



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 076**

51 Int. Cl.:  
**B01J 13/08** (2006.01)  
**B01J 13/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07735133 .6**  
96 Fecha de presentación : **15.03.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2004321**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54 Título: **Procedimiento de preparación de microcápsulas por coacervación.**

30 Prioridad: **04.04.2006 EP 06112197**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.09.2011**

73 Titular/es: **FIRMENICH S.A.**  
**1, Route des Jeunes, P.O. Box 239**  
**1211 Geneva 8, CH**

72 Inventor/es: **Dardelle, Grégory y**  
**Normand, Valéry**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 365 076 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 preparación microcápsulas por coacervación.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar microcápsulas por coacervación y al uso de transglutaminasa para la reticulación en coacervación de complejos. La presente invención se refiere adicionalmente a los procedimientos de coacervación en los que se añade un material a encapsularse a una solución que comprende al menos un coloide por debajo de la temperatura de gelificación del coloide.

**Antecedentes de la invención y problemas a resolver**

10 Las típicas etapas de los procedimientos de coacervación implican generalmente (a) emulsión de un material generalmente hidrófobo en una solución que comprende hidrocoloides, (b) coacervación (separación de fase) que implica la formación de una fase de coacervados (c) formación de pared por agregación de hidrocoloides alrededor de gotitas de material hidrófobo emulsionado y (d) endurecimiento de pared, que se logra generalmente reticulando el hidrocoloide que forma la pared volviendo así el proceso irreversible y haciendo a las microcápsulas resultantes insolubles en agua, resistentes a estrés mecánico y a exposición a calor.

15 La etapa de formación de pared está dirigida generalmente por la diferencia de tensión superficial entre la fase de coacervados, el agua y el material hidrófobo. En la mayoría de los procedimientos de coacervación industrial, uno de los hidrocoloides usados en los procedimientos de coacervación está seleccionado de proteínas gelificables. Éstos son más fáciles de usar y menos propensos a agregación después de formación de la pared cuando la temperatura está por debajo de la temperatura de gelificación, si se comparan con hidrocoloides no gelificables. La gelificación, a su vez, generalmente se provoca bajando la temperatura de la mezcla de reacción por debajo del punto de gelificación del hidrocoloide gelificable. Este principio bien reconocido está ilustrado en el documento de los EE.UU. 2,800,457, donde el procedimiento de una coacervación de complejos se revela en detalle. En la columna 1 está escrito: La mezcla puede elaborarse así formando un sol acuoso de un coloide, emulsionando el aceite seleccionado en ello y mezclando la emulsión con un sol acuoso de otro coloide, o los dos soles pueden elaborarse y mezclarse y el aceite puede emulsionarse en ello. [...] Las etapas del procedimiento, a partir de la etapa de gelificación, se llevan a cabo con los ingredientes a una temperatura por encima del punto de gel de los materiales de coloide usados y la gelificación se provoca enfriando.

De forma similar, los documentos GB 920,868 y WO 2004/022220 A1 revelan ambos formar las emulsiones, que incluyen el material hidrófobo a encapsularse, a una temperatura por encima del punto de gel.

30 Hoy, aún se están llevando a cabo muchos procedimientos de coacervación industrial de acuerdo con este principio. En vista de esto, es un objetivo de la presente invención establecer diferentes maneras de elaborar microcápsulas por coacervación. En particular, es un objetivo de la invención reducir la duración de la etapa de calentamiento y acortar el tiempo general del procedimiento.

35 Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a la etapa de endurecimiento de la pared. Durante algunos años ya, se ha hecho un esfuerzo para reemplazar glutaraldehído y formaldehído, debido a su toxicidad, como agentes endurecedores por tratamiento enzimático con transglutaminasa para reticular el hidrocoloide. La transglutaminasa es una enzima que tiene su temperatura óptima en el intervalo de 45-55°C y su pH óptimo a aproximadamente 6-7.

40 De acuerdo con ello, los documentos US 6,475,542 B1 y US 6,592,916 B2 revelan procedimientos de coacervación simples, en los que la etapa de reticulación se comienza a 30°C pero después se lleva a cabo a una temperatura elevada de 40°C, estando cerca de la temperatura óptima de la enzima. En estas referencias se menciona que la reacción enzimática se lleva a cabo usualmente a 10 a 60°C.

45 En el documento EP 0,856,355 A2 se describe un procedimiento de coacervación de complejos con reticulación por transglutaminasa. De acuerdo con esta enseñanza, la temperatura durante la reticulación en coacervación de complejos se puede ajustar a 20°C a 27°C o a 5 a 10°C, pero preferentemente a lo último. A esta temperatura baja, se ajusta preferentemente el pH al pH óptimo, es decir, 7. Asimismo, en el documento de los EE.UU. 6,969,530 B1, la reticulación se lleva a cabo a temperaturas muy bajas, preferentemente aproximadamente 5°C.

50 En vista de la técnica anterior respecto a reticulación por transglutaminasa es un objetivo proporcionar un procedimiento de coacervación en el que la transglutaminasa se use en condiciones que son diferentes de aquellas reveladas hasta ahora. En particular, es un objetivo proporcionar un procedimiento industrialmente viable de microencapsulación por coacervación de complejos a temperaturas que no requieran enfriamiento prolongado y/o calentamiento prolongado a temperaturas extremas. Es un objetivo realizar reticulación a temperaturas ambiente o ligeramente por encima de la temperatura ambiente, pero aún por debajo del óptimo enzimático de 50°C, con el fin de evitar el gasto de energía por calentamiento excesivo. Especialmente con la etapa de endurecimiento por transglutaminasa, que generalmente toma de 5 a 24 horas y así es la etapa más larga del procedimiento de elaboración completa, hay un interés vital en evitar el mantenimiento de temperaturas elevadas (30°C o por encima) o de temperaturas por debajo de la temperatura ambiente (10°C o inferiores). En otras palabras, es un objetivo de la

presente invención proporcionar un procedimiento más seguro y más económico general para fabricar microcápsulas por coacervación.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento que es útil para encapsular una gran variedad de materiales diferentes, incluyendo compuestos altamente volátiles y/o compuestos sensibles al calor. Los aromas y las fragancias caen frecuentemente en esta categoría. Es un objetivo particular reducir la pérdida de componentes volátiles del material a encapsularse durante el procedimiento de encapsulación. Por esta razón es un objetivo proporcionar un procedimiento de microencapsulación a temperaturas comparativamente bajas, evitando así la pérdida de volátiles por evaporación. Además, principios bioactivos tales como aromas, fragancias, fármacos, por ejemplo, comprenden compuestos sensibles al calor. Para evitar degradación de tales compuestos, los procedimientos de encapsulación a baja temperatura proporcionarían una ventaja adicional.

Además, la presente invención tiene el objetivo de proporcionar micro-cápsulas que satisfagan los requerimientos religiosos y/o nutricionales en todo el mundo. En particular, la presente invención tiene el objetivo de usar hidrocoloides y en particular gelatina que es gelatina kosher y/o halal.

A este respecto, el documento WO 96/20612 desvela el uso de gelatina de pescado de peces de agua caliente en procedimientos de coacervación. De acuerdo con ello, se enseña que la microencapsulación por coacervación de complejos ha de llevarse a cabo a temperaturas elevadas, notablemente a temperaturas de aproximadamente 33-35°C. Mientras la etapa de "microencapsulación" en esta referencia se refiere probablemente a la etapa de formación de paredes, ella llega a ser de nuevo un objetivo de la presente invención para elaborar micro-cápsulas a temperaturas más bajas y así, en una manera más económica. Es en general un objetivo de la presente invención usar gelatina de pescado de peces de agua caliente en un procedimiento de coacervación, debido a que se ha mostrado que proporciona paredes de cápsulas que tienen buena resistencia al calor y estabilidad física frente a fuerzas de cizallamiento. Además, la gelatina de pescado, dado que es kosher, es susceptible de obtener el estatus de halal.

Dado que la temperatura de gelificación de gelatina de pescado de peces de agua caliente está generalmente por encima de 27°C, parece, de acuerdo con el conocimiento actual, virtualmente imposible llevar a cabo un procedimiento de coacervación por debajo de esta temperatura. Es así un objetivo de la presente invención usar gelatina de pescado de peces de agua caliente en procedimientos de coacervación y en particular en procedimientos de coacervación de complejos y al mismo tiempo, llevar a cabo la etapa de micro-encapsulación (formación de pared) por debajo de las temperaturas indicadas en la técnica anterior.

### **Sumario de la invención**

De forma notable, los presentes inventores encontraron que en los procedimientos de coacervación, la etapa de añadir un material hidrófobo a una solución hidrocoloidal se puede llevar a cabo a temperaturas por debajo de la temperatura de gelificación de una fase de coacervados, comprendiendo la última generalmente gelatina. En marcado contraste con la enseñanza de acuerdo con el conocimiento general, la formación de la pared de las microcápsulas obtenida por coacervación puede iniciarse por debajo de la temperatura de gelificación de la fase de coacervados basada en gelatina.

De acuerdo con ello, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de micro-encapsular un material hidrófobo por coacervación, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- preparar una solución hidrocoloidal disolviendo al menos una proteína y, opcionalmente, un polímero no proteico, en agua;
- enfriar la solución hidrocoloidal a una temperatura por debajo de la temperatura de gelificación de una fase de coacervados basada en la proteína;
- preparar, después de la etapa de enfriamiento, una emulsión y/o suspensión emulsionando y/o suspendiendo un material hidrófobo en la solución;
- formar una pared coloidal que comprende proteína alrededor de gotitas y/o partículas del material hidrófobo presente en una emulsión y/o suspensión; y,
- reticular la pared coloidal.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de preparar microcápsulas por coacervación de complejos, comprendiendo el procedimiento la etapa de reticular una pared hidrocoloidal de las microcápsulas con transglutaminasa a una temperatura en el intervalo de 13-25°C y a un pH en el intervalo de 4-6,5.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparar microcápsulas por coacervación de complejos, el procedimiento comprende la etapa de reticular un pared hidrocoloidal que comprende gelatina de pescado de peces de agua caliente con transglutaminasa, a una temperatura en el intervalo de 13-25°C.

Una ventaja importante de la presente invención reside en el hecho de que en gran medida, el procedimiento de coacervación de la presente invención puede ser realizado, si se desea, a temperatura ambiente ( $TA = 25^{\circ}C$ ) o a temperaturas ligeramente por encima o por debajo de las temperaturas ambiente, por ejemplo,  $\pm 10^{\circ}C$  de TA. De acuerdo con ello, el gasto de energía requerido de lo contrario para enfriamiento y/o calentamiento puede minimizarse. Además, la pérdida por evaporación de principios volátiles y/o degradación térmica se puede reducir si el procedimiento se lleva a cabo en la ausencia de calentamiento de gran alcance. En particular, el procedimiento tiene en cuenta llevar a cabo aquellas etapas que implican el material hidrófobo opcionalmente volátil y/o térmicamente sensible a temperaturas relativamente bajas, mientras que otras etapas, tales como disolver hidrocoloides, pueden llevarse a cabo aún a temperaturas elevadas.

Sorprendentemente, en el procedimiento de la presente invención, si la separación de fase se provoca bajando el pH, la etapa de reticulación puede llevarse a cabo a aproximadamente la fase de ajuste de pH para la separación de fase. De acuerdo con ello, se puede reducir el ajuste repetitivo de pH al óptimo de la etapa respectiva.

Sorprendentemente, la presente invención proporciona el uso de gelatina de pescado de peces de agua caliente y la reticulación por transglutaminasa, que conlleva ventajas en términos de seguridad en general así como en estatus halal y kosher.

### **Breve descripción de los dibujos**

**Figura 1** muestra la evolución de temperatura y velocidad de agitación así como las etapas de procedimiento principal en el curso del procedimiento de acuerdo con la presente invención. La Etapa A es la preparación de una solución diluida de goma arábiga y gelatina, B representa una etapa de enfriamiento rápido, C hace referencia a la introducción de la fase aceitosa, durante la fase, D, la temperatura se mantiene a  $25^{\circ}C$  y durante la etapa E tiene lugar el enfriamiento a la temperatura final.

**Figura 2** es una vista microscópica de las microcápsulas obtenidas en el Ejemplo 2.

**Figura 3** es una vista microscópica de las microcápsulas obtenidas en el Ejemplo 3.

### **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

La presente invención proporciona el procedimiento de micro-encapsular un material hidrófobo por coacervación. Un material hidrófobo, para el propósito de la presente invención, puede estar en el estado líquido o sólido durante el procedimiento de la invención. Preferentemente, es líquido. Los materiales hidrófobos se consideran generalmente como materiales que no son miscibles en agua a  $25^{\circ}C$  y, cuando se añaden a ella, forman una fase hidrófoba, separada. Para el propósito de la presente invención, el término material hidrófobo incluye material que está en el estado sólido a las temperaturas generalmente empleadas en procedimientos de coacervación, es decir, a menos de o igual a aproximadamente  $50^{\circ}C$ . Tal material sólido puede estar presente en forma de cristales, por ejemplo. Preferentemente, si el material sólido se licúa calentando por encima de su punto de fusión, ello forma una fase separada en agua a esa temperatura.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el material hidrófobo comprende aromas, fragancias, grasas, aceites, potenciadores de tacto en la boca, nutracéuticos, fármacos, otros componentes bioactivos o mezclas de los mismos.

Los términos "aromas" y "fragancias" como se usan en el presente documento se estima que definen una diversidad de materiales de aromas y fragancias tanto de orígenes sintéticos como naturales. Éstos incluyen compuestos individuales o mezclas. Ejemplos específicos de tales componentes puede encontrarse en la bibliografía, por ejemplo en el Handbook of Flavor Ingredients de Fenaroli, 1975, CRC Press; Synthetic Food Adjuncts, 1947 por M.B. Jacobs, editado por van Nostrand; o Perfume and Flavor Chemicals por S. Acrtander 1969, Montclair, N.J. (Estados Unidos). Estas sustancias se conocen por la persona experta en la técnica de perfumar, condimentar o aromatizar los productos del consumidor, es decir de impartir un olor y/o aroma o sabor a un producto de consumidor tradicionalmente perfumado o aromatizado, o de modificar el olor y/o el sabor del producto del consumidor.

Los nutracéuticos son materiales comestibles tales como alimentos o ingredientes de alimentos que proporcionan beneficio médico o de la salud a un individuo humano o animal tras el consumo. Los nutracéuticos incluyen, por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados y/o aceites que los comprenden, vitaminas, minerales, co-enzima Q, carnitina, extractos botánicos, por ejemplo de ginseng, Ginko biloba, hipérico, sabal, alimentos funcionales tales como avena, salvado, psilio, ligninas, prebióticos, aceite de colza y estanoles, por ejemplo. Preferentemente, el material hidrófobo comprende aromas y/o fragancias. Muchos principios bioactivos, pero en particular aromas y/o fragancias, o composiciones de aromas y/o fragancias, tienen una alta proporción de compuestos y/o componentes volátiles.

De acuerdo con ello, en una realización, el ingrediente comprende al menos el 5% en peso, preferentemente al menos el 10% en peso, preferentemente al menos el 20% en peso, más preferentemente al menos el 30% en peso y lo más preferentemente el 40% en peso de compuestos químicos que tienen una presión de vapor de  $> 0,007$  Pa a  $25^{\circ}C$ .

- Preferentemente, al menos el 10% en peso tienen una presión de vapor de  $> 0,1$ , más preferentemente, al menos el 10% en peso tienen una presión de vapor  $> 1$  Pa a  $25^{\circ}\text{C}$ , y lo más preferentemente al menos el 10 % en peso tienen una presión de vapor de  $> 10$  Pa a  $25^{\circ}\text{C}$ . El valor de  $0,007$  Pa a  $25^{\circ}\text{C}$  se selecciona debido a que ello comprende la mayoría de los compuestos usados por el químico de perfumes y/o perfumista. Los compuestos que reúnen estos
- 5 criterios se considera generalmente que tienen un carácter volátil. Además, los compuestos que permanecen inodoros debido a una menor volatilidad se excluyen. El límite del 10% en peso de tales compuestos se considera que constituye una parte sustancial del ingrediente. El procedimiento de la presente invención, sin embargo, tiene en cuenta encapsulación eficiente de más ingredientes volátiles que están presentes en cantidades mayores de los ingredientes totales.
- 10 Para el objeto de la presente invención y por conveniencia, la presión de vapor se determina por cálculo. De acuerdo con ello, el procedimiento revelado en "EPI suite"; 2000 U.S. Environmental Protection Agency, se usa para determinar el valor concreto de la presión de vapor de un compuesto o componente específico del ingrediente. Este programa informático está libremente disponible y se basa en los valores promedio de presiones de vapor obtenidas por diversos procedimientos de diferentes científicos.
- 15 El compuesto de fragancia limoneno se aduce para ilustrar la determinación de presión de vapor por cálculo: aplicando el procedimiento "EPI suite", se calcula el limoneno para tener una presión de vapor de aproximadamente  $193$  Pa a  $25^{\circ}\text{C}$ .
- Uno de los procedimientos de la presente invención comprende la etapa de preparar una solución hidrocoloidal disolviendo al menos una proteína y opcionalmente un polímero no proteico en agua. Preferentemente, el polímero no
- 20 proteico se carga de forma opuesta a la proteína. La palabra "comprender" o "comprendiendo", para el propósito de la presente invención se desea para querer decir "incluyendo entre otros". No se desea para querer decir "consistiendo sólo en".
- La presente invención comprende coacervación "simple" y "de complejos". En la coacervación simple, la proteína sola se usa para formar una pared de cápsula como separación de fase que está teniendo lugar. La coacervación de
- 25 complejos se refiere a procedimientos en los que un polímero no proteico cargado generalmente de forma opuesta y un polímero proteico forman conjuntamente la pared de la cápsula. De acuerdo con los principios de coacervación de complejos el procedimiento de la presente invención proporciona la adición opcional de un polímero de proteína cargado de forma opuesta, preferentemente un polisacárido, a la solución hidrocoloidal.
- El término coloides generalmente se refiere a hidrocoloides, es decir sustancias poliméricas que pueden disolverse en
- 30 agua, opcionalmente a temperaturas elevadas hasta  $90^{\circ}\text{C}$ , por ejemplo. Éstas abarcan polímeros tales como proteínas, polisacáridos y poliácidos, por ejemplo, que se conocen generalmente por ser útiles en procedimientos de coacervación.
- Los polímeros no proteicos típicos útiles en procedimientos de coacervación de complejos incluyen, en particular, polímeros cargados negativamente. Por ejemplo, pueden seleccionarse a partir de goma arábiga, xantana, sales de
- 35 alginato, derivados de celulosa, por ejemplo carboximetilcelulosa, sales de pectinato, carragenina, ácido poliacrílico y metacrílico, y/o mezclas de los mismos. Productos no proteicos adecuados adicionales se pueden derivar de la bibliografía, por ejemplo del documento WO 2004/022221, página 4, líneas 27-29.
- Las proteínas útiles en los procedimientos de coacervación incluyen albúminas, globulinas vegetales y gelatinas. El peso molecular de las proteínas está típicamente en el orden de  $40.000$  a  $500.000$  preferentemente  $20.000$  a  $250.000$ .
- 40 Algunos agregados de proteínas, sin embargo, pueden tener pesos moleculares del orden de millones.
- Preferentemente, la proteína es una gelatina. Es preferible usar gelatina que tenga buenas propiedades fisicoquímicas y químicas como se tipifica por buena capacidad de formación de películas, propiedades anfóteras, la controlabilidad de la cantidad de cargas por pH, y, preferentemente, la aparición del cambio de solución a gel a una
- 45 temperatura crítica. Indicado específicamente, se puede emplear cualquier gelatina que satisfaga la especificación para usar en producción de microcápsulas.
- La gelatina puede ser gelatina de pescado, de cerdo, de ternera, y/o de aves de corral, por ejemplo. De acuerdo con una realización preferida, la proteína es gelatina de pescado, de ternera o de aves de corral. De acuerdo con una realización más preferida, la proteína es gelatina de pescado de peces de agua caliente. Preferentemente, la gelatina de
- 50 pescado de peces de agua caliente tiene un valor de Bloom desde aproximadamente  $150$  a aproximadamente  $300$  bloom, más preferentemente desde aproximadamente  $200$  hasta aproximadamente  $300$  bloom. Preferentemente, la gelatina de pescado de peces de agua caliente tiene  $> 250$  bloom. De acuerdo con el conocimiento general, los peces de agua caliente son peces que son capaces de tolerar agua por encima de los  $27^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo prolongado.
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención la proteína es halal. De acuerdo con una realización preferida adicionalmente la proteína es kosher.
- 55 Preferentemente, en la solución hidrocoloidal acuosa, la proteína está presente en una cantidad desde  $0,5$ - $3,5\%$  en peso, preferentemente  $1$ - $2\%$  en peso.

Si está presente, el polisacárido está presente en cantidades desde 0,5-3,5%, preferentemente 1-2% en peso en la solución acuosa.

Las concentraciones anteriores pueden obtenerse después de una etapa de dilución opcional durante la que las soluciones de reserva más concentradas se llevan a concentraciones útiles para las etapas de inducir la formación de la fase de coacervados y/o de formar paredes de cápsulas. Una ventaja de empezar a partir de soluciones de reserva más concentradas es que el tamaño de partículas de emulsión puede controlarse más fácilmente en soluciones hidrocoloidales más concentradas. De acuerdo con una realización preferida, los procedimientos de la presente invención comprenden una etapa de inducir la formación de una fase de coacervados. La fase de coacervados está basada generalmente en la proteína, y opcionalmente, en el compuesto no polimérico. Esta etapa se refiere también como separación de fase. Esta etapa puede llevarse a cabo preferentemente modificando, preferentemente disminuyendo, el pH a o por debajo de el punto isoeléctrico de la proteína. Si un polímero no proteico, por ejemplo un polisacárido está presente, el pH está preferentemente ajustado de tal forma que las cargas positivas de la proteína estén neutralizadas por las cargas negativas del polímero no proteico.

La separación de fase se puede inducir por diversas otras vías, en general cambiando el ambiente fisicoquímico de la solución. Dependiendo del tipo de procedimiento de coacervación (simple; de complejos) se pueden aplicar diferentes modos de inducir separación de fase. Por ejemplo, la separación de fase se puede realizar por precipitación de proteína por sales, añadiendo un segundo componente de peso molecular alto tal como para inducir separación de fase entrópica del material de pared, por ejemplo.

Los procedimientos de la presente invención puede comprender la etapa de enfriar la solución hidrocoloidal a una temperatura por debajo de la temperatura de gelificación de una fase de coacervados basada en la gelatina. En procedimientos de coacervación simples, la fase de coacervados está libre de un polisacárido, mientras que en los procedimientos de coacervación de complejos la fase de coacervados comprende la proteína y al menos un polisacárido. Por conveniencia, para el propósito de la presente invención, la temperatura de gelificación de la proteína gelificable usada en el procedimiento de coacervación de la presente invención se considera que es igual a la temperatura de gelificación de la fase de coacervados de la presente invención.

La determinación de la temperatura de gelificación de la proteína gelificable, preferentemente gelatina, necesita establecerse, en parte mediante experimento. Para el propósito de la presente invención, la temperatura de gelificación corresponde a la temperatura crítica Tc descrita por Normand V. y Parker A. en "Scaling the Dynamics of Gelatin Gels", 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure, 2003, 185-189.

La temperatura Tc para cualquier proteína gelificable dada corresponde a la temperatura a la que las dinámicas de formación del gel exceden las dinámicas de fusión del gel en un sistema. De forma interesante, como se indica por Normand y Parker en 2003, la temperatura crítica para cualquier proteína gelificable es independiente de la concentración, a pesar del impacto de la última en las cinéticas de formación de gel.

De acuerdo con ello, para el propósito de la presente invención, la temperatura de gelificación, Tc, con una exactitud de ±1°C, se determinó sobre la base de la ecuación 1 en Normand y Parker, 2003:

$$\frac{G(t)}{\epsilon^\alpha (c - c_c)^\mu} = g\left(\frac{t}{\epsilon^\beta (c - c_c)^\nu}\right)$$

**Ecuación 1**

en la que ε es la temperatura reducida, ε = 1-T/Tc en °C, C es la concentración expresada como fracción de peso, t es tiempo y g(x) es una función escalante que define la forma de la curva maestra de acuerdo con Normand y Parker (2003). Los cuatro exponentes y la concentración crítica, Cc, son parámetros de ajuste. Para el propósito de la presente invención, los exponentes se considera que son constantes, es decir, α = 3,2, β = -9,3, μ = 2,3 y ν = -2,6. Cc se considera que es 0. Estos valores se usan como simplificación aproximada pero se encuentra que generalmente se ajustan a la situación encontrada con la mayoría de gelatinas.

Los valores para determinar G(t), el único elemento desconocido para calcular Tc, se miden experimentalmente, de acuerdo con el ajuste experimental proporcionado en lo siguiente.

De acuerdo con ello, un reómetro Physica MCR 300 se emplea (Anton Paar GmbH, Alemania, [www.anton-paar.com](http://www.anton-paar.com)), ajustado con una geometría de cono de 2°C de ángulo, 5 cm de diámetro y de placa. El intervalo es 50 μm. Se hacen medidas oscilatorias a una frecuencia de 1 Hz y a una tensión constante del 1%.

Se realizan cuatro (4) experimentos individuales para una duración de 20 horas, durante las que se controla la formación de gel. A partir de estos experimentos, se puede establecer una curva maestra, a partir de la que la temperatura crítica, Tc, se puede deducir siguiendo Normand y Parker (2003). En particular, se preparan cuatro

soluciones acuosas de proteínas gelificables, dos de las cuales están a concentraciones del 5% en peso, las otras dos al 10% en peso. Las soluciones se preparan disolviendo la gelatina en agua calentando la solución a 60°C y manteniendo la temperatura durante 30 minutos en condiciones de agitación lumínica. Después esto, las soluciones se enfrían a una velocidad de 2°C/min a las temperaturas de ensayo.

- 5 Para cada una de las dos concentraciones, se probaron dos temperaturas experimentales, 15°C y 20°C, respectivamente.

Empezando desde el momento en que se alcanza la temperatura experimental para una muestra dada, se hacen medidas reológicas de  $G(t)$  por oscilación como se indica anteriormente. El valor obtenido para  $G(t)$  caracteriza la resistencia mecánica proporcionada por un gel que se está formando. Se toman medidas de  $G(t)$  durante un total de 10 20 horas, cada minuto en la primera hora, cada 10 minutos en la segunda hora y una cada hora desde el comienzo de la tercera hora. A partir de los valores obtenidos de las medidas a lo largo del tiempo de cada una de las cuatro muestras, se pueden establecer las curvas similares a la Figura 1 de Normand y Parker (2003). La temperatura crítica es la temperatura  $T_c$  a la que se obtiene el mejor ajuste para el valor medido, estando constantes otros parámetros ( $C_c, \alpha, \beta, \mu, \nu$ ). El mejor ajuste está representado por una curva maestra basada en la Ecuación 1, que corresponde a la Figura 2 de Normand y Parker (2003). De este modo, la temperatura crítica se determina a una precisión de  $\pm 1^\circ\text{C}$ , según se menciona. De acuerdo con ello, a partir del ajuste experimental anterior en conjunción con la Ecuación 1, la temperatura de gelificación crítica de una proteína gelificable dada se puede establecer. De acuerdo con un procedimiento de la presente invención, la solución hidrocoloidal que comprende la proteína gelificable se enfría por debajo de esta temperatura, que se toma para ser la temperatura de gelificación de la fase de coacervados.

20 Para ilustración, se puede decir que la temperatura de gelificación exacta, sin embargo, está generalmente en el intervalo de 29°C-36°C. La temperatura de gelificación exacta, sin embargo, de cualquier gelatina seleccionada de cualquier gelatina de cerdo, de ternera, de aves de corral o de pescado de peces de agua caliente, por ejemplo, puede determinarse por la metodología anterior. De acuerdo con la presente invención, la temperatura de la solución se reduce preferentemente a o por debajo de estas temperaturas. De acuerdo con uno de los procedimientos de la presente invención, esta etapa de enfriamiento tiene lugar antes de añadir el material hidrófobo como se detalla adicionalmente a continuación. De acuerdo con ello, la solución se enfría a 0-5°C, preferentemente 1-4°C, más preferentemente 2-3°C por debajo de la temperatura de gelificación de la gelatina usada antes de añadir el material hidrófobo.

30 Según una realización preferida, el material hidrófobo se añade a la solución con la solución teniendo una temperatura en el intervalo de 22-33°C, preferentemente 24-32°C. La temperatura exacta dependerá de la temperatura de gelificación de la proteína particular usada, como se indica anteriormente en el ejemplo de proteínas gelificables tales como gelatina.

Los procedimientos de la presente invención pueden comprender la etapa de preparar, después de la etapa de enfriamiento, una emulsión y/o suspensión emulsionando y/o suspendiendo un material hidrófobo en la solución. Preferentemente, la etapa de enfriamiento antes de la adición de añadir material hidrófobo por suspensión o emulsión se lleva a cabo comparativamente rápido. Por ejemplo, esta etapa de enfriamiento preferentemente tiene lugar a aproximadamente 1,4 a 4°C/min, preferentemente a 1,8 a 2,5°C/min.

La emulsión y/o la suspensión puede estar preparada en una forma convencional. Preferentemente, el material hidrófobo se añade lentamente durante 3-10 min, preferentemente 4-6 min, con un agitador ajustándose a 300-400 rpm. Por un ajuste de la velocidad del agitador, el tamaño de gotitas emulsionadas de material hidrófobo se puede ajustar a un diámetro promedio de 20-1000  $\mu\text{m}$ , preferentemente 100-800, más preferentemente 150-700  $\mu\text{m}$  y lo más preferentemente de 250-350  $\mu\text{m}$ . El promedio se refiere a la media aritmética. Por simplicidad, el diámetro de las gotitas emulsionadas o de las partículas suspendidas se toma según el tamaño de las microcápsulas de la presente invención.

45 Los procedimientos de la presente invención puede comprender una etapa de formar una pared coloidal que comprende la proteína alrededor de las gotitas del material hidrófobo presente en una emulsión y/o suspensión. Esta etapa tiene lugar espontáneamente una vez se induce la etapa de formación de una fase de coacervados.

Los procedimientos de la presente invención comprenden preferentemente una etapa de reticular la pared coloidal. La reticulación se puede llevar a cabo de cualquier manera, por ejemplo añadiendo cantidades suficientes de formaldehído y/o de glutaraldehído. Preferentemente, sin embargo, la reticulación se lleva a cabo enzimáticamente. De acuerdo con una realización preferida, la reticulación se lleva a cabo con la enzima Transglutaminasa. Preferentemente, se añade transglutaminasa a las 10-100, preferentemente a las 30-60 unidades de actividad por gramo de gelatina. Esta enzima está bien definida y es obtenible comercialmente. La temperatura óptima de espécimen comercialmente disponible de esta enzima está generalmente por encima de los 40°C. De acuerdo con ello, es una ventaja de la presente invención que la reticulación se lleve a cabo a temperaturas ambiente, o, a temperaturas ligeramente enfriadas y/o calentadas, por ejemplo, relativamente cerca de la temperatura óptima de la enzima.

De acuerdo con una realización de la invención, reticulación, en particular con transglutaminasa, se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 11-27°C. Por ejemplo, la reticulación puede tener lugar a una temperatura en el rango de 11-27°C, preferentemente 12-26°C, más preferentemente 13-25°C, incluso más preferentemente 14-24°C, por ejemplo 14-22°C. De forma similar, el pH durante la etapa de reticulación está preferentemente ajustado a un nivel al que se puede llevar a cabo efectivamente la reticulación. Por ejemplo, si la reticulación está catalizada por la acción de transglutaminasa, el pH puede ajustarse preferentemente a 3-8, preferentemente 3,5-7. De acuerdo con una reticulación preferida, el pH está ajustado a 3,5-6,5, preferentemente 4-6, lo más preferentemente a 4-5,5. Una ventaja de la presente invención es que la reticulación tiene lugar a aproximadamente el mismo pH que la iniciación de la separación de fase, como se induce preferentemente por disminución de pH. El hecho de que no sea necesario ajuste de pH o sólo sea necesario ajuste de pH opcional reduce una etapa de procedimiento adicional y así constituye una ventaja adicional de la presente invención. Las microcápsulas producidas por los procedimientos de la presente invención se pueden usar en muchas clases de aplicaciones o productos finales del consumidor, por ejemplo aquellos en el campo de los aromas y fragancias. En particular, se pueden usar para la aromatización de las aplicaciones de cocción, carne, tabaco, fritada y enlatado (procesamiento térmico). Por otro lado, en el campo de la perfumería, se pueden usar para el perfumado de diversos productos del consumidor tales como limpiadores del hogar, toallitas prehumedecidas y productos de cuidado personal. Por lo tanto, las composiciones perfumantes o aromatizantes que comprenden microcápsulas de acuerdo con la invención, opcionalmente conjuntamente con otros ingredientes perfumantes o aromatizantes, son también aspectos de la presente invención.

### Modos de llevar a cabo la invención

La invención se describirá ahora para propósitos meramente ilustrativos pero no limitativos en los ejemplos a continuación.

#### Ejemplo 1

##### Microencapsulación de limoneno dentro de una cáscara hidrocoloidal por un procedimiento de coacervación de complejos

Gelatina de pescado de peces de agua caliente (200 Bloom, proporcionada por Weishardt) que tiene una temperatura de gelificación de 27°C y goma arábiga (Efficacia®, desde CNI) se usan como los hidrocoloides. Una solución de reserva de gelatina (solución A) se prepara mezclando 180 g de agua caliente desionizada y 20 g de gelatina en un recipiente hasta que se disuelve completamente; la solución se mantiene después a 40°C. Una solución de reserva de goma arábiga (solución B) se prepara mezclando 180 g de agua fría desionizada y 20 g de goma arábiga en un recipiente hasta que se disuelve completamente; la solución se calienta y guarda después a 40°C.

Se mezclan 105,4 g de solución A con 70,3 g de solución B en un recipiente sometido a agitación suave (la proporción gelatina/goma arábiga es 1,5:1). El pH se ajusta a 4,6 con una solución láctica acuosa al 50% p/p.

Se añaden 70,3 g de limoneno lentamente a la mezcla de gelatina y goma arábiga y se homogeneizan con un agitador a 350 RPM durante 5 minutos, tal como para alcanzar un tamaño de gotitas promedio de 300 µm.

El sistema se diluye después por la adición de 354,1 g de agua desionizada caliente, que lleva la concentración hidrocoloide total al 3,5% p/p. La mezcla se enfría finamente a 20°C a una velocidad de 0,5°C/min. La velocidad de agitación se disminuye ligeramente, el pH se ajusta a 4,5 y se añaden 4,22 g de transglutaminasa (ACTIVA® WM proporcionada por Ajinomoto, que tiene 100 UA/g de enzima) a la mezcla. La reticulación se deja continuar durante toda una noche a 20°C.

De este modo, se adquiere una suspensión acuosa de microcápsulas.

#### Ejemplo 2

##### Microencapsulación por procedimiento de coacervación de complejos-Adición de limoneno por debajo de la temperatura de gelificación

Gelatina de pescado de peces de agua caliente (200 Bloom, proporcionada por Weishardt) que tiene una temperatura de gelificación de 27°C y goma arábiga (Efficacia®, desde CNI) se usan como los hidrocoloides. Se prepara una solución de reserva de gelatina (solución A) mezclando 180 g de agua caliente desionizada y 20 g de gelatina en un recipiente hasta que ello está disuelto completamente; la solución se mantiene después a 40°C. Una solución de reserva de goma arábiga (solución B) se prepara mezclando 180 g de agua desionizada fría y 20 g de goma arábiga en un recipiente hasta que ello está disuelto completamente; la solución se calienta después y se mantiene a 40°C.

Se mezclan 105,4 g de solución A con 70,3 g de solución B en un vaso en agitación suave (la proporción gelatina/goma arábiga es 1,5:1). El sistema se diluye por la adición de 354,1 g de agua caliente desionizada, que lleva la concentración de hidrocoloides total a 3,4% p/p. La solución se mantiene al 40°C y el pH se ajusta a 4,6 con una solución láctica acuosa al 50% p/p. La mezcla se enfría después rápidamente a 25°C a una velocidad de 2°C/min.

A 25°C, se añaden lentamente 70,3 g de limoneno a la mezcla de gelatina y goma arábiga y se homogeneizan con un agitador a 350 RPM durante 5 minutos, tal como para alcanzar un tamaño de gotitas promedio de 300 µm. La emulsión se mantuvo después a 25°C durante 20 min y finalmente se enfría lentamente a 20°C a una velocidad de 0,1°C·min<sup>-1</sup>. La velocidad de agitación se disminuye ligeramente; el pH se ajusta a 4,5 y se añaden a la mezcla 4,22 g de transglutaminasa (ACTIVA® WM proporcionada por Ajinomoto). La reticulación se deja continuar durante toda una noche a 20°C.

Las microcápsulas así obtenidas se muestran en Figura 1. Las microcápsulas tienen un diámetro promedio de 250 µm. La Figura 2 ilustra la evolución del procedimiento en términos de temperatura y velocidad de agitación a lo largo del tiempo.

### 10 Ejemplo 3

#### Microencapsulación por procedimiento de coacervación de complejos con gelatina de cerdo

La gelatina de cerdo de tipo A (275 Bloom), que tiene una temperatura de gelificación por encima de 32°C, establecida de acuerdo a la metodología dada en la descripción y goma arábiga (Efficacia®, desde CNI) se usan como los hidrocoloides. Una solución de reserva de gelatina (solución A) se prepara mezclando 180 g de agua caliente desionizada y 20 g de gelatina en un recipiente hasta que ello está completamente disuelto; la solución se mantiene después a 40°C. Una solución de reserva de goma arábiga (solución B) se prepara mezclando 180 g de agua desionizada y 20 g de goma arábiga en un recipiente hasta que ello está completamente disuelto; la solución se calienta después y se mantiene a 40°C.

Se mezclan 105,4 g de solución A con 70,3 g de solución B en un recipiente sometido a agitación suave (la proporción gelatina/goma arábiga es 1,5:1). El sistema se diluye por la adición de 354,1 g de agua caliente desionizada, que lleva la concentración total de hidrocoloide a 3,4% p/p. La solución se mantiene a 40°C y el pH se ajusta a 4,5 con una solución láctica acuosa al 50% p/p. La mezcla se enfría entonces rápidamente a 31°C a una velocidad de 2°C · min<sup>-1</sup>. Se añaden lentamente 70,3 g de limoneno a la mezcla de gelatina y goma arábiga y se homogeneizó con un agitador a 350 RPM durante 5 min, tal como para alcanzar un promedio de tamaño de gotita de 300 µm. La emulsión se mantuvo entonces a 31°C durante 20 min y finalmente se enfrió lentamente a 20°C a una velocidad de 0,1°C · min<sup>-1</sup>. La velocidad de agitación está ligeramente disminuida; el pH se ajusta a 4,5 si es necesario y se añaden a la mezcla 4,22 g de transglutaminasa (ACTIVA® WM proporcionada por Ajinomoto). La reticulación se deja continuar durante toda una noche a 20°C.

Las microcápsulas así obtenidas se muestran en la Figura 3. Las microcápsulas tienen un diámetro promedio de 250 µm.

### Ejemplo 4

#### Microencapsulación según la invención con gelatina de ternera

La gelatina de ternera de tipo B (275 Bloom-Kosher) que tiene una temperatura de gelificación por encima de 32°, como se determina por la metodología proporcionada en la descripción, y la goma arábiga (Efficacia®, de CNI) se usan como los hidrocoloides. Una solución de reserva de gelatina (solución A) se prepara mezclando 180 g de agua desionizada caliente y 20 g de gelatina en un recipiente hasta que ello está disuelto completamente; la solución se mantiene después a 40°C. Una solución de reserva de goma arábiga (solución B) se prepara mezclando 180 g de agua desionizada fría y 20 g de goma arábiga en un recipiente hasta que ello está disuelto completamente; la solución se calienta después y se mantiene a 40°C.

105,4 g de solución A se mezcla con 70,3 g de solución B en un recipiente en agitación suave (la proporción gelatina/goma arábiga es 1,5:1). El sistema se diluye por la adición de 354,1 g de agua desionizada caliente, que lleva la concentración de hidrocoloide total al 3,4% p/p. La solución se mantiene a 40°C y el pH se ajusta a pH 3,75 con una solución láctica acuosa al 50% p/p. La mezcla se enfrió rápidamente después a 31°C a una velocidad de 2°C · min<sup>-1</sup>. Se añadieron 70,3 g de limoneno lentamente a la gelatina y a la mezcla de goma arábiga y se homogeneiza con un agitador a 350 RPM durante 5 min, tal como para alcanzar un tamaño de gotitas promedio de 300 µm. La emulsión se mantiene después a 31°C durante 20 min y finalmente se enfría lentamente a 20°C a una velocidad de 0,1°C · min<sup>-1</sup>. La velocidad de agitación está ligeramente disminuida; el pH se ajusta a 4,5 si es necesario y se añaden a la mezcla 4,22 g de transglutaminasa (ACTIVA® WM proporcionada por Ajinomoto). La reticulación se deja continuar durante toda una noche a 20°C.

Se obtiene así una suspensión acuosa de microcápsulas. Las microcápsulas tienen un diámetro promedio de 250 µm.

### Ejemplo 5

#### Microencapsulación de acuerdo con la invención con gelatina de aves de corral

La gelatina de aves de corral (200 Bloom) que tiene una temperatura de gelificación por encima de 32°, como se

determina por la metodología proporcionada en la descripción y la goma arábica (Efficacia®, de CNI) se usan como los hidrocoloides. Una solución de reserva de gelatina (solución A) se prepara mezclando 180 g de agua desionizada caliente y 20 g de gelatina en un recipiente hasta que ello está disuelto completamente; la solución se mantiene después a 40°C. Una solución de reserva de goma arábica (solución B) se prepara mezclando 180 g de agua desionizada fría y 20 g de goma arábica en un recipiente hasta que ello está disuelto completamente; la solución se calienta después y se mantiene a 40°C. 105,4 g de solución A se mezclan con 70,3 g de solución B en un recipiente en agitación suave (la proporción gelatina/goma arábica es 1,5:1). El sistema se diluye por la adición de 354,1 g de agua desionizada caliente, que trae la concentración de hidrocoloide total a 3,4% p/p. La solución se mantiene a 40°C y el pH se ajusta a 4,2 con una solución láctica acuosa al 50% p/p. La mezcla se enfría después a 31°C a una velocidad de 2°C · min<sup>-1</sup>. 70,3 g de limoneno se añadieron lentamente a la mezcla de gelatina y goma arábica y se homogeneizaron con un agitador a 350 RPM durante 5 min, tal como para alcanzar un tamaño de gotita promedio de 300 µm. La emulsión se mantiene después a 31°C durante 20 minutos y finalmente se enfría lentamente a 20°C a una velocidad de 0,1°C · min<sup>-1</sup>. La velocidad de agitación está ligeramente disminuida; el pH se ajusta a 4,5 si es necesario y se añaden 4,22 g de transglutaminasa (ACTIVA® WM proporcionada por Ajinomoto) a la mezcla. La reticulación se deja continuar durante toda una noche a 20°C.

Se obtiene así una suspensión acuosa de microcápsulas. Las microcápsulas tienen un diámetro promedio de 250 µm.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de microencapsular un material hidrófobo por coacervación, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 - preparar una solución hidrocoloide disolviendo al menos una proteína gelificable y opcionalmente, un compuesto polimérico no proteico, en agua;
  - enfriar la solución hidrocoloide a una temperatura por debajo de la temperatura de gelificación de una fase de coacervado basada en la proteína;
  - preparar, después de la etapa de enfriamiento, una emulsión y/o suspensión emulsionando y/o suspendiendo un material hidrófobo en la solución;
  - 10 - formar una pared coloidal que comprende la proteína alrededor de las gotitas y/o partículas del material hidrófobo presente en una emulsión y/o suspensión; y,
  - reticular la pared coloidal.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende la etapa de proporcionar la fase de coacervado basada en proteína induciendo separación de fase en la solución.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la reticulación se lleva a cabo con la enzima Transglutaminasa.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la reticulación tiene lugar a un pH en el intervalo de 3,5-6,5.
5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el material hidrófobo se añade a la solución con la solución teniendo una temperatura en el intervalo de 22-32°C.
- 20 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la reticulación se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 11-27°C.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la reticulación se lleva a cabo en el intervalo de 12-26°C.
- 25 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la reticulación se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 13-25°C.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína es gelatina de pescado de peces de agua caliente.
- 30 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el material hidrófobo comprende aromas, fragancias, grasas, aceites, potenciadores de sensación en boca, nutracéuticos, fármacos, otros ingredientes bioactivos y/o mezclas que incluyen varios o más de éstos.

Figura 1

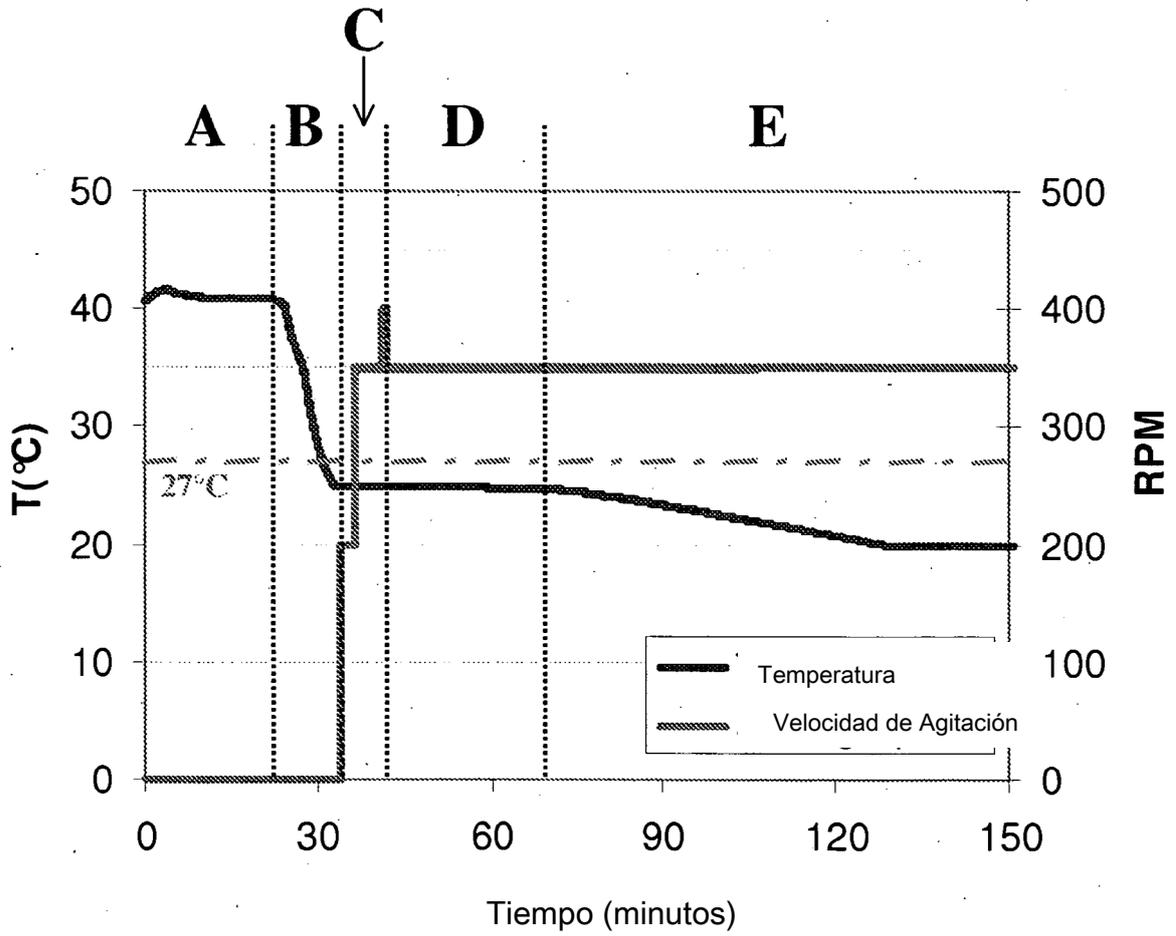


Figura 2

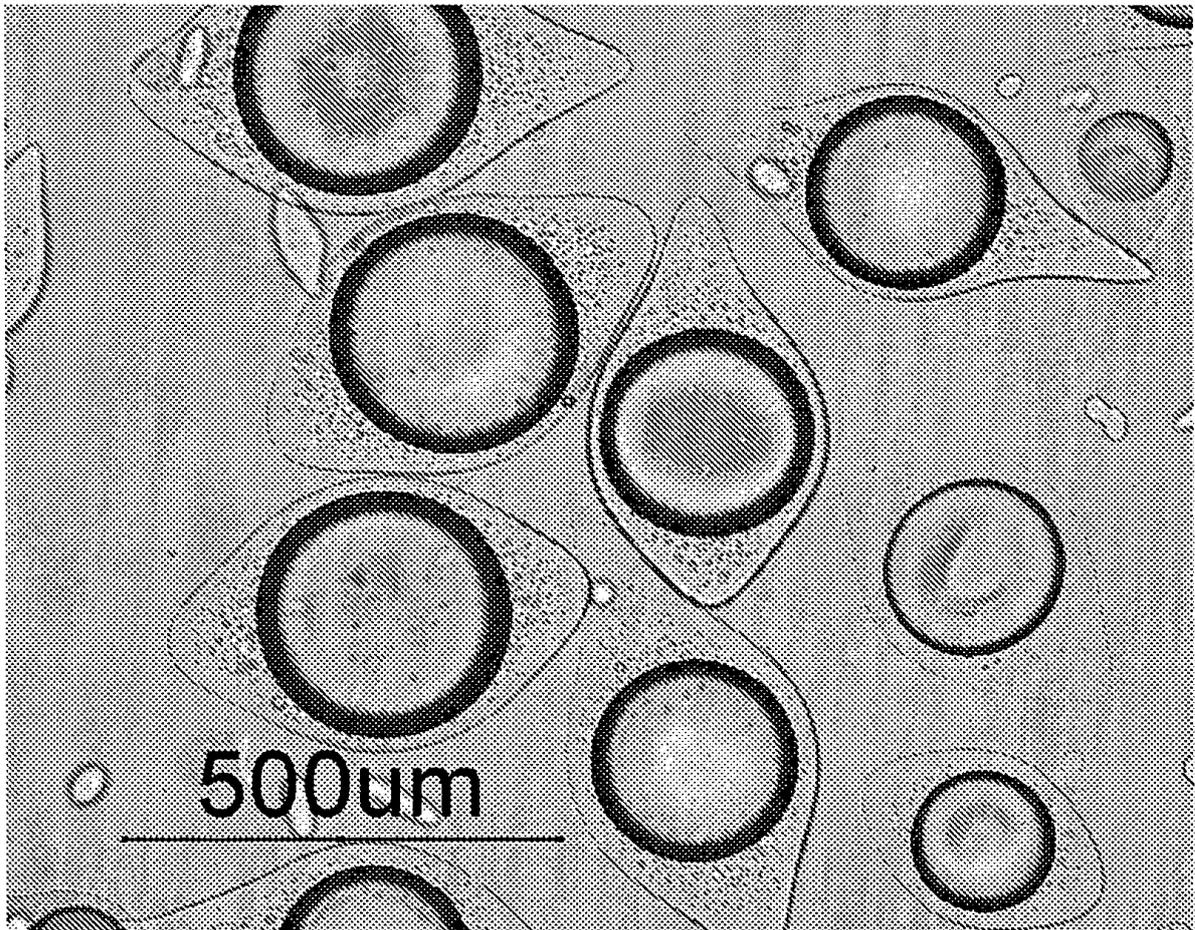


Figura 3

