción (Pérez, 2009). Este micronutriente se encuentra presente en los alimentos en dos formas, como Fe hemínico (FeHem), llamado así por formar parte del grupo hemo de hemoproteínas, el cual está contenido en alimentos de origen animal (carne, vísceras y sangre) (Conrad y Umbreit, 2000). Esta forma de Fe no es comúnmente consumida por los cerdos. Sin embargo, en algunas dietas para cerdos de recría y adultos se utilizan insumos como harinas de carne y sangre, que lo incluyen (DeRouchey *et al.*, 2003). La otra forma, corresponde a Fe no hemínico (Fe no-Hem), que se encuentra disponible como suplementos inorgánicos, en alimentos de origen vegetal y animal como huevos y lácteos (Conrad y Umbreit, 2000). Esta forma representa la mayor fuente de Fe para los cerdos (Yu *et al.*, 2000). Ambas formas presentan distinta biodisponibilidad, debido a sus diferentes vías de absorción, formas químicas, solubilidades y factores potenciadores e inhibidores que afectan su absorción durante su paso por el tracto gastrointestinal (Jolliff y Mahan, 2011; Lipiński *et al.*, 2013), resultando siempre más biodisponible, en el caso de humanos, roedores y cerdos, la forma de FeHem (Lipiński *et al.*, 2013; Pfau *et al.*, 1977; Quintero-Gutiérrez *et al.*, 2008). El FeHem es absorbido a nivel duodenal, desde el lumen intestinal es transportado al enterocito a través de un transportador proteico que no ha sido del todo caracterizado en el cerdo, pero sí en humanos y roedores conocido como “hem carrier protein-1” (HCP-1) (Shayeghi *et al.*, 2005), una vez ingresado al enterocito, el grupo Hem sufre una catabolización por la enzima hemo-oxigenasa 1, resultando en Fe libre que es incorporado al “pool” de Fe de la célula intestinal (Collins *et al.*, 2008; Lipiński *et al.*, 2013). Lipiński *et al.* (2013) reportaron la posible internalización del FeHem vía HCP-1, en donde esta molécula podría permanecer completa en el enterocito y ser exportada a la circulación mediante la expresión del “feline leukemia virus subgroup C cellular receptor” (FLVCR1) en la zona basal del enterocito, que podría entregar el grupo hem a un transportador específico para su distribución a la células blanco, hecho que aún está en estudio.

La anemia por deficiencia de Fe es una carencia nutricional del cerdo lactante (Collard, 2009; Lipiński *et al.*, 2013). Sin la suplementación de Fe exógeno el cuadro clínico se instaura entre los 7 a 10 días posteriores al nacimiento (Egeli *et al.*, 1998; Zimmermann, 1995), generando un gran impacto en la industria porcina debido a que afecta negativamente los parámetros productivos, incrementa la susceptibilidad a infecciones y los índices de mortalidad, que puede llegar a un 10% (Ishaya e Ishaya, 2012; Pérez, 2009). Su origen es multicausal, y algunos factores determinantes son: el rápido crecimiento de los cerdos (Lipiński *et al.*, 2010), el insuficiente contenido de Fe en la leche de la cerda (1 mg/día), que no logra cubrir el requerimiento de 7-12 mg de Fe diarios/animal (Jolliff y Mahan, 2011), la escasa reserva corporal de Fe que no supera los 50 mg, almacenados principalmente en el hígado (Pérez, 2009; Peters y Mahan, 2008), y privación de acceso a fuentes de Fe natural en los sistemas productivos confinados (Ishaya e Ishaya, 2012). Recientemente Lipiński *et al.* (2010) describieron una inmadurez en el sistema de absorción y transporte de Fe no-Hem durante la primera semana de vida de cerdos neonatos.

Como prevención, actualmente se administra Fe dextrano en dosis única de 200 mg vía intramuscular (im) en los cerdos neonatos (Ishaya e Ishaya, 2012; Peters y Mahan, 2008). Aunque esta medida es efectiva contra la anemia por deficiencia de Fe, se presentan varias desventajas como: detrimento del bienestar animal por el estrés y dolor que genera esta maniobra (Marchant-Forde *et al.*, 2014), alteraciones cutáneas, nerviosas y musculares como abscesos, hematomas, rabdomiolisis y polimiositis, que pueden causar cojeras temporales; además de disminuir el valor comercial del músculo, cuando la administración de este suplemento no se realiza de la manera adecuada (Foulkes *et al.*, 1991; Svoboda y Drábek, 2007). Pero, principalmente cuadros de toxicidad por el alto aporte de Fe administrado, que conduce a un aumento en los procesos oxidativos hepáticos, reacciones de hipersensibilidad e intoxicaciones por Fe (Lipiński *et al.*, 2010; Jolliff y Mahan, 2011). Otra alternativa a este procedimiento es la suplementación oral con Fe (Mehansho, 2006; Theilkuhl *et al.*, 2000). La mayoría de las experiencias se han realizado suplementando cerdos lechones durante sus primeras semanas de vida con Fe no-Hem (pastas de Fe, sulfato ferroso, sales ácidas de Fe, compuesto de Fe aminoquelados, suelo ferralínico, entre otros.). Sin embargo, los resultados han sido desalentadores y actualmente esta vía de suplementación no es comúnmente utilizada, debido a la baja biodisponibilidad del Fe no-Hem (Ishaya e

Ishaya, 2012), explicada por factores intraluminales que inhiben su absorción como: caseína, calcio, cobre, zinc, proteína de suero, fosfatos, taninos, polifenoles, soya, etc. (Mehansho, 2006; Yu *et al.*, 2000). Por otra parte, como se describió anteriormente también influye el escaso desarrollo de la maquinaria molecular implicada en la absorción y transporte de esta forma de Fe (Lipiński *et al.*, 2010).

La utilización de subproductos como ingredientes alimentarios se ha incrementado en la industria de la alimentación animal. Hay experiencias en el uso de harina de sangre para aprovechar su alto valor nutritivo en la alimentación de cerdos y eliminar un efluente contaminante (Almeida *et al.*, 2013; DeRouchey *et al.*, 2003). Sin embargo, la investigación sobre la utilización de la harina de sangre como fuente de FeHem para cerdos lechones es limitada. Algunas estimaciones de la biodisponibilidad del FeHem de la harina de sangre en cerdos oscilan entre 50-60% (Pfau *et al.*, 1977). Quintero-Gutiérrez *et al.* (2008) utilizaron galletas elaboradas con FeHem (17,9% de inclusión) como medio de suplementación oral para cerdos de 4 semanas de edad, que fue comparado con la administración de sulfato ferroso oral. El grupo suplementado con FeHem mostró mayores ganancias de peso, una disminución del 10% del índice de mortalidad, mejora de los parámetros hematológicos y mayor absorción intestinal de Fe, siendo un 23% superior al grupo suplementado con sulfato ferroso. La mayor biodisponibilidad del FeHem en los cerdos podría ser explicada, porque esta forma de Fe no tiene fuertes inhibidores de su absorción (Henry y Miller, 1995). Además, el FeHem ingresa como molécula completa al enterocito, lo que le brinda protección; y es absorbida por una vía alternativa a la del Fe no-Hem (Lipiński *et al.*, 2010; 2013). Por otra parte, en estudios sobre absorción de FeHem realizados en humanos y roedores, se ha determinado que los factores que aumentan su biodisponibilidad, son proteínas animales como la hemoglobina (Conrad *et al.*, 1966), diferentes tipos de aminoácidos o carne bovina (Layrisse *et al.*, 1984), y cuando el FeHem se entrega dentro de su matriz (como eritrocitos completos) (Fernando Pizarro, Comunicación personal¹). Así la harina de sangre se podría convertir en un sustrato para la suplementación oral de FeHem a bajo costo. Sin embargo, existen otros problemas asociados a la suplementación oral de Fe como la necesidad de entregar varias dosis repetidas en el tiempo, su baja palatabilidad, problemas de tolerancia gástrica e inestabilidad a nivel gastrointestinal

¹ Informe final Proyecto FONDECYT Regular 1061060. Comunicación personal. Profesor Fernando Dagoberto Pizarro Aguirre. Director del proyecto. INTA, Universidad de Chile.

(Theilkuhl *et al.*, 2000). Estas problemáticas han obligado a la industria alimentaria a buscar nuevas herramientas tecnológicas para resolverlas. Una alternativa es la utilización de la técnica de encapsulación.

La encapsulación, es una tecnología de micro-empaquetamiento que consiste en el recubrimiento de un material activo o núcleo que puede encontrarse en estado líquido, sólido o gaseoso, con una membrana polimérica semi-permeable de diversos materiales, generando micropartículas, microcápsulas y/o microesferas de tamaños variables (nm a mm) (Gouin, 2004; Nazzaro *et al.*, 2012; Rathore *et al.*, 2013). La encapsulación puede ocurrir mediante diversos métodos: atomización, gelación iónica, extrusión, emulsión, coacervación, entrapamiento en liposomas, entre los más usados (Gouin, 2004; Nazzaro *et al.*, 2012). La encapsulación tiene un amplio uso en la industria de alimentos. Hace algunas décadas se comenzó a utilizar ampliamente en medicina veterinaria con un importante enfoque en nutrición animal (Underwood y van Eps, 2012; Valenzuela *et al.*, 2013). En el ámbito de la nutrición y alimentación animal esta técnica provee ciertas ventajas como: proteger al material núcleo de su paso por el tracto gastrointestinal con materiales muralla adecuados, y liberar su contenido a velocidades controladas en zonas específicas del intestino (Nazzaro *et al.*, 2012). Lo cual sería adecuado para el caso del Fe ya que podría evitar la interacción de este con componentes dietarios que disminuyan su absorción mejorando su biodisponibilidad, además podría evitar alteraciones organolépticas cuando el Fe es usado en fortificación de alimentos, ya que el Fe induce oxidación de lípidos generando olores indeseables y sabor metálico (Mehansho, 2006; Theilkuhl *et al.*, 2000). Lograr obtener micropartículas que liberen Fe controladamente podría reducir el número de dosificaciones repetidas para su suplementación oral y dirigir su liberación a nivel de duodeno (Nazzaro *et al.*, 2012). Para la encapsulación de Fe y su uso como suplemento oral, se debe seleccionar un material muralla que soporte condiciones gástricas y que libere la mayor cantidad de su contenido a nivel de intestino delgado. También, se espera que este material tenga una alta eficiencia de encapsulación superior al 50%. Uno de los polímeros con mayores ventajas para la elaboración de micropartículas y cápsulas es el alginato de sodio (AS), el cual es un polisacárido constituido por los ácidos D-manúrico y L-gulurónico, de origen natural, extraídos desde algas pardas (Sankalia *et al.*, 2005). El AS ha sido ampliamente utilizado como material muralla para generar cápsulas para la industria alimentaria debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad

e inocuidad (Cook *et al.*, 2012). Además, presenta fácil manipulación, nula toxicidad, alta solubilidad en agua, propiedades espesantes y gelificantes (Cook *et al.*, 2012; Lotfipour *et al.*, 2012). Uno de los métodos bastante estudiados para formar cápsulas en base a AS es la gelación iónica, en donde soluciones de AS se gotean sobre soluciones saturadas de cationes como Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , generándose una transición sol-gel, que produce la formación de cápsulas (Barba *et al.*, 2012; Capone *et al.*, 2013; Cook *et al.*, 2012; Gouin, 2004; Sharma y Mazumdar, 2014). Las cápsulas de AS son estables, presentan una alta eficiencia de encapsulación y mínima liberación de su contenido encapsulado en fluidos de pH ácidos como el gástrico, aumentando su velocidad de liberación y capacidad de desintegración en condiciones de pH neutros y alcalinos (5,5 a 7) del intestino delgado (Bhopatkar *et al.*, 2005; George y Abraham, 2006; Sankalia *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006).

Hay varios reportes relacionados con encapsulación de Fe no-Hem como vehículo de fortificación de alimentos o suplementos orales y de su utilización en modelos celulares, roedores y humanos como medio de prevención y/o tratamiento de la anemia por deficiencia de Fe (Andersson *et al.*, 2008; Navas-Carretero *et al.*, 2009; Zimmermann, 2004). En nutrición animal hay información de encapsulación de algunos minerales como cinc y cromo (Underwood y van Eps, 2012), sin embargo, no hay reportes acerca del uso de suplementos basados en Fe encapsulado en cerdos. Para el caso de la forma hemínica, la información sobre su encapsulación es escasa en comparación con la investigación realizada sobre encapsulación de Fe no-Hem. El FeHem se ha encapsulado en liposomas, los cuales presentan una baja eficiencia de encapsulación (35% aproximadamente), y han sido probados en ratas con anemia por inflamación (Yuan *et al.*, 2013), en ratas normovolémicas (Rudolph *et al.*, 1995) y en ratas con bajos índices de hemoglobina provocado por ejercicio extenuante (Xu *et al.*, 2014). En estos estudios la suplementación con los liposomas de FeHem han mejorado los parámetros hematológicos por encima de la suplementación con el FeHem no encapsulado. Gran parte de la investigación en el área de encapsulación del grupo hemo se ha centrado en generar micropartículas de hemoglobina como portador de oxígeno para los tejidos, sustituto de células eritroides o como biosensores (Ma *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2007). Por tanto, el objetivo de la presente memoria de título fue elaborar y caracterizar cápsulas de alginato de sodio que encapsulen FeHem y estudiar sus perfiles de liberación en condiciones gastrointestinales *in vitro* simuladas de cerdo.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Materiales

Se utilizó como material núcleo de las cápsulas eritrocitos bovinos deshidratados por atomización (EBDA) (LICAN Alimentos S.A). Como material pared, AS (Sigma Aldrich®, USA), y como agente reticulante CaCl_2 (Merck® S.A). Para hacer las digestiones *in vitro* se utilizaron preparados comerciales, pepsina A de mucosa de cerdo (107185, Merck® S.A), mezcla de extractos de ácidos biliares de cerdo (B8631, Sigma Aldrich®, USA), y pancreatina de cerdo (incluye enzimas como amilasa, tripsina, ribonucleasa y proteasa) (P3292-25G, Sigma Aldrich®, USA). Todos los reactivos fueron de grado analítico obtenidos en Merck® S.A y Sigma Aldrich®.

2.2.- Análisis químico, contenido de Fe y color de EBDA

A los EBDA se les realizó un análisis químico proximal (A.O.A.C., 1996) para determinar el contenido de humedad (método 945.15), proteína cruda (método de Kjeldahl 945,18, $N \times 6,25$), y cenizas (método de 920.153).

Se determinó el contenido de Fe total (FeT) desde los EBDA mediante digestión ácida (método 999.11, A.O.A.C., 1996), utilizando espectrofotometría de absorción atómica (espectrofotómetro, GBC modelo 905AA, Australia). El contenido de Fe no-Hem se determinó después de una extracción ácida (Rebouche *et al.*, 2004) y lectura por espectrofotometría de absorción atómica. El contenido de FeHem fue calculado por diferencia (FeT – Fe no-Hem). Los resultados se expresaron en g/100g de muestra.

El color fue determinado con un colorímetro (Konica-Minolta CR-300, Japón), utilizando los parámetros de la escala de color Hunter Lab: L^* , a^* y b^* .

2.3.- Solución de AS

Se preparó una solución al 2% p/v de AS y agua desionizada, la cual se mantuvo con agitación continua durante 40 min a 750 rpm (agitador, REMI. India) a 25°C, hasta lograr una solución homogénea.

2.4.- Solución reticulante de CaCl₂

Se preparó una solución al 5% p/v de CaCl₂ y agua desionizada, la cual se mantuvo en agitación continua durante 10 min a 300 rpm (agitador, REMI. India) a 25°C, logrando una solución transparente y homogénea.

2.5.- Preparación de mezclas entre AS y EBDA

Los EBDA se suspendieron en la solución de AS 2% p/v en diferentes concentraciones: 2,5, 5, 10, 20 y 30% p/v, y se mezclaron en un agitador magnético hasta obtener mezclas homogéneas (\approx 30 min). A las mezclas se le determinó la viscosidad rotacional (viscosímetro Brookfield RVT, England) a 25°C (aguja N° 61); en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

2.6.- Formación de cápsulas

Las 5 mezclas entre AS/EBDA fueron goteadas con jeringa de 1 mL y aguja 25G x 5/8 (de tuberculina) sobre la solución reticulante descrita anteriormente, bajo agitación magnética (agitador, Remi India). Finalizado el goteo se mantuvo la agitación del sistema durante 5 minutos. Se obtuvieron 5 tipos de cápsulas cuyas proporciones entre el material encapsulante (AS) y el material núcleo (EBDA) fueron de: 1:1,25, 1:2,5, 1:05, 1:10 y 1:15 (p/p). Las cápsulas fueron filtradas con un colador metálico, descartando la solución reticulante. Una parte de las cápsulas fueron guardadas en estado fresco para la realización de los análisis de eficiencia de encapsulación (EE%), tamaño, humedad, color, resistencia, apariencia, y morfología. La otra parte de las cápsulas fueron secadas en estufa a 50°C durante 10 h aproximadamente para determinarles contenido de FeT, FeHem, y tamaño.

2.7.- Contenido de Fe y EE% de las cápsulas

El contenido de Fe de las cápsulas se determinó por espectrofotometría de absorción atómica. Para esto, con jeringa de 1 mL y aguja 25G x 5/8 se tomaron desde las mezcla de AS/EBDA 5, 10 y 15 gotas de cada proporción, y se suspendieron en 10 mL de agua desionizada siendo homogenizadas con agitación mecánica continua, quedando en reposo hasta su cuantificación por espectrofotometría de absorción atómica (fracción correspondiente al FeT teórico encapsulado). Por otra parte se pesaron 0,5 g de cápsulas las cuales se suspendieron en 10 mL de agua desionizada, y a continuación fueron sometidas a sonicación (Elma modelo Elmasonic E 08.2011, Alemania), dos veces por veinte minutos cada una, luego se centrifugaron a $851 \times g$ por 10 min. En el sobrenadante se determinó el FeT superficial, por espectrofotometría de absorción atómica. La EE% se cuantificó según la ecuación 1.

$$EE(\%) = \frac{FeT_{teórico} - FeT_{superficial}}{FeT_{teórico}} * 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde: EE, es eficiencia de encapsulación.

2.8.- Caracterización de las cápsulas

Humedad: la humedad se determinó según la metodología descrita por la A.O.A.C. (1996) (método 945.15).

Color: el color fue determinado con un colorímetro (Konica-Minolta CR-300, Japón), utilizando los parámetros de la escala de color Hunter Lab: L^* , a^* y b^* .

Tamaño: se midió el diámetro de las cápsulas húmedas y secas utilizando un micrómetro digital (Veto E5010109, China).

Resistencia: la resistencia a la presión de las cápsulas se determinó mediante el ensayo de tracción con un durómetro digital (TSS OC-SPA, Inglaterra) equipado con una sonda de metal de 1 mm de diámetro, con desplazamiento vertical a una velocidad de 1,5

mm/s. Los resultados se expresaron como la fuerza máxima de penetración en Newton (N) (N= 30 por cada réplica).

Apariencia: la apariencia de las cápsulas se registró mediante imágenes tomadas con una cámara digital (Sony DSC-HX1, USA).

Morfología: para describir la morfología superficial de las cápsulas se realizó microscopía electrónica de barrido con un microscopio LEO 1420 VP (Cambridge, Reino Unido), equipado con espectrometría de energía dispersiva, usando un voltaje de aceleración de 25 kv. Previo al análisis, se seleccionaron cápsulas de manera aleatoria, las cuales fueron secadas a punto crítico y montadas en una moneda sombreada con oro dos veces (PELCO 91.000).

2.9.- Perfil de liberación *in vitro* de Fe desde las cápsulas en condiciones digestivas simuladas de cerdos neonatos

Las digestiones gástricas e intestinales se realizaron en base a la metodología propuesta por Boisen y Fernández (1995). Para simular la condición gástrica se preparó una solución de 100 mL de agua desionizada, a la cual se le agregaron 2 g/L de NaCl, 10 g/L de pepsina A (preparado comercial, Merck®), y se ajustó el pH a 2 con HCl 1 N. Luego, se le agregaron 2,5 g de cápsulas y se incubaron por 75 min a 37°C con agitación constante a 150 rpm (agitador, REMI. India). Cada 15 min se obtuvieron 5 mL de la suspensión para la determinación de FeT por espectrofotometría de absorción atómica. En los cálculos se consideró la pérdida de volumen de la suspensión. Como blanco se utilizaron cápsulas de AS sin EBDA. Finalmente, las cápsulas se filtraron con un colador metálico y se les dejó reposar en papel absorbente para luego ser sometidas a digestión intestinal.

Para simular la condición intestinal se preparó una solución de 100 mL que contenía 8,76 g/L de NaCl en tampón fosfato (PBS 0,1 M, pH 7,4), a la cual se le agregaron 50 g/L de pancreatina de cerdo (preparado comercial, Sigma Aldrich®, USA) y 31,2 g/L de ácidos biliares de cerdo (preparado comercial, Sigma Aldrich®, USA) El pH de esta mezcla fue ajustado a 6 con HCl 1 N. A esta suspensión se le agregaron las cápsulas que ya habían sido digeridas en condiciones gástricas, las cuales se incubaron por 135 min a

37°C con agitación constante a 150 rpm (agitador, REMI. India). Cada 15 min se obtuvieron 5 mL de la suspensión para la determinación de FeT por espectrofotometría de absorción atómica. En los cálculos se consideró la pérdida de volumen de la suspensión. Como blanco se utilizaron cápsulas de AS sin EBDA.

2.10.- Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron en triplicado. A los datos se les realizó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilk). Para aquellos datos que mostraron una distribución normal: viscosidad, color, tamaño, humedad, contenido de Fe, EE% y perfiles de liberación gástrica e intestinal se les realizó el análisis estadístico mediante ANDEVA y una prueba de Tukey ($p < 0,05$). Los datos que no presentaron una distribución normal como la evaluación de resistencia se les aplicó una prueba de Kruskal-Wallis con una comparación de múltiples rangos ($p < 0,05$). Todos los análisis se procesaron con el programa Stadistix 8.

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- Caracterización de EBDA

La composición química de los EBDA fue de: $97,5 \pm 0,1\%$ materia seca, $93,1 \pm 0,6\%$ proteína cruda, $3,6 \pm 0,2\%$ ceniza, y $3,4\%$ extracto no nitrogenado. El contenido de FeT de los EBDA fue de $2,44 \pm 0,03$ mg/g, del cual una fracción mínima fue de Fe no-Hem, de $0,17$ mg/g, por lo tanto, el 99% del FeT contenido en los EBDA correspondió a FeHem. Los valores del análisis químico proximal se encontraron dentro de los rangos reportados para harinas de sangre, así como el contenido de Fe ($2,3$ a $2,5$ mg de Fe/g) para esta materia prima de origen bovino y porcino (Almeida *et al.*, 2013; Batal y Dale, 2014). El alto valor proteico mostrado por los EBDA fue alto y esperable, y se explica porque el componente principal de los eritrocitos es la hemoglobina (DeRouchey *et al.*, 2002; Wismer-Pedersen, 1988).

La evaluación colorimétrica de los EBDA, presentó valores de: $L^*=22,8 \pm 1,67$; $a^*=7,68 \pm 0,62$ y $b^*=7,03 \pm 0,54$. Un estudio realizado por Wismer-Pedersen (1988), reportó que harinas de sangre mostraban valores similares y un color marrón oscuro similar a lo observado en los EBDA.

3.2.- Caracterización de las cápsulas

Se obtuvieron 5 soluciones formadoras de cápsulas que presentaron los siguientes valores de viscosidad: 245 ± 15^a , 252 ± 27^a , 287 ± 41^a , 567 ± 53^b , y 758 ± 57^c mPa.s ($p < 0,05$). A partir de cada solución se obtuvo un tipo de cápsula, resultando 5 proporciones diferentes entre AS:EBDA de: 1:1,25, 1:2,5, 1:05, 1:10 y 1:15 (p/p) y cápsulas control (sin EBDA). Las características que presentaron las cápsulas fueron las siguientes:

3.2.1.- Contenido de Fe total de las cápsulas

Se determinó el contenido de FeT de las cápsulas por ser un método más sencillo y rápido, además casi la totalidad de FeT correspondió a FeHem. El contenido de Fe por cápsula, no evidenció diferencias significativas entre las cápsulas 1:1,25 y 1:2,5; sin embargo, en la medida que aumentó la concentración de EBDA se incrementó significativamente el contenido de Fe total de las cápsulas a partir de la proporción 1:05 (Figura 1).

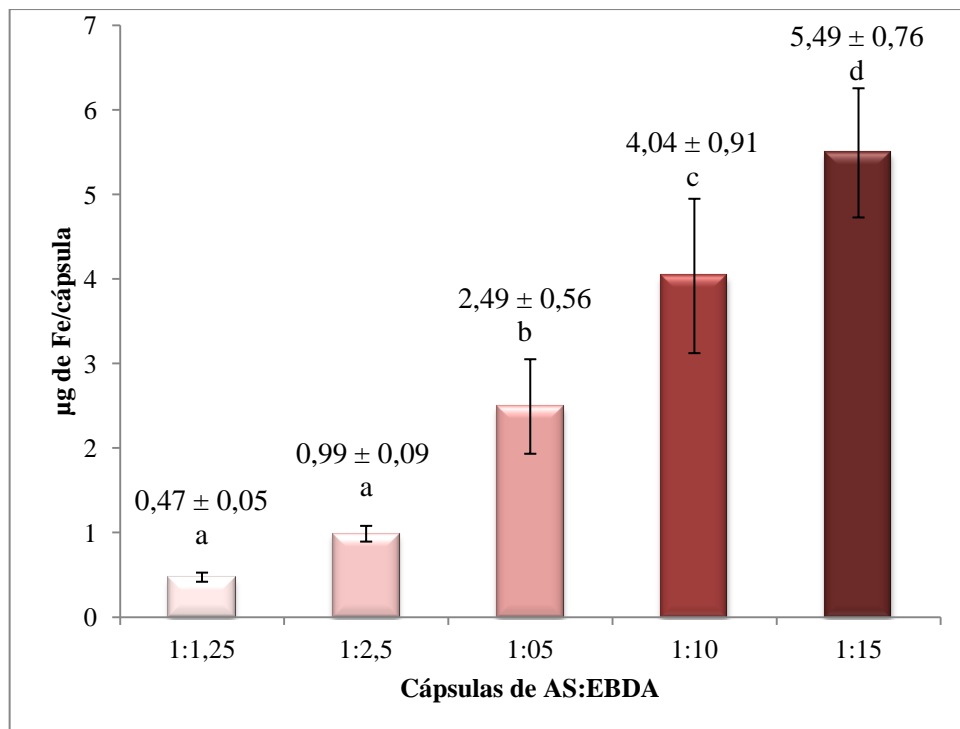


Figura 1. Contenido de Fe total de cápsulas de AS y EBDA. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANDEVA, Tukey, $p < 0,05$).

Actualmente no hay otros estudios que permitan comparar valores asociados a la cantidad de FeHem encapsulado en cápsulas de AS. Al comparar estos resultados con cápsulas de Fe no-Hem existen grandes diferencias. Banerjee *et al.* (2007) encapsularon $\text{FeCl}_3:\text{CaCl}_2$ en cápsulas de AS y observaron un incremento de la concentración de Fe por cápsula en la medida que se utilizaba una mayor proporción de Fe, alcanzando un máximo de 268 µg Fe/cápsula. Perez-Moral *et al.* (2013) encapsularon diferentes tipos de Fe no-Hem (FeCl_3 , FeSO_4 , Gluconato de Fe dihidrato y Citrato de Fe) en cápsulas de

AS y reportaron concentraciones de Fe desde 50 a 180 mg/g de cápsulas secas. Estos valores son bastante superiores al encontrado en el presente estudio (5,49 μg Fe/cápsula para la proporción 1:15), y se debe a que el Fe inorgánico tiene un porcentaje mayor de inclusión en las distintos compuestos férricos o ferrosos. A diferencia de los EBDA que por estar incluidos en una matriz orgánica su contenido de Fe es menor. Si bien los contenidos de Fe de las cápsulas (Figura 1), fueron inferiores comparados a otros compuestos de Fe no-Hem encapsulados (Banerjee *et al.*, 2007; Perez-Moral *et al.*, 2013), hay que tener en cuenta que el FeHem presenta mayor biodisponibilidad y potencia la absorción del Fe no-Hem (Conrad y Umbreit, 2000), por tanto si se quisiera aumentar la carga de Fe de las cápsulas generadas en este estudio se podrían elaborar combinaciones entre ambas formas de Fe.

3.2.2.- EE% de las cápsulas

La EE% fue alta para todas las cápsulas y significativamente mayor en las cápsulas elaboradas en la proporción 1:05 (Figura 2).

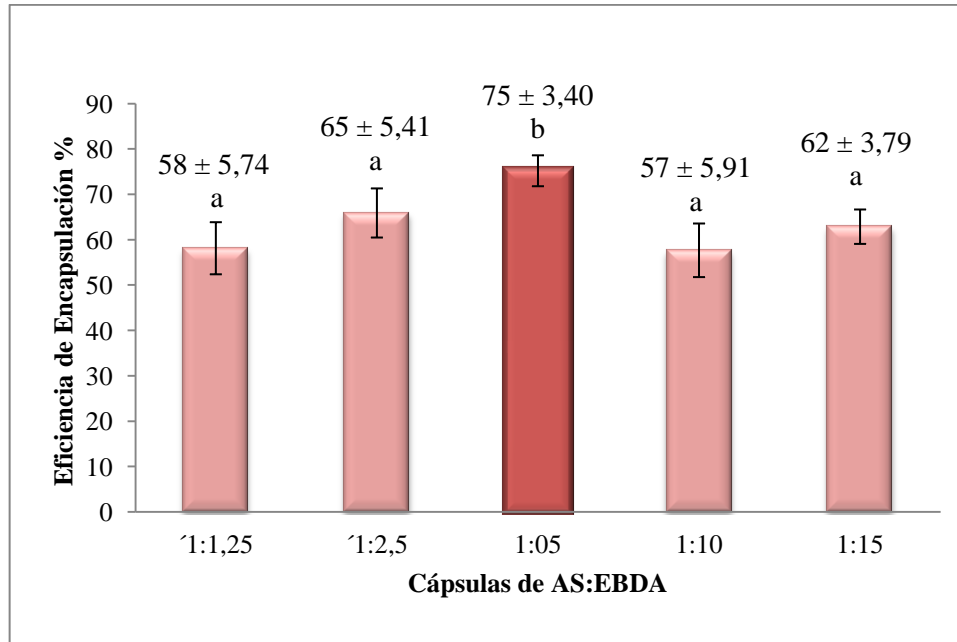


Figura 2. EE% de Fe de las cápsulas de AS y EBDA. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA, Tukey, $p < 0,05$).

Los resultados de EE% obtenidos en este trabajo difieren a lo esperado, ya que algunos estudios señalan que debiese ocurrir un aumento en la EE% a medida que se incrementa la concentración del material núcleo en las cápsulas (Hari *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el aumento de la cantidad de AS de 5 a 25 g/L, mejora la EE% hasta en un 30% para las cápsulas (Chan, 2011). En este tipo de sistema de encapsulación también se ha descrito la gran importancia del tipo de AS utilizado (su conformación, densidad, peso molecular, entre otras variables) (Chan, 2011); sin embargo, éstas no fueron determinadas en este trabajo, siendo un aspecto relevante de analizar para futuras investigaciones. Otros autores han planteado que un aumento en la concentración del núcleo y/o combinado con una baja concentración del polímero pared genera una disminución de la EE% (Chan, 2011; Rafati *et al.*, 1997). En este estudio la concentración del AS no varió, pero el material núcleo, EBDA aumentó en las diferentes proporciones, lo que podría haber generado un colapso del AS como matriz, a partir de la proporción 1:05, disminuyendo la EE%. Debido a que afectaría el grado de reticulación de la superficie de las cápsulas, resultando un factor determinante para disminuir la formación de poro y evitar difusión del material núcleo (Chan, 2011).

Los valores de EE% de las cápsulas resultaron ser superiores a los reportados para liposomas elaborados con FeHem (36%) (Yuan *et al.*, 2013). Además, se logró superar valores alcanzados en trabajos realizados con liposomas de Fe no-Hem (sulfato ferroso) (67%) (Li *et al.*, 2010).

3.2.3.- Aspecto y morfología de las cápsulas

El aspecto de las cápsulas obtenido mediante fotografía digital se presenta en la Figura 3, en donde se observa que su forma fue esférica y el color varió dependiendo de la concentración de EBDA, desde transparente para las cápsulas control a marrón oscuro para las cápsulas 1:15, debido a la pigmentación marrón oscura propia del grupo hemo (Huguet *et al.*, 1994; Wismer-Pedersen, 1988). En la Figura 3 también se puede observar un mayor tamaño de las cápsulas con mayores concentraciones de EBDA, lo que se define de manera cuantitativa más adelante en la Tabla 1.

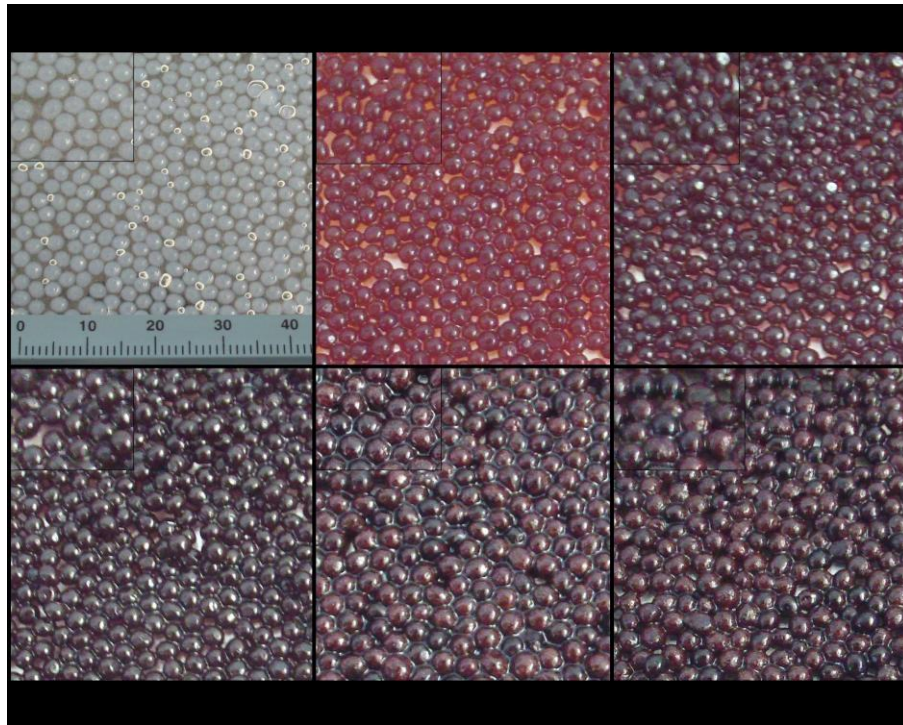


Figura 3. Fotografía digital de cápsulas de AS y EBDA en diferentes proporciones.

Imágenes obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido de los 5 tipos de cápsulas secas se muestran en la Figura 4. Se observa que las cápsulas hasta la proporción 1:05 presentan forma esférica, superficie lisa y homogénea (Figura 4 A-C), pero las cápsulas en proporciones 1:10 y 1:15 tienen forma irregular con poros de diversas magnitudes, y su superficie se vuelve porosa con rugosidades y prominencias (Figura 4 A-C). En la Figura 4D se observa la acumulación de Fe (denotado con puntos rojos) por mapeo con espectrometría de energía dispersiva, confirmando la presencia de este metal, cuya distribución resultó homogénea en la superficie de las cápsulas para todas las proporciones.

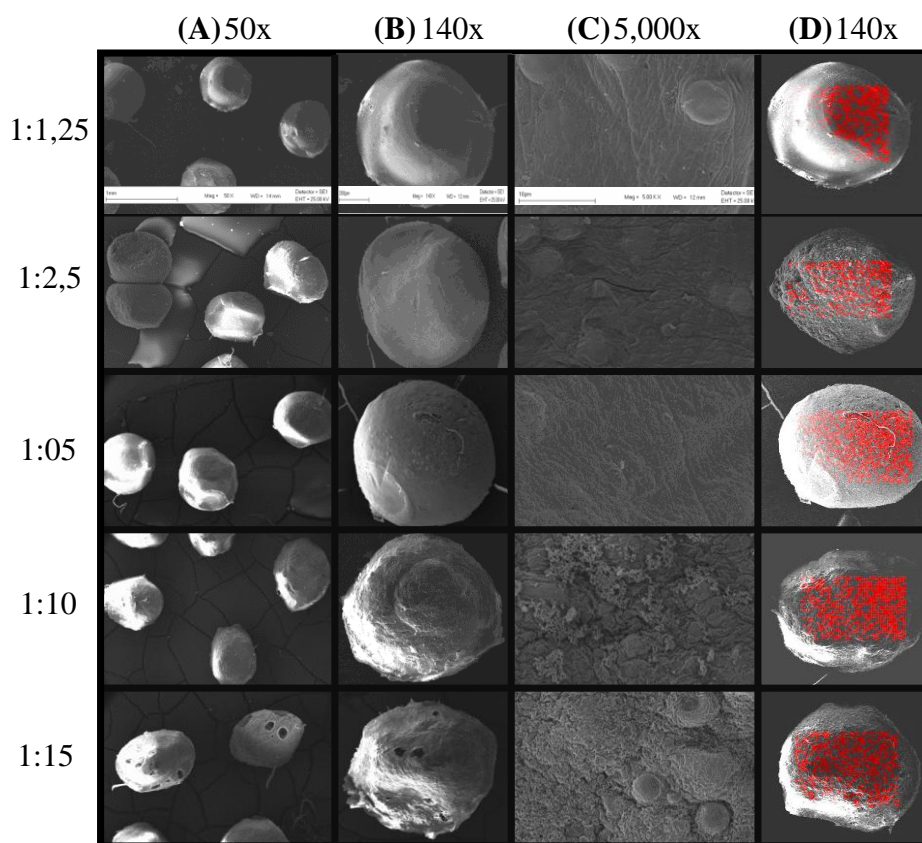


Figura 4. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de cápsulas de AS y EBDA, tomadas con diferentes magnitudes (A) 50X, (B) 140X y (C) 5,000X. La columna D muestra imágenes obtenidas por mapeo con espectrometría de energía dispersiva. El color rojo indica átomos de Fe.

El análisis de morfología de las cápsulas reveló una forma esférica regular y lisa, forma que ha sido descrita anteriormente en cápsulas de AS y hemoglobina (Silva *et al.*, 2006). Esta apariencia también ha sido identificada en cápsulas de AS que encapsulan Fe no-Hem (FeCl_3) (Banerjee *et al.*, 2007). La irregularidad observada en las dos proporciones con mayor contenido de EBDA se podría relacionar con el aumento de la viscosidad de las soluciones formadoras de las cápsulas (ver sección 3.2). Este efecto fue previamente descrito por Fundueanu *et al.* (1999), quienes señalaron que soluciones muy viscosas generan cápsulas de aspecto deforme y de superficie irregular. Por lo tanto, es posible establecer que a consecuencia del alto contenido de EBDA en ambas proporciones, los cuales poseen propiedades gelificantes potentes por efecto del alto contenido de hemoglobina (Saguer *et al.*, 2008; Salvador *et al.*, 2009), ocurrió una

aceleración del proceso de coagulación en la solución formadora de estas cápsulas, que gatilló los cambios morfológicos observados.

Ensayos realizados por Liu *et al.* (2012) han determinado que la apariencia de las cápsulas depende de la proporción de los materiales utilizados, es así como cápsulas elaboradas únicamente con AS muestran una superficie muy densa y lisa, condición que se mantiene si las proporciones entre el AS y el material a encapsular son de 1:1; sin embargo, la pérdida de la proporción provocará cambios estructurales como rugosidades superficiales, tal como se observó en el presente trabajo. Otro factor que pudo haber afectado la morfología de las cápsulas es la metodología de secado a punto crítico, el uso de etanol como solvente, como en este caso, ha descrito mejores propiedades para conservar la forma original, sin generar un excesivo aspecto agrietado (Pasparakis y Bouropoulos, 2006; Sharma y Mazumdar, 2014). Pero este proceso frecuentemente genera cambios en las cápsulas como superficies irregulares, rugosidades y apariencias ásperas (Liu *et al.*, 2012).

3.2.4.- Color de las cápsulas

En la Tabla 1 se presentan los parámetros de color de las cápsulas. Se observa que las cápsulas en proporción 1:1,25 mostraron valores significativamente mayores en los parámetros a^* y b^* , y un menor valor de L^* . Lo que se traduce en que aquellas cápsulas con una menor concentración de EBDA mostraron una tonalidad marrón más clara respecto a las otras (Figura 3), y que la adición de EBDA generó un cambio en la coloración de las cápsulas desde transparentes (sin EBDA, Figura 3 proporción 1:0) a diferentes tonos marrones de claros a oscuros (Figura 3), tal como ya había sido comentado en el ítem de aspecto de las cápsulas. Otras evaluaciones de colorimetría aplicadas en alimentos fortificados con Fe no-Hem (fumarato ferroso), han revelado valores similares a los obtenidos para a^* , ya que el fumarato ferroso presenta un color marrón similar a los EBDA (Li *et al.*, 2010; Mehansho, 2006).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las cápsulas.

Parámetros	Tipo de cápsulas según proporción de AS:EBDA				
	1:1,25	1:2,5	1:05	1:10	1:15
Color L*	15,4 ± 0,5 ^a	17,2 ± 2,8 ^{a,b}	17,7 ± 2,9 ^{a,b}	17,8 ± 3,4 ^{a,b}	19,4 ± 2,3 ^b
Color a*	3,3 ± 0,3 ^a	1,5 ± 0,9 ^b	1,5 ± 0,4 ^b	1,1 ± 0,6 ^b	1,4 ± 0,3 ^b
Color b*	2,1 ± 0,5 ^a	1,4 ± 0,4 ^b	1,2 ± 0,6 ^b	1,2 ± 0,3 ^b	1,0 ± 0,5 ^b
TH (mm)	2,2 ± 0,0 ^a	2,2 ± 0,0 ^b	2,3 ± 0,1 ^c	2,3 ± 0,0 ^d	2,4 ± 0,0 ^e
TS (mm)	0,8 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,0 ^b	1,1 ± 0,0 ^c	1,3 ± 0,1 ^d	1,6 ± 0,1 ^e
Humedad (%)	92,6 ± 0,2 ^a	91,3 ± 0,3 ^b	88,2 ± 0,5 ^c	83,8 ± 0,3 ^d	81,1 ± 0,7 ^e
RP (N)¹	2,5 ± 1,1 ^a	2,2 ± 1,3 ^a	2,2 ± 1,5 ^a	4,0 ± 2,6 ^b	5,4 ± 2,5 ^c

TH: tamaño húmedo. TS: tamaño seco. RP: resistencia a la presión. Letras distintas en cada fila indican diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA, Tukey o Kruskal-Wallis¹, p<0,05).

3.2.5.- Tamaño de las cápsulas

El tamaño de las cápsulas se presenta en la Tabla 1. En la medida que se incrementó el contenido de EBDA en las cápsulas secas y húmedas el tamaño aumentó significativamente. Estos resultados eran esperables debido al incremento del material núcleo; y son similares a los obtenidos en otras investigaciones, como la desarrollada por Lotfipour *et al.* (2012) y Wichchukit *et al.* (2013), quienes probaron que una mayor viscosidad de la solución formadora de cápsulas debida al incremento del material núcleo, que en este caso también era proteico, aumentaba significativamente el tamaño de las cápsulas de AS. La elevada viscosidad de las soluciones AS:EBDA correspondientes a las cápsulas 1:10 y 1:15, es un elemento a considerar para la determinación del tamaño obtenido; basado en estudios que indican, que es posible elaborar cápsulas de mayor diámetro en la medida que se trabaja con soluciones más viscosas (Chen y Subirade, 2006; Wichchukit *et al.*, 2013). Otros factores que afectan el tamaño de las cápsulas pueden ser el tipo de AS, la solución gelificante (tipos de iones y concentración), el tamaño de la aguja utilizada para formar las cápsulas, que puede ser el más influyente, entre otros (Chan, 2011; Dalmoro *et al.*, 2012; Sankalia *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006). Factores que afectan negativamente, disminuyendo el tamaño de las cápsulas de AS, son una alta concentración de CaCl₂ y un mayor tiempo en la solución reticulante donde se mantienen las cápsulas (Sankalia *et al.*, 2005). Resulta de interés,

un aspecto poco considerado como la velocidad del agitador magnético aplicada durante la formación de las cápsulas que ha demostrado influir sobre la generación de mayores diámetros si se utiliza a bajas rpm (< 200 rpm) (Silva *et al.*, 2006), por lo tanto este factor podría funcionar como un regulador del tamaño y ser analizado en futuras investigaciones.

3.2.6.- Contenido de humedad de las cápsulas

Los porcentajes de humedad de las cápsulas se presentan en la Tabla 1. A medida que aumentó el contenido de EBDA en las cápsulas, el porcentaje de humedad disminuyó significativamente. Estos resultados eran esperables, porque si se incorporan cantidades crecientes de EBDA, que poseen un alto porcentaje de materia seca (97,5%), la humedad debería disminuir. Además, de acuerdo con los resultados de Zohar-Perez *et al.* (2004), ocurre una disminución importante de la cantidad de agua cuando las cápsulas se elaboran con una mayor proporción de material núcleo, sobre todo si este es harina ya que disminuye la capacidad hidrofílica del AS (Wichchukit *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

3.2.7.- Resistencia de las cápsulas

La medición de resistencia de las cápsulas se presenta en la Tabla 1. A partir de la proporción 1:10, se observó un aumento significativo de la resistencia a la presión de las cápsulas, siendo más resistentes las de proporción 1:15. Los resultados difieren a lo esperado, porque las cápsulas elaboradas con una mayor concentración de EBDA en relación a la inclusión constante de AS deberían mostrar una disminución de la resistencia, debido a que se ha descrito que el AS presenta una alta flexibilidad y resistencia a la presión mecánica (de Queiroz *et al.*, 2006; Wichchukit *et al.*, 2013), resultando el grado de entrecruzamiento del AS un factor determinante de la estabilidad mecánica y la permeabilidad que pueden alcanzar las cápsulas (Spasojevic *et al.*, 2014).

Se ha descrito que una elevada viscosidad de la solución formadora de cápsulas genera un incremento en la resistencia mecánica de éstas (Bhattacharya, 2010), este punto podría explicar el resultado obtenido en las cápsulas del presente estudio, ya que las

proporciones 1:10 y 1:15, fueron más resistentes. Sin embargo, pocos estudios atribuyen la resistencia de las cápsulas a la variación de viscosidad por incremento del núcleo.

El uso de AS en una concentración al 2%, ha demostrado ser suficiente para el desarrollo de cápsulas esféricas y resistentes (Chen *et al.*, 2012). Otros antecedentes como que un mayor tiempo de permanencia de las cápsulas en la solución reticulante, pueden generar un aumento del grado de entrecruzamiento formando cápsulas de menor tamaño pero más resistentes (Sankalia *et al.*, 2005; Serp *et al.*, 2000), podría ser considerado en próximos ensayos que requieran la elaboración de cápsulas más resistentes.

3.3.- Perfil de liberación *in vitro* de Fe desde las cápsulas

3.3.1.- Perfil de liberación gástrico

La liberación de Fe en el tiempo de incubación durante la digestión gástrica *in vitro* expresado en porcentaje de Fe liberado, se presenta en la Figura 5A. En el caso de la digestión gástrica, se observa que a los 15 minutos no existen diferencias significativas entre las cápsulas. A los 30 y 45 minutos de digestión, las cápsulas en proporción 1:1,25 liberaron una cantidad significativamente mayor de Fe, respecto a las otras cápsulas, pero esta no fue significativamente diferente de la liberación de Fe de las cápsulas 1:2,5. A los 60 y 75 minutos las cápsulas que contenían las dos concentraciones menores de EBDA, liberaron significativamente más Fe (23% en promedio) que las de otras proporciones (11% en promedio).

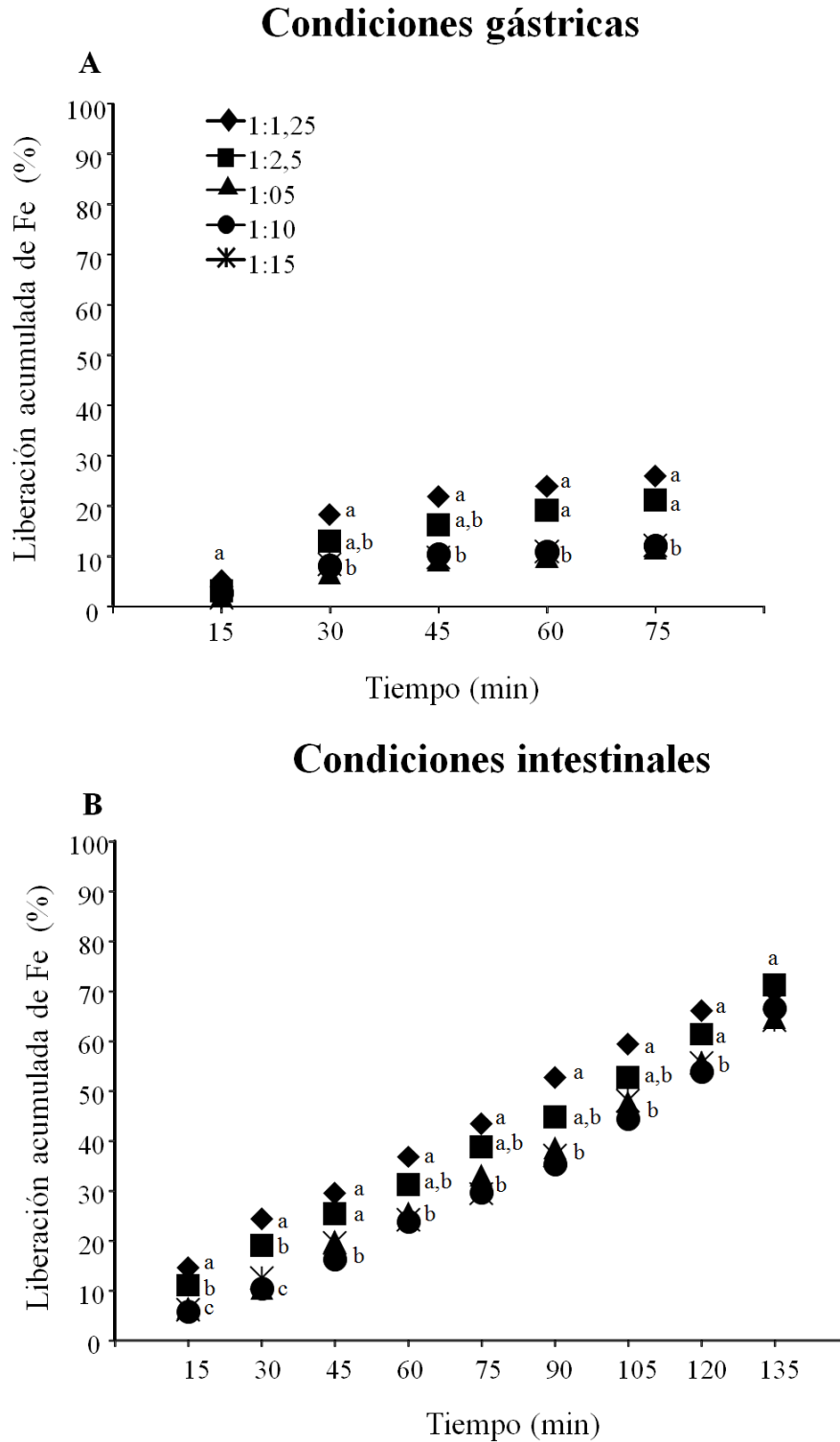


Figura 5. (A) Perfil de liberación gástrica (A) e intestinal (B) de Fe *in vitro* de las cápsulas de AS y EBDA. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (ANDEVA, Tukey, $p < 0,05$).

Un ensayo realizado por Ha *et al.* (2008), indicó que cuando existió una disminución de la concentración del material núcleo en las cápsulas de AS, el coeficiente de difusión aumentó. Señalando que en la liberación desde las cápsulas influyen factores como la viscosidad de la solución, la velocidad de agitación y la concentración del núcleo. Estos antecedentes expuestos fueron observados en las cápsulas de AS:EBDA, ya que la proporción 1:1,25 que contenían la menor concentración de núcleo alcanzaron un mayor porcentaje de liberación de Fe a nivel gástrico, en comparación a aquellas de 1:15. Otras investigaciones relacionaron el tamaño de las cápsulas y la velocidad a la que transitan por el tracto gastrointestinal con la liberación de su contenido. Chan y Neufeld (2009) y Li *et al.* (2011), describieron que a medida que las cápsulas poseían menor tamaño, permanecían mayor tiempo en el sistema gastrointestinal, logrando liberar un mayor porcentaje del núcleo. Similar a lo expuesto por Davis *et al.* (1986), quienes consideraron que los tiempos de vaciamiento gástrico resultaban variables y dependientes de la dosificación y el tamaño de las cápsulas. En cerdos, estudios previos reportaron un vaciamiento más lento que en humanos, un 50% más lento para alimentos líquidos y que requieren de 0,25 a 0,5 horas para alimentos sólidos (Davis *et al.*, 2001).

La liberación de Fe desde las cápsulas en condiciones gástricas *in vitro* fue baja, sobre todo para las cápsulas en proporciones 1:05, 1:10 y 1:15, y esperada, según lo reportado en cápsulas de AS por otros autores. Jelvehgari *et al.* (2014), obtuvieron resultados similares con cápsulas de AS que contenían piroxicam, al incubarlas a pH ácidos, las que liberaron un contenido de núcleo que varió entre 3 a 28%. Otro ensayo realizado por Sankalia *et al.* (2005), demostraron una liberación que no superó el 20% de papaína desde cápsulas de AS sometidas a pH 1,2, resultado que los autores atribuyeron al elevado peso molecular del núcleo y a las condiciones ácidas del medio de incubación que inhiben la desintegración de las cápsulas. De acuerdo a lo expuesto en la literatura, los bajos niveles de Fe liberados desde las cápsulas sometidas a pHs ácidos (< 3) se explica porque se produce un encogimiento de las cápsulas, con una subsecuente reducción del tamaño de los poros de la matriz de AS, disminuyendo significativamente la liberación de su contenido (George y Abraham, 2006; Pasparskis y Bouropoulos, 2006). La contracción del tamaño de los poros se favorece por la disminución de la repulsión electrostática entre los grupos carboxilatos del AS que se protonizan a pHs ácidos (< 3) (Ouwerx *et al.*, 1998; Pawar y Edgar, 2012; Serp *et al.*, 2000). Huguet *et al.* (1996), describieron que la hemoglobina encapsulada en AS puede disociarse en

condiciones de pH ácido (< 4) debido a la precipitación parcial de AS en ácido algínico, generando dímeros y monómeros de la hemoproteína, lo que facilita la difusión a través de los microporos de la matriz.

Otros estudios *in vitro*, confirman que ocurre una inhibición de la liberación del contenido desde cápsulas elaboradas con AS a pH ácidos (< 1,2) similar al pH estomacal de ratas y humanos (Gombotz y Fong, 2012; George y Abraham, 2006). Pruebas aplicadas a cápsulas de hemoglobina y AS, en condiciones similares de incubación *in vitro* por sobre los 30 minutos, resultaron con una precipitación parcial de AS debido a una disminución del entrecruzamiento de la matriz, quedando como ácido algínico (forma insoluble) a causa del agotamiento y/o secuestro de iones Ca^{2+} , sin evidenciar cambios en la apariencia de las cápsulas a simple vista (Sabitha *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2006). Sin embargo, cápsulas de AS incubadas en condiciones de pH 1,2 evidenciaron cambios de apariencia tornándose más transparentes, aspecto que fue atribuido a la presencia de ácido algínico (Abou el Ela *et al.*, 2014), sin que ocurra una ruptura de las cápsulas, incluso luego de 6 horas de incubación a pH 3 (Yang *et al.*, 2014). Aunque cabe mencionar, que podría ocurrir una disminución en el grado de entrecruzamiento y acelerar el proceso degradativo de las cápsulas, al incrementar el tiempo de incubación en medio ácido (Bajpai y Sharma, 2004).

3.3.2.- Perfil de liberación intestinal

El porcentaje de Fe liberado durante la digestión intestinal *in vitro* se presenta en la Figura 5B. A los 15 y 30 minutos las cápsulas en proporción 1:1,25, liberaron significativamente más Fe que las en proporción 1:2,5, y estas a su vez liberaron una significativa mayor cantidad de Fe que las otras cápsulas. Desde los 45 a los 120 minutos las cápsulas 1:1,25 liberaron una significativa mayor cantidad de Fe respecto a las otras cápsulas. Finalmente a los 135 minutos el porcentaje de liberación de Fe desde las cápsulas no mostró diferencias significativas entre las proporciones.

Los porcentajes de liberación de Fe desde las cápsulas en condiciones intestinales *in vitro*, resultaron mayores que los valores obtenidos por Perez-Moral *et al.* (2013), quienes encapsularon diferentes tipos de Fe no-Hem en cápsulas de AS que fueron sometidas a digestiones *in vitro* alcanzando sólo un 12% de liberación a nivel duodenal.

Al contrario Sankalia *et al.* (2005), describieron tiempos muy cortos de liberación, en donde cápsulas de AS que encapsulaban papaína liberaron el 100% de su contenido en 60 minutos de incubación *in vitro* en solución intestinal simulada a pH 6,8; argumentando este hecho como consecuencia de un incremento en la afinidad entre el ion Ca^{2+} y el tampón fosfato de Na^+ , debilitando la reticulación del polímero, generando la desintegración total de la matriz de AS. Resultados similares a los del presente estudio fueron obtenidos por Gombotz y Fong (2012), quienes sometieron cápsulas de AS a pH alcalino (PBS 0,1 M, pH 7,4) y comprobaron que las cápsulas liberaban de forma activa todo el contenido durante 2 horas. Estos autores describieron que la liberación en estas condiciones puede ocurrir mediante dos vías, a través de la formación de poros en la matriz del AS y/o por degradación progresiva del polímero. Li *et al.* (2011) también describieron que cuando cápsulas de AS son sometidas a pH alcalino ocurre un aumento en el tamaño de los poros de la matriz de AS, generando en corto tiempo la degradación del polímero y desintegración de las cápsulas.

Someter las cápsulas a condiciones intestinales *in vitro* afectó la estructura del AS, esto debido a que puede degradarse parcial o totalmente en presencia de elementos quelantes como lactato, citrato o fosfato o por iones como Na^+ o Mg^{2+} (Gombotz y Wee, 1998), elementos que podrían estar disponibles en el tampón fosfato base de la solución intestinal. Luego de transitar a nivel gástrico y ser afectadas por el pH ácido, las cápsulas sufren un debilitamiento estructural de la matriz de AS, y al llegar al intestino el AS se transforma en una capa viscosa soluble permitiendo la mayor liberación del Fe (George y Abraham, 2006; Silva *et al.*, 2006). Efecto que estaría dado porque a pH neutros y alcalinos el AS sufre un debilitamiento de los puentes de hidrógeno que estabilizan su estructura (Pawar y Edgar, 2012), y/o también se ha atribuido a un efecto de repulsión entre los grupos carboxilos (COO^-), debilitando las uniones que conforman la matriz, generando como consecuencia una elevada absorción de agua, fenómeno conocido como hinchamiento, con un consiguiente aumento de tamaño de las cápsulas (Bajpai y Sharma, 2004; Draget *et al.*, 2005). Una vez que las cápsulas han alcanzado la máxima capacidad de retención de agua, se comienza a erosionar la matriz polimérica, a perder peso y a desintegrarse (Bajpai y Sharma, 2004; Cardoso *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). El mismo efecto fue descrito por Bhattacharya *et al.* (2014), al incubar a pH alcalino (7,0) cápsulas de AS que contenían complejos de proteínas heterogéneas, observando el hinchamiento y aumento de peso de las cápsulas en estas condiciones.

Respecto al tiempo de liberación desde las cápsulas en condiciones de pH alcalino, un ensayo demostró que las cápsulas de AS alcanzan un máximo de liberación entre los 60 a 180 minutos, posterior a este período el polímero comienza a desintegrarse hasta disolverse totalmente (Bajpai y Sharma, 2004). Según los resultados obtenidos en el presente estudio, a los 135 minutos de incubación *in vitro*, ocurrió la desintegración total de las cápsulas en cada proporción (dato que no fue registrado cuantitativamente en esta memoria, pero sí fue observado para todas las proporciones). Esta ruptura de la matriz del AS, explicaría la inexistencia de diferencias significativas en los porcentajes de liberación de Fe desde las cápsulas al minuto 135.

Entre los factores que pueden afectar al grado de liberación del contenido de las cápsulas de AS en el tracto gastrointestinal, se mencionan el espesor del gel de AS, a través del cual ocurre la difusión de las moléculas, la capacidad de absorción de agua y la desintegración de las cápsulas (Cardoso *et al.*, 2013; El-Kamel *et al.*, 2003). Además, las cápsulas deben superar barreras biológicas tales como la acidez del pH estomacal, la acción de los ácidos biliares, y de enzimas digestivas (Ma *et al.*, 2008; Murata *et al.*, 2004). Un ensayo de digestión *in vitro* con cápsulas de AS en bilis y pancreatina, mostró que durante los primeros 60 minutos ocurre un aumento de peso, por hinchamiento de las cápsulas, y a los 90 minutos la matriz se desintegra totalmente (González y Hernández, 2006). Chen y Subirade (2006), atribuyeron la degradación de cápsulas de AS cargadas con proteína de lacto-suero, al efecto que generó la pancreatina sobre la matriz polimérica en condiciones intestinales simuladas. Por otra parte, se le ha atribuido un efecto inhibitorio al AS sobre la actividad de algunas enzimas gastrointestinales, como la pepsina y la lipasa pancreática (Sunderland *et al.*, 2000; Wilcox *et al.*, 2014). Sin embargo, otros autores han reportado que los ácidos biliares no tienen efectos degradativos sobre el AS, sino que el principal efecto es dado por el pH alcalino (Mooranian *et al.*, 2014), como fue descrito anteriormente.

La sumatoria de los porcentajes de liberación total de Fe desde las cápsulas incubadas *in vitro* bajo condiciones gástricas e intestinales mostró los siguientes valores 1:1,25= 96%; 1:2,5= 92%; 1:05= 76%; 1:10= 79% y 1:15= 76%. Es posible que si la incubación en condiciones intestinales se hubiese extendido por más tiempo las cápsulas 1:05, 1:10 y 1:15 hubiesen continuado liberando Fe.

4.- CONCLUSIONES

En este estudio fue posible elaborar y encapsular FeHem provenientes de EBDA en cápsulas de AS, obteniendo 5 proporciones de cápsulas entre AS:EBDA de: 1:1,25; 1:2,5; 1:05; 1:10 y 1:15 (p/p). Alcanzando todas las cápsulas una alta EE%. Las cápsulas resultaron de forma esférica y el Fe se distribuyó homogéneamente en toda la superficie de las cápsulas. Las cápsulas soportaron condiciones gástricas y se desintegraron completamente en condiciones intestinales después de 135 minutos de incubación, liberando casi la totalidad de su contenido. Por lo tanto, en base a características como presentar el mayor contenido de Fe encapsulado, una alta EE%, un mínimo porcentaje de Fe liberado en condiciones gástricas, y el elevado porcentaje de Fe liberado en intestino, las cápsulas en proporción 1:15, podrían ser las más adecuadas para el futuro desarrollo de un suplemento de Fe oral para cerdos neonatos.

5.- BIBLIOGRAFÍA

- **ABOU EL ELA, A.; HASSAN, M.; EL-MARAGHY, D.** 2014. Ketorolac tromethamine floating beads for oral application: Characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Saudi. Pharm. J.* 22:349-359.
- **ALMEIDA, F.; HTOO, K.; THOMSON, J.; STEIN, J.** 2013. Comparative amino acid digestibility in US blood products fed to weanling pigs. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 181:80-86.
- **ANDERSSON, M.; THANKACHAN, P.; MUTHAYYA, S.; GOUD, R.; KURPAD, A.; HURRELL, R.; ZIMMERMANN, M.** 2008. Dual fortification of salt with iodine and iron: a randomized, double-blind, controlled trial of micronized ferric pyrophosphate and encapsulated ferrous fumarate in southern India. *Am. J. Clin. Nutr.* 88(5):1378-1387.
- **A.O.A.C.** 1996. *Official Methods of Analysis of AOAC International* (16th ed.). Gaithersburg, USA: AOAC International.
- **BAJPAI, S.; SHARMA, S.** 2004. Investigation of Swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *React. Funct. Polym.* 59:129-140.
- **BARBA, A.; DALMORO, A.; D'AMORE, M.** 2012. An engineering approach to biomedical sciences: advanced strategies in drug delivery systems production. *Transl. Med. UniSa.* 11(4):3-11.
- **BATAL, A.; DALE, N.** 2014. Feedstuffs. Ingredient analysis table. <http://fdsmagissues.feedstuffs.com> (Accessed January 2014).
- **BANERJEE, A.; NAYAN, D.; LAHIRI, S.** 2007. A new method of 354 synthesis of iron doped calcium alginate beads and determination of iron content by radiometric method. *Biochem. Eng. J.* 33:260-262.
- **BHATTACHARYA, S.** 2010. Stress relaxation behavior of moth bean flour dough: product characteristics and suitability of model. *J. Food. Eng.* 97:539-546.
- **BHATTACHARYA, S.; MUKHOPADHYAY, P.; KUNDU, P.; MISHRA, R.** 2014. Viper and cobra venom neutralization by alginate coated multicomponent polyvalent antivenom administered by the oral route. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 8(8):1-14.
- **BHOPATKAR, D.; ANAL, A.; STEVENS, W.** 2005. Iontropic alginate beads for controlled intestinal protein delivery: effect of chitosan and barium counter-ions on entrapment and release. *J. Microencapsul.* 22(1):91-100.

- **CAPONE, S.; DUFRESNE, M.; RECHEL, M.; FLEURY, M.; SALSAC, A.; PAULLIER, P.; DAUJAT-CHAVANIEU, M.; LEGALLAIS, C.** 2013. Impact of alginate composition: from bead mechanical properties to encapsulated hepg2/c3a cell activities for in vivo implantation. PLoS. ONE. 8(4):1-10.
- **CARDOSO, G.; ARAÚJO, V.; MALTA, A.; MIGUEZ, M.** 2013. Characterization of antibiotic-loaded alginate-osa starch microbeads produced by ionotropic pregelation. Biomed. Res. Int. 2013:1-11.
- **CHAN, E.** 2011. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. Carbohydr. Polym. 84:1267-1275.
- **CHAN, A.; NEUFELD, R.** 2009. Modeling the controllable pH-responsive swelling and pore size of networked alginate based biomaterials. Biomaterials. 30(30):6119-6129.
- **CHEN, L.; SUBIRADE, M.** 2006. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. Biomaterials. 27(26):4646-4654.
- **CHEN, X.; WANG, X.; LOU, W.; LI, Y.; WU, H.; ZONG, M.; SMITH, T.; CHEN, X.** 2012. Immobilization of *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 for efficient asymmetric reduction of ketones and biocatalyst recycling. Microb. Cell. Fact. 11:111-119.
- **COLLINS, L.; WESSLING-RESNICK, M.; KNUTSON, M.** 2008. Hepcidin regulation of iron transport. J. Nutr. 138:2284-2288.
- **COLLARD, K.** 2009. Iron homeostasis in the neonate. Pediatrics. 123:1208-1216.
- **CONRAD, M.; CORTELL, S.; WILLIAMS, H.; FOY, A.** 1966. Polymerization and intraluminal factors in the absorption of hemoglobin-iron. J. Lab. Clin. Med. 68:659-668.
- **CONRAD, M.; UMBREIT, J.** 2000. Iron absorption and transport-an update. Am. J. Hematol. 64:287-298.
- **COOK, M.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V.** 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. J. Control Release. 162:56-67.
- **DALMORO, A.; BARBA, A.; LAMBERTI, G.; GRASSI, M.; d'AMORE, M.** 2012. Intensifying the microencapsulation process: ultrasonic atomization as an innovative approach. Eur. J. Pharm. Biopharm. 80:471-477.
- **DAVIS, S.; HARDY, J.; FARA, J.** 1986. Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. Gut. 27:886-892.

- **DAVIS, S.; ILLUM, S.; HINCHCLIFFE, M.** 2001. Gastrointestinal transit of dosage forms in the pig. *J. Pharm. Pharmacol.* 53:33-39.
- **DE QUEIROZ, Á.; PASSES, E.; DE BRITO, S.; SILVA, G.; HIGA, O.; VÍTOLO, M.** 2006. Alginate-poly(vinyl alcohol) core-shell microspheres for lipase immobilization. *J. Appl. Polym. Sci.* 102(2):1553-1560.
- **DEROUCHEY, J.; TOKACH, M.; NELSEN, J.; GOODBAND, R.; DRITZ, S.; WOODWORTH, J.; JAMES, B.** 2002. Comparison of spray-dried blood meal and blood cells in diets for nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 80:2879-2886.
- **DEROUCHEY, J.; TOKACH, M.; NELSEN, J.; GOODBAND, R.; DRITZ, S.; WOODWORTH, J.; WEBSTER, M.; JAMES, B.** 2003. Effects of blood meal pH and irradiation on nursery pig performance. *J. Anim. Sci.* 81:1013-1022.
- **DRAGET, K.; SMIDSRØD, O.; SKJAK-BRAEK, G.** 2005. *In: Alginates polysaccharides and polyamides in the food industry.* Wiley, Weinheim, pp. 1-30.
- **EGELI, A.; FRAMSTAD, T.; MORBERG, H.** 1998. Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. *Acta Vet. Scand.* 39:381-393.
- **EL-KAMEL, A.; AL-GOHARY, O.; HOSNY, E.** 2003. Alginate-diltiazem hydrochloride beads: optimization of formulation factors, in vitro and in vivo availability. *J. Microencapsul.* 20(2):211-225.
- **FOULKES, W.; SEWRY, C.; CALAM, J.; HODGSON, H.** 1991. Rhabdomyolysis after intramuscular iron-dextran in malabsorption. *Ann. Rheum. Dis.* 50:184-186.
- **FUNDUEANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M.** 1999. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials.* 20:1427-1435.
- **GEORGE, M.; ABRAHAM, E.** 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan- a review. *J. Control Release.* 114:1-14.
- **GOMBOTZ, W.; FONG, S.** 2012. Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64:194-205.
- **GOMBOTZ, W.; WEE, S.** 1998. Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31:267-285.
- **GONZÁLEZ, J.; HERNÁNDEZ, H.** 2006. Efecto de la simulación gástrica y sales biliares en capsulas de alginato y k-carragenina para encapsular bacterias

lácticas. **In:** IV Congreso internacional de ingeniería bioquímica. Morelia Mich. México. 4-7 abril 2006. Colegio mexicano de ingenieros bioquímicos. pp. 1-9.

- **GOUIN, S.** 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Technol.* 15:330-347.
- **HA, J.; ENGLER, C.; LEE, S.** 2008. Determination of diffusion coefficients and diffusion characteristics for chlorferon and diethylthiophosphate in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* 100(4):698-706.
- **HARI, P.; CHANDY, T.; SHARMA, C.** 1996. Chitosan/calcium alginate microcapsules for intestinal delivery of nitrofurantoin. *J. Microencapsul.* 13:319-329.
- **HENRY, P.; MILLER, E.** 1995. Iron availability. **In:** Ammerman, C.B. Baker, D.H. Lewis, A.S. (Eds.), *Bioavailability of Nutrients for Animals*, Academic Press, San Diego, pp. 169-199.
- **HUGUET, M.; GROBOILLOT, A.; NEUFELD, R.; PONCELET, D.; DELLACHERIE, E.** 1994. Hemoglobin encapsulation in chitosan/calcium alginate beads. *J. Appl. Polym. Sci.* 51:1427-1432.
- **HUGUET, M.; NEUFELD, R.; DELLACHERIE, E.** 1996. Calcium-alginate beads coated with polycationic polymers: comparison of chitosan and DEAE dextran. *Process Biochem.* 31:347-353.
- **ISHAYA, V.; ISHAYA, M.** 2012. Iron nutrition and anemia in piglets: a review. *J. Vet. Adv.* 2(6):261-265.
- **JELVEHGARI, M.; MOBARAKI, V.; MONTAZAM, S.** 2014. Preparation and evaluation of mucoadhesive beads/discs of alginate and alginopectinate of piroxicam for colon-specific drug delivery via oral route. *Jundishapur. J. Nat. Pharm. Prod.* 9(4):1-10.
- **JOLLIFF, J.; MAHAN, D.** 2011. Effect of injected and dietary iron in young pigs on blood hematology and postnatal pigs growth performance. *J. Anim. Sci.* 89:4068-4080.
- **LAYRISSE, M.; MARTÍNEZ-TORRES, C.; LEETS, I.; TAYLOR, P.; RAMÍREZ, J.** 1984. Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans. *J. Nutr.* 114:217-23.
- **LI, Y.; DIOSADY, L.; WESLEY, A.** 2010. Iodine stability in iodized salt dual fortified with microencapsulated ferrous fumarate made by an extrusion-based encapsulation process. *J. Food. Eng.* 99:232-238.
- **LI, Y.; HUB, M.; DU, Y.; XIAO, H.; JULIAN, D.; CLEMENTS, MC.** 2011. Control of lipase digestibility of emulsified lipids by encapsulation within calcium alginate beads. *Food Hydrocoll.* 25:122-130.

- **LIPÍŃSKI, P.; STARZYŃSKI, R.; CANONNE-HERGAUX, F.; TUDEK, B.; OLINSKI, R.; KOWALCZYK, P.; DZIAMAN, T.; THIBAudeau, O.; GRALAK, M.; SNAUDA, E.; WOLINSKI, J.; USINSKA, A.; ZABIELSKI, R.** 2010. Benefits and risks of iron supplementation in anemic neonatal pigs. *Am. J. Pathol.* 177(3):1233-1243.
- **LIPÍŃSKI, P.; STYŚ, A.; STARZYŃSKI, R.** 2013. Molecular insights into the regulation of iron metabolism during the prenatal and early postnatal periods. *Cell Mol. Life Sci.* 70:23-38.
- **LIU, L.; WAN, Y.; XIE, Y.; ZHAI, R.; ZHANG, B.; LIU, J.** 2012. The removal of dye from aqueous solution using alginate-halloysite nanotube beads. *Chem. Eng. J.* 187:210-216.
- **LOTFIPOUR, F.; MIRZAEELI, S.; MAGHSOODI, M.** 2012. Preparation and characterization of alginate and Psyllium beads containing *Lactobacillus acidophilus*. *Scient. World J.* 2:1-8.
- **MA, F.; ZHOU, L.; TANG, J.; WEI, S.; ZHOU, Y.; ZHOU, J.; WANG, F.; SHEN, J.** 2012. A facile method for hemoglobin encapsulation in silica nanoparticles and application in biosensors. *Microporous Mesoporous Mater.* 160:106-113.
- **MA, Y.; WANG, J.; XU, J.; HUANG, X.; KORENEVSKY, A.; SABOUR, P.** 2008. Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(15):4799-4805.
- **MARCHANT-FORDE, J.; LAY, D.; MCMUNN, K.; CHENG, H.; PAJOR, E.; MARCHANT-FORDE, R.** 2014. Postnatal piglet husbandry practices and well-being: The effects of alternative techniques delivered in combination. *J. Anim. Sci.* 92:1150-1160.
- **MEHANSHO, H.** 2006. Iron fortification technology development: new approaches. *J. Nutr.* 136:1059-1063.
- **MOORANIAN, A.; NEGRULJ, R.; CHEN-TAN, N.; AL-SALLAMI, N.; FANG, Z.; MUKKUR, T.; MIKOV, M.; GOLOCORBIN-KON, S.; FAKHOURY, M.; ARFUSO, F.; AL-SALAMI, H.** 2014. Novel artificial cell microencapsulation of a complex gliclazide-deoxycholic bile acid formulation: a characterization study. *Drug. Des. Devel. Ther.* 8:1003-1012.
- **MURATA, Y.; KUDO, S.; KOFUJI, K.; MIYAMOTO, E.; KAWASHIMA, S.** 2004. Adsorption of bile acid by chitosan-ototic acid salt and its application as an oral preparation. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 52(10):1183-1185.
- **NAVAS-CARRETERO, S.; PÉREZ-GRANADOS, A.; SARRIÁ, B.; VAQUERO, M.** 2009. Iron absorption from meat pate fortified with ferric pyrophosphate in iron-deficient women. *Nutrition.* 25(1):20-40.

- **NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.** 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23:182-186.
- **OUWERX, C.; VELINGS, N.; MESTDAGH, M.M.; AXELOS, M.A.V.** 1998. Physicochemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polym. Gels Netw.* 6:393-408.
- **PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N.** 2006. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. *Int. J. Pharm.* 323:34-42.
- **PAWAR, S.; EDGAR, K.** 2012. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials.* 33:3279-3305.
- **PÉREZ, F.** 2009. Prácticas de manejo del lechón en maternidad: estrategias para mejorar su sobrevivencia y aumentar la productividad. [en línea] Argentina < <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010110.html> > [consulta: 25-01-2013].
- **PEREZ-MORAL, N.; CHUECA, M.; PARKER, R.** 2013. Preparation of iron-loaded alginate gel beads and their release characteristics under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocoll.* 31:114-120.
- **PETERS, J.; MAHAN, D.** 2008. Effects of neonatal iron status, iron injections at birth, and weaning in young pigs from sows fed either organic or inorganic trace minerals. *J. Anim. Sci.* 86:2261-2269.
- **PFAU, A.; RUDOLPHI, K.; HEINRICK, H.** 1977. Dosisabhängigkeit der intestinalen eisenabsorption beim saugironkel. *Zentbl. Vet. Med. A.* 24:140-148.
- **PHILLIPS, W.; KLIPPER, R.; AWASTHI, V.; CLIFF, A.; KWASIBORSKI, V.; GOINS, B.** 1999. Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: a long circulating red cell substitute. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288:665-670.
- **QUINTERO-GUTIÉRREZ, A.; GONZÁLEZ-ROSENDO, G.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, J.; POLO-POZO, J.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J.** 2008. Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. *Int. J. Biol. Sci.* 4:58-62.
- **RAFATI, H.; COOMBES, A.; ADLER, J.; HOLLAND, J.; DAVIS, S.** 1997. Protein-loaded PLGA microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics. *J. Control. Release.* 43:89-102.
- **RATHORE, S.; DESAI, P.; LIEW, C.; CHAN, L.; HENG, P.** 2013. Microencapsulation of microbial cells. *J. Food. Eng.* 116:369-381.

- **REBOUCHE, C.; WILCOX, C.; WIDNESS, J.** 2004. Microanalysis of non-heme iron in animal tissues. *J. Bioch. Bioph. Met.* 58:239-251.
- **RUDOLPH, A.; SPIELBERG, H.; SPARGO, B.; KOSSOVSKY, N.** 1995. Histopathologic study following administration of liposome-encapsulated hemoglobin in the normovolemic rat. *J. Biomed. Mater. Res.* 29(2):189-196.
- **SABITHA, P.; RATNA, J.; RAVINDRA, K.** 2010. Design and evaluation of controlled release chitosan-calcium alginate microcapsules of anti tubercular drugs for oral use. *Int. J. ChemTech. Res.* 2(1):88-98.
- **SAGUER, E.; FORT, N.; ALVAREZ, P.; SEDMAN, J.; ISMAIL, A.** 2008. Structure-functionality relationships of porcine plasma proteins probed by FTIR spectroscopy and texture analysis. *Food Hydrocoll.* 22(3):459-467.
- **SALVADOR, P.; TOLDRA, M.; SAGUER, E.; CARRETERO, C.; PARE´S, D.** 2009. Microstructure-function relationships of heat-induced gels of porcine haemoglobin. *Food Hydrocoll.* 23:1654-1659.
- **SANKALIA, M.; MASHRU, R.; SANKALIA, J.; SUTARIYA, V.** 2005. Papain entrapment in alginate beads for stability improvement and site-specific delivery: physicochemical characterization and factorial optimization using neural network modeling. *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* 6(2):209-222.
- **SERP, D.; CANTANA, E.; HEINZEN, C.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I.** 2000. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* 70(1):41-53.
- **SHARMA, V.; MAZUMDAR, B.** 2014. Characterization of gliclazide release from Isabgol husk hydrogel beads by validated HPLC method. *Acta Pol. Pharm.* 71(1):153-166.
- **SHAYEGHI, M.; LATUNDE-DADA, G.; OAKHILL, J.; LAFTAH, A.; TAKEUCHI, K.; HALLIDAY, N.; KHAN, Y.; WARLEY, A.; MCCANN, F.; HIDER, R.; FRAZER, D.; ANDERSON, G.; VULPE, C.; SIMPSON, R.; MCKIE, A.** 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 122:789-801.
- **SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FIGUEIREDO, M.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.** 2006. Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *AAPS. J.* 7(4):1-11.
- **SPASOJEVIC, M.; BHUJBAL, S.; PAREDES, G.; J DE HAAN, B.; SCHOUTEN, A.; DE VOS, P.** 2014. Considerations in binding diblock copolymers on hydrophilic alginate beads for providing an immunoprotective membrane. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 102(6):1887-1896.

- **SUNDERLAND, A.; DETTMAR, P.; PEARSON, J.** 2000. Alginates inhibit pepsin activity in vitro; A justification for their use in gastro-oesophageal reflux disease (GORD). (Abstract). *Gastroenterology*. 118(4):347
- **SVOBODA, M.; DRÁBEK, J.** 2007. Intramuscular versus subcutaneous administration of iron dextran in suckling piglets. *Acta Vet. Brno*. 76:11-15.
- **THEILKUH, J.; LOZANO, F.; MENESES DE GÓNGORA, B.** 2000. Estudio comparativo del sulfato ferroso y del citrato férrico amónico en el modelo de la anemia hipocrómica del cerdo lactante. Tesis Magíster en Farmacología. Colombia. U. Nacional de Colombia. 3-15 p.
- **UNDERWOOD, C.; VAN EPS, A.** 2012. Nanomedicine and veterinary science: the reality and the practicality. *Vet. J.* 193:12-23.
- **VALENZUELA, C.; HERNÁNDEZ, V.; RODRÍGUEZ, F.; CARRILLO, R.** 2013. Tecnología de encapsulación y su aplicación en ciencias veterinarias. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 28(2):58-75.
- **WICHCHUKIT, S.; OZTOP, M.; MCCARTHY, M.; MCCARTHY, K.** 2013. Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. *Food Hydrocoll.* 33:66-73.
- **WILCOX, M.; BROWNLEE, J.; RICHARDSON, C.; DETTMAR, P.; PEARSON, J.** 2014. The modulation of pancreatic lipase activity by alginates. *Food. Chem.* 146(100):479-484.
- **WISMER-PEDERSEN, J.** 1988. Uses of haemoglobin in foods. *Meat Sci.* 24:31-45.
- **YANG, C.; YEN, C.; JHENG, J.; WANG, C.; CHEN, S.; HUANG, P.; HUANG, K.; SHAW, J.** 2014. Immobilization of *Brassica oleracea* Chlorophyllase 1 (BoCLH1) and *Candida rugosa* lipase (CRL) in magnetic alginate beads: an enzymatic evaluation in the corresponding proteins. *molecules*. 19:11800-11815.
- **XU, Z.; LIU, S.; WANG, H.; PENG, G.; CHANG, Y.** 2014. Encapsulation of iron in liposomes significantly improved the efficiency of iron supplementation in strenuously exercised rats. *Biol. Trace. Elem. Res.* 162(3):181-188.
- **YANG, Y.; DI PASQUA, A.; HE, W.; TSAI, T.; SUEDA, K.; ZHANG, Y.; JAY, M.** 2013. Preparation of alginate beads containing a prodrug of diethylenetriaminepentaacetic acid. *Carbohydr. Polym.* 92:1915-1920.
- **YU, B.; HUANG, W-J.; WEN-SHYG, P.** 2000. Bioavailability of iron from amino acid complex in weanling pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86:39-52.

- **YUAN, L.; GENG, L.; GE, L.; YU, P.; DUAN, X.; CHEN, J.; CHANG, Y.** 2013. Effect of iron liposomes on anemia of inflammation. *Int. J. Pharm.* 454:82-89.
- **ZHAO, L.; LIU, C.; YUAN, Y.; TAO, X.; SHAN, X.; SHENG, Y.; WU, F.** 2007. Preparation of hemoglobin-loaded nano-sized particles with porous structure as oxygen carriers. *Biomaterials.* 28:1414-1422.
- **ZIMMERMANN, W.** 1995. Auswirkungen diverser anämieprophylaxeformen auf die blutparameter der saugferkl. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 102:32-38.
- **ZIMMERMANN, M.** 2004. The potential of encapsulated iron compounds in food fortification: a review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74:453-461.
- **ZOHAR-PEREZ, C.; CHET, I.; NUSSINOVITCH, A.** 2004. Irregular textural features of dried alginate–filler beads. *Food Hydrocoll.* 18:249-258.