

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 090**

51 Int. Cl.:

B01F 17/14 (2006.01)

B01F 17/42 (2006.01)

B01J 13/00 (2006.01)

B01F 3/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2008 E 08762097 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2129455**

54 Título: **Procedimiento de preparación de nano-emulsiones**

30 Prioridad:

14.02.2007 WO PCT/FR2007/000269

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

01.08.2014

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris , FR**

72 Inventor/es:

**BIBETTE, JÉRÔME;
GOUTAYER, MATHIEU y
TEXIER-NOGUES, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 482 090 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 de nano-emulsiones

5 [0001] La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de nano-emulsiones.

[0002] Las nano-emulsiones, llamadas a veces mini-emulsiones, emulsiones ultrafinas o también emulsiones de submicras, son emulsiones en las cuales la fase dispersada presenta un diámetro medio generalmente comprendido entre 10 y 200 nm.

10 [0003] A modo de recordatorio, una emulsión es una mezcla de dos sustancias líquidas no miscibles constituidas por una fase continua y una fase dispersada. Una sustancia está dispersada en la segunda sustancia (fase continua) en forma de pequeñas gotitas (fase dispersada). La mezcla permanece estable gracias a la acción de moléculas anfífilas, llamadas emulsificantes o tensioactivas, que se colocan en la interfaz entre las dos fases. Las emulsiones son unos edificios supramoleculares meta-estables. Estas estructuras se ilustran en la figura 3B y se diferencian de los polimerosomas y de las micelas.

15 [0004] Los polimerosomas (familia que comprende los liposomas) son unas vesículas que presentan un diámetro medio que varía desde algunas decenas a algunos miles de nanómetros. Estas vesículas están compuestas por una o varias bicapas de tensioactivos que permiten separar el medio intravesicular del medio exterior, siendo los dos medios de misma naturaleza, casi siempre acuosa (La figura 3A).

20 [0005] Las micelas consisten en unos agregados de tensioactivos autoensamblados, de algunos nanómetros de diámetro. Los tensioactivos se organizan para orientar su parte hidrófila hacia el exterior (el disolvente) y sus cadenas hidrofobas hacia el núcleo de la micela (ver La figura 3C).

25 [0006] Son conocidos varios procesos de preparación de nano-emulsiones de tipo aceite-en-agua.

30 [0007] De este modo se ha propuesto un procedimiento en el cual los tensioactivos se solubilizan en la fase continua, es decir el agua (Jafari, S. M.; He, Y.; Bhandari, B., *Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques*. Journal of Food Engineering 2007, 82, (4), 478-488 y Jafari, S. M.; He, Y. H.; Bhandari, B., Nano-emulsion production by sonication and microfluidization- A comparison. International Journal of Food Properties 2006, 9, (3), 475-485 y Mason, T. G.; Wilking, J. N.; Meleson, K.; Chang, C. B.; Graves, S. M., Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. Journal of Physics: Condensed Matter 2006, 18, (4), R635-R666).

35 [0008] EP 1 018 363 y EP 1 010 16 describen el procedimiento de preparación de una nanoemulsión aceite en el agua pudiendo contener un lípido anfífilo, en especial fosfolípidos que comprende una etapa de mezclado de una fase acuosa y de una fase oleosa en condiciones de agitación viva seguida de una homogeneización a alta presión con cizallamiento. La nanoemulsión de EP 1 018 363 contiene un tensoactivo escogido de entre los copolímeros bloques de óxido de etileno y de óxido de propileno y las de EP 1 010 416 contienen un tensoactivo sólido escogido de entre los ésteres grasos de glicerol.

40 [0009] EP 0 406 162 describe un procedimiento de preparación de una nanoemulsión que comprende la etapa de mezclado de una fase acuosa, de un aceite y de un tensoactivo anfótero en un homogeneizador a alta presión.

[0010] WO 2006/087156 describe un procedimiento de preparación de nano-emulsiones que comprende lipoaminoácidos y glicéridos de ácidos grasos como tensoactivos que comprende las etapas de:

- 50 - pre-calefacción de la fase oleosa que comprende el lipoaminoácido y dichos ácidos grasos,
- mezclado con la fase acuosa por aplicación de energía mecánica en aparatos emulsificantes.

[0011] Zeevi y otros, International Journal of Pharmaceutics, 108(1), 57-68, 1994 describen emulsiones de submicras obtenidas por:

- 55 - preparación de una fase acuosa que comprende eventualmente poloxámero,
- preparación de una fase oleosa que comprende aceite MCT, α -tocoferol, fosfolípidos,
- combinación de las dos fases calentadas seguida de una mezcla en un mezclador de elevado cizallamiento.

60 [0012] US 2006/0257493 describe un procedimiento de preparación de nano-emulsiones aceite en agua que comprende las etapas de:

- 65 - preparar una fase acuosa que comprende un lípido anfífilo y calentarla a 70°C,
- preparar una fase oleosa y calentarla a 70°C,
- mezclar las dos fases,
- homogeneizar.

[0013] Sin embargo, numerosos tensioactivos, en especial los fosfolípidos, son difícilmente solubles en la fase acuosa y en la fase oleosa. Es por lo tanto difícil incorporar en una de las fases la cantidad de tensoactivo necesaria para obtener nano-emulsiones con una fase dispersada de reducido diámetro.

[0014] Con el fin de poder solubilizar una cantidad más importante de tensoactivo, se ha propuesto solubilizar los tensioactivos en un disolvente, el cual a continuación se evapora para formar un film de tensioactivos. A continuación se añade el agua o la solución acuosa y la mezcla se somete a ultrasonidos con el fin de dispersar el film de tensioactivos. En la solución de liposomas obtenida se dispersa a continuación el aceite. La mezcla bifásica obtenida se vuelve a someter a sonicación o tratado mediante un microfluidizador para dar como resultado la nano-emulsión (Vyas, T. K.; Shahiwala, A.; Amiji, M. M., Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. International Journal of Pharmaceutics 2008, 347 (1-2), 93-101) y US 200510079131. Sin embargo, este procedimiento es largo y requiere varias etapas de sonicación. Además, la presencia de liposomas residuales en la nano-emulsión no se puede excluir.

[0015] La presente invención tiene como objetivo principal proponer un procedimiento de preparación de nano-emulsiones que permita superar uno o varios de los inconvenientes mencionados más arriba.

[0016] En particular, la invención tiene como objetivo proponer un procedimiento simple que permita el acceso a unas nano-emulsiones que tienen una fase dispersada de diámetro reducido.

[0017] La invención también como objetivo proponer un procedimiento de preparación de nano-emulsiones que permite controlar el tamaño de la fase dispersada y/o la naturaleza físico-química de la interfaz.

[0018] El objetivo se alcanza mediante un procedimiento de preparación de una nano-emulsión en el cual al menos un tensoactivo poco soluble, en especial un fosfolípido, se solubiliza en la fase oleosa gracias a la presencia de un lípido solubilizante.

[0019] Por lo tanto, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de nano-emulsiones que comprende al menos una fase continua acuosa y al menos una fase dispersada oleosa, que comprende las etapas consistentes en:

- (i) preparar la fase oleosa que comprende al menos un lípido anfífilo y al menos un lípido solubilizante;
- (ii) dispersar la fase oleosa en una fase acuosa bajo la acción de un cizallamiento suficiente para formar una nano-emulsión; y
- (iii) recuperar la nano-emulsión así formada en el cual el lípido solubilizante consiste en una mezcla de glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden de 0 % a 20 % en peso de ácidos grasos en C8, 0 % a 20 % en peso de ácidos grasos en C10, 10 % a 70 % en peso de ácidos grasos en C12, 5% a 30% en peso de ácidos grasos en C14, 5% a 30% en peso de ácidos grasos en C16 y 5% a 30% en peso en C18.

[0020] El procedimiento según la presente invención presenta en particular las ventajas siguientes:

- solamente comprende que una única etapa de sonicación;
- permite la disolución de cantidades elevadas de tensioactivos y por ello la preparación de nano-emulsiones cuya fase dispersada presenta un diámetro reducido;
- es rápida puesto que la fase acuosa está poco cargada con tensoactivo y por lo tanto es menos viscosa y puede ser emulsionada rápidamente; y
- evita la formación de liposomas y permite así el acceso a una nano-emulsión homogénea.

[0021] En el sentido de la presente invención:

- el término « gotita » engloba a la vez las gotitas de aceite líquido propiamente dichas así como las partículas sólidas provenientes de emulsiones de tipo aceite-en-agua en las cuales el aceite utilizado es un aceite cristalizante. En este último caso, se habla a menudo también de emulsión sólida.
- el término « lípido » designa pequeñas moléculas principalmente constituidas por carbono, hidrógeno y oxígeno y que presentan una densidad inferior a la del agua. Los lípidos pueden estar en el estado sólido, como en las ceras, o líquido, como en los aceites.
- el término « anfífilo » designa especies químicas que tienen un grupo hidrófilo y un grupo hidrófobo. Los compuestos anfífilos tienen propiedades tensioactivas, es decir modifican la tensión superficial entre dos superficies.
- el término « fosfolípido » se refiere a lípidos que tienen un grupo fosfato, en especial los fosfoglicéridos. Casi siempre, los fosfolípidos comprenden un extremo hidrófilo formado por el grupo fosfato eventualmente sustituido y dos extremos hidrófobos formados por cadenas de ácidos grasos. Entre los fosfolípidos, se citan en particular la fosfatidilcolina, la fosfatidil etanolamina, la fosfatidil inositol, la fosfatidil serina y la esfingomielina.
- el término « lecitina » designa la fosfatidilcolina, es decir un lípido formado a partir de una colina, un fosfato, un glicerol y dos ácidos grasos. Cubre de manera más amplia los fosfolípidos extractos de seres vivos, de origen

vegetal o animal, en la medida en que están mayoritariamente constituidos por fosfatidilcolina. Estas lecitinas constituyen generalmente mezclas de lecitinas que llevan diferentes ácidos grasos.

- el término « nano-emulsión » designa en el sentido de la invención una emulsión en la cual la fase dispersada presenta un diámetro medio comprendido entre 10 y 200 nm, preferentemente entre 10 y 150 nm y muy especialmente entre 10 y 80 nm.

[Fase oleosa]

[0022] La nano-emulsión preparada según el procedimiento de la invención comprende una fase oleosa y una fase acuosa.

[0023] La fase oleosa comprende al menos un lípido anfífilo y al menos un lípido solubilizante.

[0024] Con el fin de formar una nano-emulsión estable, es generalmente necesario incluir en la composición al menos un lípido anfífilo a título de tensoactivo.

[0025] La naturaleza anfífila del o de los tensoactivos garantiza la estabilización de las gotitas de aceite en el seno de la fase continua acuosa. Casi siempre, se utilizan al menos dos tensoactivos para preparar una nano-emulsión. El tensoactivo puede por otro lado presentar otros efectos en la aplicación prevista de la nano-emulsión.

[0026] Según la invención, la fase oleosa comprende al menos un lípido anfífilo.

[0027] Estos lípidos anfífilos pueden ser de origen natural o sintético. Preferentemente, se escogen de entre los fosfolípidos; el colesterol; los lisolípidos; las esfingomielinas; los tocoferoles; los glucolípidos; las estearilaminas y las cardiolipinas.

[0028] La lecitina es el lípido anfífilo preferido.

[0029] Según un modo de realización particular, todo o parte del lípido anfífilo puede tener una función reactiva, tal como un grupo maleimida, tiol, amina, éster, oxiamina o aldehído. Esta variante permite la hibridación de compuestos funcionales al nivel de la interfaz. El lípido anfífilo reactivo está incorporado en la capa formada en la interfaz que estabiliza a la fase dispersada, donde es susceptible de acoplarse con un compuesto reactivo presente en la fase acuosa.

[0030] Generalmente, la fase oleosa comprenderá de 1 a 99% en peso, preferentemente de 5 a 75% en peso y muy especialmente de 20 a 60% en peso de lípido anfífilo.

[0031] El lípido solubilizante es un lípido que presenta una afinidad con el lípido anfífilo suficiente para permitir su solubilización. En el caso donde el lípido anfífilo es un fosfolípido, puede tratarse en especial de derivados del glicerol, y en particular de glicéridos obtenidos por esterificación de glicerol con ácidos grasos.

[0032] El lípido solubilizante utilizado se escoge ventajosamente en función del lípido anfífilo utilizado. Presentará generalmente una estructura química parecida, con la finalidad de asegurar la solubilización deseada. Puede tratarse de un aceite o de una cera.

[0033] Los lípidos solubilizantes, en particular para los fosfolípidos son los glicéridos de ácidos grasos, en especial de ácidos grasos saturados, y en particular de ácidos grasos saturados que comprenden de 8 a 18 átomos de carbono, más preferentemente de 12 a 18 átomos de carbono.

[0034] Se trata de glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden de 0% a 20% en peso de ácidos grasos en C8, 0% a 20% en peso de ácidos grasos en C10, 10% a 70% en peso de ácidos grasos en C12, 5% a 30% en peso de ácidos grasos en C14, 5% a 30% en peso de ácidos grasos en C16 y 5% a 30% en peso de ácidos grasos en C18.

[0035] Especialmente preferidas lo son las mezclas de los glicéridos semisintéticos sólidos a temperatura ambiente vendidos mediante la denominación comercial Suppocire®NC por la empresa Gattefossé. Los Suppocire® de tipo N se obtienen por esterificación directa de ácidos grasos y de glicerol. Se trata de glicéridos semi-sintéticos de ácidos grasos saturados de C8 a C18, cuya composición cuali-cuantitativa se indicada en la siguiente tabla.

[0036] La cantidad de lípido solubilizante puede variar ampliamente en función de la naturaleza y de la cantidad de lípido anfífilo presente en la fase oleosa.

[0037] Generalmente, la fase oleosa comprenderla de 1 a 99% en peso, preferentemente de 5 a 75% en peso y muy especialmente de 10 a 50% en peso de lípido solubilizante.

Tabla: Composición en ácidos grasos del Suppocire NC® de Gattefossé

Longitud de cadenas	[% en peso]
C8	0,1 a 0,9
C10	0,1 a 0,9
C12	25 a 50
C14	10 a 24,9
C16	10 a 24,9
C18	10 a 24,9

[0038] Preferentemente, la fase oleosa comprende por otro lado uno o varios otros aceites.

5 [0039] Los aceites utilizados en el marco del procedimiento de la invención presentan preferentemente un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) inferior a 8 y aún más preferentemente comprendida entre 3 y 6.

[0040] Ventajosamente, los aceites se utilizan sin modificación química o física previamente a la formación de la emulsión.

10 [0041] Según las aplicaciones previstas, los aceites pueden ser escogidos de entre los aceites biocompatibles, y en particular de entre los aceites de origen natural (vegetal o animal) o sintético.

15 [0042] De entre estos aceites, se pueden en especial citar los aceites de origen natural vegetal entre los cuales figuran en especial los aceites de soja, de lino, de palma, de maní, de olivas, de pepitas de uvas y de girasol; los aceites sintéticos entre los cuales figuran en especial los triglicéridos, diglicéridos y los monoglicéridos. Estos aceites pueden ser de primera expresión, refinados o inter-esterificados.

[0043] Los aceites preferidos son el aceite de soja y el aceite de lino.

20 [0044] Generalmente, la fase oleosa comprenderá de 1 a 70% en peso, preferentemente de 2 a 50% en peso y muy especialmente de 5 a 30% en peso de aceite.

25 [0045] Obviamente, la fase oleosa puede contener además otros aditivos tales como colorantes, estabilizantes, conservantes, fluoroforos o principios activos farmacológicos en la cantidad apropiada.

[0046] En el marco del procedimiento según la invención, se mezclan primero los diferentes constituyentes oleosos para preparar una premezcla oleosa para la fase dispersada de la emulsión. La mezcla puede eventualmente ser facilitada por puesta en solución de uno de los constituyentes o de la mezcla completa en un disolvente orgánico apropiado, seguida de la evaporación del disolvente, un premezclado oleosa homogéneo para la fase dispersada.

30 [0047] Por otro lado, se prefiere realizar el premezclado a una temperatura a la cual el conjunto de los ingredientes son líquidos.

35 [Fase acuosa]

[0048] La fase acuosa realizada en el procedimiento según la invención está preferentemente constituida por agua y/o un tampón tal como un tampón fosfato como por ejemplo PBS ("*Phosphate Buffer Saline*") o una solución salina, en especial de cloruro de sodio.

40 [0049] Además, comprende eventualmente otros ingredientes, de entre los cuales preferentemente un co-tensioactivo.

45 [0050] Los co-tensioactivos utilizables en las emulsiones conformes a la presente invención son preferentemente tensioactivos hidrosolubles.

[0051] Los tensioactivos hidrosolubles comprenden preferentemente al menos una cadena compuesta por motivos de óxido de etileno (PEO o PEG) o de óxido de etileno y de óxido de propileno. Preferentemente, el número de motivos en la cadena varía entre 2 y 500.

50 [0052] A título de ejemplo de co-tensioactivos, se puede en particular citar los compuestos conjugados polietilenglicol/ fosfatidil-etanolamina (PEG-PE), los éteres de ácido graso y de polietilenglicol tales como los productos vendidos bajo las denominaciones comerciales Brij® (por ejemplo Brij® 35, 58, 78 o 98) por la empresa ICI Americas Inc., los esteres de ácido graso y de polietilenglicol tales como los productos vendidos bajo las denominaciones comerciales Myrj® por la empresa ICI Americas Inc. (por ejemplo Myrj® 45, 52, 53 o 59) y los copolímeros bloques de óxido de etileno y de óxido de propileno tales como los productos vendidos bajo las denominaciones comerciales Pluronic® por la empresa BASF AG (por ejemplo Pluronic® F68, F127, L64, L61, 10R4,

17R2, 17R4, 25R2 o 25R4) o los productos vendidos bajo la denominación comercial Synperonic® por la empresa Unichema Chemie BV (por ejemplo Synperonic® PE/F68, PE/L61 o PE/L64).

5 **[0053]** La fase acuosa comprende preferentemente de 0 a 50% en peso, preferentemente de 1 a 30% en peso y muy especialmente de 5 a 20% en peso de co-tensioactivo hidrosoluble.

10 **[0054]** Según un modo de realización preferido, la fase continua comprende también un agente espesante tal como un glicerol, un sacárido, oligosacárido o polisacárido, una goma o también una proteína, preferentemente glicerol. Efectivamente, la utilización de una fase continua de viscosidad más elevada facilita el emulsionado y permite así reducir el tiempo de sonicación.

[0055] La fase acuosa comprende ventajosamente de 0 a 50% en peso, preferentemente de 1 a 30% en peso y muy especialmente de 5 a 20% en peso de agente espesante.

15 **[0056]** Obviamente, la fase acuosa puede contener además otros aditivos tales como colorantes, estabilizantes y conservantes en cantidad apropiada.

[0057] La premezcla acuosa para la fase continua de la emulsión puede prepararse por simple mezclado de los diferentes constituyentes con el medio acuoso escogido.

20 **[Emulsionado]**

[0058] Según el procedimiento de la invención, la nano-emulsión se prepara por dispersión de cantidades apropiadas de fase oleosa y de fase acuosa bajo el efecto de un cizallamiento.

25 **[0059]** La proporción de fase oleosa y de fase acuosa es muy variable. Sin embargo, Casi siempre, las nano-emulsiones se prepararán con 1 a 50%, preferentemente 5 a 40% y muy especialmente 10 a 30% en peso de fase oleosa y 50 a 99%, preferentemente 60 a 95% y muy especialmente 70 a 90 % en peso de fase acuosa.

30 **[0060]** Ventajosamente, la fase oleosa es a continuación dispersada en la fase acuosa en el estado líquido. Si una de las fases se solidifica a temperatura ambiente, es preferible realizar la mezcla con las dos fases calentadas a una temperatura superior o igual a la temperatura de fusión.

35 **[0061]** El emulsionado bajo el efecto de cizallamiento se realiza preferentemente con ayuda de un sonicador o de un microfluidizador. Preferentemente, la fase acuosa y la fase oleosa se introducen en las proporciones deseadas en un recipiente cilíndrico apropiado y luego el sonicador se hunde en el medio y se pone en marcha durante una duración suficiente para obtener una nano-emulsión, Casi siempre algunos minutos.

40 **[0062]** Se obtiene entonces una nano-emulsión homogénea en la cual el diámetro medio de las gotitas de aceite es superior a 10 nm e inferior a 200 nm.

[0063] Antes del acondicionamiento, la emulsión puede ser diluida y/o esterilizada, por ejemplo por filtración. La etapa de filtración permite por otro lado eliminar los eventuales agregados que podrían formarse en el transcurso de la preparación de la emulsión.

45 **[0064]** La invención se explicará con más detalle mediante ejemplos ofrecidos a título ilustrativo y las figuras adjuntas, que muestran:

50 La figura 1: una representación esquemática de la producción de nano-emulsiones por ultrasonidos según el estado de la técnica;

La figura 2: una representación comparativa de la producción de nano-emulsiones por ultrasonidos según un modo de realización preferido de la invención;

La figura 3: una representación esquemática de la estructura de una nano-emulsión (b) con respecto a los sistemas micelares (c) y a los polimerosomas (a), teniendo las estructuras todas agua para fase continua;

55 La figura 4: la distribución en tamaño ponderada en volumen de una nano-emulsión preparada según el ejemplo 1, estando el porcentaje en volumen indicado en función del tamaño en nm;

La figura 5: el diámetro medio de la fase dispersada de las nano-emulsiones según el ejemplo 1 (j) y el ejemplo 2 en función de la cantidad total de tensioactivos con ratio molar tensioactivo / co-tensioactivo igual;

60 La figura 6: el diámetro medio de la fase dispersada de las nano-emulsiones según el ejemplo 1 (j) y el ejemplo 3 en función de la cantidad de tensioactivos y de co-tensioactivos; y

La figura 7: la evolución en el tiempo del diámetro medio de nano-emulsiones preparadas según el ejemplo 1.

EJEMPLOS

65 **EJEMPLO 1**

Formulación de una nano-emulsión agua-en-aceite

[0065] En un recipiente apropiado, se ha preparado una pre-mezcla constituida por 0,125 g de aceite de soja (Sigma-Aldrich), de 0,375 g de glicéridos semisintéticos vendidos bajo la denominación comercial Suppocire® NC (Gattefossé) y de 0,350 g de lecitina de soja (enriquecida con 75 % de fosfatidilcolina) vendida por la empresa Lipoïd con la denominación comercial Lipoïd® S75.

[0066] Estos compuestos se han disuelto en cloroformo, a continuación se ha evaporado la solución bajo presión reducida y se ha secado a 50°C para obtener una premezcla que se presenta en la forma de un aceite viscoso que se solidifica al enfriarlo. La mezcla obtenida se ha calentado a 50-60°C de tal manera que pueda mantenerse líquida para el emulsionado.

[0067] La fase continua se preparó por mezclado de 0,125 g de glicerol, de 0,55 g de estearato de polioxietileno a 50 moles de óxido de etileno vendido bajo la denominación comercial Myrj® 53 por la empresa ICI Americas Inc y de solución tampón fosfato, llamado PBS (acrónimo inglés de Fosfato Buffer Solución) para completar a 4,150 g. Esta solución se ha mantenido en caliente (50-60°C) antes de el emulsionado.

[0068] A continuación se ha añadido la solución acuosa a la mezcla aceite/lecitina. Luego la solución bifásica se ha puesto en contacto con un sonicador AV505® dotado de una sonda cónica de 3 mm de diámetro (Sonics, Newtown) inmersa aproximadamente 1 cm en la solución. La solución se ha sometido a ultrasonidos durante 5 minutos con el sonicador ajustado a 30 % de la potencia máxima, con la secuencia de pulsos siguiente: 10 segundos de sonicación / 30 segundos de reposo. Durante la sonicación, la solución se mantuvo a 40°C.

[0069] El diámetro medio de la fase dispersada de la emulsión preparada se determina por difusión dinámica de luz (Zetasizer nano ZS, Malvern Instrument)

[0070] La fase dispersada de las nano-emulsiones así obtenidas presenta un diámetro medio de 35 nm (Ver la figura 4). La tabla 1 resume la composición de la formulación de la nano-emulsión obtenida. La figura 7 ilustra la estabilidad a lo largo del tiempo de nano-emulsiones preparadas según el ejemplo 1.

Tabla 1: formulación de la nano-emulsión del ejemplo 1

Ejemplo 1		Masa [mg]	% en peso	[mmol]
Fase dispersada	aceite de soja	125	2,5	
	Suppocire	375	7,5	
Tensioactivos	Lecitina	350	7	0,467
	Myrj 53	550	11	0,233
Fase acuosa	Glicerol	125	2,5	
	Solución tampón	3475	69,5	
Total		5000	100	

EJEMPLOS 2A a 2K**Efecto de la Cantidad total de tensoactivo y se co-tensoactivo**

[0071] Con la finalidad de estudiar el efecto de los tensioactivos en la formulación del ejemplo 1, este se ha reproducido haciendo variar la cantidad de lecitina y de Myrj 53, pero para conservar el ratio molar entre estos [lecitina / (lecitina + Myrj® 53) constante a un valor de 0,67. La cantidad y la composición de la fase dispersada están sin cambios con respecto a la formulación del ejemplo 1. También se ha modificado la cantidad de solución tampón consecuentemente para obtener 5 g de solución.

[0072] En los ejemplos 2A a 2B, en los que la cantidad de co-tensoactivo es importante, el glicerol está reemplazado por solución tampón puesto que la solución es suficientemente viscosa. La tabla 2 resume las concentraciones utilizadas para las diferentes formulaciones, preparadas tal como se indica en el ejemplo 1.

Tabla 2: formulación de las emulsiones de los ejemplos 2A a 2K

Ejemplo	Tensoactivo (lecitina)		Co-tensioactivo (Myrj®53)		Cantidad total de tensioactivo [mmol]	Diámetro medio [nm]
	Masa [mg]	% en peso	Masa [mg]	% en peso		
1	350	7	550	11	0,7	36,6
2A	420	8,4	660	13,2	0,84	35,1
2B	385	7,7	605	12,1	0,77	34,2
2C	315	6,3	495	9,9	0,63	37,4
2D	280	5,6	440	8,8	0,56	40,3
2E	245	4,9	385	7,7	0,49	45,7
2F	210	4,2	330	6,6	0,42	72,7
2G	175	3,5	275	5,5	0,35	92,9
2H	140	2,8	220	4,4	0,28	127
2I	105	2,1	165	3,3	0,21	170
2J	70	1,4	110	2,2	0,14	177
2K	35	0,7	55	1,1	0,07	272

5 **[0073]** Se constata que el diámetro medio de la fase dispersada de las nano-emulsiones obtenidas disminuye cuando la cantidad total de tensioactivos aumenta (ver la figura 5). La formulación del ejemplo 1 está representada en la figura 5 por un cuadrado.

10 **[0074]** Por lo tanto es posible controlar el tamaño de la fase dispersada de la nano-emulsión ajustando la cantidad de tensioactivos. Sin embargo, se pueden distinguir dos regímenes diferentes: por debajo de 0,5 mmol de tensioactivos, el diámetro medio varía rápidamente con la cantidad de tensioactivos, mientras que más allá de esta concentración, el diámetro medio evoluciona poco. Por lo tanto, las formulaciones que comprenden más de 0,5 mmol de tensioactivos parecen más robustas puesto que una reducida variación de la cantidad de tensioactivo apenas tendrá efectos en el tamaño final de la fase dispersada de las nano-emulsiones

15 **EJEMPLOS 3A a 3F**

Efecto del ratio molar tensioactivo / co-tensioactivo

20 **[0075]** Luego se ha reproducido el ejemplo 1 pero haciendo variar el ratio tensioactivos / co-tensioactivos, manteniendo sin embargo constante la cantidad molar total de tensioactivos.

[0076] En los ejemplos 3A a 3F, donde la cantidad de co-tensioactivo es importante, el glicerol está reemplazado por la solución tampón puesto que la solución es suficientemente viscosa. La tabla 3 resume las concentraciones utilizadas para las diferentes formulaciones, preparadas tal como se indica en el ejemplo 1.

Ejemplo	Tensoactivo (lecitinas)		Co-tensioactivo (Myrj®53)		Diámetro medio [nm]
	Masa [mg]	% en peso	Masa [mg]	% en peso	
1	350	7,0	550	11	34,3
3A	516	10,3	0	0	215
3B	387	7,7	428	9	48,8
3C	258	5,2	856	17	30,6
3D	172	3,4	1142	23	27,4
3E	129	2,6	1284	26	27,5
3F	0	0,0	1712	34	26,1

25 **[0077]** El tamaño de la fase dispersada de las emulsiones obtenidas se indica en función de la concentración de lecitina y de Myrj® 53, estando la formulación nominal representada por un cuadrado. Los datos se ilustran en el diagrama de la figura 6.

30 **[0078]** Se constata que el tamaño de las gotitas disminuye con la cantidad de tensioactivo, pero también con la cantidad de co-tensioactivo. Se puede destacar por otro lado que el efecto del co-tensioactivo aparece claramente más importante al respecto.

35 **[0079]** Por lo tanto el ratio tensioactivo / co-tensioactivo también permite controlar el diámetro de la fase dispersada afectando al mismo tiempo a la composición de la interfaz de la emulsión.

EJEMPLO 4

40 **Efecto de la longitud de las cadenas hidrófilas del co-tensioactivo**

[0080] Con la finalidad de estudiar el efecto de la longitud de las cadenas hidrófilas del co-tensioactivo, se ha reproducido la formulación del ejemplo 1 pero sustituyendo el Myrij® 53 por unos co-tensioactivos que llevan cadenas polioxietileno de longitud diferente.

5 [0081] Se han probado los co-tensioactivos siguientes: el Tween® 80, el Myrj® 45, el Myrj® 49, y el Myrj® 59. La tabla 4 siguiente resume las características de estos co-tensioactivos.

[0082] El co-tensioactivo en la formulación del ejemplo 1 ha sido reemplazado por la misma cantidad en moles, es decir 0,233 mmol.

10

Tabla 4: Características de los co-tensioactivos polietoxilados

Co-tensioactivo polietoxilado	Número de unidades polioxietileno (POE)	Peso molecular (g/mol)
Tween® 80	20	1310
Myrj® 45	8	636
Myrj® 49	20	1164
Myrj® 53	50	2484
Myrj® 59	100	4684

EJEMPLO 5

15 Efecto de la longitud de las cadenas hidrófilas del co-tensioactivo en una formulación que comprende tensioactivo y co-tensioactivo en cantidad equimolar

[0083] Se ha profundizado en el estudio del efecto de la longitud de las cadenas hidrófilas de los co-tensioactivos con una segunda serie de experiencias realizada como en el ejemplo 4, pero a partir de una formulación en la cual el tensioactivo y el co-tensioactivo están presentes en cantidad equimolar (0,344 mmol).

20

[0084] Los resultados en términos de diámetro medio de la fase dispersada se resumen para los ejemplos 4 y 5 en la tabla 5 siguiente.

25

Tabla 5: Diámetro medio de la fase dispersada de las emulsiones según los ejemplos 4 y 5

Co-tensioactivo	Ejemplo 4 [nm]	Ejemplo 5 [nm]
Tween® 80	65,5	28,2
Myrj® 45	182	-
Myrj® 49	132	31,4
Myrj® 53	34,7	29,5
Myrj® 59	15,3	37,7

[0085] Se constata que la longitud de las cadenas hidrófilas en el co-tensioactivo tiene una influencia probada en el diámetro medio de la fase dispersada de la emulsión obtenida para las formulaciones del ejemplo 4. Efectivamente, el diámetro medio de la fase dispersada de la emulsión disminuye claramente cuando la longitud de las cadenas aumenta.

30

[0086] Sin embargo se destaca que la nano-emulsión del ejemplo 4 con un co-tensioactivo que presenta cadenas muy largas (Myrj® 59) resulta ser inestable. Por otro lado, el diámetro muy reducido de la fase dispersada (15,3 nm) deja suponer la presencia de una solución micelar antes que una nano-emulsión.

35

[0087] En cambio, la formulación equimolar en tensioactivos del ejemplo 5 lleva a unas nano-emulsiones en las cuales el diámetro de la fase dispersada permanece cercana de 30 nm. Por lo tanto, en este caso se puede cambiar la longitud de las cadenas hidrófilas sin afectar de manera importante al diámetro de las partículas.

40

EJEMPLOS 6A a 6G

Efecto de la composición de la fase dispersada

45 [0088] Finalmente, se ha estudiado el impacto de la composición de la fase oleosa en el diámetro medio de la fase dispersada variando la naturaleza y la proporción en aceite y lípido solubilizante.

[0089] En la formulación según el ejemplo 1, la fase dispersada está compuesta por una mezcla de 75 % en peso de lípido solubilizante (Suppocire® NC) y 25 % en peso de aceite de soja. El lípido solubilizante es rico en ácidos grasos de cadena media saturados, mientras que el aceite de soja es rico en ácidos insaturados de tipo w6 (C18:2) y el aceite de lino es rico en ácidos insaturados de tipo w3 (C18:3).

50

[0090] Por lo tanto, se han preparado nano-emulsiones cuya fase dispersada está compuesta por lípido solubilizante puro, una mezcla de lípido solubilizante y de aceite de soja o de aceite de lino. La composición en lípido solubilizante y aceite respectiva de las nano-emulsiones se indicada en porcentaje en peso en la tabla 8 siguiente.

5 **[0091]** En lo que respecta al resto, conservando la formulación según el ejemplo 5, esta formulación tiene como ventaja reducir la cantidad de lecitina con respecto a la formulación del ejemplo 1, lo que permite disminuir la cantidad de lípido solubilizante garantizando a la vez una buena solubilización de la lecitina. La formulación de las nano-emulsiones fuera de fase oleosa se resume en la tabla 7 siguiente.

10

Tabla 7: Formulación de las nano-emulsiones según el ejemplo 6

		Masa mg	%	[mmol]
Fase dispersada	Aceite total	500	10	
Tensioactivos	Lecitina	258	5	0,344
	Myrj®53	827,5	16,55	0,344
Fase acuosa	Glicerol	125	2,5	
	Solución tampón	3289,5	65,95	

[0092] La siguiente tabla 8 resume el diámetro medio de la fase dispersada en las nano-emulsiones obtenidas con la composición indicada.

15

Tabla 8: Evolución del diámetro medio en función de la composición de la fase aceite

Ejemplo	Suppocire® NC % en peso	Aceite de soja % en peso	Aceite de lino % en peso	Diámetro medio (d, nm)
6A	75	25	0	29
6B	50	50	0	30,4
6C	25	75	0	30,9
6D	100	0	0	29,2
6E	75	0	25	29
6F	50	0	50	28,3
6G	25	0	75	30

20

[0093] Estos resultados muestran que la composición de la fase dispersada de la emulsión puede ser modificada sin hacer variar su diámetro, lo que permite así modificar las características de solubilización sin afectar al diámetro de la fase dispersada de las nano-emulsiones.

25

[0094] El procedimiento descrito permite por lo tanto obtener fácilmente y rápidamente nano-emulsiones estables y homogéneas. El procedimiento permite además controlar el diámetro medio de la fase dispersada, la interfaz y/o la fase dispersada de las nano-emulsiones mediante la concentración y el tipo de tensioactivos utilizados tal como se ha descrito más arriba.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Procedimiento de preparación de nano-emulsiones que comprende al menos una fase continua acuosa y al menos una fase dispersada oleosa, que comprende las etapas consistentes en:
- (i) preparar la fase oleosa que comprende al menos un lípido anfílico y al menos un lípido solubilizante;
- (ii) dispersar la fase oleosa en una fase acuosa bajo la acción de un cizallamiento suficiente para formar una nano-emulsión; y
- 10 (iii) recuperar la nano-emulsión así formada, en el cual el lípido solubilizante consiste en una mezcla de glicéridos de ácidos grasos saturados que comprenden de 0% a 20% en peso de ácidos grasos en C8, 0% a 20% en peso de ácidos grasos en C10, 10% a 70% en peso de ácidos grasos en C12, 5% a 30% en peso de ácidos grasos en C14, 5% a 30% en peso de ácidos grasos en C16 y 5% a 30% en peso de ácidos grasos en C18.
- 15 **2.** Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el lípido anfílico se escoge de entre los fosfolípidos, el colesterol, los lisolípidos, las esfingomielinas, los tocoferoles, los glucolípidos, estearilaminas, las cardiolipinas de origen natural o sintético.
- 3.** Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el cual el lípido anfílico es un fosfolípido.
- 20 **4.** Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual la fase oleosa comprende además al menos un aceite.
- 5.** Procedimiento según la reivindicación 4, en el cual el aceite presenta un balance hidrófilo-lipófilo (HLB) comprendido entre 3 y 6.
- 25 **6.** Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual la fase oleosa comprende al menos un aceite que se escoge de entre el aceite de soja y el aceite de lino.
- 7.** Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual la fase acuosa comprende además un co-tensoactivo.
- 30 **8.** Procedimiento según la reivindicación 7, en el cual el co-tensoactivo comprende al menos una cadena compuesta por motivos de óxido de etileno o de óxido de etileno y de óxido de propileno.
- 35 **9.** Procedimiento según la reivindicación 7, en el cual el co-tensoactivo se escoge de entre los compuestos conjugados polietilenglicol/ fosfatidil-etanolamina (PEG-PE), los éteres de ácido graso y de polietilenglicol, los ésteres de ácido graso y de polietilenglicol y los copolímeros bloques de óxido de etileno y de óxido de propileno.
- 10.** Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual la fase continua de la emulsión comprende un tampón fisiológicamente aceptable.
- 40 **11.** Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el cual la acción de cizallamiento es ejercida por sonicación.
- 45 **12.** Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el cual la fase oleosa se prepara por puesta en solución de todo o parte de los constituyentes en un disolvente apropiado y evaporación subsecuente del disolvente.

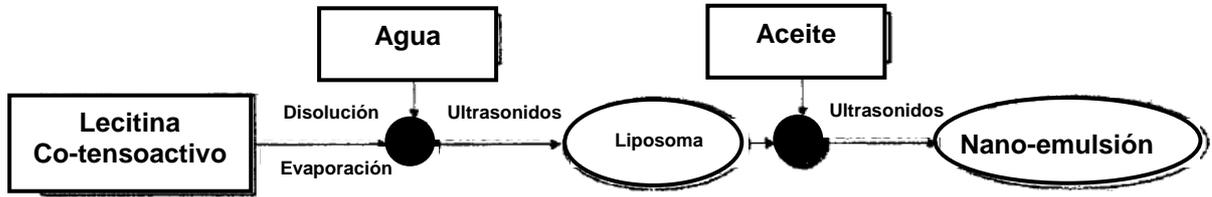


FIG.1

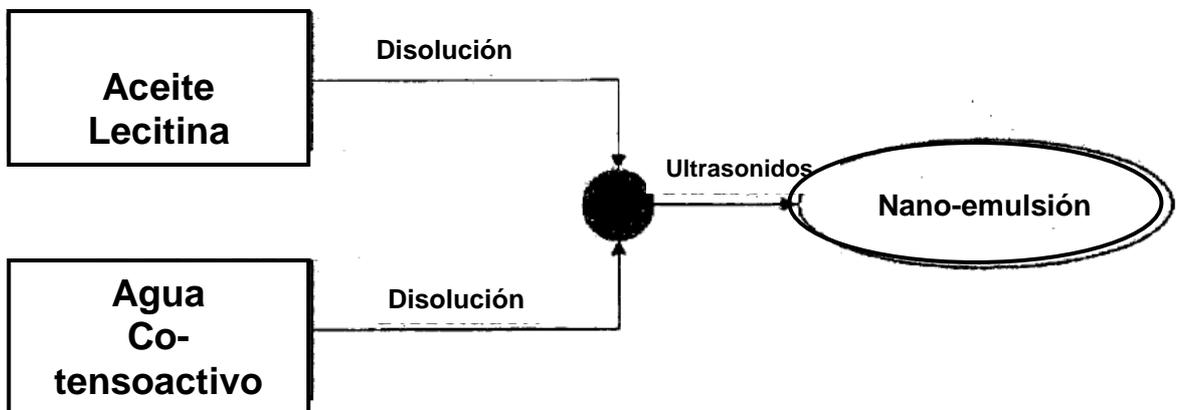


FIG.2

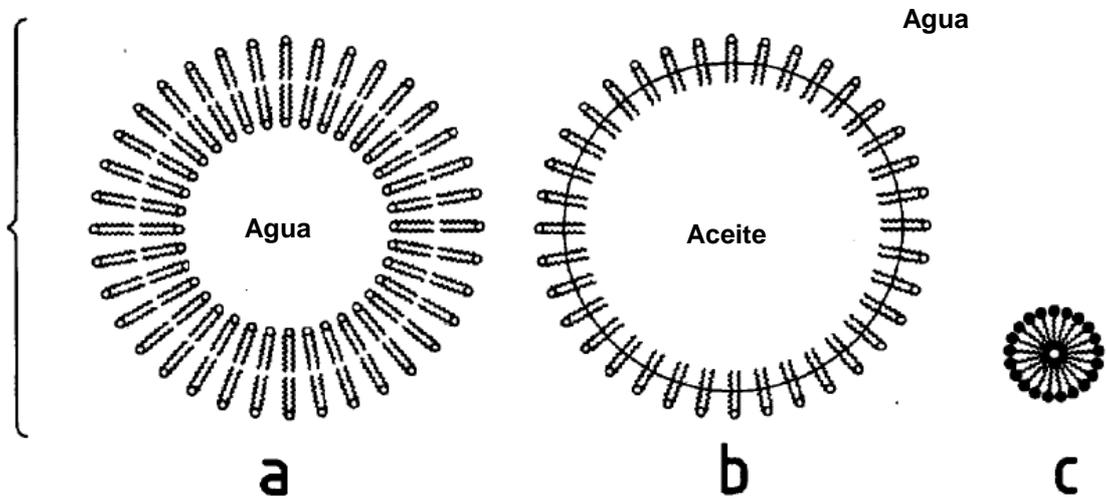


FIG.3

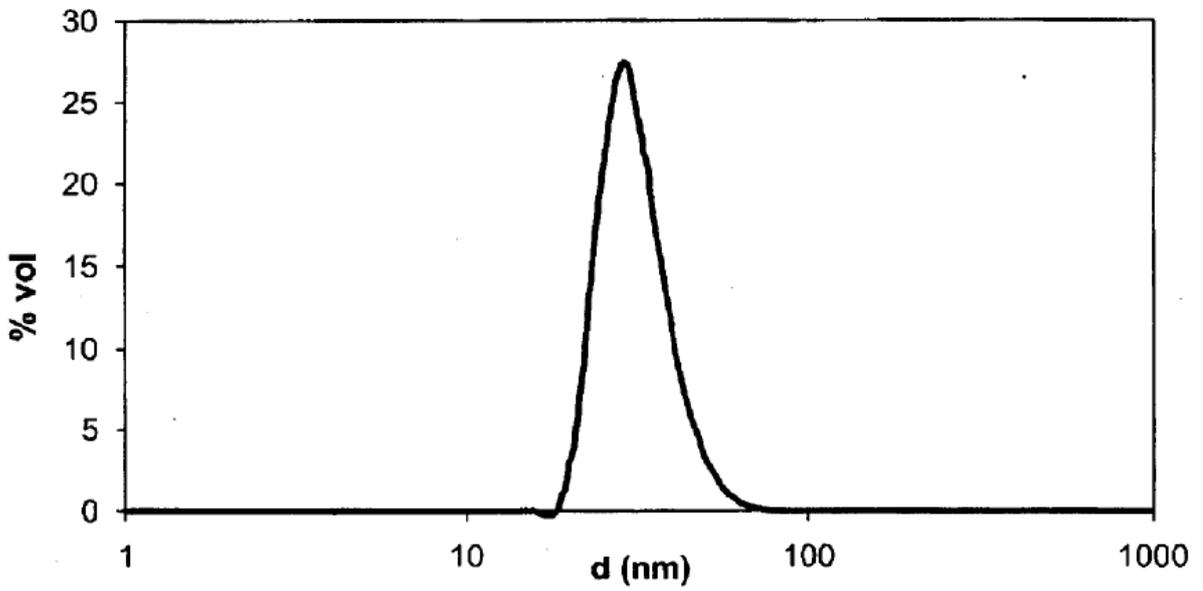


FIG.4

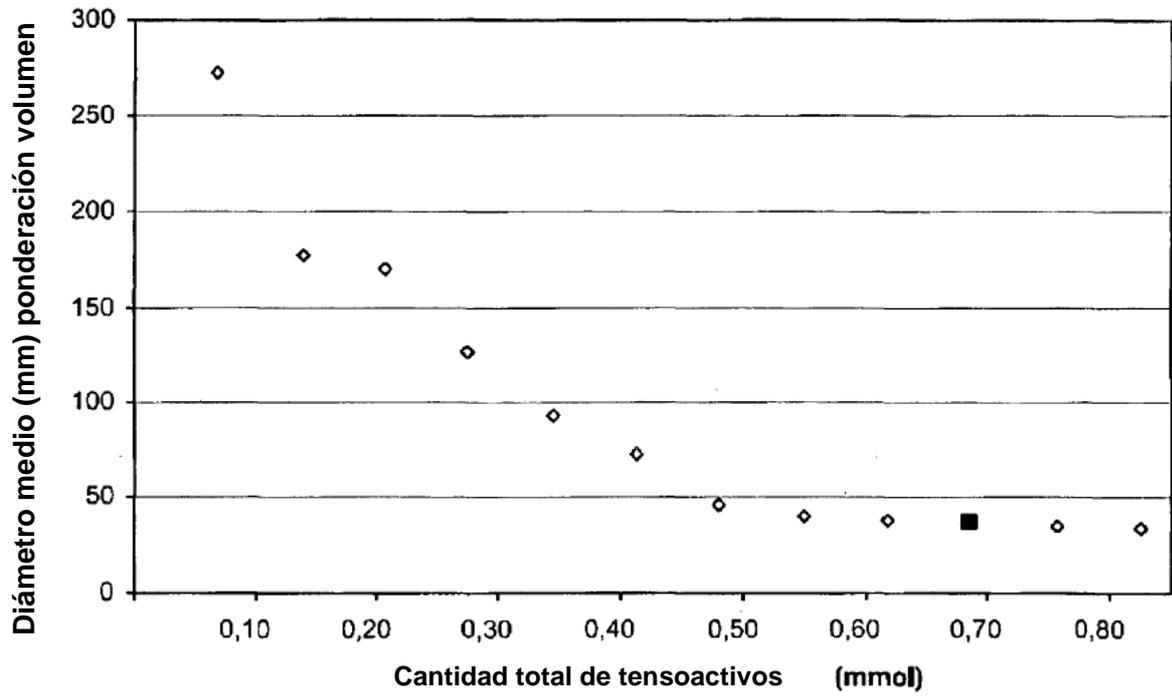


FIG.5

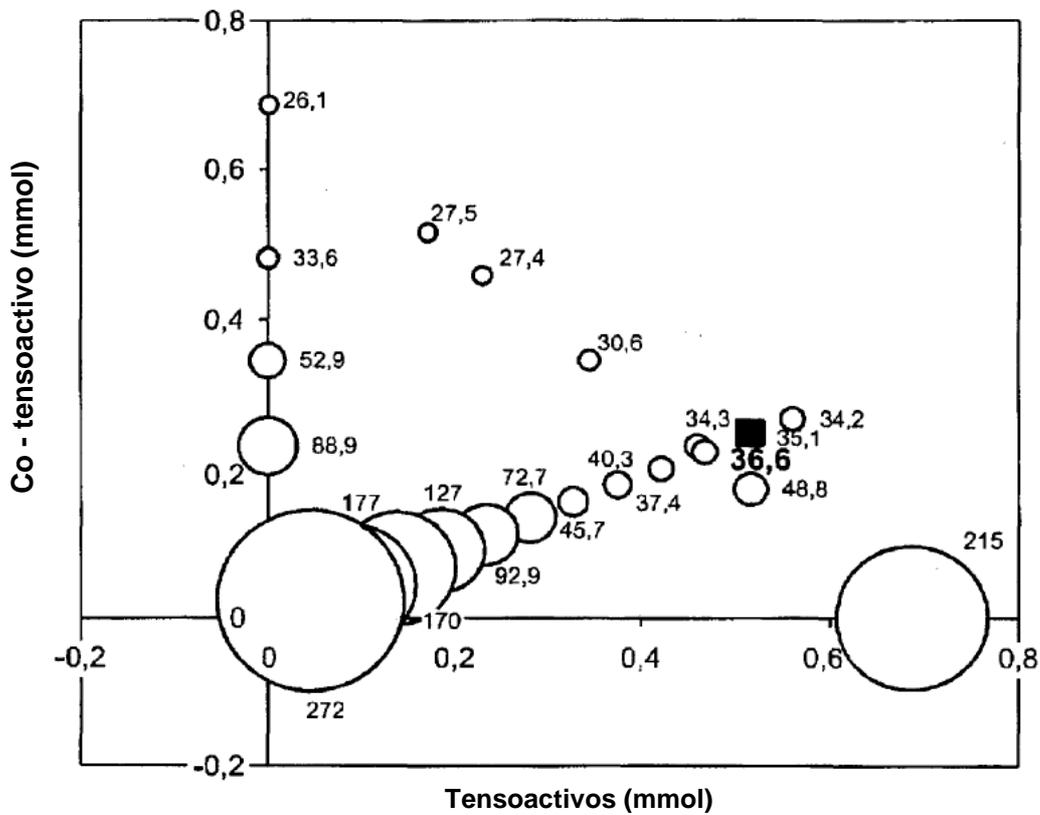


FIG.6

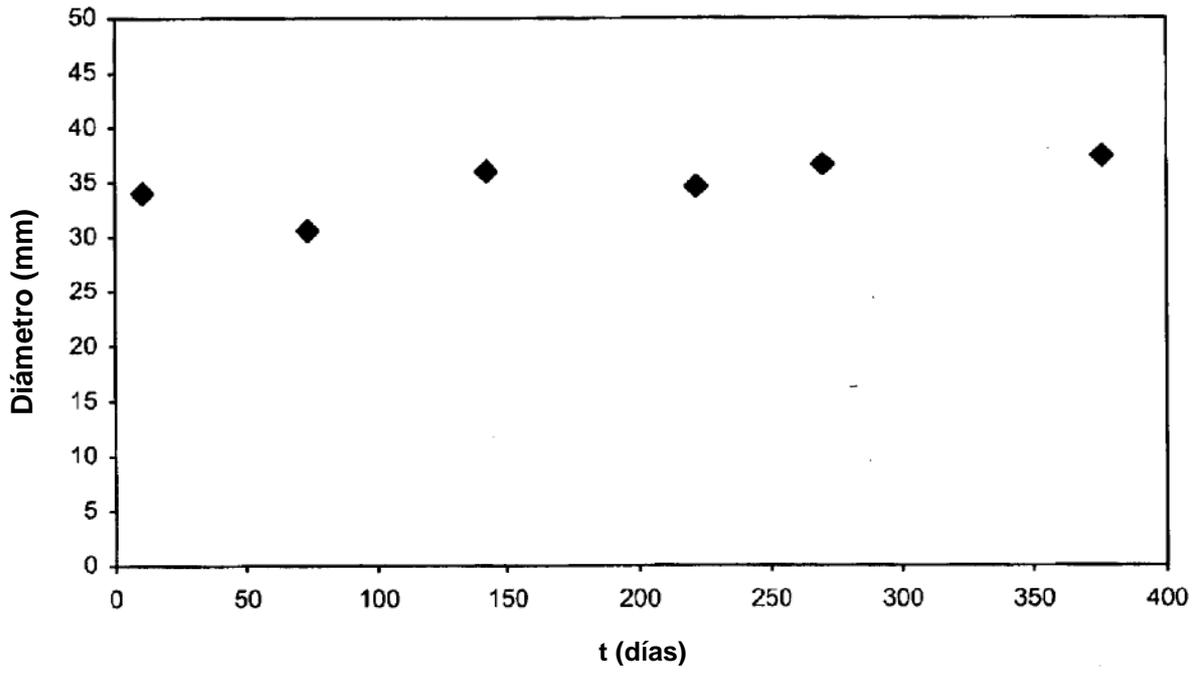


FIG.7