



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

**ELABORACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SUPLEMENTACIÓN
ORAL DE MICROPARTÍCULAS DE HIERRO EN RATAS
DEPLETADAS**

Nadia Alejandra Rocha Pérez

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

PROFESOR GUÍA: Carolina Valenzuela V.
Universidad de Chile

Financiamiento: Fondecyt de Iniciación 11140249

SANTIAGO, CHILE
2016



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

**ELABORACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SUPLEMENTACIÓN
ORAL DE MICROPARTÍCULAS DE HIERRO EN RATAS
DEPLETADAS**

Nadia Alejandra Rocha Pérez

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

Nota Final:,

Prof. Guía:	Carolina Valenzuela Venegas	Firma:
Profesor Corrector:	María Sol Morales Silva	Firma:
Profesor Corrector:	Jaime Figueroa Hamed	Firma:

SANTIAGO, CHILE
2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a todo el Departamento de Fomento de la Producción Animal, en especial a mi profesora guía Carolina Valenzuela, quien, con mucha paciencia, comprensión y dedicación me ayudó en todos los pasos y obstáculos durante el proceso, a mis profesores correctores, María Sol Morales y Jaime Figueroa, quienes estuvieron dispuestos a prestarme toda ayuda necesaria para la elaboración de este proyecto. Quiero agradecer también a la querida tía Corina, que me alegró, me acompañó y ayudó en mis días de trabajo. También agradecer a todo el resto del personal involucrado durante el proceso.

Agradecer también a mi compañera de laboratorio Dafna, quien tuvo toda la disposición del mundo para enseñarme y ayudarme durante la parte práctica, siempre con muy buena disposición.

Quisiera dar las gracias también a mi amigos que estuvieron durante mi etapa educativa, a Vivian Correa, Erika Lillo y Ricardo Riquelme, con quienes comencé y finalicé la carrera, con quienes reí y sufrí con las evaluaciones, muchas gracias chiquillos.

Muchas gracias también a los más cercanos y más antiguos, Víctor, Vitoko, mi amigo desde química hasta el día de hoy, muchas gracias por tu tiempo, tus enseñanzas, tu paciencia y tu apoyo en todo momento.

A mi gran amiga Carolina, Carito, muchas gracias por acompañarme cada día del proceso, desde inglés, y aunque no terminamos juntas siempre estuviste ahí, ayudándome en mis estudios, en mi vida y en todo momento, gracias por acompañarme por siempre.

Darle las gracias a mi amiga más cercana, Belén, gracias por tu tiempo, tu cariño y sabiduría, gracias por tus enseñanzas de vida y de conocimientos. Gracias por tus incansables horas de estudios y por tu ayuda en todo momento que te necesité durante este proceso.

Agradecer a mi familia, a mi tía Vero por su apoyo emocional frente a todas las dificultades que tuvo, quien siempre creyó en mí y me dio una palabra de aliento, a mi primo Lukas, que más que un primo es mi hermano, gracias por hacerme reír, por estar ahí y entenderme de una forma que nadie más podía.

Agradecer a mi Tata y Lela por su constante preocupación durante el proceso de formación, por los queques y cositas ricas, por su amor y compañía constante.

Gracias a mi abuelita Gina, por acompañarme, por malcriarme, por darme cositas ricas, gracias por ayudar a formar a quien soy hoy en día, gracias por sentirte siempre orgullosa de mí y mis logros y por estar ahí siempre que la necesité.

A mi mamá, linda, gracias por todas tus palabras, por tu abrazos y consejos, gracias por las veces que me ayudaste a estudiar para la universidad, gracias por acompañarme a cuidar a mis ratitas y lavarle sus platitos, gracias por ir a dejarme y un sin número de muchas gracias más, te amo.

A mi papá, gracias por tu cariño, tus abrazos ketchup y tus consejos, apoyándome sin importar que pasara, gracias por entender todo sin preguntar, gracias por ser mi impresora, gracias por todo papito lindo, te amo.

A los dos gracias por apoyarme en los momentos más difíciles que tuvo esta etapa, cuando todo se veía negro ustedes lo iluminaron, los adoro mucho.

A mi hermanita, Valentina, muchas gracias por tus consejos, tu ayuda en el estudio, tus compañías cuando me quedaba hasta tarde, pero sobretodo gracias por estar ahí siempre que te necesité, sin importar nada, gracias por ser la mejor hermana que pude pedir.

Quiero agradecer a mi quinto abuelo, a uno que estuvo ahí, siempre, sonriendo, tío Ricardo, muchas gracias por acompañarme durante todo el proceso, orgulloso hasta más no poder de todos los logros, quien me dio amor como si fuera su nieta real, quien siempre estuvo ahí cuando lo necesité, y quien escondió mis pillerías, mi viejito lindo.

A mi perro, Nicky, quien fue el que gatilló todo esto y me hizo elegir esto para el resto de mi vida, de no ser por el la historia sería distinta.

A todos ellos muchas gracias, esto es por ustedes.

RESUMEN

El objetivo fue elaborar y caracterizar micropartículas de hierro (Fe) y determinar su efecto sobre el estado de nutrición de Fe en ratas depletadas. Se elaboraron y caracterizaron dos tipos de micropartículas (M), de Fe no Hem (M1) y Fe no Hem/Fe Hem (M2). Se utilizaron 15 ratas Sprague Dawley depletadas en Fe que fueron divididas en 3 grupos, los cuales fueron alimentados con dietas bajas en Fe: Control: dieta+sulfato ferroso (55,6 mg de Fe/kg); T1: dieta+M1 (54,1 mg de Fe/kg), y T2: dieta+M2 (54,1 mg de Fe/kg). Después de 18 días se determinó el estado de nutrición de Fe de las ratas mediante hemograma y ferritina sérica (FS). Las M1 fueron de color blanco-verdosa y las M2 café-rojizas, las cuales mostraron un contenido de Fe total (mg/g) de: $70,7 \pm 4,5$ y $81,1 \pm 3,9$, respectivamente; y mayor para las M2 ($p < 0,05$). El potencial Z (mv) fue de: -4,1 y 11,6; respectivamente. La morfología de M1 fue más irregular que M2. La suplementación oral de todos los tratamientos mejoraron el estado de depleción de Fe en ratas, obteniendo valores de FS (ng/mL) de C: 983 ± 251 , T1: 1.281 ± 236 y T2: 1.105 ± 316 . Otros parámetros de nutrición de Fe no se vieron afectados por los tratamientos de suplementación. En conclusión, no se observó un efecto en el estado de nutrición de Fe en ratas depletadas de la encapsulación ni la mezcla de formas de Fe.

Palabras claves: depleción, ferritina, hierro, micropartículas, ratas.

ABSTRACT

The aim was to develop and characterize microparticles of iron (Fe) and determine its effect on the nutritional status of Fe in depleted rats. Two types of microparticles (M), non-Hem Fe (M1) and non-Hem/Hem Fe (M2) were prepared and characterized. Fifteen depleted Sprague Dawley rats were used and divided into 3 groups, which were fed with diets low in Fe: Control: diet+ferrous sulfate (55.6 mg Fe/kg); T1: diet+M1 (54.1 mg Fe/kg) and T2: diet+M2 (54.1 mg Fe/kg). After 18 days nutritional Fe status of rats was determined by haemogram and serum ferritin (SF). M1 were white-green color and M2 red-brown, and showed total Fe content (mg/g): 70.7 ± 4.52 and 81.09 ± 3.92 , respectively; and higher for M2 ($p < 0.05$). The zeta potential (mv) was: -4,1 and 11,6; respectively. The morphology of M1 was more irregular than M2. Oral supplementation with all treatment improved the Fe depletion state in rats, obtaining values of FS (ng/mL) of C: 983 ± 251 , T1: $1,281 \pm 236$ and T2: $1,105 \pm 316$. Other parameters of Fe nutrition were not affected by different forms of supplementation. In conclusion, an effect on the Fe nutrition status in depleted rats of encapsulation or the mixture of Fe forms was not observed.

Keywords: depletion, ferritin, iron, microparticles, rats.

INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial que se puede encontrar como Fe Hem (hemoglobina, mioglobina, entre otras hemoproteínas) en alimentos de origen animal, como carnes, sangre y vísceras, y como Fe no Hem formando parte de sales inorgánicas, principalmente en alimentos de origen vegetal y lácteos. El Fe Hem presenta un mayor porcentaje de biodisponibilidad (20 a 30 %), e incluso puede alcanzar un 50 % según las necesidades del individuo. Mientras que la biodisponibilidad del Fe no Hem varía entre 1 a 15 % (Przybyszewska y Żekanowska, 2014). En el caso del Fe no Hem la absorción comienza con su reducción en el medio gástrico (de Fe^{+3} a Fe^{+2}), realizada por una

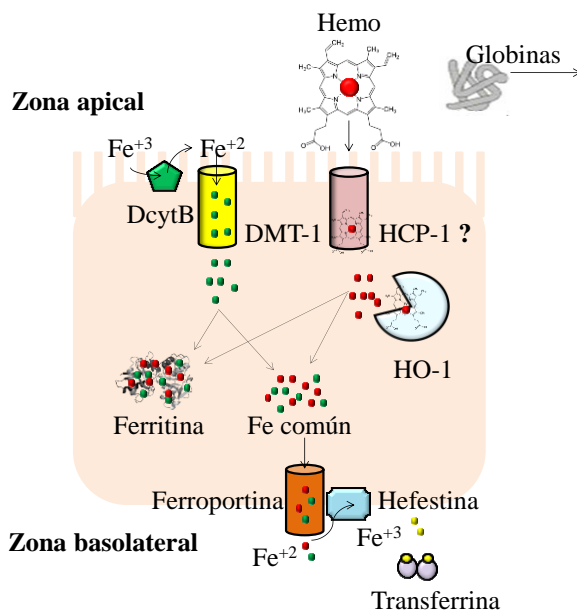


Figura 1. Vías de absorción de Fe no hem y Fe hem.

oxidoreductasa denominada DcytB, luego se produce un co-transporte del Fe^{+2} a través del transportador de metales divalentes (DMT1). Según las necesidades corporales, el Fe puede almacenarse en la ferritina, o ser transferido a la transferrina mediante la ferroportina, previa oxidación a Fe^{+3} por la hefestina, luego es captado y transportado hacia los tejidos por la transferrina (Conrad y Umbreit, 2002; Fuqua *et al.*, 2012) (Figura 1). En el caso del Fe Hem el proceso de absorción se realiza por una vía diferente. En el estómago la pepsina comienza a liberar las

globinas y el grupo hemo es transportado hacia el duodeno, donde este proceso continúa y el hemo es liberado completamente. Como receptor se ha descrito una proteína transportadora intestinal llamada “Hem Carrier Protein” (HCP-1), que no está del todo caracterizada en mamíferos como receptor de Fe (Lipiński *et al.*, 2013). Luego el grupo hemo ingresa al citoplasma del enterocito donde la enzima hem-oxigenasa-1 (HO-1) libera el Fe^{+2} del grupo hemo, el cual es almacenado en la ferritina o se exporta unido a la

transferrina (Conrad y Umbreit, 2002; Hooda *et al.*, 2014) (Figura 1). Existen factores intraluminales que afectan principalmente la absorción del Fe no Hem, como la soya, fibra dietaria, fitatos, taninos, polifenoles y minerales (Conrad y Umbreit, 2002). Como potenciadores de su absorción, se han descrito el ácido ascórbico (vitamina C), la carne, ciertos aminoácidos y alimentos que contengan una alta proporción de Fe Hem (Fuqua *et al.*, 2012). Para el caso del Fe Hem casi no se han descrito inhibidores de su absorción, a excepción del calcio cuyo rol es controversial (López *et al.*, 2009), y como factores potenciadores se describe la carne, hemoglobina (Navas *et al.*, 2009), algunos aminoácidos (Gaitán *et al.*, 2006) y, recientemente, se ha identificado al estroma del eritrocito (Pizarro *et al.*, 2016).

La absorción del Fe es esencial en la homeostasis y la deficiencia sostenida en el tiempo genera anemia, definida como la disminución de la concentración de hemoglobina en la sangre por niveles bajo los estándares para cada especie, acompañado de la alteración de otros biomarcadores del estado de nutrición de Fe (Tillán *et al.*, 2004). Se estima que un 30 % de la población mundial padece anemia, sobre todo en países en vías de desarrollo (WHO, 2008). En el cerdo lactante criado de forma intensiva, esta deficiencia se presenta de manera habitual utilizándose como modelo para su estudio (Lipiński *et al.*, 2013; Odle *et al.*, 2013). Otros animales, como ratas y ratones, se han utilizado como biomodelos en estudios de absorción y homeostasis de Fe para medir la eficacia de estrategias de suplementación o fortificación con este nutriente, debido a su similitud con el ser humano en procesos de absorción de Fe, por su menor costo de utilización y facilidad de manejo. Este modelo ha sido utilizado para el estudio de suplementos que combinan formas de Fe no Hem/Fe Hem. Así, por ejemplo, García *et al.* (2013a) evaluaron el efecto antianémico durante la recuperación de ratas anémicas suplementadas con mezclas de Fe Hem (aportado por un suplemento comercial para humanos, el Trofin[®]) y Fe no Hem aportado por sulfato ferroso (FeSO₄). Dicho estudio concluyó que es más eficiente la combinación de Fe no Hem/Fe Hem en revertir el estado anémico, comparado con el grupo de ratas anémicas que fue tratada sólo con FeSO₄. Otros estudios también confirman que la asociación entre ambos tipos de Fe mejora su biodisponibilidad, lo que se refleja positivamente en los

biomarcadores del estado de nutrición de Fe en ratas anémicas (Pallarés *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 1996; García *et al.*, 2013a; García *et al.*, 2013b).

Además de la combinación de diferentes fuentes de Fe, se ha estudiado la encapsulación de este mineral para mejorar su biodisponibilidad, entre otras ventajas. La encapsulación es una técnica bastante utilizada en el último tiempo en nutrición animal (Valenzuela *et al.*, 2013a), por la cual una gran variedad de compuestos (moléculas bioactivas, minerales, vitaminas, aminoácidos, enzimas, etc.) son cubiertos con una película polimérica (material muralla) que los protege. La encapsulación de Fe presenta algunas ventajas como: proteger el material núcleo del medio ambiente (evitando su degradación, oxidación y precipitación), mejorar la características organolépticas de productos fortificados, disminuir interacciones del Fe con otros componentes de los alimentos que disminuyen su biodisponibilidad, liberación controlada del Fe en su sitio de absorción (Zubillaga *et al.*, 1996; Lysionek *et al.*, 2002; Zimmermann, 2004).

Uno de los métodos más utilizados para encapsular, debido a su bajo costo, uno de los métodos más utilizados para encapsular es el secado por atomización o “spray drying”, el cual puede convertir dispersiones líquidas en micropartículas de diversos tamaños en estado sólido. La maltodextrina es uno de los materiales utilizados como muralla, la cual se obtiene por hidrólisis ácida o enzimática de los almidones. Este componente tiene baja viscosidad a altas concentraciones y permite la formación de micropartículas de libre flujo (Pai *et al.*, 2015). La maltodextrina tiene como ventaja su relación costo y efectividad, lo cual constituye un importante atributo para su aplicación productiva (Chronakis, 1998). Además es un material adecuado para utilizar en la técnica de atomización, que se ha comprobado tiene alta eficiencia de encapsulación.

En la actualidad, muchos alimentos son utilizados como vehículos para la fortificación con sales inorgánicas de Fe, con la finalidad de disminuir la anemia por deficiencia de este mineral. Sin embargo, estos compuestos pueden afectar el sabor y aroma del producto fortificado debido a oxidación de moléculas orgánicas, generando sabores metálicos en el alimento y alterando el color de este (Hurrell, 2002; Navas *et al.*, 2007). Además, estas

sales de Fe presentan una baja biodisponibilidad cuando son administradas vía oral, debido a su alta capacidad de interacción con compuestos que inhiben su absorción, necesiéndose múltiples dosis para la normalización del estado hematológico (Zimmermann y Hurrell, 2007). Algo similar ocurre cuando se utiliza Fe Hem para fortificación de alimentos, ya que debido a su procedencia y color rojizo, éste causa alteraciones organolépticas, cambiando el color y olor del producto fortificado (Baltussen *et al.*, 2004; Alemán *et al.*, 2016). Estas desventajas podrían también mejorarse mediante el uso de la tecnología de encapsulación.

La encapsulación de Fe se ha utilizado para prevenir o revertir el estado de anemia por deficiencia de Fe. En ratas anémicas, formulaciones encapsuladas de Fe no Hem presentan mejor biodisponibilidad que aquellas sin encapsular (Zubillaga *et al.*, 1996; Lysionek *et al.*, 2002; Navas *et al.*, 2007). No obstante, la información referente a suplementos de Fe Hem encapsulados es escasa (Rudolph *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2014). La mayoría de los estudios existentes han utilizado la técnica de atrapamiento en liposomas, en los cuales han probado una forma u otra de Fe de manera individual (Rudolph *et al.*, 1995; Navas *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). Sin embargo, en un estudio realizado por Antileo *et al.* (2016) se demostró que un suplemento oral de mezcla entre Fe no Hem/Fe Hem encapsulados individualmente en micropartículas de maltodextrina, entregados en 3 dosis orales cada 6 días por 21 días, fue suficiente para prevenir la anemia por deficiencia de Fe en cerdos neonatos. Sin embargo, no se pudo identificar si este efecto fue debido a la encapsulación o a la combinación de ambas formas de Fe (Fe no Hem y Fe Hem), o ambas condiciones en conjunto. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue elaborar y caracterizar micropartículas de hierro y determinar su efecto como suplementación oral sobre el estado de nutrición de Fe en ratas previamente depletadas mediante el uso de dietas sin suplementación con Fe y flebotomías semanales.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Encapsulación de micropartículas de Fe no Hem y Fe no Hem/Fe Hem (mezcla)

Materiales

Para la elaboración de las micropartículas de Fe se utilizó como material muralla maltodextrina (Prinal S.A), como material núcleo se utilizó sulfato ferroso (SF) (Fe no Hem) (Merck S.A) y como Fe Hem, eritrocitos de bovinos atomizados (EA) (Lican Alimentos S.A). Los materiales utilizados para la elaboración de la dietas de los animales fueron caseína libre de Fe, fibra (All Nutrition S.A), almidón de maíz y sacarosa (Droguería Michelson S.A), núcleo de vitaminas y aminoácidos (Alimentos Concentrados Cisternas Ltda). Todos los ingredientes del núcleo mineral fueron adquiridos en Merk S.A y Sigma-Aldrich.

Encapsulación de Fe

Las condiciones de encapsulación a utilizar fueron determinadas previamente en estudios realizados en el Laboratorio de Nutrición de Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias (FAVET). Para la encapsulación del Fe se elaboró una solución al 40 % p/v de maltodextrina (M) en agua desionizada, y en esta se dispersaron los compuestos de Fe que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Soluciones para la formación de micropartículas de Fe no Hem y de Fe no Hem/Fe Hem

Micropartículas	M (% p/v)	SF (% p/v)	EA (% p/v)
Fe no Hem	40	30	0
Fe no Hem/Fe Hem	40	30	20

M: maltodextrina, SF: sulfato ferroso, EA: eritrocitos de cerdo atomizados.

Luego estas dispersiones se secaron por atomización (Mini Spray Dryer B-290, Buchi, Suiza) bajo los siguientes parámetros: T° programada de entrada: 140 °C y salida de 80-90 °C, una presión de 4,8 bar y una velocidad de 357 L/h. En cuanto se recibieron las micropartículas se calculó su rendimiento, para esto siempre se atomizaron dispersiones de 100 mL y se pesó lo obtenido (g).

Caracterización de micropartículas

Las micropartículas fueron caracterizadas según su contenido de Fe total (método 999.11, A.O.A.C., 1996), utilizando espectrofotometría de absorción atómica (espectrofotómetro, GBC modelo 905AA, Australia); tamaño por dispersión dinámica de luz láser (Brookhaven Instrument Corp, USA); potencial Z (Zeta Plus, Brookhaven instruments Corp., USA) y color, usando un colorímetro (Konica-Minolta CR-300, 119 Japón). Se fotografiaron las micropartículas con una cámara digital para observar su apariencia. La morfología superficial de las micropartículas fue observada por microscopía electrónica de barrido, con un microscopio LEO 1420 VP (Cambridge, Reino Unido), usando un voltaje de aceleración de 25 kV. Previo al análisis, las muestras fueron montadas en una moneda de 5 pesos y sombreada con oro dos veces (PELCO 91.000).

II. Ensayo de depleción y suplementación en ratas

Animales

Los protocolos experimentales de este estudio cuentan con la aprobación del Comité de Bioética de FAVET (certificado N° 10-2015). Se utilizaron 15 ratas Sprague Dawley machos, de 5 semanas de edad con un peso promedio de 100 g, provenientes del Bioterio de la Universidad Católica de Chile. Los animales se mantuvieron durante todo el estudio en la Unidad de Manejo Experimental de Animales de FAVET, alojados en parejas, en jaulas de piso plástico y cama de viruta de madera. Esta unidad cuenta con calefacción controlada mediante un equipo de aire acondicionado ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) y termómetro de máximas

y mínimas. A las jaulas se les incorporaron elementos de enriquecimiento ambiental (iglús plásticos, tubos de pvc y cubos de madera).

Generación del estado de depleción de Fe en ratas

Se elaboraron dietas deficientes en Fe, siguiendo las directrices del “*Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition*” (1995), incorporando un núcleo mineral sin inclusión de sulfato ferroso como se presenta en la Tabla 2 (García *et al.*, 2010; García *et al.*, 2013a). La dieta deficiente se ofreció a las ratas durante 6 semanas. Además se les entregó agua desionizada *ad libitum*.

Tabla 2. Dieta formulada para ratas en crecimiento (AIN-93G) (*Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition*, 1995).

Ingredientes	g/kg de dieta
Almidón de maíz	467
Caseína (libre de Fe)	200
Maltodextrina	132
Sacarosa	100
Fibra dietaria	50
Núcleo mineral*	35
Núcleo de vitaminas	10
DL-metionina	3
Lisina	3

*Núcleo mineral para generar dietas deficientes en Fe (control) en mg/kg: fosfato de calcio dibásico (500 mg/kg); citrato de potasio monohidrato (220 mg/kg); cloruro de sodio (74 mg/kg); sulfato de potasio (52 mg/kg); óxido de magnesio (24 mg/kg); sulfato ferroso 16-17% fe (0 mg/kg); carbonato de manganeso (3,5 mg/kg); carbonato de zinc (1,6 mg/kg); sulfato de potasio cromo (0,55 mg/kg); carbonato cúprico (0,30 mg/kg); yodato de potasio (0,01 mg/kg); maltodextrina (124,04 mg/kg).

Adicionalmente a la dieta deficiente en Fe, las ratas fueron sometidas a flebotomías semanales (Tillán *et al.*, 2004) a partir de la segunda semana experimental. Las extracciones de sangre se realizaron previa anestesia general, donde los animales fueron introducidos en una cámara con 1,5 mL de isofluorano, hasta observar pérdida de conciencia. Se obtuvieron volúmenes de sangre calculados en base al peso del animal, y se realizaron extracciones de sangre equivalentes al 10% de la volemia como máximo, por punción de la vena basal y laterales de la cola (Lindstrom *et al.*, 2015).

Con este protocolo de inducción de deficiencia y consecuente anemización se obtuvieron solamente individuos depletados, basados en la información de ferritina sérica.

Tratamiento dietario

Al comprobarse efectivamente por medio del parámetro ferritina sérica (<400 µg/mL) que el 100 % de los animales presentaban depleción de Fe, los animales fueron distribuidos al azar a 3 grupos experimentales, para ser alimentados una vez al día con 20 g/rata de la dieta presentada anteriormente en la Tabla 2 (*Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition*, 1995):

- **Grupo Control (N=5):** suplementación con 50 mg de sulfato ferroso/kg de dieta incluidos al momento de la elaboración del núcleo mineral.
- **Grupo T1 (N=5):** suplementación con micropartículas de Fe no Hem (Tabla 1), que fueron incluidas al momento de la preparación del núcleo mineral hasta alcanzar los 50 mg de Fe/kg en la dieta.
- **Grupo T2 (N=5):** suplementación con micropartículas de mezcla (Tabla 1), que fueron incluidas al momento de la preparación del núcleo mineral hasta alcanzar los 50 mg de Fe/kg en la dieta.

Después de las 6 semanas de alimentación con la dieta deficiente en Fe, los animales fueron pesados y se extrajo una muestra de sangre (según las indicaciones mencionadas en las

flebotomías) para realizar hemograma completo en el Laboratorio de Micronutrientes del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA), y una prueba ELISA para determinar ferritina sérica (Rat Ferritin, Cusabio®), con el fin de establecer su condición basal de estatus de Fe previo al inicio del experimento de suplementación.

Las jaulas de los animales fueron identificadas con el grupo de tratamiento correspondiente, y los animales se identificaron individualmente mediante una marca numérica en la cola con plumón de punta fina permanente, que era remarcada diariamente, y se mantuvieron bajo estos tratamientos por 18 días.

Variables evaluadas

Estado de nutrición de Fe

Para determinar el estado de nutrición de Fe de las ratas, se tomó una muestra de sangre de 0,5 mL desde la vena de la cola al día 18 post-suplementación, previa anestesia, la cual se depositó en un tubo pediátrico con EDTA para hemograma completo, que fue realizado en el Laboratorio de Micronutrientes del INTA. Los parámetros a cuantificar fueron: eritrocitos (E), volumen corpuscular medio (VCM), hematocrito (Hto), hemoglobina (Hb), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (*Electronic Counter, CELDYN*) y zinc protoporfirina eritrocitaria (Zpp), determinada en un hematofluorómetro (AVIV Biomedical Inc., Lakewood, NJ, modelo 206D). También se cuantificó la ferritina sérica (FS) como se mencionó anteriormente.

Consumo de alimento

Durante la suplementación y hasta el día 17 para medir el consumo de alimento diario se usó una balanza analítica. Se pesó el alimento entregado (20 g) por comedero, y 24 h después se retiraron los comederos y se pesó lo recolectado, calculando el consumo por diferencia. Como las ratas están alojadas en parejas el valor obtenido se dividió en dos.

Peso

Se pesaron las ratas en una balanza digital al inicio de la etapa de suplementación y luego al finalizar esta etapa (día 18 de experimentación).

Análisis estadístico

Para comparar las diferentes características de las micropartículas se realizó una prueba de T-Student ($p < 0,05$). Para comparar los biomarcadores del estado de nutrición de Fe y peso entre grupos de tratamiento, se realizó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilk). Como los datos estuvieron distribuidos de manera normal, se realizó una prueba de ANOVA seguida de una de Tukey ($p < 0,05$). Para el análisis de los datos de consumo de alimento se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) debido a que no se encontraban distribuidos de manera normal. Se utilizó el programa estadístico Statistix 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización de las micropartículas

Se obtuvieron dos tipos de micropartículas, uno de Fe no Hem y el otro de mezcla (Fe no Hem/Fe Hem), pudiéndose encapsular ambos tipos de Fe. La caracterización de estas micropartículas se presenta en la Tabla 3.

Respecto al rendimiento, se observó que las micropartículas de mezcla presentaban un mayor rendimiento que las de Fe no Hem, esto quiere decir que por 100 mL de solución se obtuvieron más gramos de micropartículas de mezcla (Tabla 3). Esto se atribuye a que la dispersión formadora de micropartículas de mezcla contenía más elementos dispersados.

Tabla 3. Caracterización de micropartículas de Fe con maltodextrina

Características	Micropartículas	
	Fe no Hem	Fe no Hem/Fe Hem
Rendimiento (g)	43,4 ± 0,8 ^a	55,1 ± 2,9 ^b
Fe total (mg/g)	70,7 ± 4,5 ^a	81,1 ± 3,9 ^b
Tamaño (nm)	964 ± 9 ^a	1.074 ± 9 ^b
Potencial Z (mv)	-4,1 ± 0,1 ^a	11,6 ± 0,9 ^b
Color (L)	39,0 ± 46,4 ^a	14,0 ± 0,5 ^b
Color (a)	-1,0 ± 0,0 ^a	5,0 ± 1,9 ^b
Color (b)	6,0 ± 0,3 ^a	5,0 ± 0,6 ^b

Letras diferentes en superíndices indican diferencias significativas (p<0,05).

El contenido de Fe total fue superior en las micropartículas de mezcla comparadas con las micropartículas de Fe no Hem (Tabla 3), lo cual era esperable debido a la adición de EA. Sin embargo, éstas solo presentaron alrededor de 10 mg más de Fe que las micropartículas de Fe no Hem debido a que el contenido de Fe de EA es bajo (2,5 mg/g), ya que el Fe está contenido dentro de eritrocitos, pero el 99 % de este Fe es de origen hemínico (Valenzuela

et al., 2014), por lo tanto, debiese ser más biodisponible que el Fe no Hem (Conrad y Umbreit, 2002).

El tamaño fue mayor para las micropartículas de mezcla (Tabla 3), lo cual también era esperable, ya que se utilizó EA en una alta concentración, además del Fe no Hem adicionado a la dispersión formadora de estas micropartículas, aumentando así la cantidad total de material núcleo. En las dos micropartículas el tamaño fue cercano a 1 μm , esto es considerado un tamaño pequeño que generalmente se logra utilizando maltodextrina como material muralla (Tonon *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2014), y usando condiciones específicas en el equipo de atomización, ya que el cambio de esas condiciones podría provocar variaciones en el tamaño de las micropartículas (Vicente *et al.*, 2013). Dentro de los beneficios que podría tener el menor tamaño de las micropartículas, se señala una mejora en la fluidez del polvo (Sansone *et al.*, 2011), lo cual es requerido para que las micropartículas se almacenen adecuadamente. Esto es ventajoso, ya que estas micropartículas fueron diseñadas para incorporarse en la dieta de ratas que comprenden varios ingredientes alimentarios en estado sólido. El tamaño también puede influir en la biodisponibilidad de la micropartícula. En un estudio realizado por Wegmüller *et al.* (2004) se estableció que a menor tamaño hay un aumento de la biodisponibilidad del material encapsulado, cuando es usado para suplementarse oralmente. A su vez, también permite que las micropartículas sean más fáciles de homogenizar cuando se quieren realizar soluciones a partir de éstas (Da Silva-Junior *et al.*, 2009). Esto fue comprobado en el estudio de Antileo *et al.* (2016), en el cual micropartículas de maltodextrina/Fe similares a las del presente trabajo, se dispersaban adecuadamente en una solución acuosa, pudiendo generar un suplemento líquido de Fe oral para cerdos lechones.

En relación al potencial Z, que es una medida que se utiliza comúnmente para caracterizar la carga superficial de las micropartículas y refleja su potencial eléctrico, que depende de la composición de éstas y el medio en el que se dispersan principalmente (Hunter, 2013). Se observó que para las micropartículas de Fe no Hem este valor fue negativo, lo que difiere bastante con las micropartículas de mezcla que fue positivo (Tabla 3). El valor negativo se podría relacionar con que las micropartículas de Fe no Hem contienen sulfato ferroso que

es un material aniónico, debido a la presencia del grupo sulfato que presenta carga negativa, y parte de este material podría estar quedando atrapado de manera superficial (ordenamiento matricial) en las micropartículas de Fe no Hem, otorgando un potencial Z negativo. Similar a lo reportado por Saloko *et al.* (2013) con micropartículas de quitosano (material muralla)/tripolifosfato de sodio (material núcleo), siendo el quitosano un material positivo y el tripolifosfato un penta-anión, éstas micropartículas presentaron un potencial Z negativo. A su vez, He *et al.* (1999) describió que en la medida que se aumenta el material núcleo con carga negativa, el potencial Z de las micropartículas se hace más negativo. Se hipotetiza que existe algún tipo de interacción de los grupos químicos entre el sulfato ferroso/EA/maltodextrina, que generaría que las micropartículas de mezcla tuvieran un potencial Z positivo. Según lo descrito por Takeuchi *et al.* (2001) el cambio de potencial Z en liposomas se observó principalmente por el cambio e interacción de diferentes polímeros en la superficie de los liposomas durante el proceso de encapsulación.

Las diferentes cargas encontradas en las micropartículas de Fe no Hem y de mezcla, pudiesen generar distintos comportamientos en su paso por el sistema gastrointestinal, donde se ven enfrentadas a procesos de disolución en los diferentes medios y adhesión/avance (Ma *et al.*, 2005). También podría influir en su mecanismo de disolución en ambientes alcalinos (He *et al.*, 1999), como el duodeno, que es donde se absorben los dos tipos de Fe (Lipiński *et al.*, 2013); o diferentes capacidades de adhesión a la mucosa intestinal (Arbos *et al.*, 2003). Sin embargo, se necesitan más estudios de tipo *in vitro* para esclarecer este tema.

En relación al color de las micropartículas, las de Fe no Hem mostraron valores más altos para los parámetros L y b , mientras que para el valor de a fue menor en comparación con las micropartículas de mezcla (Tabla 3). Esto indicaría una coloración con mayor tendencia a los tonos rojos para las micropartículas de mezcla, y un color más claro y verdoso para las micropartículas de Fe no Hem (Gandía *et al.*, 2010). En la Figura 2 se puede apreciar la apariencia y el color de las micropartículas. La coloración blanco-verdosa de las micropartículas de Fe no Hem (Figura 2A) se debe a la encapsulación de sulfato ferroso (color turquesa) con maltodextrina (color blanco) y la coloración de las micropartículas de

mezcla (Figura 2B) por el uso de EA que tienen una coloración café-rojiza debido a su origen hemático. Aunque se utilizó la misma concentración de maltodextrina para la elaboración de ambas micropartículas, el color del material núcleo fue mayormente enmascarado en las micropartículas de Fe no Hem.



Figura 2. Apariencia de las micropartículas de Fe no Hem (A) y de mezcla (B).

Finalmente, con respecto a la morfología superficial de las micropartículas se observaron grandes diferencias entre ellas. Las de Fe no Hem (Figura 3A) presentaban una superficie más irregular y heterogénea, con numerosas depresiones y concavidades. Mientras que las micropartículas de mezcla (Figura 3B) presentaban una forma mas esférica con una superficie lisa y homogénea.

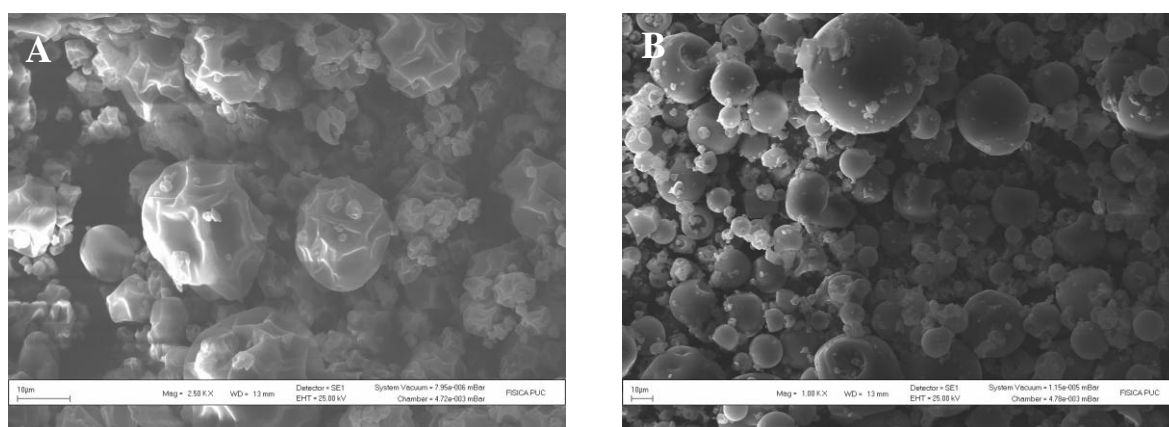


Figura 3. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido: (A) Micropartículas de Fe no Hem; (B) Micropartículas de mezcla.

Según la literatura estas diferencias se pueden atribuir al material muralla utilizado, el proceso de secado y formación de las micropartículas y el material núcleo, entre las principales causas (Alamilla *et al.*, 2005; Loksawan, 2007; Gandía *et al.*, 2010; Sansone *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2014). Para el caso de las micropartículas generadas en este trabajo, se utilizó el mismo material muralla y en la misma proporción para ambos tipos, además las condiciones del equipo de atomización fueron similares, por lo que no podría atribuirse a estos factores las diferentes morfologías observadas. Por lo general, las micropartículas que tienen como material muralla maltodextrina y son secadas por atomización, presentan una superficie rugosa y con concavidades (Di Battista *et al.*, 2015; Otálora *et al.*, 2015), lo cual es similar a lo observado en las micropartículas de Fe no Hem del presente estudio, por lo que podría deducirse que la incorporación de Fe Hem a la solución formadora de estas micropartículas, ejerce un efecto en la morfología. Se ha descrito que la adición de ciertos materiales núcleos o muralla en micropartículas atomizadas, podrían generar un efecto plastificante, obteniendo superficies más lisas y homogéneas (Zhang *et al.*, 2000; Bruschi *et al.*, 2003). Rosenberg *et al.* (1985) describió que las concavidades observadas en micropartículas se forman durante la evaporación rápida de las gotas de líquido en el proceso de atomización, así de alguna forma los EA podrían enlentecer este proceso de secado, haciendo que las concavidades desaparezcan. Esto podría tener relación con la higroscopicidad de este material, así como el de otros hidrolizados proteicos similares, como el de carne al ser encapsulados (Kurozawa *et al.*, 2009).

El hecho que las micropartículas de mezcla presenten formas más esféricas y homogéneas, podría ser beneficioso para su almacenamiento y mezcla con alimentos u otro vehículo para su administración, ya que esto permite que las micropartículas fluyan de mejor manera (Walton y Mumford, 1999; Otálora *et al.*, 2015).

Evaluación de las micropartículas sobre el estado de nutrición de Fe de ratas

Estado basal de nutrición de Fe en ratas

La deficiencia de Fe se puede clasificar en tres etapas según su severidad: 1) depleción, 2) deficiencia y 3) anemia. En la depleción, los depósitos de Fe se agotan, observándose una disminución de la ferritina sérica. La deficiencia se caracteriza por la disminución de las reservas de Fe y por la alteración de los biomarcadores del estado de nutrición de él, como la reducción de la producción de proteínas Fe-dependientes. En esta etapa el Fe de transporte se reduce y, por ende, también lo hace el suministro de este mineral a las células, lo que se manifiesta con un bajo nivel de Fe sérico y saturación de la transferrina, un aumento de la capacidad total de fijación del hierro y de la concentración de zinc protoporfina eritrocitaria. La anemia es la forma más severa de deficiencia y se caracteriza por la disminución de las reservas de Fe, más la reducción de la hemoglobina y la alteración de otros indicadores del estado de nutrición de Fe, además de observar comúnmente la disminución del volumen corpuscular medio (VCM) y número de eritrocitos, debido a un suministro insuficiente de Fe para la elaboración de éstos (Brownlie *et al.*, 2002).

El contenido de Fe de la dieta deficiente de las ratas (antes de la suplementación), fue de 17 mg de Fe/kg, valor menor al requerimiento de ratas machos en crecimiento de 35 mg de Fe/kg (*Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition*, 1995; Keenan *et al.*, 2000). Sin embargo, en este estudio sólo se logró generar en las ratas un estado de depleción de Fe. Otros autores que utilizaron dietas formuladas de manera similar a los de este estudio, sí lograron obtener dietas con menores cantidades de Fe/kg. Así, Srigiridhar y Madhavan (1998) obtuvieron dietas de 8 mg/kg de Fe, Alférez *et al.* (2011), dietas con 5 mg/kg, y García *et al.* (20013a) con 1,25 mg/kg de Fe. Aún cuando se esperaba obtener una situación de anemia en las ratas, con dicha dieta sólo se alcanzó un estado de deplación.

Aunque se siguieron las recomendaciones para la elaboración de dietas bajas en Fe, no fue posible disminuir el contenido de éste en las dietas utilizadas, ya que todas las materias primas presentaron una concentración en traza que aportaron al total en la dieta.

Como se mencionó anteriormente, antes de la suplementación las ratas se encontraban en un estado de depleción de Fe. En la Tabla 4 se observa que todos los parámetros del hemograma, con excepción de la ferritina sérica (FS), se encontraron dentro o sobre los rangos referenciales para eritrocitos (E), volumen corpuscular medio (VCM), hematocrito (Hto), hemoglobina (Hb) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Estos resultados eran esperables, ya que en ratas depletadas estos parámetros no se alteran (Hinton *et al.*, 2000; Brownlie *et al.*, 2002). En el caso de la zinc protoporfina, en la literatura existe bastante variabilidad en el valor normal de este parámetro, ya que no está bien establecido en el caso de las ratas, pero el valor que se utilizó en este estudio es similar al punto de corte de humanos ($> 70 \mu\text{g/dL}$) (Centers for Disease Control and Prevention-CDC, 1998).

Tabla 4. Valores basales de biomarcadores del estado nutrición de Fe en ratas después de inducida la depleción y previo al ensayo de suplementación.

Parámetros	C	T1	T2	Rangos	p-value
E ($\times 10^6 \times \text{mm}^3$)	$10,1 \pm 0,9^a$	$9,6 \pm 1,1^a$	$9,6 \pm 1,0^a$	7,7-8,2 ¹	0,565
VCM (fL)	$53,6 \pm 1,3^a$	$53,8 \pm 1,3^a$	$54,2 \pm 0,8^a$	53,0-59,5 ¹	0,879
Hto (%)	$58,6 \pm 3,4^a$	$54,7 \pm 4,8^a$	$54,6 \pm 4,4^a$	41,2-47,3 ¹	0,234
Hb (g/dL)	$16,2 \pm 0,6^a$	$15,6 \pm 0,9^a$	$15,9 \pm 0,9^a$	14,4-16,0 ¹	0,987
CHCM (g/dL)	$30,6 \pm 0,4^a$	$31,3 \pm 0,7^a$	$30,9 \pm 0,6^a$	26,7-27,9 ²	0,765
ZnPP ($\mu\text{g/dL}$)	$74,8 \pm 13,6^a$	$78,3 \pm 14,6^a$	$80,6 \pm 12,3^a$	s/i ^{3*}	0,341
FS (ng/mL)	221 ± 27^a	217 ± 63^a	212 ± 71^a	300-400 ⁴	0,439

E: Eritrocitos; VCM: Volumen Corpuscular Medio; Hto: Hematocrito; Hb: Hemoglobina; CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media; Zpp: Zinc Protoporfina Eritrocitaria (*este valor fue expresado como punto de corte); FS: Ferritina Sérica.¹Giknis y Clifford (2006), ²Ameri *et al.* (2011), ³s/i: sin información para ratas y ⁴Watanabe *et al.* (2001).

Letras en superíndices indican diferencias significativas entre grupos según parámetro ($p < 0,05$).

C: grupo control; T1: grupo suplementado con micropartículas de Fe no Hem; T2: grupo suplementado con micropartículas de Fe no Hem/Fe Hem.

El parámetro ferritina sérica se encontró bajo el límite establecido para la especie, lo que era esperable, ya que este parámetro está correlacionado con las reservas de Fe en el organismo (Hunter, 1978; Watanabe *et al.*, 2001). Además, la prueba ELISA para determinar ferritina sérica es el mejor indicador de las reservas de Fe y estado de depleción (Liu y Kaffes, 2012). Estos resultados fueron similares a los de Hunter (1978), quien utilizó dietas bajas en Fe por 5 semanas en ratas, período similar al transcurrido en esta memoria, lo cual provocó una disminución en la ferritina sérica en las ratas.

Suplementación oral de Fe en forma de micropartículas

Luego de comprobar que efectivamente las ratas del estudio presentaron un estado de depleción de Fe, se incluyeron las micropartículas de Fe en las diferentes dietas. Así las dietas presentaron un contenido similar entre ellas, de: C ($55,6 \pm 3,4$ mg/kg), T1 ($54,1 \pm 5,1$ mg/kg) y T2 ($56,8 \pm 3,8$ mg/kg). Estos valores son superiores al requerimiento de las ratas en etapa de crecimiento el cual fue establecido en 35 mg/kg de dieta (*Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition*, 1995). En la Tabla 5 se observa que la mayoría de los parámetros que miden el estado de nutrición de Fe, después de la suplementación, se encontraron dentro o sobre el rango referencial para esta especie, manteniéndose en valores similares previos a la suplementación, a excepción de la ferritina sérica, la cual aumentó en todos los grupos, sobrepasando el rango. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento para este parámetro.

Tabla 5. Valores finales de biomarcadores del estado nutrición de Fe en ratas, posterior a la suplementación con Fe en diferentes condiciones

Parámetros	C	T1	T2	Rangos	p-value
E ($\times 10^6 \times \text{mm}^3$)	10,8 \pm 0,5 ^a	11,4 \pm 0,4 ^a	11,1 \pm 0,5 ^a	7,7-8,2 ¹	0,840
VCM (fL)	52,6 \pm 1,7 ^a	58,3 \pm 1,7 ^a	58,4 \pm 1,6 ^a	53,0-59,5 ¹	0,123
Hto (%)	57,5 \pm 1,9 ^a	61,5 \pm 1,9 ^a	59,3 \pm 2,7 ^a	41,2-47,3 ¹	0,789
Hb (g/dL)	18,3 \pm 1,0 ^a	19,3 \pm 0,8 ^a	18,7 \pm 1,0 ^a	14,4-16,0 ¹	0,912
CHCM (g/dL)	31,8 \pm 0,8 ^a	31,4 \pm 0,5 ^a	31,6 \pm 0,5 ^a	26,7-27,9 ²	0,834
ZnPP (ug/dL)	61,1 \pm 7,2 ^a	61,1 \pm 7,2 ^a	61,7 \pm 6,9 ^a	s/i ^{3*}	0,675
FS (ng/mL)	983 \pm 251 ^a	1.281 \pm 236 ^a	1.105 \pm 316 ^a	300-400 ⁴	0,567

E: Eritrocitos; VCM: Volumen Corpuscular Medio; Hto: Hematocrito; Hb: Hemoglobina; CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media; Zpp: Zinc Protoporfina Eritrocitaria (*este valor fue expresado como punto de corte); FS: Ferritina Sérica.¹Giknis y Clifford (2006), ²Ameri *et al.* (2011)³s/i: sin información para ratas y ⁴Watanabe *et al.* (2001).

C: grupo control; T1: grupo suplementado con micropartículas de Fe no Hem; T2: grupo suplementado con micropartículas de Fe no Hem/Fe Hem.

Letras en superíndices indican diferencias significativas entre grupos según parametro ($p < 0,05$).

De la Tabla 5 se desprende que todos los tratamientos de suplementación de Fe usados en este estudio mejoraron el estado de depleción de las ratas, aumentando el valor de ferritina sérica, incluso por sobre el punto de corte. Sin embargo, no hubo un efecto del tratamiento de encapsulación del Fe no Hem, como tampoco de la suplementación con diferentes fuentes de Fe encapsulado ($p > 0,05$, Tabla 5). A diferencia de otros trabajos revisados, como es el caso de la investigación realizada por García *et al.* (2013a), quienes evaluaron la eficiencia en la remisión de anemia ferropriva en ratas, utilizando mezclas de Fe no Hem/Fe Hem no encapsulado, donde se observó que la mezcla de ambos tipos tuvo un mejor efecto en la remisión de anemia que el Fe no Hem por sí solo. Por otra parte, en un estudio realizado por Yuan *et al.* (2013) se evaluó el efecto de la encapsulación en forma de liposomas de diferentes compuestos de Fe en la remisión de anemia por inflamación en ratas. Para esto se compararon cuatro tipos de tratamientos, dos de ellos encapsulados en liposomas y dos sin encapsular, concluyéndose que los elementos encapsulados tuvieron resultados superiores en la remisión de la anemia que los sin encapsular. En otro estudio

realizado por Xu *et al.* (2014) se evaluaron distintos suplementos de Fe Hem y Fe no Hem encapsulados como liposomas y sin encapsular en ratas con anemia, donde tanto los liposomas de Fe no Hem y de Fe Hem mejoraron los parámetros de nutrición de Fe debido al aumento de la eficiencia de absorción. Navas *et al.* (2007) evaluaron patés enriquecidos con Fe encapsulado como liposomas sobre la absorción de este mineral y, observaron que la encapsulación protegió al Fe y mejoró la biodisponibilidad de este mineral.

Los resultados de estos estudios difieren de los obtenidos en la presente memoria, posiblemente porque en éstos se utilizaron ratas anémicas. La explicación de este fenómeno se basa en que la absorción de Fe está condicionada a las necesidades del organismo. Así, Valenzuela *et al.* (2013b), reportaron que individuos con anemia por deficiencia de Fe absorbían mayor cantidad de este mineral que los deficientes y depletados y éstos, a su vez, mayor cantidad que los normales. También se debe considerar que a medida que aumenta la cantidad de Fe almacenado (medido por la ferritina sérica), disminuye la absorción de éste (Frazer *et al.*, 2002; Aggett, 2012), lo cual previene la sobrecarga de Fe en el organismo (Finch, 1994).

En un estudio realizado por Viteri *et al.* (1995) en ratas, se observó que con un estado de deficiencia de Fe, la absorción de éste fue mayor en animales con un estado de nutrición de Fe normal. Sin embargo, dentro del grupo deficiente, las ratas que eran suplementadas cada tres días, presentaron una mayor absorción de Fe, que las suplementadas diariamente, posiblemente por la respuesta de los mecanismos de homeostasis, ante un escenario de sobrecarga del mineral. Esto también se da en el caso de bebés nacidos de madres deficientes en Fe, en donde la absorción de este mineral en los infantes era inversamente proporcional a la cantidad de Fe almacenado (Hicks *et al.*, 2006; Finkelstein *et al.*, 2013). Así se especula que el estado de depleción de las ratas en la presente memoria no fue suficiente para gatillar una mayor absorción de Fe para haber observado diferencias entre tratamientos. En estados de anemia se hacen más relevantes las diferencias de biodisponibilidad que puedan tener los suplementos orales de Fe, ya que los más biodisponibles tienden a absorberse de mejor manera (Finch, 1994).

En un estudio realizado por Antileo *et al.* (2016), quien usando el mismo tipo de micropartículas utilizadas en esta memoria, vehiculizadas como solución oral y entregadas en tres dosis durante el periodo de lactancia de 21 días, mejoraron los parámetros de nutrición de Fe de los cerdos, con resultados comparables a los obtenidos con suplementación con hierro dextrano parenteral.

Finalmente, cabe mencionar que si bien el período experimental de este estudio fue menor al establecido por otros autores, no habría influido en los resultados, debido a que el tiempo de suplementación de 18 días es tiempo suficiente para observar el efecto de la suplementación oral con Fe sobre los parámetros que muestran su funcionalidad, principalmente, la concentración de hemoglobina (CHCM) y cantidad de eritrocitos (E), ya que se describe que el Fe consumido de forma oral se incorpora progresivamente a los eritrocitos desde que se ingiere, alcanzando un *plateau* a los 15 días (Callender *et al.*, 1957), estimando que un 80-100 % del Fe es incorporado a los eritrocitos a los 14 días (Heath y Fairweather, 2002).

Efecto de la suplementación con Fe en diferentes formas sobre el peso y consumo de alimento

Los pesos de las ratas pre-suplementación no mostraron diferencias entre los grupos de estudio (Tabla 6). Post-suplementación se observa un aumento de peso de las ratas, debido a que la dieta ofrecida cumplía con los requerimientos de estos animales. Tampoco se observa un efecto del grupo de suplementación sobre el peso al final del estudio. Estos resultados fueron diferentes a los obtenidos por Campos *et al.* (1998) y Alférez *et al.* (2011), en donde se observó una menor ganancia de peso en ratas, las que presentaban una condición de anemia.

Tabla 6. Peso al inicio y al final del período de suplementación medido en gramos y consumo promedio de gramos consumidos por rata día medido en gramos.

Grupos	C	T1	T2
Peso (g)			
Pre-suplementación	214 ± 28 ^{a1}	204 ± 23 ^{a1}	199 ± 22 ^{a1}
Post-suplementación	253 ± 42 ^{a2}	231 ± 19 ^{a2}	248 ± 43 ^{a2}
Consumo (g)			
Día 04	6,5 ± 2,1 ^{a1}	8,1 ± 0,3 ^{b1}	8,5 ± 4,7 ^{b1}
Día 17	4,3 ± 1,5 ^{a2}	5,5 ± 2,8 ^{a2}	5,9 ± 4,4 ^{a2}

C: grupo control; T1: grupo suplementado con micropartículas de Fe no Hem; T2: grupo suplementado con micropartículas de Fe no Hem/Fe Hem.

Letras diferentes en superíndices indican diferencias significativas entre grupos y números en el tiempo (p<0,05).

Se informa el consumo de alimento (Tabla 6) al día 4 y 17, ya que después de graficar los datos de consumo diarios (datos no mostrados), se observó una disminución del consumo el día 4, y desde el día 5 en adelante los consumos fueron similares. Así se puede observar que hay un mayor consumo de alimento al día 4 que el día 17, lo cual podría atribuirse a que la cantidad de alimento consumido por individuo se ve condicionada por su estado fisiológico (Forbes, 2010), debido a que las ratas en estado de depleción consumirían más alimento suplementado hasta alcanzar un estado normal de Fe, por lo que al final de la etapa experimental, y al encontrarse todos los individuos con sus reservas de Fe normales, el consumo de la dieta tendería a disminuir, tal como se observó en el presente estudio.

Es importante destacar que las ratas del grupo control consumieron menos alimento que las de los grupos T1 y T2, en donde se usó la técnica de encapsulación de Fe. Seguramente porque esta tecnología mejora las características organolépticas del Fe, disminuyendo el sabor metálico y el sabor a “sangre” que provocan el sulfato ferroso y los eritrocitos cuando se fortifican alimentos (Hurrell, 2002; Zimmermann, 2004). Este menor consumo de alimento de las ratas control no se vió reflejado en su peso vivo ni en el estado de nutrición de Fe, comparado a las ratas de los otros grupos, posiblemente porque después del día 5 no

hubo diferencias en el consumo de alimento entre grupos, manteniéndose un consumo constante hasta el día 17.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos tipos de micropartículas de Fe no Hem y de mezcla entre Fe no Hem/Fe Hem. Las micropartículas encapsularon Fe eficientemente, mostrando un contenido de hierro alto y levemente mayor para las de mezcla. La morfología superficial de las micropartículas muestra una forma redondeada para las de mezcla, y más rugosa e irregular para las de Fe no Hem.

No se observó un efecto de la encapsulación de Fe para el caso de la suplementación oral de Fe no Hem sobre la remisión de la depleción en ratas, sin embargo, tampoco hubo un efecto de la combinación de ambos tipos de Fe encapsulado versus las micropartículas de Fe no Hem luego de la suplementación oral sobre el estado de nutrición férrico de las ratas. Las 3 formas de suplementación oral de Fe usada en este estudio mejoraron el estado de depleción de las ratas, generando individuos con un estado de nutrición de Fe normal.

En estudios posteriores es necesario que se establezca un protocolo para inducir anemia en ratas, con la finalidad de generar un aumento de la absorción de Fe que pudiera llegar a detectar mínimas diferencias entre diferentes tratamientos de suplementación oral de este mineral. También se considera necesario incluir otro grupo experimental que evalué el efecto de la mezcla de Fe sin encapsular.

BIBLIOGRAFÍA

AGGETT, P. 2012. Iron. **In:** Present Knowledge in Nutrition. 10^a ed. Wiley-Blackwell. Oxford, UK. pp. 506-520.

ALAMILLA, L.; CHANONA, J.; JIMÉNEZ, A.; GUTIÉRREZ, G. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *J. Food Eng.* 67(1-2):179-184.

ALEMÁN, M.; BOU, R.; TRES, A.; POLO, J.; CODONY, R.; GUARDIOLA, F. 2016. Oxidative stability of a heme iron-fortified bakery product: Effectiveness of ascorbyl palmitate and co-spray-drying of heme iron with calcium caseinate. *Food Chem.* 196:567-576.

ALFÉREZ, M.; DÍAZ, J.; LÓPEZ, I.; RODRÍGUEZ, M.; PÉREZ, L.; CAMPOS M. 2011. Development of nutritional iron deficiency in growing male rats: haematological parameters, iron bioavailability and oxidative defence. *Brit. J. Nutr.* 105:517-525.

AMERI, M.; SCHNAARS, H.; SIBLEY, J.; HONOR, D. 2011. Stability of hematologic analytes in monkey, rabbit, rat and mouse blood store at 4°C in EDTA using the ADVIA 120hematology analyzer. *Vet. Clin. Pathol.* 40(2):188-194.

ANTILEO R, VALENZUELA C, FIGUEROA J. 2016. Characterization of a novel encapsulated oral iron supplement to prevent iron-deficiency anemia in neonatal piglets. *J Anim. Sci.* doi: 10.2527/jas.2015-9698.

ARBOS, P.; CAMPANERO, M.; ARANGO, M.; RENEDO, M.; IRACHE, J. 2003. Influence of the surface characteristics of PVM/MA nanoparticles on their bioadhesive properties. *J. Control Release.* 89(1):19-30.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1996. Official Methods of Analysis of AOAC International (16th ed.). AOAC International: Gaithersburg, USA.

BALTUSSEN, R.; KNAI, C.; SHARAN, M. 2004. iron fortification and iron supplementation are cost-effective interventions to reduce iron deficiency in four subregions of the world. *J. Nutr.* 134(10):2678-2684.

BROWNLIE, T.; UTERMÖHLEN, V.; HINTON, P.; GIORDANO, C.; HAAS JERE. 2002. Marginal iron deficiency without anemia impairs aerobic adaptation among previously untrained women. *Am. J. Clin. Nutr.* 75(4):734-742.

BRUSCHI, M.; CARDOSO, M.; LUCCHESI, M.; GREMIAO, M. 2003. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spraydrying technique preparation and characterization. *Int. J. Pharm.* 264:45-55.

CALLENDER S.; MALLETT B.; SMITH M. Absorption of haemoglobin iron. 1957. *Br. J. Haematol.* 3:186-192

CAMPOS, M.; PALLARÉS, I.; MORATALLA, A.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; GÓMEZ-AYALA, A.; HARTITI, S.; ALFÉREZ, M.; BARRIONUEVO, M.; LISBONA, F. 1996. Bioavailability of Fe, Ca, P and Mg in deficient rats treated with different sources of dietary iron. *Nutr. Res.* 16(4):683-696.

CAMPOS M.; BARRIONUEVO, M.; ALFÉREZ, M.; GÓMEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; LOPEZ, I.; LISBONA, F. 1998. Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in the nutritionally iron-deficient rat. *Exp. Physiol.* 83(6):771-781.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1998. Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. [en línea] <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00051880.htm>>. [consulta: 11-05-2016].

CHRONAKIS, I. 1998. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38(7):599-637.

CONRAD, M.; UMBREIT, J. 2002. Pathways of iron absorption. *Blood Cell. Mol. Dis.* 29(3):336-355.

DA SILVA-JUNIOR, A.; DE MATOS, J.; FORMARIZ, T.; ROSSANEZI, G.; SCARPA, M.; DO EGITO, E.; DE OLIVEIRA, A. 2009. Thermal behaviour and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. *Int. J. Pharm.* 368:45-55.

DI BATTISTA, C.; CONSTENLA, D.; RAMÍREZ, M.; PIÑA, J. 2015. The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technol.* 286:193-201.

FERNANDES, R.; BORGES, S.; BOTREL, D. 2014. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydr. Polym.* 101:524-532.

FINCH, C. 1994. Regulators of iron balance in humans. *Blood.* 84:1697-1702.

FINKELSTEIN, J.; O'BRIEN, K.; ABRAMS, S.; ZAVALETA, N. 2013. Infant iron status affects iron absorption in Peruvian breastfed infants at 2 and 5 mo of age. *Am. J. Clin. Nutr.* 98:1475-1484.

FORBES, J. 2010. Palatability: principles, methodology and practice for farm animals. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.* 5(53): 1-15.

FRAZER, D.; WILKINS, S.; BECKER, E.; VULPE, C.; MCKIE, A.; TRINDER, D.; ANDERSON, G. 2002. Hcpidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology*. 123:835-844.

FUQUA, B.; VULPE, C.; ANDERSON, G. 2012. Intestinal iron absorption. *J. Trace Elem. Med. Bio.* 26:115-119.

GAITÁN, D.; OLIVARES, M.; ARREDONDO, M.; PIZARRO, F. 2006. Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Rev. Chil. Nutr.* 33(2):142-148.

GANDÍA, F.; JIMÉNEZ, M.; CABANES, J.; GARCÍA, F.; ESCRIBANO, J. 2010. Stabilization of the Bioactive Pigment of *Opuntia* Fruits through maltodextrin encapsulation. *J. Agr. Food Chem.* 58:10646-10652.

GARCÍA, Y.; GONZÁLEZ, R.; CÁRDENAS, R.; CARMONA, A. 2010. Desarrollo de un biomodelo de ratas anémicas mediante dos tipos de dieta de caseína. *Rev. Cub. Aliment. Nutr.* 20(1):26-34

GARCÍA, Y.; GONZÁLEZ, R.; GARCÍA, Á.; ÁNGELES, S.; CARMONA, A.; CÁRDENAS, R. 2013a. Efecto de la suplementación con diferentes fuentes de hierro durante la recuperación de ratas anémicas. *Rev. Cenic Cs. Biol.* 44(3):14-22.

GARCÍA, Y.; DÍAZ, J.; LÓPEZ, I.; ALFÉREZ, M.; RAMOS, A.; SÁNCHEZ, M. 2013b. Bioavailability of Fe, Cu, Zn and antioxidant defence in anemic rat supplemented with a mixture of heme/non-heme Fe. *J. Food Nutr. Res.* 52(2):128-138.

GIKNIS, M.; CLIFFORD, C. 2006. Clinical Laboratory Parameters for CrI:CD (SD) Rats. Charles River Laboratories. [en línea] <http://www.criver.com/files/pdfs/rms/cd/rm_rm_r_clinical_parameters_cd_rat_06.aspx> [consulta: 01-04-2016].

HE, P.; DAVIS, S.; ILLUM, L. 1999. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *Int. J. Pharm.* 187:59-65.

HEATH, A; FAIRWEATHER, S. 2002. Clinical implications of changes in the modern diet: iron intake, absorption and status. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 15(2):225-241.

HICKS, P.; ZAVALETA, N.; CHEN, Z.; ABRAMS, S.; LÖNNERDAL, B. 2006. Iron deficiency, but not anemia, upregulates iron absorption in breast-fed peruvian infants. *J. Nutr.* 136:2435-2438.

HINTON, P.; GIORDANO, C.; BROWNLIE, T.; HAAS, J. 2000. Iron supplementation improves endurance after training in iron-depleted, nonanemic women. *J. Appl. Physiol.* 88:1103-1111.

HOODA, J.; SHAH, A.; ZHANG, L. 2014. Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes. *Nutrients.* 6:1080-1102.

HUNTER, E. 1978. Variable effects of iron status on the concentration of ferritin in rat plasma, liver and spleen. *J. Nutr.* 108:497-505.

HUNTER, R. 2013. Zeta potential in colloid science: principles and applications. Academic press. San Diego, California, Estados Unidos. 398p.

HURRELL, R. 2002. Fortification: Overcoming technical and practical barriers. *J. Nutr.* 132(4):806S-812S.

KEENAN, K.; BALLAM, G.; HAUGHT, D.; LAROQUE, P. 2000. Chapter 5-Nutrition. **In:** Krinke, G. *The Laboratory Rat.* Academic Press. Scotland, UK. pp. 57-75.

KUROZAWA L.; PARK K.; HUBINGER M. 2009. Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. *J. Food Eng.* 94:326-333.

LINDSTROM, N.; MOORE, D.; ZIMMERMAN, K.; SMITH, S. 2015. Hematologic assessment in pet rats, mice, hamsters, and gerbils: blood sample collection and blood cell identification. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 18(1):21-32.

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, K; KAFFES, A. 2012. Iron deficiency anaemia: a review of diagnosis, investigation and management. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 24:109-116.

LOKSUWAN, J. 2007. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloid.* 21:928-935.

LÓPEZ, I.; DÍAZ, J.; NESTARES, T.; MUÑOZ, M.; SÁNCHEZ, M. 2009. Calcium-supplemented goat milk does not interfere with iron absorption in rats with anemia induced by dietary iron depletion. *Food Chem.* 133(3):839-841.

LYSIONEK, A.; ZUBILLAGA, M.; SALGUEIRO, M.; PIÑEIRO, A.; CARO, R.; WEILL, R.; BOCCIO, J. 2002. Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in powdered milk produced from fortified fluid milk: a prophylactic study in rats. *Nutrition.* 18(3):279-281.

MA, Z.; LIM, T.; LIM, L. 2005. Pharmacological activity of peroral chitosan–insulin nanoparticles in diabetic rats. *Int. J. Pharm.* 293(1):271-280.

NAVAS, S.; PÉREZ, A.; SARRIÁ, B.; SCHOPPEN, S.; VAQUERO, M. 2007. Iron bioavailability from pate enriched with encapsulated ferric pyrophosphate or ferrous gluconate in rats. *Food Sci. Technol. Int.* 13:159-163.

NAVAS, S.; PÉREZ, A.; SARRIÁ, B.; SCHOPPEN, S.; VAQUERO, M. 2009. Iron absorption from meat pate fortified with ferric pyrophosphate in iron-deficient women. *Nutrition.* 25:20-24.

ODLE, J.; LIN, X.; JACOBI, S.; KIM, S.; STAHL, C. 2013. The suckling piglet as an agrimedical model for the study of pediatric nutrition and metabolism. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2:419-44.

OTÁLORA, M; CARRIAZO, J.; ITURRIAGA, L.; NAZARENO, M.; OSORIO, C. 2015. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chem.* 187:174-181.

PAI, D.; VANGALA, V.; NG, J.; NG, W.; TAN, R. 2015. Resistant maltodextrin as a shell material for encapsulation of naringin: production and physicochemical characterization. *J. Food Eng.* 161:68-74.

PALLARÉS, I.; LISBONA, F.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; BARRIONUEVO, M.; ALFÉREZ, M.; CAMPOS, M. 1993. Effects of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Brit. J. Nutr.* 70:609-620.

PIZARRO, F.; OLIVARES, M.; VALENZUELA, C.; BRITO, A.; WEINBORN, V.; FLORES, S.; ARREDONDO, M. 2016. The effect of proteins from animal source foods on heme iron bioavailability in human. *Food Chem.* 196:733-8.

PRZYBYSZEWSKA, J.; ŻEKANOWSKA, E. 2014. The role of hepcidin, ferroportin, HCP1, and DMT1 protein in iron absorption in the human digestive tract. *Prz. Gastroenterol.* 9(4):208-213.

ROSENBERG M.; KOPELMAN I.; TALMON, Y. 1985. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *J. Food Sci.* 50:139-144

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.

SALOKO, S.; DARMADJI, P.; STIAJI, B.; PRANOTO, Y.; ANAL, A. 2013. Encapsulation of coconut shell liquid smoke in chitosan-maltodextrin based nanoparticles. *Int. Food Res. J.* 20(3):1269-1276.

SANSONE, F.; MENCHERINI, T.; PICERNO, P.; D'AMORE, M.; AQUINO, R.; LAURO, M. 2011. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *J. Food Eng.* 105:468-476.

SRIGIRIDHAR, K.; MADHAVAN, K. 1998. Iron-deficient intestine is more susceptible to peroxidative damage during iron supplementation in rats. *Free Radic Biol Med.* 25(6):660-665.

SUBCOMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL NUTRITION. 1995. Nutrient Requirements of laboratory rat. Academy Press: Estados Unidos. pp. 11-79.

TAKEUCHI, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. 2001. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 47(1):39-54.

TILLÁN, J.; RODRÍGUEZ, J.; GÓMEZ, J.; PARDO, Z.; AGÜERO, S. 2004. Actividad antianémica de la *Cassia grandis* L. *Rev. Cubana Farm.* 38(3):1-7.

276.

TONON, R.; BRABET, C.; HUBINGER, M. 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Res. Int.* 43(3):907-914.

VALENZUELA, C.; HERNÁNDEZ, V.; RODRÍGUEZ, F.; CARRILLO, R. 2013a. Tecnología de encapsulación y su aplicación en ciencia veterinarias. *Av. Cs. Vet.* 23(2):58-75.

VALENZUELA, C.; OLIVARES, M.; BRITO, A.; HAMILTON-WEST, C.; PIZARRO, P. 2013b. Is a 40% Absorption of iron from a ferrous ascorbate reference dose appropriate to assess iron absorption independent of iron status. *Biol. Trace Elem. Res.* 155(3):322-326.

VALENZUELA, C.; HERNÁNDEZ, V. MORALES, S.; NEIRA-CARRILLO, A.; PIZARRO, F. 2014. Preparation and characterization of heme iron-alginate beads. *Lwt-Food Sci. Technol.* 59(2):1283-1289.

VICENTE, J.; PINTO, J.; MENEZES, J.; GASPAR, F. 2013. Fundamental analysis of particle formation in spray drying. *Powder Technol.* 247:1-7.

VITERI, F.; XUNIAN, L.; TOLOMEI, K.; MARTÍN, A. 1995. True absorption and retention of supplemental iron is more efficient when iron is administered every three days rather than daily to iron-normal and iron-deficient rats. *J. Nutr.* 125:82-91.

WALTON, D.; MUMFORD, C. 1999. Spray dried products- characterization of particle morphology. *Chem. Eng. Res. Des.* 77(1):21-38.

WATANABE, K.; YAMASHITA, Y.; OHGAWARA, H.; SEKIGUCHI, M.; SATAKE, N.; ORINO, K.; YAMAMOTO, S. 2001. Iron content of rat serum ferritin. *J Vet. Med. Sci.* 63(5):587-589.

WEGMÜLLER, R.; ZIMMERMANN, M.; MORETTI, D.; ARNOLD, M.; LANGHANS, W.; HURRELL, R. 2004. Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric pyrophosphate in rats. *J. Nutr.* 134(12):3301-3304.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2008. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. [en línea] <http://www.who.int/vmnis/database/anaemia/anaemia_data_status_t2/es/> [consulta: 23-02-2015].

XU, Z.; LIU, S.; WANG, H.; GAO, G.; YU, P.; CHANG, Y. 2014. Encapsulation of iron in liposomes significantly improved the efficiency of iron supplementation in strenuously exercised rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 162(1-3):181-188.

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(1):82-89.

ZHANG, Z.; PING, Q.; XIAO, B. 2000. Microencapsulation and characterization of tramadol–resin complexes. *J. Control Release.* 66:107-113.

ZIMMERMANN, M. 2004. The potential of encapsulated iron compounds in food fortification: A Review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74(6):453-461.

ZIMMERMAN, M.; HURRELL, R. 2007. Nutritional iron deficiency. *Lancet.* 370:511-520.

ZUBILLAGA, M.; CARO, R.; BOCCIO, J.; GOTELLI, C.; GOTELLI, M.; WEILL, R. 1996. New procedure to fortify fluid milk with iron: metabolic and biochemical study in rats. *Nutr. Res.* 16(1):131-137.

