

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 553**

21 Número de solicitud: 201131048

51 Int. Cl.:

B01J 13/02 (2006.01)

A61K 9/64 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.06.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.02.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)**

**Serrano nº 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ RUBIO, Amparo y
LAGARON CABELLO, José María**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE MICRO-, SUBMICRO- Y NANOCÁPSULAS BASADO EN PROTEÍNAS DEL SUERO DE LA LECHE.**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de micro-, submicro- y nanocápsulas basado en proteínas del suero de la leche.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de cápsulas basado en proteínas del suero de la leche que comprende las siguientes etapas:

- a. diluir el producto de las proteínas de la leche;
- b. adición a la disolución de la etapa a) de:
 - i. ingredientes a encapsular solubles en agua o en disolventes polares; o
 - ii. una disolución del ingrediente a encapsular; y
- c. electroestirado o electroesprayado o estirado por soplado o esprayado por soplado de la disolución resultante de la etapa b).

Estas cápsulas generadas pueden usarse como vehículos de encapsulación de ingredientes y aditivos funcionales para su incorporación en preparados farmacéuticos o alimentarios.

ES 2 395 553 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de micro-, submicro- y nanocápsulas basado en proteínas del suero de la leche

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de micro-submicro- y nanocápsulas basado en proteínas del suero de la leche. Estas micro-, submicro- y nanocápsulas generadas pueden utilizarse como vehículos de encapsulación de ingredientes de valor añadido y aditivos funcionales para su utilización en aplicaciones multisectoriales incluyendo preparados alimentarios o farmacéuticos.

10

ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR

15 Existe un considerable interés en el desarrollo de partículas biopoliméricas a partir de proteínas y polisacáridos, ya que éstas pueden utilizarse en la protección y liberación controlada de compuestos bioactivos en sistemas alimentarios y farmacéuticos [Jones, O., Decker, E.A., McClements, D.J. (2010). *Food Hydrocolloids* 24, 239-248]. Una gran variedad de procesos se han desarrollado para preparar micropartículas proteicas, siendo las técnicas más comunes el secado por atomización [Bruschi, M. L., Cardoso, 20 M. L. C., Lucchesi, M. B., & Gremiao, M. P. D. (2003). *Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: Preparation and characterization. International Journal of Pharmaceutics*, 264, 45–55], emulsificación y entrecruzamiento [Ishizaka, T., & Koishi, M. (1981). *Preparation of egg albumin microcapsules and microspheres. Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70, 358–361] o la coacervación [Mauguet, M.C., Legrand, J., Brujes, L., Carnelle, G., Larre, C., & Popineau, Y.J. (2002). *Gliadin matrices for microencapsulation processes by simple coacervation method. Journal of Microencapsulation*, 19, 377–384]. Sin embargo, estas técnicas requieren un calentamiento de las soluciones o el 25 uso de agentes orgánicos al menos en una de las fases de producción, lo cual conlleva la destrucción de ingredientes sensibles encapsulados, así 30

como a problemas de toxicidad asociados con contenidos residuales de los agentes orgánicos [Birnbaum, D., Kosmala, J., Henthorn, D., & Brannon-Peppas, L. (2000). *Controlled release of beta-estradiol from PLAGA microparticles: The effect of organic phase solvent on encapsulation and release. Journal of Controlled Release, 65, 375–387*]. Por tanto, nuevas tecnologías que no involucren condiciones severas (tanto de temperatura como de disolventes utilizados) y que den lugar a tamaños de partículas más reducidos son altamente deseables. En este sentido, las técnicas de electrospinning y electrospraying (electroestirado y electroesprayado por alto voltaje) y de blow spinning y blow spraying (estirado y esprayado por soplado) son métodos simples y altamente versátiles para la obtención de encapsulados con morfología controlada tales como fibras y/o cápsulas en el rango micrométrico y submicrométrico mediante la acción de un campo eléctrico externo que se aplica entre dos electrodos o de un flujo a presión de un fluido y al que se somete la solución polimérica. La técnica del estirado o esprayado por soplado (blow spinning/spraying), que no requiere siquiera del uso de campos eléctricos se basa por tanto en la aplicación de un gas presurizado a alta velocidad para generar las micro- y nanoestructuras. Estos procesos no requieren del uso de temperatura. Además, los biopolímeros (tales como las proteínas) pueden conformarse a partir de disoluciones acuosas, simplemente mediante el correcto ajuste de los parámetros del proceso y/o mediante la variación de las propiedades de la disolución a través de la adición de aditivos adecuados. La técnica de electrospinning ha sido ampliamente utilizada para generar nanofibras con aplicaciones en diversos campos como la medicina regenerativa, catálisis o filtración [Subbiah, T., Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran, S., and Ramkumar, S.S. (2005). *Electrospinning of nanofibers. Journal of Applied Polymer Science 96, 557-569*], pero también tiene un tremendo potencial en el área de tecnología de alimentos para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales tal y como se ha demostrado recientemente [Torres-Giner, S., Martinez-Abad, A., Ocio, M.J., and Lagaron, J.M. (2010).

Stabilization of a nutraceutical omega-3 fatty acid by encapsulation in ultrathin electrospayed zein prolamine. Journal of Food Science 75, N69-N79; Lopez-Rubio, A., Sanchez, E., Sanz, Y., and Lagaron, J.M. (2009). Encapsulation of living bifidobacteria in ultrathin PVOH electrospun fibers. Biomacromolecules 10, 2823-2829].

5 Las técnicas de blow spinning y blow spraying (estirado por soplado y esprayado por soplado, respectivamente), sin embargo, se han desarrollado recientemente y su aplicación en biopolímeros ha sido bastante limitada hasta el momento [Medeiros, E.S., Glenn, G.M., Klamczynski, A.P., Orts, W.J., Maltoso, L.H.C. (2009). Solution blow spinning: a new method to produce micro- and nanofibers from polymer Solutions. Journal of Applied Polymer Science 113, 2322-2330; Sinha-Ray, S., Zhang, Y., Yarin, A.L., Davis, S.C., Pourdeyhimi, B. (2011). Solution blowing of soy protein fibers. Biomacromolecules 12, 2357-2363].

15

La morfología de las estructuras obtenidas mediante estas técnicas de spinning puede modificarse ajustando los parámetros del proceso y, para un determinado material, pueden obtenerse cápsulas muy pequeñas (proceso que se conoce como “spraying” debido a la naturaleza discontinua

20 de las estructuras obtenidas).

En la actualidad, no existe ninguna referencia bibliográfica que describa el desarrollo de micro- o nanocápsulas de proteínas de la leche utilizando las técnicas mencionadas (electrospinning/electrospraying/blow spinning/blow

25 spraying). El uso de proteínas de la leche para encapsular apenas se ha explorado, sobre todo los basados en el concentrado, pero tiene un gran potencial debido a las excelentes propiedades funcionales de estas proteínas y su bajo coste (ya que constituyen un subproducto durante la fabricación de productos lácteos fermentados). En la literatura científica

30 encontramos algunos ejemplos de microencapsulados a base de estos concentrados de proteínas de la leche utilizando técnicas como el secado

por atomización [Rosenberg, M., Young, S.L., Brooker, B.E., and Colombo, V.E. (1993). *Food Structure* 12, 31-41; Bylaite, E., Venskutonis, P.R., Mapdperiene, R. (2001). *European Food Research and Technology* 212, 661-670; Jimenez, M., Garcia, H.S., Beristain, C.I. (2010). *Journal of Food Process Engineering* 33, 434-447; Huynh, T.V., Caffin, N., Dykes, G.A., Bhandari, B. (2008). *Drying Technology* 26, 357-368; Jafari, S.M., Assadpoor, E., Bhandari, B., He, Y. (2008). *Food Research International* 41, 172-183; Hogan, S.A., McNamee, B.F., O’Riordan, E.D., O’Sullivan, M. (2001). *Journal of Food Science* 66, 675-680.] y el uso de hidrogeles [Gunasekaran, S., Ko, S., and Xiao, L. (2007). *Journal of Food Engineering* 83, 31-40]. Existe también una patente que describe la generación de micropartículas a partir del concentrado de proteínas de la leche pero que involucra el uso de temperatura y altas presiones [WO/2008/06]. En otra patente se describe la formación de microencapsulados de liposomas y un concentrado de proteínas del suero de la leche obtenido mediante un proceso de homogeneización, pasteurización y secado por atomización [WO/2009/050333 (A1)].

DESCRIPCION DE LA INVENCION

En la presente invención se propone el uso de productos basados en proteínas del suero de la leche y sus mezclas con otros biopolímeros para el desarrollo de micro- (por encima de la micra), submicro- (por debajo de la micra hasta los 100 nanómetros) y nanocápsulas (entre 1 y 100 nanómetros) que sirvan de protección a sustancias de valor añadido.

Adicionalmente, y con el fin de poder resolver los problemas técnicos que se generan al fabricar las micro, submicro y nanocápsulas, en adelante cápsulas, por los métodos convencionales de fabricación de las mismas, la presente invención describe un procedimiento de obtención de dichas cápsulas sin el inconveniente técnico de hacer uso de elevadas

temperaturas y presiones, disolventes orgánicos u otras condiciones relativamente agresivas que pueden condicionar la estabilidad y mediante las cuales se puedan encapsular ingredientes sensibles a condiciones medioambientales para las que la encapsulación es un procedimiento de protección de valor.

Por lo tanto un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de cápsulas basado en proteínas del suero de la leche que comprende las siguientes etapas:

- a) diluir el producto basado en proteínas de la leche;
- b) adición a la disolución de la etapa a) de:
 - i) ingredientes funcionales a encapsular solubles o suspensionables en agua; o
 - ii) una disolución del ingrediente a encapsular; y
- c) electroestirado o electroesprayado o estirado por soplado o esprayado por soplado de la disolución resultante de la etapa b).

En una realización preferida, no limitativa, el preparado de proteínas se basa en un concentrado de proteínas de la leche procedente de mamíferos o de soja. Preferiblemente, de vaca, de oveja, de cabra o soja, aún más preferiblemente de vaca.

En una realización preferida, el disolvente de la etapa a) se selecciona entre agua o leche o disolventes de alta polaridad tales como alcoholes o mezclas de los mismos.

En una realización preferida, el porcentaje en peso de las proteínas en la disolución es de entre un 0,1 hasta un 99%, preferiblemente de entre el 10 y el 70%.

Según otra realización preferida, los ingredientes se seleccionan del grupo formado por antioxidantes (vitamina C, vitamina E, carotenoides, compuestos fenólicos como los flavonoides y el resveratrol) y concentrados o aislados de antioxidantes naturales o sintéticos, organismos biológicos
5 tales como células de valor en biomédicina y probióticos (bacterias lácticas, bifidobacterias), prebióticos(lactulosa, galacto-oligosacáridos, fructo-oligosacáridos, malto-oligosacáridos, xylo-oligosacáridos y oligosacáridos de la soja), simbióticos, fibras, ácido oleico, ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y omega-6) y otros aceites marinos, fitoesteroles, fitoestrógenos,
10 ingredientes de naturaleza proteica (ADN y sus derivados, lactoferrina, ovotransferrina, lactoperoxidasa, lisozima, proteína de soja, inmunoglobulinas, péptidos bioactivos) y productos farmacéuticos tales como nutraceúticos y otros preparados y sustancias de valor añadido para la industria farmacéutica, biomédica, alimentaria y química que puedan ser
15 desestabilizados por condiciones ambientales, de procesado o de almacenamiento en su presentación comercial o cualquier combinación de los mismos.

De manera más preferida, los ingredientes se seleccionan del grupo
20 formado por:

- carotenoides y polifenoles
- Bifidobacterias y bacterias lácticas
- células de interes biomédico para regeneración ósea y de tejidos.
- ácidos grasos poliinsaturados
- 25 - enzimas y otras proteínas de valor tecnológico seleccionadas entre lactoferrina, ovotransferrina, lactoperoxidasa, lisozima, proteína de soja e inmunoglobulinas.
- péptidos bioactivos seleccionados entre antihipertensivos y antimicrobianos.

30

De manera aun más preferida:

- Bifidobacterias y bacterias lácticas

- células de interés biomédico para regeneración ósea y de tejidos.

- ácidos grasos poliinsaturados

5 - enzimas y otras proteínas de valor tecnológico seleccionadas entre lactoferrina, ovotransferrina, lactoperoxidasa, lisozima, proteína de soja e inmunoglobulinas.

- péptidos bioactivos seleccionados entre antihipertensivos y antimicrobianos.

10

En otra realización preferida, se adicionan en la etapa a) otros biopolímeros seleccionados de la siguiente lista: carbohidratos, otras proteínas y lípidos para generar mezclas que mejoren la protección y estabilidad de los ingredientes funcionales encapsulados.

15

En otra realización preferida, se adicionan en la etapa a) aditivos seleccionados de la siguiente lista: plastificantes, entrecruzantes, surfactantes, ácidos, bases, emulsionantes, antioxidantes, ayudantes del procesado en general o cualquier mezcla de los mismos u otros que
20 faciliten la formación de las cápsulas o la incorporación de los ingredientes a encapsular.

25

En otra realización preferida tras la etapa b) se lleva a cabo una etapa de homogenización por agitación y/o ultrasonidos. La agitación puede ser vigorosa para favorecer la dispersión del ingrediente a encapsular y/o de los aditivos en la matriz biopolimérica (concentrado de proteínas del suero de la leche).

30

Según otra realización preferida, la etapa c) se realiza a una distancia entre el capilar y el soporte de entre 0,1 y 200 cm, y más preferiblemente entre 2 y 50 cm.

Según otra realización preferida, en la etapa c) la velocidad de deposición es de entre 0,001 y 100 ml/h, más preferiblemente entre 0,01 y 10 ml/h.

- 5 Según otra realización preferida, en la etapa c) el electroestirado o electroesprayado se realiza aplicando un voltaje entre 0,1 y 1000 kV, y más preferiblemente entre 5 y 30 kV.

- 10 Según otra realización preferida, en la etapa c) el estirado por soplado o esprayado por soplado se realiza utilizando un flujo de gas presurizado de entre 50 y 1000 m/s, y más preferiblemente entre 200 y 300 m/s.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a las cápsulas obtenidas mediante el procedimiento anteriormente descrito.

15

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un alimento funcional que comprende las cápsulas con los ingredientes funcionales obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito.

- 20 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o biomédica que comprende las cápsulas con los ingredientes obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito.

- 25 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a una composición química (e.j. fertilizantes, fitosanitarios, antimicrobianos, antiolor, aromas, agentes activos y para productos en suspensión o dispersos en disolventes no polares) que comprende las cápsulas con los ingredientes obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito.

- 30 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a una composición nutracéutica que comprende las cápsulas con los ingredientes obtenidas

por el procedimiento anteriormente descrito.

Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a un envase funcional que comprende a las cápsulas con los ingredientes obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito.

Un octavo aspecto de la presente invención se refiere al uso de las cápsulas obtenidas mediante el procedimiento anteriormente descrito, para su incorporación en composiciones farmacéuticas, biomédicas, químicas, nutraceúticas o en alimentos o envases funcionales.

En la presente invención las técnicas de electroestirado/electroesprayado se refieren a una tecnología basada en la aplicación de campos eléctricos elevados para producir fluidos eléctricamente cargados a partir de disoluciones poliméricas viscoelásticas, las cuales al secarse producen microfibras y nanofibras y nanocápsulas, respectivamente.

El blow spinning y el blow spraying, por otro lado utilizan un fluido (normalmente un gas a alta velocidad y presión) para la generación de fibras y cápsulas de tamaño submicrométrico.

Estas técnicas no requieren el uso de altas temperaturas ni disolventes orgánicos y pueden generarse estructuras de encapsulación partiendo de disoluciones acuosas de las proteínas (en este caso en concreto de un concentrado de proteínas del suero de la leche) y sus mezclas.

En la presente invención se entiende como “envase funcional” a aquel material de envase que contiene ingredientes bioactivos (en este caso concreto contendría las cápsulas o fibras desarrolladas incorporadas en su estructura o como recubrimiento interno del envase) conservados en condiciones óptimas hasta su liberación a los alimentos envasados, contribuyendo por tanto a la producción de alimentos funcionales.

En la presente invención se entiende por ingrediente bioactivo a un compuesto o ingrediente que posee un efecto beneficioso sobre la salud o de gran valor añadido en algún campo de aplicación. Del mismo modo,
5 puede aplicarse a extractos o compuestos químicos denominados funcionales, incluso a los obtenidos de alimentos comunes. Ejemplos de ingredientes a los que se les atribuyen propiedades funcionales son el aceite de oliva, el vino tinto, el brócoli, la soja, bifidobacterias, β -carotenos, etc.

10

En la presente invención se entiende como “alimento funcional” a aquellos alimentos que son elaborados no sólo por sus características nutricionales sino también para cumplir una *función específica* como puede ser el mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades. Para ello se
15 les agregan componentes biológicamente activos, como minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra alimenticia o antioxidantes, etc.

En la presente invención se entiende como nutraceutico a un concentrado de ingredientes funcionales o bioactivos que sirven para cumplir una
20 *función específica* como puede ser mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades.

La composición farmacéutica o biomédica, es un conjunto de componentes que está formada al menos por las micro- o nanocápsulas de la invención,
25 que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una mejora del estado general de su salud, por ejemplo una aplicación cosmética, aunque puede no implicar un efecto fisiológico en el organismo sino una mejora en el bienestar del sujeto relacionada con su psicología. Por tanto, dicha
30 composición farmacéutica puede ser un producto de higiene personal, un producto cosmético o un producto que puede constituir la base para la

elaboración de los productos anteriores o la base para la elaboración de un medicamento o un implante o dispositivo biomédico.

5 El “producto de higiene personal” se define como las sustancias o preparados que, sin tener la consideración legal de medicamentos, productos sanitarios, cosméticos o biocidas, están destinados a ser aplicados sobre la piel, dientes o mucosas del cuerpo humano con finalidad de higiene o de estética, o para neutralizar o eliminar ectoparásitos.

10 El “producto cosmético” se define como toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, y/o
15 corregir los olores corporales, y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado.

El término “medicamento” tiene un significado más limitado que el significado de “composición farmacéutica”, tal como se define en la
20 presente invención, ya que el medicamento implica necesariamente un efecto terapéutico es decir, un efecto fisiológico en el metabolismo del sujeto.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y
25 sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende
30 que sean limitativos de la presente invención.

FIGURAS

Figura 1. Muestra una imagen de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de estructuras electroesprayadas a partir de un concentrado de proteínas del suero de la leche en disolución acuosa.

Figura 2. Muestra una imagen de microscopía óptica obtenida con luz polarizada (A) y utilizando una fuente de fluorescencia (B) de estructuras electroesprayadas de un concentrado de proteínas de suero de la leche que contienen el antioxidante β -caroteno disuelto en glicerol.

Figura 3. Muestra una gráfica semilogarítmica del número de unidades formadoras de colonia por mililitro de bifidobacterias encapsuladas y no encapsuladas (en leche) a diferentes intervalos de tiempo almacenadas a 20°C.

Figura 4. Muestra una imagen de microscopía óptica obtenida con luz polarizada de estructuras obtenidas por blow spraying (esprayado por soplado) de un concentrado de proteínas de suero de la leche.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del procedimiento de la invención para la obtención de nanocápsulas a partir de un concentrado de proteínas del suero de la leche y la capacidad de estas matrices para la protección de diversos ingredientes.

Ejemplo 1.

Obtención de nanocápsulas a partir de un concentrado de proteínas del suero de la leche

En este ejemplo se describe un proceso típico de obtención de las
5 nanocápsulas basadas en un concentrado de proteínas del suero de la
leche utilizando la técnica de electroesprayado.

En una primera etapa, se prepara la disolución del concentrado de
proteínas del suero de la leche en agua destilada. La concentración
utilizada del concentrado de proteínas es de un 40% en peso respecto al
10 volumen del disolvente y se agita a temperatura ambiente hasta obtener
una disolución homogénea.

Una vez obtenida la disolución, ésta se emplea para generar las micro- y
nanocápsulas mediante la técnica de electroesprayado con una
configuración en horizontal. La disolución se introduce en jeringas de 5 mL
15 conectadas a través de tubos de teflón a una aguja de acero inoxidable de
diámetro 0,9 mm. La aguja se conecta a un electrodo que a su vez está
conectado a una fuente de alimentación de 0-30 KV. Se aplica un voltaje
comprendido entre 12-14 KV y la disolución se bombea a través de dicha
aguja con un flujo de 0,3 mL/h. El contra-electrodo se conecta a una placa
20 (colector) de acero inoxidable donde se recogen las estructuras obtenidas,
siendo la distancia entre la aguja y el colector de unos 7 cm. El proceso se
lleva a cabo a temperatura ambiente. De este modo se obtienen las micro-
y nanocápsulas que se muestran en la Figura 1.

Los tamaños de las cápsulas obtenidas de este modo oscilan entre los 50
25 nm y las 3 micras, aunque preferiblemente se obtienen nanocápsulas (es
decir, cápsulas con tamaños inferiores a los 100 nm).

Ejemplo 2.**Protección del antioxidante β -caroteno mediante encapsulación utilizando matrices a base de concentrado de proteínas del suero de la leche**

5 En este ejemplo, se demuestra la capacidad de encapsulación de las estructuras generadas mediante electroesprayado y su capacidad de protección de ingredientes sensibles tales como el antioxidante β -caroteno.

En primer lugar se preparó una disolución del antioxidante β -caroteno en glicerol, que se ha demostrado que tiene una elevada capacidad para
10 estabilizar este ingrediente bioactivo frente a la fotodegradación. Se disolvió 1 g de β -caroteno en 10 mL de glicerol y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Por otro lado se preparó una disolución de concentrado de proteínas del suero de la leche en agua destilada, utilizando una concentración de un 40% en peso respecto al
15 volumen del disolvente y se agitó a temperatura ambiente hasta obtener una disolución homogénea. A esta última disolución, se le agregó el β -caroteno disuelto en glicerol, siendo la proporción añadida de un 20% en peso con respecto al peso de la proteína utilizada, y se dejó en agitación durante un par de horas a temperatura ambiente para conseguir una
20 disolución homogénea.

Esta última disolución acuosa conteniendo el concentrado de proteínas de suero de la leche y el antioxidante β -caroteno disuelto en glicerol, se utilizó para generar las microcápsulas que se muestran en la Figura 2 mediante la técnica de electroesprayado con una configuración horizontal. La disolución
25 se introdujo en jeringas de 5 mL conectadas a través de tubos de teflón a una aguja de acero inoxidable de diámetro 0,9 mm. La aguja se conectó a un electrodo que a su vez estaba conectado a una fuente de alimentación de 0-30 KV. Se aplicó un voltaje comprendido entre 9-10 KV y la disolución se bombeó a través de dicha aguja con un flujo de 0,3 mL/h. El contra-
30 electrodo se conectó a una placa (colector) de acero inoxidable donde se

recogieron las estructuras obtenidas, siendo la distancia entre la aguja y el colector de unos 7 cm. El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. Parte de las cápsulas obtenidas se recogieron directamente sobre un porta de vidrio para microscopía. El tamaño medio de las cápsulas en este caso era superior (~4 micras) debido a la presencia de glicerol en la disolución.

Ejemplo 3.

Encapsulación y estabilización de bifidobacterias a 20°C mediante el uso de microcápsulas electroesprayadas a partir de un concentrado de proteínas del suero de la leche

En este ejemplo se demuestra la capacidad de esta tecnología de desarrollo de estructuras de concentrado de proteínas del suero de la leche para la encapsulación y protección de bifidobacterias de interés en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales.

El estudio de viabilidad se llevó a cabo con una cepa de bifidobacterias comercial y se utilizó como control una disolución concentrada de bacterias en leche desnatada, que se sabe que actúa de protector natural de las bifidobacterias.

En primer lugar se preparó la disolución del concentrado de proteínas del suero de la leche tal y como se ha descrito en los anteriores ejemplos, es decir, mezclando mediante agitación a temperatura ambiente una proporción del 40% en peso del concentrado de proteínas en el disolvente. La diferencia en este ejemplo es que en lugar de utilizar agua destilada como disolvente, se utilizó directamente la leche conteniendo una concentración conocida de células de bifidobacterias. Esta disolución se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta la obtención de una mezcla homogénea que se utilizó para la fabricación de microcápsulas mediante electroesprayado. La disolución se introdujo en jeringas de 5 mL conectadas a través de tubos de teflón a una aguja de acero inoxidable de

diámetro 0,9 mm. La aguja se conectó a un electrodo que a su vez estaba conectado a una fuente de alimentación de 0-30 KV. Se aplicó un voltaje comprendido entre 12-14 KV y la disolución se bombeó a través de dicha aguja con un flujo de 0,6 mL/h. El contra-electrodo se conectó a una placa (colector) de acero inoxidable donde se recogieron las estructuras obtenidas, siendo la distancia entre la aguja y el colector de unos 6 cm. El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. El material recogido en el colector se dividió en eppendorfs que se almacenaron a 20°C para el recuento de viabilidad en función del tiempo y se compararon con las células de bifidobacterias suspendidas en leche desnatada y almacenadas en las mismas condiciones.

La técnica de encapsulación por electroesprayado de las bifidobacterias utilizando como matriz encapsulante un concentrado de proteínas del suero de la leche demostró aumentar la viabilidad a temperatura ambiente de las células encapsuladas, en comparación con las células suspendidas en leche desnatada, tal y como se muestra en la Figura 3.

Ejemplo 4.

20 Obtención de estructuras de encapsulación submicrométricas a partir de un concentrado de proteínas del suero de la leche utilizando la técnica de blow spinning/spraying (estirado/esprayado por soplado)

En este ejemplo, se detalla el procedimiento de obtención de cápsulas submicrométricas mediante la técnica de estirado/esprayado por soplado.

25 En primer lugar se prepara una disolución del concentrado de proteínas de la leche en agua, utilizando una concentración de las mismas del 40% en peso respecto al volumen utilizado, agitando a temperatura ambiente hasta obtener una disolución homogénea.

Esta disolución acuosa conteniendo el concentrado de proteínas de suero de la leche se utiliza para generar las microcápsulas que se muestran en la Figura 2 mediante la técnica de electroesprayado por soplado con una configuración vertical. La disolución se introdujo en una jeringa de 5 mL
5 situada en una bomba de jeringas y conectada a través de tubos de teflón a una aguja interna de acero inoxidable de diámetro 0,9 mm. Esta aguja estaba montada en configuración coaxial, siendo la aguja exterior por la que fluye gas nitrógeno presurizado a alta velocidad (230-250 m/s). El flujo de nitrógeno bombeado coaxialmente por la aguja exterior acelera y estira
10 la disolución proteica que fluye por la aguja interior y ayuda a la formación de las estructuras de encapsulación. El flujo de la disolución con el concentrado de proteínas de la leche fue de 0,5 mL/h. La presión del gas nitrógeno en la botella era de 20-30 bar. Las estructuras generadas y solidificadas se recogieron en un colector situado a una distancia de unos
15 18-20 cm. La figura 4 muestra una imagen de microscopía óptica de las cápsulas generadas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de cápsulas a partir de un producto basado en proteínas del suero de la leche que comprende las siguientes etapas:
- 5
- a. diluir el producto de las proteínas de la leche;
 - b. adición a la disolución de la etapa a) de:
 - i. ingredientes a encapsular solubles en agua o en disolventes polares; o
 - 10 ii. una disolución del ingrediente a encapsular; y
 - c. electroestirado o electroesprayado o estirado por soplado o esprayado por soplado de la disolución resultante de la etapa b).
- 15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde el producto basado en proteínas de la leche es un concentrado de proteínas de la leche que procede de mamíferos o de soja.
- 20 3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el producto basado en proteínas de la leche es un concentrado de proteínas de la leche que procede de la leche de vaca, de oveja, de cabra o de soja.
- 25 4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el producto basado en proteínas de la leche procede de un concentrado de proteínas de la leche que procede de la leche de vaca.
- 30 5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el disolvente de la etapa a) se selecciona entre agua o leche o disolventes polares o mezclas de los anteriores.

6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el porcentaje en peso de la proteína en la disolución es de entre un 0,1 hasta un 99%.
- 5 7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el porcentaje en peso de las proteínas en la disolución es de entre el 10 y el 70%.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde
10 los ingredientes son ingredientes funcionales que se seleccionan del grupo formado por antioxidantes, probióticos, células para regeneración ósea y de tejidos prebióticos, simbióticos, fibras, ácido oleico, ácidos grasos poliinsaturados, aceites marinos, fitoesteroles, fitoestrógenos, ingredientes funcionales de naturaleza proteica, nutracéuticos, enzimas
15 o proteínas de valor tecnológico seleccionadas entre lactoferrina, ovotransferrina, lactoperoxidasa, lisozima, proteína de soja, inmunoglobulinas o cualquier combinación de los mismos.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde
20 los ingredientes funcionales se seleccionan del grupo formado por
- a. β -caroteno;
 - b. bifidobacterias y bacterias lácticas;
 - c. células de interés biomédico para regeneración ósea y de tejidos;
 - 25 d. ácidos grasos poliinsaturados;
 - e. enzimas y otras proteínas de valor tecnológico seleccionadas entre lactoferrina, ovotransferrina, lactoperoxidasa, lisozima, proteína de soja, inmunoglobulinas;
 - 30 f. péptidos bioactivos, seleccionados entre péptidos antihipertensivos y antimicrobianos.

10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde los ingredientes funcionales se seleccionan del grupo formado por:
- a. bifidobacterias y bacterias lácticas;
 - b. células de interés biomédico para regeneración ósea y de tejidos;
 - c. ácidos grasos poliinsaturados;
 - d. enzimas y otras proteínas de valor tecnológico seleccionadas entre lactoferrina, ovotransferrina, lactoperoxidasa, lisozima, proteína de soja, inmunoglobulinas;
 - e. péptidos bioactivos, seleccionados entre péptidos antihipertensivos y antimicrobianos.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde se adicionan en la etapa a) otros biopolímeros seleccionados de la siguiente lista: carbohidratos, proteínas y lípidos.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde se adicionan en la etapa a) aditivos seleccionados de la siguiente lista: plastificantes, ácidos, entrecruzantes, bases, emulsionantes, antioxidantes, ayudantes del procesado o cualquier mezcla de los mismos u otros que faciliten la formación de las cápsulas o la incorporación de los ingredientes a encapsular.
13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde tras la etapa b) se lleva a cabo una etapa de homogenización por agitación y/o ultrasonidos.
14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la etapa c) de electroestirado o electroesprayado o estirado por soplado o esprayado por soplado, se realiza a una distancia entre el capilar y el

soporte de entre 0,1 y 200 cm. y más preferiblemente entre 2 y 50 cm.

- 5 15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde en la etapa c) de electroestirado o electroesprayado o estirado por soplado o esprayado por soplado, la velocidad de deposición es de entre 0,001 y 100 ml/h, más preferiblemente entre 0,01 y 10 ml/h.
- 10 16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde en la etapa c) el electroestirado o electroesprayado se realiza aplicando un voltaje entre 0,1 y 1000 kV.
- 15 17. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde en la etapa c) el electroestirado o electroesprayado se realiza aplicando un voltaje entre 5 y 30 kV.
18. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 donde en la etapa c) el estirado por soplado o esprayado por soplado se realiza aplicando un flujo de gas presurizado de entre 50 y 1000 m/s.
- 20 19. El procedimiento según la reivindicación 18, donde en la etapa c) el estirado por soplado/esprayado por soplado se realiza aplicando un flujo de gas presurizado de entre 200 y 300 m/s.
- 25 20. Cápsulas obtenibles mediante el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 19.
21. Uso de las cápsulas de la reivindicación 20, para elaborar alimentos funcionales.
- 30 22. Uso de las cápsulas de la reivindicación 20, para elaborar composiciones farmacéuticas o biomédicas.

23. Uso de las cápsulas de la reivindicación 20, para elaborar composiciones químicas.
- 5 24. Uso de las cápsulas de la reivindicación 20, para elaborar composiciones nutraceuticas.
25. Uso de las cápsulas de la reivindicación 20, para elaborar envases funcionales.

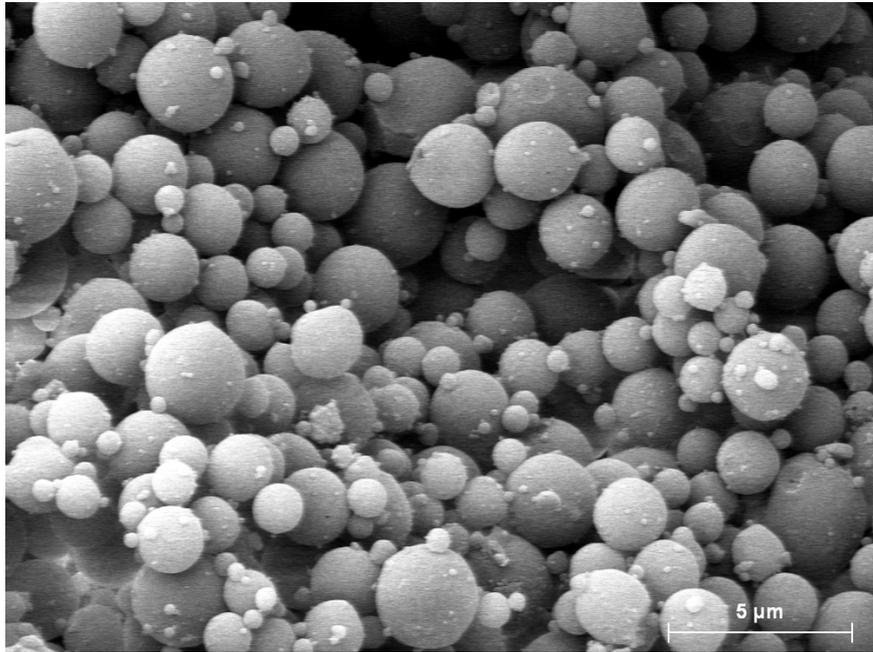


FIG 1

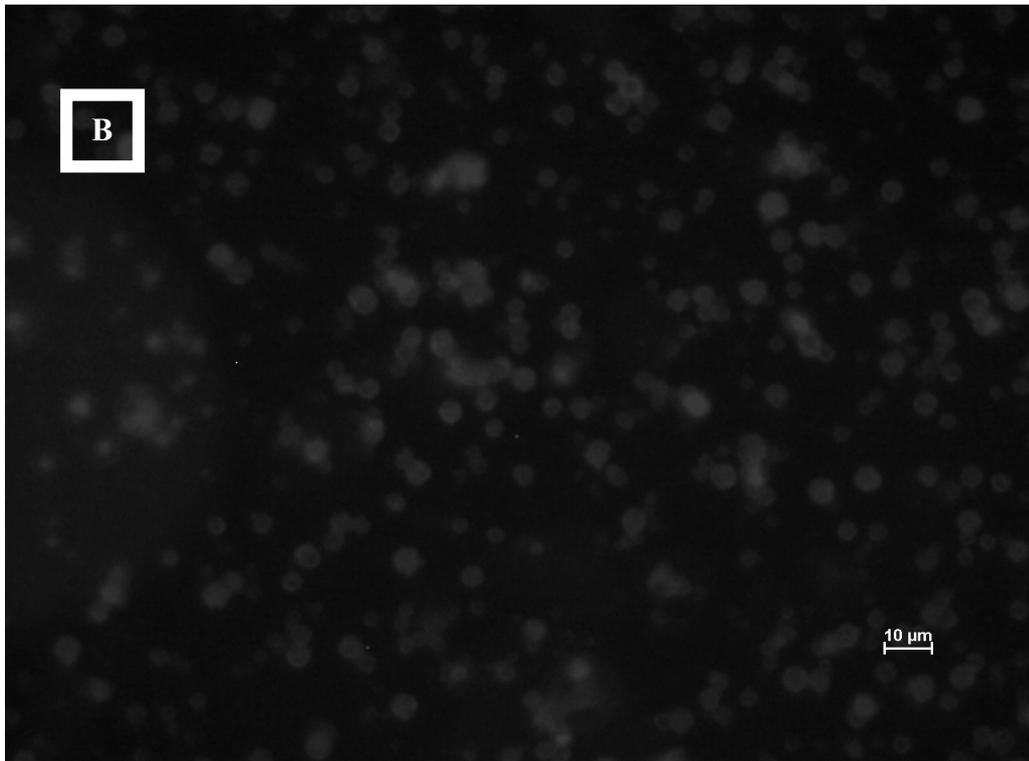
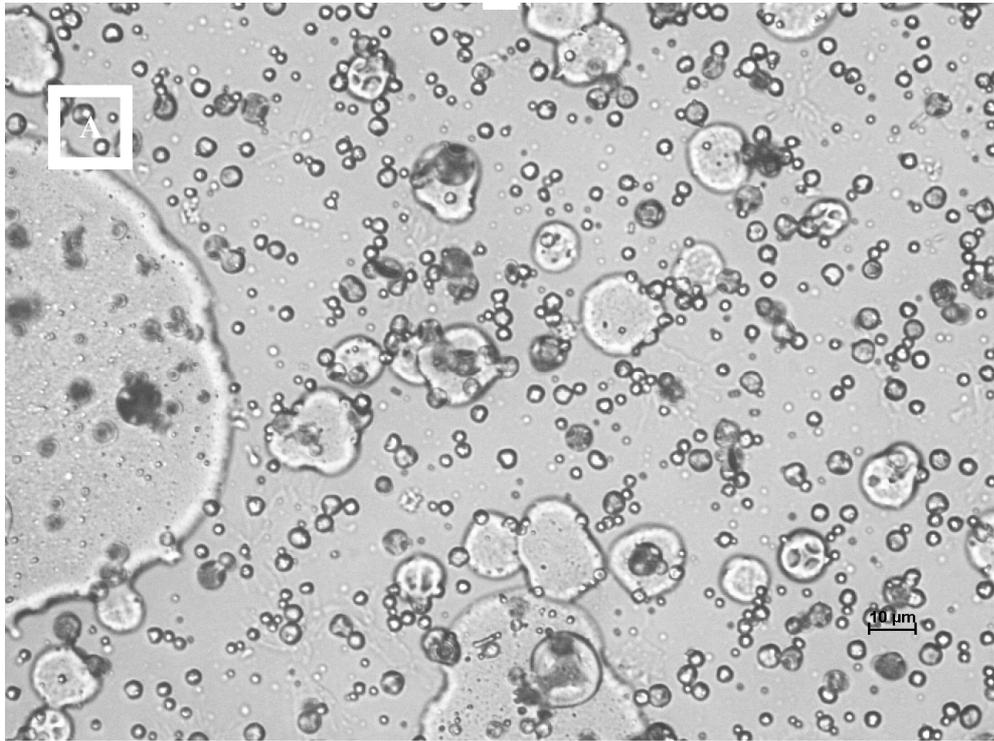


FIG 2

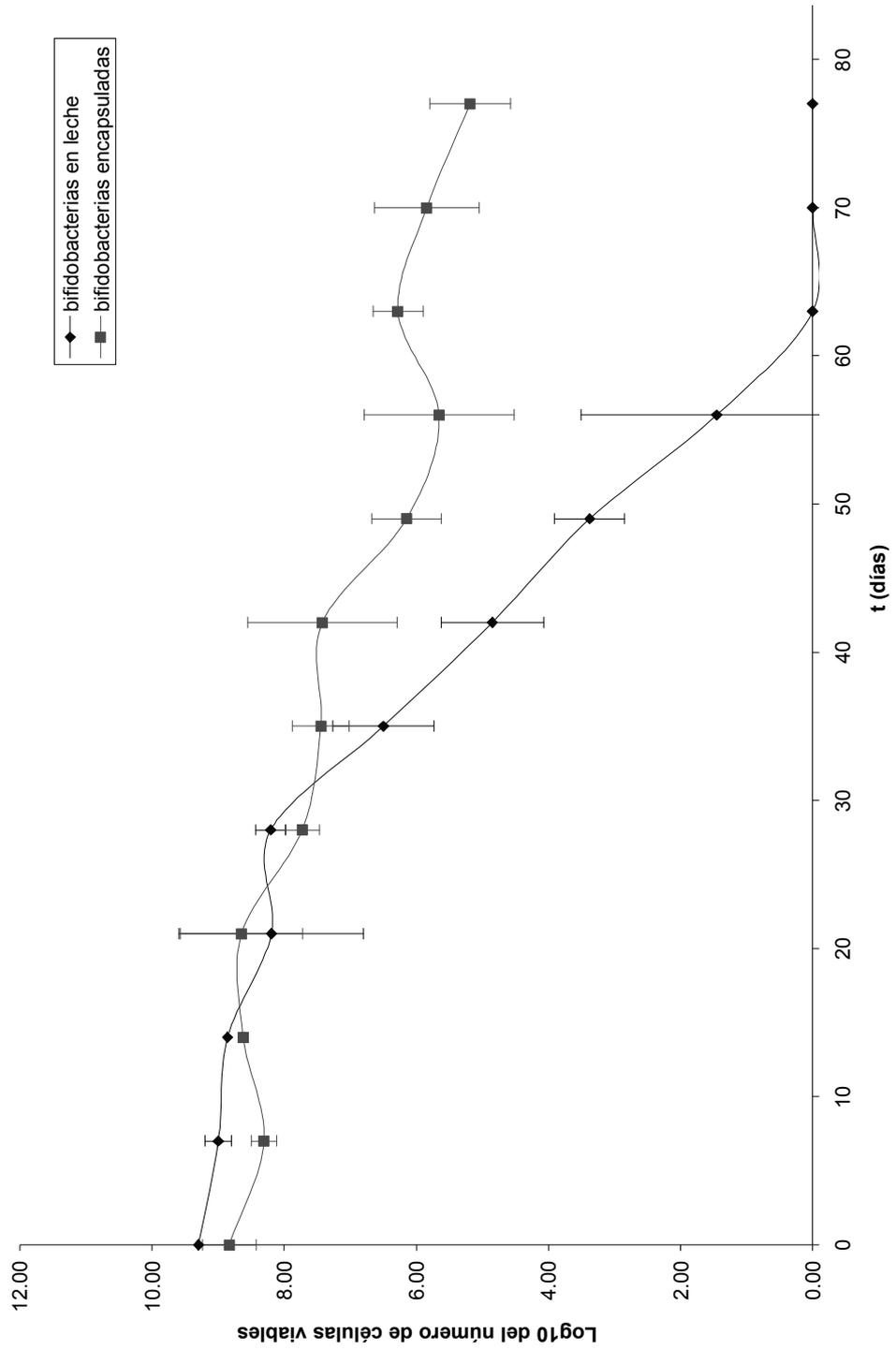


FIG 3

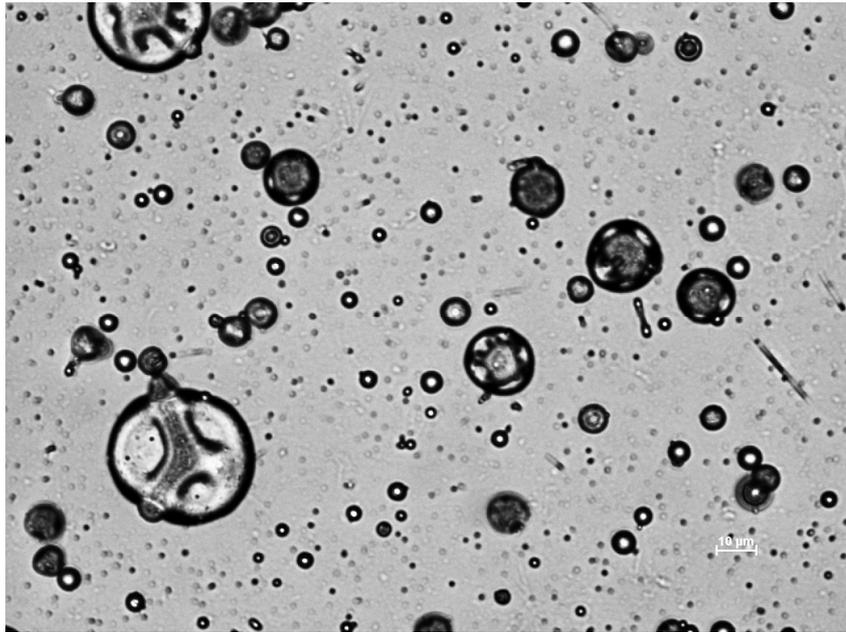


FIG 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131048

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.06.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **B01J13/02** (2006.01)
A61K9/64 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 5601760 A (ROSENBERG M.) 11.02.1997, columna 3, línea 44 – columna 4, línea 8; columna 7, línea 20 – columna 10, línea 56; figura 1; reivindicaciones 1-7.	1-25
Y	WO 2008146169 A2 (PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A. [CH/CH]) 04.12.2008, página 1, línea 24 – página 2, línea 22; página 8, líneas 3-22; figuras 1-2; reivindicaciones 1,10.	1-17,20-25
Y	YEO Y. et al. Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs. Biotechnology Bioprocess Engineering 2001. Vol. 6, páginas 213-230, página 222, columna 1; Figura 10.	18,19
A	FUKUI Y. et al. Preparation of monodispersed polyelectrolyte microcapsules with high encapsulation efficiency by and electrospay technique. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2010. Vol. 370, páginas: 28-34, todo el documento.	1-25
A	EP 0093668 A1 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 09.11.1983, página 1, líneas 1-10; página 1, línea 34 – página 3, línea 8; reivindicación 5.	1-25
A	WO 2004110412 A1 (LIPOFOODS, S.L. [ES/ES]) 23.12.2004, página 2, línea 1 – página 4, línea 8; reivindicaciones 1,15.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.10.2012

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

B01J, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE ACADEMICO.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-25	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 5601760 A	11.02.1997
D02	WO 2008146169 A2	04.12.2008
D03	YEO Y et al. Biotechnology Bioprocess Engineering. 2001. Vol. 6, páginas: 213-230.	2001
D04	FUKUI Y et al. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2010. Vol. 370, páginas: 28-34.	2010
D05	EP 0093668 A1	09.11.1983
D06	WO 2004110412 A1	23.12.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un procedimiento de obtención de micro o nano cápsulas a partir de un producto basado en proteínas del suero de la leche, mediante electroestirado o electroesprayado, o estirado por soplado, o esprayado por soplado, de una disolución de proteínas de la leche a la que se ha añadido el producto a encapsular (reivindicación 1). Las proteínas pueden proceder de leche de mamíferos o de soja y el disolvente puede agua, leche u otro disolvente polar (reivindicaciones 2-7). Se refiere también al uso de estas cápsulas como vehículos de encapsulación de ingredientes y aditivos funcionales para preparación de composiciones farmacéuticas y/o alimentarias (reivindicaciones 8-25).

El documento D01 divulga un procedimiento de obtención de microcápsulas a partir de proteínas del suero de la leche mediante secado por atomización. Preferentemente, se refiere a la encapsulación de la materia grasa de la leche y de aceites esenciales, empleando como agentes encapsulantes proteínas del suero de la leche que pueden ser mezcladas con carbohidratos (ver columna 3, línea 44 - columna 4, línea 8; columna 7, línea 20 - columna 10, línea 56; figura 1; reivindicaciones 1-7).

El documento D02 divulga un procedimiento de obtención de microcápsulas, mediante electroestirado o electroesprayado, formadas por un material polimérico que encapsulan agentes aromatizantes y no aromatizantes. Se refiere también al uso de estas microcápsulas en filtros de tabaco (ver página 1, línea 24 - página 2, línea 22; página 8, líneas 3-22; figuras 1-2; reivindicaciones 1, 10).

El documento D03 divulga una revisión de métodos de microencapsulación basados en el uso de esta técnica para administrar productos farmacéuticos constituidos por proteínas contenidas en microcápsulas formadas por polímeros biodegradables. Uno de estos métodos se refiere a la formación de microcápsulas mediante la aplicación de un gas presurizado a alta velocidad (ver página 222, columna 1; Figura 10).

El documento D04 divulga un procedimiento de obtención de microcápsulas mediante electroesprayado, formadas por alginato sódico y quitosano que encapsulan levaduras como agentes bioactivos (ver todo el documento).

El documento D05 divulga microcápsulas, que contienen una sustancia farmacéuticamente activa, obtenidas por una reacción de reticulación interfacial entre una proteína de la leche y un agente reticulante, preferentemente un reactivo bifuncional acilante o un dialdehído. Estas microcápsulas también pueden contener sustancias alimenticias, preferentemente aceites esenciales (ver página 1, líneas 1-10; página 1, línea 34 - página 3, línea 8; reivindicación 5).

El documento D06 divulga unas microcápsulas para administración de ingredientes activos, formadas por un núcleo que comprende uno o más ingredientes activos y por un recubrimiento de sustancias no grasas como polisacáridos o proteínas animales, vegetales o lácteas. Se refiere también al procedimiento de obtención de estas cápsulas, mediante secado por atomización, y a su uso en dietética y alimentación humana, farmacia y veterinaria (ver página 2, línea 1 - página 4, línea 8; reivindicaciones 1, 15).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente solicitud es un procedimiento de obtención de de micro o nano cápsulas mediante electroestirado o electroesprayado de una disolución de proteínas de la leche a la que se ha añadido el producto a encapsular y su uso como vehículos de encapsulación de ingredientes y aditivos funcionales para preparación de composiciones farmacéuticas y/o alimentarias.

1.1. REIVINDICACIONES 1-25

Aunque el desarrollo de microcápsulas a partir de proteínas y polisacáridos, para preparación de composiciones farmacéuticas y/o alimentarias, es anticipado en los documentos de patente citados como D01, D05-D06, la presente solicitud difiere de estos documentos en que ninguno de ellos se refiere a su obtención por electroestirado o electroesprayado.

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa un procedimiento de obtención de microcápsulas, que contiene sustancias activas, a partir de proteínas del suero de la leche, preparando una disolución de las proteínas lácteas, que puede contener otros componentes, a la que se adiciona los productos a encapsular. Sin embargo, en este documento no se menciona el empleo de técnicas de electroestirado o electroesprayado.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-25 cumplen el requisito de novedad (Art. 6.1 LP11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES 1-17, 20-25

La invención que divulga D01 divulga un procedimiento de obtención de microcápsulas basado en proteínas del suero de la leche. La diferencia entre el documento D01 y el objeto técnico de las reivindicaciones de la presente invención radica en el empleo de técnicas de electroestirado o electroesprayado para obtener dichas microcápsulas.

La obtención de microcápsulas por electroestirado o electroesprayado se encuentra en el estado de la técnica, de hecho es anticipada en los documentos D02 y D04. El documento D02 divulga un procedimiento de obtención de microcápsulas, mediante electroestirado o electroesprayado, en condiciones similares a las reivindicadas en la presente solicitud.

Por lo tanto según lo divulgado en el documento D01 en combinación con el D02, se considera que resultaría obvio para un experto en la materia aplicar técnicas de electroestirado o electroesprayado para obtener las microcápsulas de la invención.

En consecuencia, la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-17, 20-25, carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.2. REIVINDICACIONES 18 y 19

La obtención de microcápsulas por estirado por soplado es conocida en el estado de la técnica; el documento D03 anticipa un procedimiento de obtención de microcápsulas mediante esta técnica. Por otra parte, se considera que las reivindicaciones 18 y 19 de la presente invención no aportan ninguna característica técnica que se pueda considerar más ventajosa que lo divulgado en el estado de la técnica.

Por lo tanto según lo divulgado en el documento D01 en combinación con el D03, se considera que resultaría obvio para un experto en la materia aplicar técnicas de estirado por soplado para obtener las microcápsulas de la invención.

En consecuencia, la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 18 y 19, carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).