



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 715**

51 Int. Cl.:
B01J 13/10 (2006.01)
B01J 13/20 (2006.01)
A61K 8/11 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)
A23P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02738248 .0**
86 Fecha de presentación : **16.05.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1390138**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Microcápsulas a base de proteínas vegetales.**

30 Prioridad: **16.05.2001 FR 01 06441**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **MAINELAB**
8 rue André Boquel
Parc Scientifique des Capucins
49100 Angers, FR

72 Inventor/es: **Richard, Joël y**
Morteau, Sophie

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 269 715 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).

ES 2 269 715 T3

DESCRIPCIÓN

Microcápsulas a base de proteínas vegetales.

5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de micropartículas a base de proteínas vegetales, y la utilización de estas partículas en los campos farmacéutico, veterinario, cosmético, agroalimentario, químico y biomédico.

10 La microencapsulación reagrupa el conjunto de las tecnologías que permiten obtener unas partículas individualizadas cuyo tamaño está comprendido entre 1 μm y 1 mm, y que conduce a la inclusión de sustancias o principios activos en el seno de un material de soporte.

Se distinguen clásicamente dos grupos de micropartículas:

- 15
- las microcápsulas o sistemas depósito: son unas partículas esféricas constituidas por una envoltura sólida y un núcleo de materia activa líquida, sólida o pastosa, y
 - las microesferas o sistemas matriciales: están constituidas por una red continua de un material envolvente en el que está dispersada la sustancia a encapsular.
- 20

Existen tres tipos de procedimientos de encapsulación: unos procedimientos fisicoquímicos (coacervación simple, coacervación compleja, evaporación del solvente, extracción-evaporación del solvente, fusión en caliente del material envolvente), unos procedimientos químicos (policondensación interfacial, polimerización en medio disperso y gelificación del material envolvente) y unos procedimientos mecánicos (encapsulación en lecho de aire fluidizado, por atomización y por prilling).

25

La coacervación compleja se basa en el fenómeno de desolvatación de macromoléculas, una cargada positivamente y la otra negativamente, que conduce a la formación de dos fases no miscibles, partiendo de soluciones acuosas coloidales inicialmente homogéneas.

30

Estas dos fases son:

- el coacervato, rico en polímero y empobrecido en agua, que resulta de la formación de complejos entre las macromoléculas cargadas positivamente y las cargadas negativamente.
 - el sobrenadante pobre en polímero y rico en agua.
- 35

El encapsulado de un aceite por coacervación compleja consiste en emulsionar el aceite en una solución de dos polímeros. La coacervación es inducida por ajuste del pH del medio. Los complejos polímeros formados se adsorben sobre las gotitas de aceite y las aíslan así del medio exterior. La pared formada es endurecida por enfriado del medio y reticulada por la acción de una agente de reticulación.

40

El encapsulado de una sustancia activa ofrece unas ventajas importantes tales como su protección frente a agentes exteriores o su liberación lenta, retardada o diferida en el sitio de utilización.

45

Para aplicaciones en los campos farmacéutico, veterinario, cosmético, agroalimentario y biomédico, los materiales más buscados como constituyentes de la pared son unas sustancias naturales, en particular las proteínas o los polisacáridos, debido a su biocompatibilidad y su biodegradabilidad. Entre estos biopolímeros, la albúmina, la gelatina, el colágeno y la caseína han sido objeto de numerosos trabajos.

50

Así, se han preparado unas cápsulas de albúmina y de alginato de sodio por coacervación compleja para desarrollar un sistema de encapsulado de proteínas y de polipéptidos (Singh *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, (1989) 41, 670-673).

Otro estudio describe el encapsulado de un principio activo en unas microesferas de caseína, preparadas por emulsión-extracción del solvente; y se ha demostrado que esta proteína de la leche constituía un soporte potencial para unas preparaciones orales de liberación prolongada (Latha *et al.*, *J. Control. Rel.*, (1995) 34, 1-7).

55

Desde hace algunos años, un nuevo enfoque que consiste en utilizar más proteínas de origen vegetal que animal. En efecto, desde el descubrimiento de la encefalopatía esponjiforme de origen animal (enfermedad de las "vacas locas"), los consumidores ya no confían en los productos susceptibles de estar contaminados por el prion, agente potencialmente responsable de esta patología. Resulta por lo tanto necesario encontrar un sustituto a las proteínas animales tales como la gelatina y la albúmina. En la literatura, se han descrito varias técnicas de encapsulado partiendo de estos polímeros de origen vegetal.

60

Se ha podido encapsular por coacervación simple un antibiótico utilizando gluten de trigo y la caseína como materiales de recubrimiento, con la finalidad de obtener un sistema de liberación prolongada (Jiunn-Yann Yu *et al.*, *J. of fermentation and Bioengineering*, (1997) vol 84, 5, 444-448).

65

ES 2 269 715 T3

Otro sistema de liberación controlada ha sido desarrollado a partir de nanopartículas de gliadina (fracción proteica del gluten de trigo) obtenidas mediante un procedimiento que se basa en la desolvatación de macromoléculas, mediante la adición de una fase orgánica de proteína a una fase acuosa (Ezpeleta *et al.*, *Int. J. Pharm.*, (1996) 131,191-200).

5 Otros trabajos han demostrado que es posible fabricar nano- y micropartículas a partir de vicilina (proteína del guisante) por coacevación simple (Ezpeleta *et al.*, *J. Microencapsulation*, (1997), Vol. 14, nº5, 557-565).

10 Por último, es posible preparar unas partículas que presentan una pared formada por proteínas vegetales mediante una reacción de reticulación interfacial entre estas proteínas y un agente reticulante polifuncional acilante. Este procedimiento permite encapsular unas sustancias activas en estado de solución, de suspensión o de emulsión y se puede utilizar cualquier proteína vegetal, en particular las que son extraídas del trigo, de la soja, del guisante, de la colza, del girasol, del centeno o de la avena (WO 99/03450).

15 En cuanto a lo que se refiere al procedimiento de coacevación compleja, los pares utilizados clásicamente son la gelatina como polication y el alginato de sodio, el polifosfato o la goma arábiga como polianión. Unos estudios han demostrado que la gelatina podía ser sustituida por albúmina bovina (Singh *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, (1989) 41, 670-673).

20 Aunque la tendencia sea la de utilizar productos naturales de origen vegetal como sustitutos de las proteínas animales, no se ha podido realizar ningún procedimiento de encapsulación por coacevación compleja a partir de proteínas vegetales. En efecto, las proteínas vegetales no son puras; presentan grandes problemas de solubilidad debido a la presencia de una fracción soluble y de una fracción insoluble y presentan asimismo un poder emulsionante bajo con respecto al de las proteínas animales, lo que hace necesaria la utilización de los tensioactivos suplementarios que interfieren en la fase de fijación de los coacervatos.

25 Ahora bien, los inventores, de forma sorprendente, han puesto a punto un procedimiento que resuelve el conjunto de estos problemas.

30 Los inventores han conseguido definir un nuevo procedimiento que permite la utilización de estas proteínas en una técnica de coacevación compleja.

35 Asimismo, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de fabricación de microcapsulas que contienen un material a encapsular, caracterizado porque se somete una mezcla de al menos una proteína vegetal solubilizada y un polielectrolito de carga opuesta a dicha proteína a una coacevación compleja en medio acuoso seguida eventualmente de un endurecimiento, en presencia de dicho material a encapsular.

En un modo de realización preferido de la invención, el procedimiento comprende:

- 40 a) la solubilización de al menos una proteína vegetal en medio acuoso a un pH comprendido entre 2 y 7 e inferior al pH isoelectrico de dicha proteína,
- b) la centrifugación de la solución obtenida en a),
- 45 c) la mezcla del sobrenadante obtenido en b) con una solución acuosa de un polielectrolito de carga opuesta a la de la proteína vegetal,
- d) la coacevación de los polielectrolitos en la forma de complejos de polímeros, y eventualmente el endurecimiento de las cápsulas, en presencia del material a encapsular.

50 La etapa b) de centrifugación se realiza en unas condiciones bien seleccionadas, en particular a una velocidad comprendida entre 2.000 y 15.000 rpm preferentemente entre 4.000 y 12.000 rpm, durante 10 a 30 minutos.

En un modo de realización particularmente ventajoso de la invención, el procedimiento se caracteriza porque se aumenta la cantidad de proteínas solubles mediante:

- 55 e) la adición de una cantidad de proteínas vegetales al sobrenadante con el objetivo de alcanzar la saturación,
- f) la centrifugación de la mezcla, y
- 60 g) eventualmente la repetición de las etapas e) y f) varias veces.

De forma muy ventajosa, el procedimiento de fabricación según la invención se caracteriza porque la etapa c) se realiza a un pH inferior al pH isoelectrico de la proteína vegetal con la finalidad de que dicha proteína sea utilizada en la etapa d) de coacevación compleja como polielectrolito catiónico.

65 De otra forma ventajosa, el procedimiento de fabricación de una pared de microcápsulas a base de proteínas vegetales se caracteriza porque se realiza la etapa c) a un pH superior al pH isoelectrico de la proteína vegetal con la finalidad de que dicha proteína sea utilizada en la etapa d) de coacevación compleja como polielectrolito aniónico.

ES 2 269 715 T3

La concentración de proteínas en la solución inicial está comprendida generalmente entre 2% y 15%, la concentración del sobrenadante de la solución inicial de las proteínas centrifugadas entre 1% y 8%, y la concentración de proteínas en la solución de coacervación entre 1,5 y 5%.

5 Las proteínas vegetales utilizadas en el marco de la invención son extraídas de vegetales seleccionados de entre el grupo que comprende: el altramuza (de la variedad *Lupinus*), la soja (de la variedad Glicina), el guisante (de la variedad Pisum), el garbanzo (*Cicer*), la alfalfa (*Medicago*), el haba (*Vicia*), la lenteja (*Lens*), la judía verde (*Phaseolus*), la colza (*Brassica*), el girasol (*Helianthus*) y de los cereales como el trigo, el maíz, la cebada, la malta y la avena. A título de ejemplo, se pueden citar las proteínas vegetales SWP100 y SWP50 y las comercializadas con las denominaciones
10 Supro[®] 670 y PISANE[®].

Ventajosamente, el polielectrolito aniónico es seleccionado de entre los clásicamente utilizados por el experto en la materia, en particular los que son seleccionados de entre el grupo que comprende el alginato de sodio, la goma arábica, los polifosfatos, la carboximetilcelulosa de sodio, el carragenano, la goma xantano y las proteínas vegetales de pH superior al pHi. De forma ventajosa, el polielectrolito catiónico es uno de los clásicamente utilizados por el experto en la materia en particular los que son seleccionados de entre el grupo que comprende los agentes tensioactivos catiónicos, los latex que poseen un amonio cuaternario, el quitosán y las proteínas vegetales de pH inferior al pHi.

20 Cuando el procedimiento comprende una etapa de endurecimiento, ésta se puede realizar mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia en particular por reticulación mediante un agente reticulante seleccionado de entre el grupo que comprende los dialdehídos tales como el glutaraldehído y los taninos tales como el ácido tánico.

25 Cuando el polielectrolito catiónico es el quitosán, el endurecimiento se realiza utilizando como agente endurecedor el anhídrido acético.

En un modo de realización particularmente ventajoso de la invención, se utiliza un par polication/polianion seleccionado de entre el grupo que comprende los pares: SWP100/alginato, SWP100/goma arábica, quitosán/Supro[®], Supro[®]/alginato o Supro[®]/goma arábica.

30 Las microcápsulas obtenidas por el procedimiento según la invención tienen un diámetro comprendido entre 5 y 500 μm , preferentemente entre 20 y 200 μm , más preferentemente entre 20 y 50 μm .

35 Las microcápsulas según la invención pueden contener unas sustancias aptas para ser utilizadas en los campos farmacéutico, veterinario, cosmético, agroalimentario, químico y biomédico, en particular unos principios activos. Pueden ser combinadas con cualquier ingrediente activo o cualquier excipiente bien conocido por el experto en la materia.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin por ello limitarla.

40 Ejemplo 1

Coacervación compleja a partir de la proteína SWP100 en presencia de alginato

45 Una solución de SWP100 al 10% mantenida a un pH de 3 es centrifugada durante 25 minutos a 4.500 rpm. Se obtienen 48 ml de un sobrenadante que contiene 0,72 g de proteínas disueltas. En esta solución de sobrenadante, son emulsionados 20 g de Miglyol[®] 812. Se añaden entonces 35,6 ml de una solución acuosa de alginato de sodio (0,36 g) y a continuación un volumen de 96 ml de agua. La temperatura del medio es de 40°C. El pH del medio es bajado de 4,22 a 3 añadiendo ácido clorhídrico 1N.

50 La relación másica SWP100/alginato es igual a 2 y la concentración final en la fase acuosa de SWP100 es de 0,4% peso/volumen y es de 0,2% peso/volumen para el alginato.

55 La coacervación compleja se realiza y el medio es enfriado a 10°C y mantenido a 10°C durante 1 hora. Se añaden 1,5 ml de glutaraldehído al 25% en el medio a 10°C. Seguidamente se deja volver el medio a la temperatura ambiente y el medio es mantenido bajo agitación durante 15 horas.

Se obtiene una dispersión de microcápsulas que contiene 95% de aceite, de un tamaño medio comprendido entre 200 y 400 μm .

60 Unas microcápsulas cuya relación másica SWP100/alginato es igual a 1, son preparadas con la misma técnica.

Ejemplo 2

Coacervación compleja a partir de la proteína SWP100 en presencia de goma arábica

65 Una solución de 100 ml de SWP100 al 17% mantenida a un pH de 3 es centrifugada durante 25 minutos a 4.500 rpm. Se obtienen 100 ml de un sobrenadante que contiene 2,6 g de proteínas disueltas. En esta solución de sobrenadante, se emulsionan 20 g de Miglyol[®] 812. Se añaden 45 ml de una solución acuosa de goma arábica (5 g) y un volumen

ES 2 269 715 T3

de agua de 13 ml. La temperatura del medio es de 40°C. El pH del medio es bajado a 3 añadiendo ácido clorhídrico 1N.

5 La relación másica SWP100/goma arábica es igual a ½ y la concentración final en la fase acuosa de SWP100 es de 1,5% peso/volumen y es de 3% peso/volumen para la goma arábica.

10 La coacervación compleja se realiza y el medio es enfriado a 10°C. El medio es dejado bajo agitación durante 1 hora y a continuación se le añaden 3 ml de glutaraldehído al 25%. Seguidamente se deja volver el medio a la temperatura ambiente manteniendo siempre el medio bajo agitación durante 6 horas.

15 Se obtiene una dispersión de microcápsulas que contiene 72,5% de aceite, de un tamaño medio comprendido entre 150 y 450 µm.

Ejemplo 3

15 *Influencia del aumento de la concentración de proteína SWP100 en el sobrenadante. Coacervación compleja a partir de la proteína SWP100 en presencia de alginato*

20 El pH de la solución proteica de SWP100 a aproximadamente el 18% (20 g en 130 g de agua) es ajustado a un valor de 4. La solución es centrifugada una primera vez a 12.000 rpm durante 15 minutos. El fondo es retirado y se añaden 12 g de proteínas SWP100 en el sobrenadante cuyo pH es de nuevo ajustado a 4.

Se realiza una segunda centrifugación y esta operación es repetida una tercera vez.

25 Después de la primera centrifugación, el sobrenadante contiene 2,9% de proteína soluble. Después de tres centrifugaciones, la concentración de proteína soluble es de 3,6%.

30 La relación másica SWP100/goma arábica es igual a 1 y la concentración final de SWP100 y la concentración final de SWP100 y de goma arábica en la fase acuosa es de 2% peso/volumen. La coacervación compleja se realiza con el sobrenadante concentrado de SWP100 a pH 4 (100 ml que contienen 3,6 g de proteína) y la goma arábica como polielectrolito aniónico (80 ml que contienen 3,6 g de goma arábica). La coacervación se realiza según el modo operativo descrito en el ejemplo 1.

35 Se obtiene una dispersión de microcápsulas que contienen 73,5% de aceite, de un tamaño medio comprendido entre 50 y 400 µm.

Ejemplo 4

40 *Coacervación compleja a partir del par Supro® 670/alginato*

Se preparan unas cápsulas según el modo operativo del ejemplo 1 a partir de una solución de Supro® 670 compuesta por 22,5 g de agua y 2,5 g de proteína y una solución de alginato compuesta de 150 g de agua y de 1,84 g de alginato.

45 El pH de coacervación es igual a 3,8.

Se obtienen microcápsulas en suspensión que contienen 82% de aceite y presentan una pared frágil de aspecto rugoso. El tamaño medio de las microcápsulas está comprendido entre 50 y 400 µm.

Ejemplo 5

50 *Evaluación de las proteínas vegetales como polielectrolito aniónico*

55 Se ajusta una solución de proteína Supro® 670 al 10% a un pH de 7, y se centrifuga una primera vez a 4.500 rpm durante 25 minutos. El fondo es retirado y el sobrenadante compuesto por 43 ml de agua y 2,57 g de proteína es utilizado para la coacervación.

60 Se emulsionan 20 g de Mygliol® 812 en el sobrenadante de la solución de proteína Supro® 670, y se añade a continuación una solución de quitosan 2622 compuesta por 120 ml de agua y 1,5 g de Quitosan a un pH de 1,32 en el medio a 40°C.

El pH de coacervación es ajustado a 6. El modo operativo es idéntico al descrito en el ejemplo 1.

65 Se obtiene una dispersión de microcápsulas que contiene 83% de aceite, de un tamaño medio comprendido entre 50 y 400 µm.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de fabricación de microcápsulas que contienen un material a encapsular, **caracterizado** porque se somete una mezcla de al menos una proteína vegetal solubilizada y un polielectrolito de carga opuesta a dicha proteína a una coacervación compleja en medio acuoso seguida eventualmente de un endurecimiento, en presencia de dicho material a encapsular.

10 2. Procedimiento de fabricación de microcápsulas a base de proteínas vegetales según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende:

- 15 a) la solubilización de al menos una proteína vegetal en medio acuoso a un pH comprendido entre 2 y 7 e inferior al pH isoelectrico de dicha proteína,
- b) la centrifugación de la solución obtenida en a),
- 20 c) la mezcla del sobrenadante obtenido en b) con una solución acuosa de un polielectrolito de carga opuesta a la de la proteína vegetal, y
- d) la coacervación de los polielectrolitos en forma de un complejo de polímeros, y eventualmente el endurecimiento de las cápsulas, en presencia del material a encapsular.

25 3. Procedimiento de fabricación de microcápsulas a base de proteínas vegetales según la reivindicación 2, **caracterizado** porque se aumenta la cantidad de proteínas solubles mediante:

- 30 e) la adición de una cantidad de proteínas vegetales al sobrenadante obtenido en la etapa b)
- f) la centrifugación de la mezcla, y
- g) eventualmente la repetición de las etapas e) y f) varias veces.

35 4. Procedimiento de fabricación de microcápsulas a base de proteínas vegetales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la etapa c) se realiza a un pH inferior al punto isoelectrico de la proteína vegetal con la finalidad de que dicha proteína sea utilizada en la etapa d) de coacervación compleja como polielectrolito catiónico.

40 5. Procedimiento de fabricación de microcápsulas a base de proteínas vegetales según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la etapa c) se realiza a un pH superior al pH isoelectrico de la proteína vegetal con la finalidad de que dicha proteína sea utilizada en la etapa d) de coacervación compleja como polielectrolito aniónico.

45 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque las proteínas vegetales son extraídas de vegetales seleccionados de entre el grupo que comprende el altramuz (de la variedad Lupinus), la soja (de la variedad Glicina), el guisante (de la variedad Pisum), el garbanzo (Cicer), la alfalfa (Medicago), el haba (Vicia), la lenteja (Lens), la judía verde (Phaseolus), la colza (Brassica), el girasol (Helianthus) y cereales como el trigo, el maíz, la cebada, la malta y la avena.

50 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6, **caracterizado** porque el polielectrolito aniónico es seleccionado de entre el grupo que comprende el alginato de sodio, la goma arábica, los polifosfatos, la carboximetilcelulosa de sodio, el carragenano, la goma xantano y las proteínas vegetales de pH superior al pHi.

55 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5 a 6, **caracterizado** porque el polielectrolito catiónico es seleccionado de entre el grupo que comprende unos agentes tensioactivos catiónicos, unos latex que poseen un amonio cuaternario, el quitosan y las proteínas vegetales de pH inferior al pHi.

60 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el endurecimiento se realiza mediante la reticulación por un agente reticulante seleccionado de entre el grupo que comprende los dialdehídos tales como el glutaraldehído y los taninos tales como el ácido tánico.

65 10. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque cuando el polielectrolito catiónico es el kitosan, el endurecimiento se realiza utilizando el anhídrido acético como agente endurecedor.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque se utiliza un par polición/polianión seleccionado de entre el grupo que comprende los pares:SWP100/alginate, SWP100/goma arábica, Quitosan/Supro®, Supro®/alginate o Supro®/goma arábica.

12. Utilización de cápsulas obtenidas mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la fabricación de composiciones útiles en los campos farmacéutico, veterinario, cosmético, agroalimentario, químico y biomédico.

ES 2 269 715 T3

13. Composiciones farmacéutica, veterinaria, cosmética, agroalimentaria o química, **caracterizadas** porque contienen unas microcápsulas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en asociación con cualquier excipiente aceptable.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

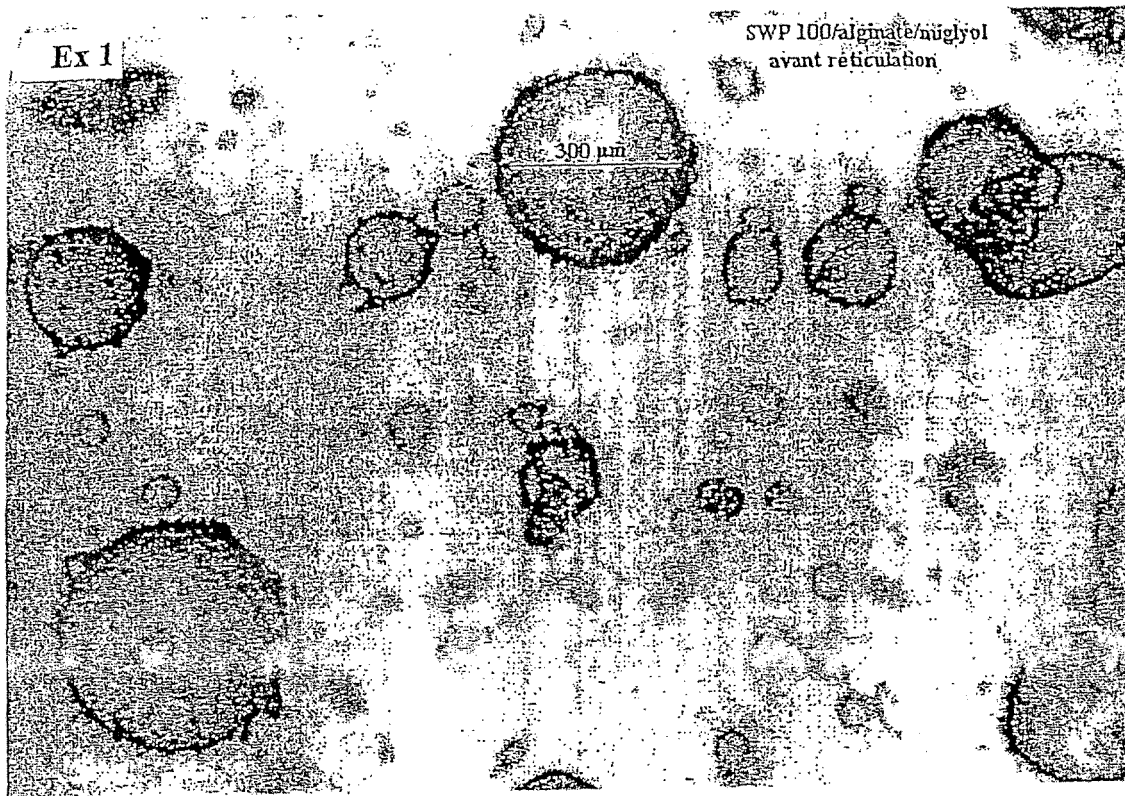


FIGURA 1