

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 063**

51 Int. Cl.:

**B01J 13/02** (2006.01)  
**A61K 9/64** (2006.01)  
**B01J 13/04** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A23P 10/30** (2006.01)  
**A23L 33/105** (2006.01)  
**A23L 33/135** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.06.2012 PCT/ES2012/070455**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12175776**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2012 E 12802201 (9)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2724775**

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

30 Prioridad:

**22.06.2011 ES 201131048 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.11.2020**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ RUBIO, AMPARO y  
LAGARÓN CABELLO, JOSÉ MARÍA**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 792 063 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## 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 alimentos y preparaciones farmacéuticas.

10 **Estado de la técnica**

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).

15 Se ha desarrollado una gran variedad de procedimientos para preparar micropartículas proteicas, siendo las técnicas más comunes el secado por pulverización (Bruschi, M. L., Cardoso, M. L. C., Lucchesi, M. B., y 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., y 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., y 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 uso de agentes orgánicos al menos en una de las fases de producción, lo cual conlleva la destrucción de ingredientes sensibles encapsulados, así como a problemas de toxicidad asociados con contenidos residuales de los

20 agentes orgánicos (Birnbbaum, D., Kosmala, J., Henthorn, D., y 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 además den lugar a tamaños de partículas más reducidos son altamente deseables. En este sentido, las técnicas de electrofibrado y electropulverizado (electrofibrado y electropulverizado por alto voltaje) y de fibrado por soplado y pulverizado por soplado (fibrado y pulverizado por medio de soplado) son procedimientos 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 un flujo de fluido presurizado al que se somete la solución polimérica. La técnica del fibrado o pulverizado por soplado 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 procedimientos 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 electrofibrado 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., Martínez-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). Las técnicas de fibrado por soplado y pulverizado por soplado, 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).

La morfología de las estructuras obtenidas mediante estas técnicas de fibrado puede modificarse ajustando los parámetros del proceso y, para un determinado material, pueden obtenerse cápsulas muy pequeñas (proceso que se conoce como “pulverizado” debido a la naturaleza discontinua 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 (electrofibrado/electropulverizado y fibrado por soplado/pulverizado por soplado). 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 dichas proteínas y su bajo coste (dado que son un subproducto generado durante la fabricación de productos lácteos fermentados). La bibliografía científica anterior contiene varios ejemplos de microencapsulados de estos concentrados de proteínas de la leche utilizando técnicas como el secado por pulverización (Rosenberg, M., Young, S.L., Brooker, B.E., y Colombo, V.E. (1993). *Food Structure* 12, 31-41; Bylaite, E., Venskutonis, P.R., Mapdieriene, 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., y Xiao, L. (2007). *Journal of Food Engineering* 83, 31-40).  
 5 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 pulverización (WO/2009/050333 (A1)).

10 Más específicamente, el documento WO2009/050333 A1 indica que los liposomas administrados por vía oral no fueron lo suficientemente estables, ya que el bajo pH del estómago y la presencia de sales biliares y lipasas tiende a desestabilizar el complejo sustancia activa-liposoma (véase la página 3, líneas 18-21). Con el fin de aumentar la estabilidad de tales liposomas, el presente documento proporciona una composición liposómica microencapsulada que comprende lípidos biológicamente activos una mezcla de proteína de suero de la leche modificada, en donde  
 15 dicha mezcla comprende el 60 – 95 % e peso de proteína del suero de la leche y el 5-40 % en peso de proteína del suero de la leche modificada por sulfitolisis (véase la página 6, líneas 21-26, página 10, líneas 10-16, página 11, líneas 16-20 y la reivindicación 1). De acuerdo con este documento de la técnica anterior, la composición liposomal microencapsulada descrita en el mismo se obtiene mediante un procedimiento que comprende varios tratamientos térmicos. En primer lugar, se suena una mezcla de proteína del suero de la leche y de proteína del suero de la leche modificada se disuelve en agua agitando a temperatura de 30-75 °C, preferentemente 40-70 °C. Una vez que se  
 20 añaden a la mezcla los lípidos biológicamente activos, se obtiene una suspensión de lípido-agua calentando hasta una temperatura de 30-80 °C, preferentemente 45-70 °C. Después de eso, se obtiene una emulsión y, opcionalmente, se pasteuriza a una temperatura de 65-85 °C, preferentemente 70-80 °C. Finalmente, la emulsión se seca por pulverización o se liofiliza, preferentemente en un secador por pulverizado a una temperatura interna de  
 25 150-180 °C y a una temperatura externa de 70-90 °C, usando aire o bajo una atmósfera inerte (véase la página 12, línea 22 a la página 13, línea 20).

Además, Atmane y col. ("Flavour encapsulation and controlled release - a review", *International Journal of Food Science and Technology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, GB (2006), 41(1), páginas 1-21) describen  
 30 diferentes materiales y procesos para sabores encapsulados. En particular, este documento menciona que los aislados de proteína del suero de la leche se pueden usar para la encapsulación de volátiles mediante secado por pulverización (véase la página 5, columna derecha, segundo párrafo). Este documento también describe que se puede usar una combinación de aislados de proteína del suero de la leche para la microencapsulación de componentes volátiles. En este sistema, la proteína del suero de la leche actúa como un emulsionante y un agente  
 35 formador de película, mientras que los carbohidratos actúan como el material formador de la matriz (véase la página 6, columna izquierda, segunda). Además de eso, el documento US5601760 A describe un procedimiento para la microencapsulación de diversos materiales principales usando agentes de microencapsulación de proteínas del suero de la leche y el secado por pulverización como la técnica de microencapsulación. En particular, este documento de la técnica anterior desvela que las condiciones de secado normalmente consisten en una temperatura  
 40 de aire interna de aproximadamente 100 °C y aproximadamente 210 °C, y de una temperatura de aire externa de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 140 °C (véase la columna 10, líneas 50-56).

Por otro lado, Jaworek y col. ("Electrospraying route to nanotechnology: An overview", *Journal of Electrostatics*, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, NL, (2008), Vol. 66, n.º 3-4, páginas 197-219) proporciona algunos  
 45 ejemplos de electropulverización o electrofibrado de proteínas para producir microcápsulas o nanocápsulas (véase el punto 3.5; y las tablas 5, 6). En particular, este documento se refiere a la referencia [227] (véase la tabla 5), en donde la albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) se usa como el material encapsulado y el núcleo, mientras que el poli-L-láctico (PLA) se usa como el material encapsulante en la cápsula. La albúmina de suero  
 50 bovino (BSA) también se usa en la referencia [232] (véase la tabla 5), en donde se describe la producción de cápsulas gruesas (10-20 micrómetros) de una mezcla de etanol/agua. Además de eso, Jaworet y col. también cita la referencia [255] (véase la tabla 6) en donde las soluciones acuosas de proteína alfa-lactoalbúmina se procesaron mediante la técnica de deposición por electropulverización (ESD, por sus siglas en inglés), una técnica que, en una cámara seca, hace uso de un inyector capilar no conductivo de vidrio que tiene un electrodo de platino, para producir  
 55 bajo ciertas condiciones una película de proteína que después se reticula para formar materiales continuos con cierta porosidad para crear capas delgadas con actividad biológica (véase, en particular, la figura 3 de referencia [255] (I. Uematsu y col., "Surface morphology and biological activity of protein thin films productd by electrospray deposition", *Journal of Colloid and Interface Science* 269 (2004), páginas 336-340) en donde se reproducen las películas obtenidas en él.

Además de lo anteriormente mencionado, el documento WO00/37547 A2 se refiere a un procedimiento de  
 60 producción para crear microesferas poliméricas huecas expandibles para obtener materiales espumados, y el documento US2010/015447 A1 hace referencia a la tecnología de electropulverización para desarrollar estructuras Janus (es decir, dos materiales en fase sólida), que combinados uno al lado del otro proporcionan estabilidad al proceso.

## 65 Descripción de la invención

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 de la producción de las micro, submicro y nanocápsulas, en lo sucesivo, en el presente documento cápsulas, por los procedimientos 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 ambientales 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 del suero de la leche en agua;
- b) añadir lo siguiente a la solución de la etapa a):

- i) ingredientes funcionales a encapsular que se pueden disolver o suspender en agua; o
- ii) una solución del ingrediente a encapsular; y
- c) electrofibrado o electropulverizado o fibrado por soplado o pulverizado por soplado de la disolución resultante de la etapa b), en donde

- o el electrofibrado o el electropulverizado se lleva a cabo con una distancia entre el capilar y el soporte de entre 2 y 50 cm, un intervalo de tasa de deposición por aguja de 0,01 a 10 ml/h y un voltaje de entre 0,1 y 1000 kV, y

- o el fibrado por soplado o el pulverizado por soplado se lleva a cabo con una distancia entre el capilar y el soporte de entre 2 y 50 cm, un intervalo de tasa de deposición por aguja de 0,01 a 10 ml/h y mediante la aplicación de un flujo de gas presurizado a entre 200 y 300 m/s.

En una realización preferida, no limitante, el preparado de proteínas se basa en un concentrado de proteínas del suero de la leche procedente de mamíferos o de soja. Preferentemente, de vaca, de oveja, de cabra o de leche de soja, aún más preferentemente de vaca.

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 tales como células de valor en biomédicina y probióticos (bacterias lácticas, bifidobacterias), prebióticos (lactulosa, galacto-oligosacáridos, fructo-oligosacáridos, maltooligosacáridos, xilo-oligosacáridos y oligosacáridos de la soja), simbióticos, fibras, ácido oleico, ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y omega-6) y otros aceites marinos, fitoesteroles, fitoestrógenos, 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 desestabilizados por condiciones ambientales, de procesado o de almacenamiento en su presentación comercial o cualquier combinación de los mismos.

Los ingredientes se seleccionan más preferentemente del grupo formado por:

- carotenoides y polifenoles,
- bifidobacterias y bacterias lácticas,
- células de interés biomédico para regeneración ósea y de tejidos,
- ácidos grasos poliinsaturados,
- 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. Aún más preferentemente:
- bifidobacterias y bacterias lácticas,
- células de interés biomédico para regeneración ósea y de tejidos,
- ácidos grasos poliinsaturados,
- 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.

- 5 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 estabilidad y la protección de los ingredientes funcionales encapsulados.
- 10 En otra realización preferida, se adicionan en la etapa a) aditivos seleccionados de la siguiente lista: plastificantes, agentes de reticulación, tensioactivos, ácidos, bases, emulsionantes, antioxidantes, ayudantes del procesado en general o cualquier mezcla de los mismos u otros que faciliten la formación de las cápsulas o la incorporación de los ingredientes a encapsular.
- 15 Según otra realización preferida, en la etapa c) el electrofibrado o el electropulverizado se realiza aplicando un voltaje preferentemente de entre 5 y 30 kV.
- 20 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a las cápsulas producidas mediante el procedimiento anteriormente descrito.
- 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 Un sexto aspecto de la presente invención se refiere a una composición nutraceútica que comprende las cápsulas con los ingredientes obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito.
- 40 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.
- 45 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 electrofibrado/electropulverizado 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.
- 50 El fibrado por soplado y el pulverizado por soplado, 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 soluciones acuosas de las proteínas (en este caso en concreto de un concentrado de proteínas del suero de la leche) y sus mezclas.
- 55 En la presente invención se entiende como "envase funcional" 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.
- 60 En la presente invención, la expresión "ingrediente bioactivo" se refiere 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, 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,  $\beta$ -carotenos, etc.
- 65 En la presente invención, la expresión "alimento funcional" se refiere a aquellos alimentos que son elaborados no solo 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 les agregan componentes biológicamente activos, tales como minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra alimenticia o antioxidantes, etc.

5 En la presente invención, el término "nutraceútico" se refiere a un concentrado de ingredientes funcionales o bioactivos que sirven para cumplir una *función específica* como puede ser mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades.

10 La composición farmacéutica o biomédica, es un conjunto de componentes que está formada al menos por las micro- o nanocápsulas de la invención, 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 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.

15 La expresión "producto de higiene personal" se refiere a las sustancias o preparados que, sin tener la consideración legal de fármacos, 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.

20 El término "producto cosmético" se refiere a 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 o las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, y/o corregir los olores corporales, y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado.

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

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. 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 que sean limitativos de la presente invención.

### 35 Figuras

La **Figura 1** muestra una imagen de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de estructuras tratadas por electropulverización a partir de un concentrado de proteínas del suero de la leche en disolución acuosa.

40 La **Figura 2** muestra una imagen de microscopía óptica obtenida con luz polarizada (A) y utilizando una fuente de fluorescencia (B) de estructuras tratadas por electropulverización de un concentrado de proteínas de suero de la leche que contienen el antioxidante  $\beta$ -caroteno disuelto en glicerol.

45 La **Figura 3** muestra una gráfica semilogarítmica del número de unidades formadoras de colonia por mililitro de bifidobacterias, tanto encapsuladas como no encapsuladas (en leche) a diferentes intervalos de tiempo almacenadas a 20 °C.

La **Figura 4** muestra una imagen de microscopía óptica obtenida con luz polarizada de estructuras obtenidas por pulverizado por soplado de un concentrado de proteínas de suero de la leche.

### 50 Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante una serie de ensayos realizados por los inventores, que demuestran la eficacia 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.

#### 55 Ejemplo 1.

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

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

65 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 volumen del disolvente. 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 electropulverizado con una configuración en horizontal. La disolución se introduce en jeringas de 5 ml conectadas a una aguja de acero inoxidable de diámetro 0,9 mm a través de tubos de teflón. 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 (colector) de acero inoxidable donde se recogen las estructuras obtenidas, siendo la distancia entre la aguja y el colector de 7 cm. El procedimiento 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 nm y los 3 micrómetros, aunque preferentemente se obtienen nanocápsulas (es decir, cápsulas con tamaños inferiores a los 100 nm).

### Ejemplo 2.

#### 15 Protección del antioxidante $\beta$ -caroteno mediante encapsulación utilizando matrices a base de concentrado de proteínas del suero de la leche

En este ejemplo, se demuestra la capacidad de encapsulación de las estructuras generadas mediante electropulverizado y su capacidad de protección de ingredientes sensibles tales como el antioxidante  $\beta$ -caroteno.

En primer lugar se preparó una disolución del antioxidante  $\beta$ -caroteno en glicerol, que se ha demostrado que tiene una elevada capacidad para estabilizar este ingrediente bioactivo frente a la fotodegradación. Se disolvió 1 g de  $\beta$ -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 volumen del disolvente y se agitó a temperatura ambiente hasta obtener una disolución homogénea. A esta última disolución, se le agregó el  $\beta$ -caroteno disuelto en glicerol, constituyendo la proporción añadida 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 disolución homogénea.

Esta última disolución acuosa que contenía el concentrado de proteínas de suero de la leche y el antioxidante  $\beta$ -caroteno disuelto en glicerol, se utilizó para generar las microcápsulas que se muestran en la Figura 2 mediante la técnica de electropulverizado con una configuración horizontal. 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 9-10 kV y la disolución se bombeó a través de dicha aguja con un flujo de 0,3 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 7 cm. El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. Parte de las cápsulas obtenidas se recogieron directamente sobre un soporte de vidrio para microscopía. El tamaño medio de las cápsulas en este caso era superior (~4 micrómetros) debido a la presencia de glicerol en la disolución.

### Ejemplo 3.

#### 45 Encapsulación y estabilización de bifidobacterias a 20°C mediante el uso de microcápsulas tratadas por electropulverización, hechas 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 productos alimenticios 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 que contiene 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 electropulverizado. 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.

5 La técnica de encapsulación por electropulverizado de las bifidobacterias utilizando como matriz de encapsulación 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.**

10 **Obtención de estructuras de encapsulación submicrométricas a partir de un concentrado de proteínas del suero de la leche utilizando la técnica de fibrado/pulverizado por soplado**

15 En este ejemplo, se detalla el procedimiento de producción de cápsulas submicrométricas mediante la técnica de fibrado/pulverizado por soplado.

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.

20 Esta disolución acuosa que contiene 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 electropulverizado por soplado con una configuración vertical. La disolución se introdujo en una jeringa de 5 ml 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  
25 velocidad (230-250 m/s). El flujo de nitrógeno bombeado coaxialmente por la aguja exterior acelera y estira 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 bares. Las estructuras generadas y solidificadas se recogieron en un colector situado a una distancia de unos 18-20 cm. La Figura 4 muestra una imagen de microscopía óptica de las cápsulas generadas.  
30

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para obtener 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 en agua,
  - b. añadir lo siguiente a la disolución de la etapa a):
- 10
- i. ingredientes funcionales a encapsular que son capaces e disolverse o suspenderse en agua, o
  - ii. una disolución del ingrediente a encapsular; **caracterizada por que** el procedimiento también comprende:
- c. electrofibrado o electropulverizado o fibrado por soplado o pulverizado por soplado de la disolución resultante de la etapa b), en donde
- 15
- o el electrofibrado o el electropulverizado se lleva a cabo con una distancia entre el capilar y el soporte de entre 2 y 50 cm, un intervalo de tasa de deposición por aguja de 0,01 a 10 ml/h y un voltaje de entre 0,1 y 1000 kV, y
  - o el fibrado por soplado o el pulverizado por soplado se lleva a cabo con una distancia entre el capilar y el soporte de entre 2 y 50 cm, un intervalo de tasa de deposición por aguja de 0,01 a 10 ml/h y mediante la aplicación de un flujo de gas presurizado a entre 200 y 300 m/s.
- 20
2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde el producto basado en proteínas del suero de la leche es un concentrado de proteínas del suero de la leche de mamíferos.
- 25
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el producto basado en proteínas del suero de la leche es un concentrado de proteínas del suero de la leche de vaca, de oveja o de cabra.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el producto basado en proteínas del suero de la leche procede de un concentrado de proteínas del suero de la leche de vaca.
- 30
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el porcentaje en peso de la proteína en la solución varía del 0,1 al 99 %.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el porcentaje en peso de las proteínas en la solución varía del 10 al 70 %.
- 35
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los ingredientes son ingredientes funcionales seleccionados del grupo de 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 o proteínas de valor tecnológico seleccionadas de lactoferrina, ovotransferrina, lactoperoxidasa, lisozima, proteína de soja, inmunoglobulina o cualquier combinación de los mismos.
- 40
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde los ingredientes funcionales se seleccionan del grupo formado por
- 45
- a)  $\beta$ -caroteno,
  - b) bifidobacterias y bacterias lácticas,
  - c) células de interés biomédico para regeneración ósea y de tejidos,
  - d) ácidos grasos poliinsaturados,
  - e) enzimas y otras proteínas de valor tecnológico seleccionadas entre lactoferrina, ovotransferrina, lactoperoxidasa, lisozima, proteína de soja, inmunoglobulinas,
  - f) péptidos bioactivos, seleccionados entre péptidos antihipertensivos y antimicrobianos.
- 50
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde se adicionan en la etapa a) otros biopolímeros seleccionados de la siguiente lista: carbohidratos, proteínas y lípidos.
- 55
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde se adicionan en la etapa a) aditivos seleccionados de la siguiente lista: plastificantes, ácidos, agentes de reticulación, 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.
- 60
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde tras la etapa b) se lleva a cabo una etapa de homogenización por agitación y/o ultrasonidos.
- 65
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde en la etapa c) el electrofibrado o

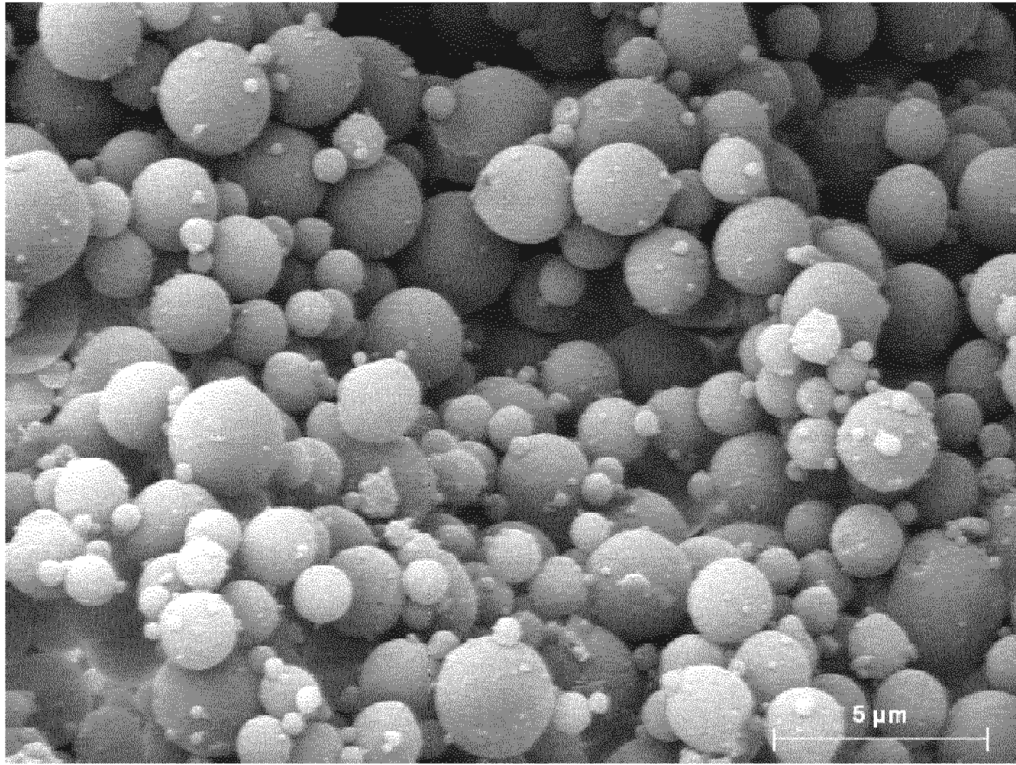
electropulverizado se realiza aplicando un voltaje entre 5 y 30 kV.

13. Cápsulas obtenibles mediante el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 12.

5 14. Uso de las cápsulas de la reivindicación 13, para preparar composiciones químicas o envases funcionales.

15. Uso de las cápsulas de la reivindicación 14, en donde las composiciones químicas se seleccionan del grupo que consiste en productos alimenticios funcionales, composiciones farmacéuticas, composiciones biomédicas y composiciones nutracéuticas.

10



**FIG 1**

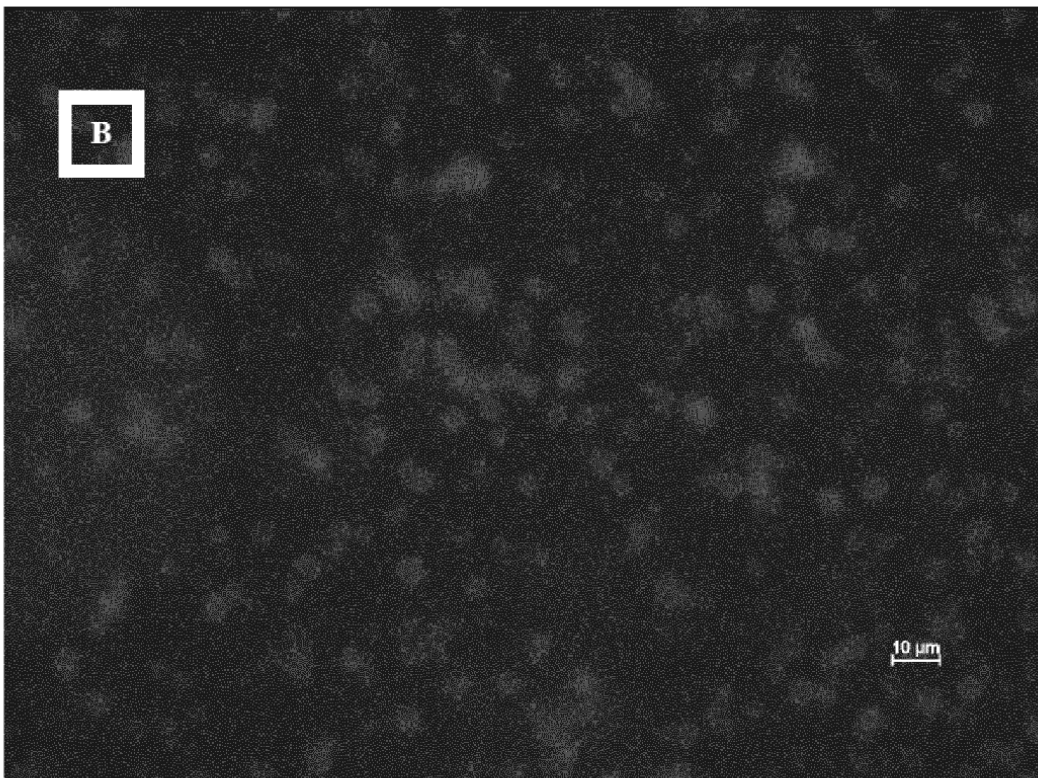
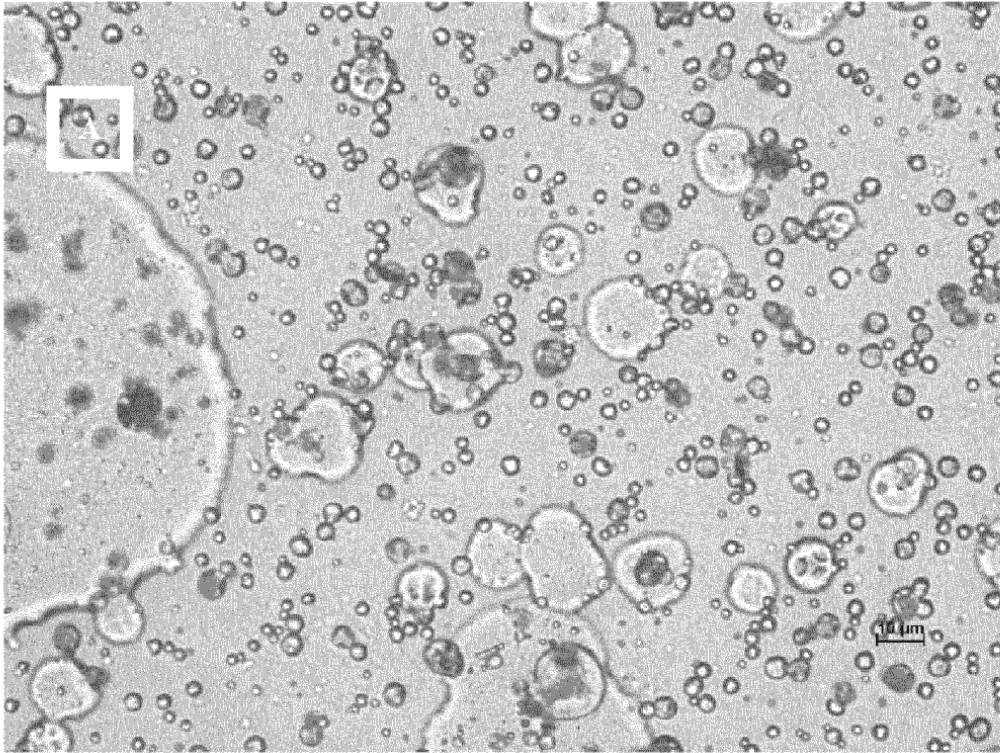


FIG 2

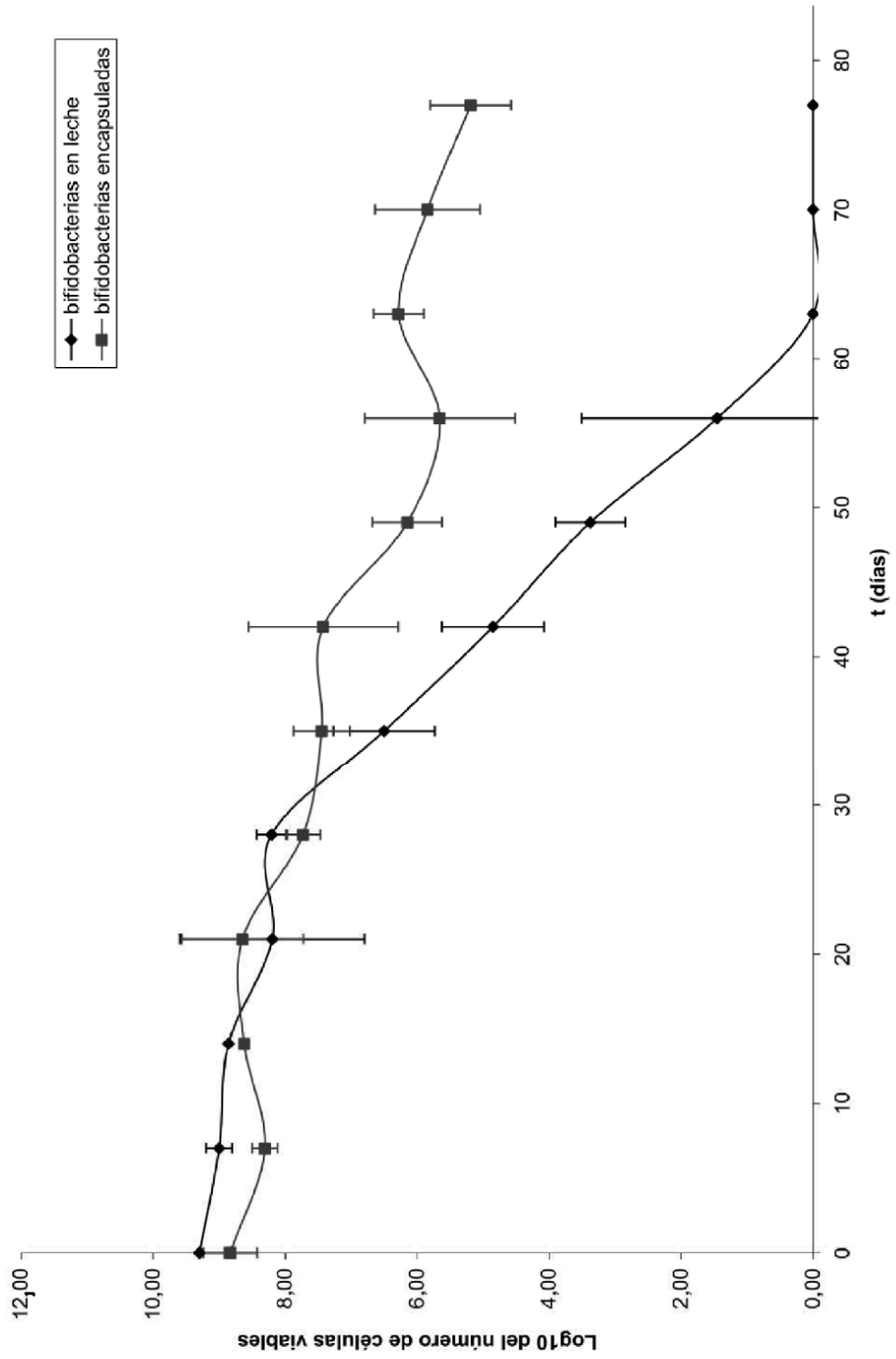


FIG 3

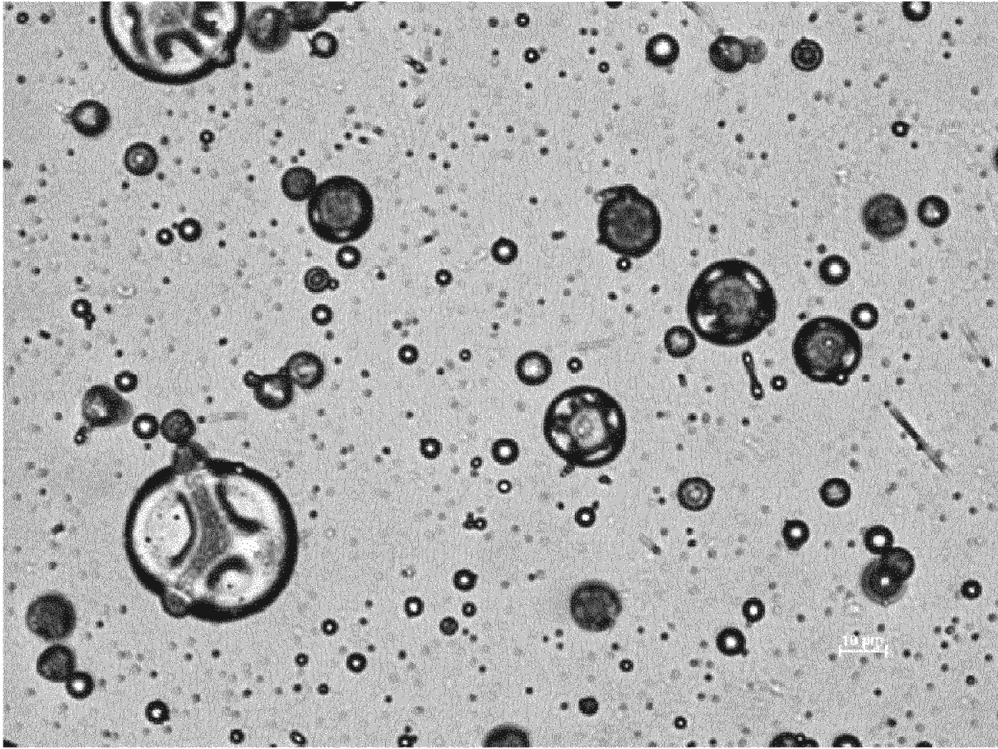


FIG 4