

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 542**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/107** (2006.01)

**A23D 7/01** (2006.01)

**A23D 7/005** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2005 E 05779908 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 1758556**

54 Título: **Emulsión aceite-en-agua para administrar**

30 Prioridad:

**18.05.2004 EP 04011749**

**16.09.2004 EP 04022046**

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

**06.08.2014**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)  
Avenue Nestlé 55  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**YAGHMUR, ANAN;  
DE CAMPO, LILIANA;  
SAGALOWICZ, LAURENT;  
LESER, MARTIN;  
GLATTER, OTTO;  
MICHEL, MARTIN y  
WATZKE, HERIBERT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 483 542 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

Emulsión aceite-en-agua para administrar

## 5 ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se refiere a una emulsión del tipo aceite-en-agua en la cual las gotitas de aceite presentan una nanoestructura autoensamblada.

## 10 ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

Emulsiones en la industria

15 Las emulsiones son sistemas coloidales corrientes en muchos productos industriales, tales como alimentos, cosméticos o preparados farmacéuticos. Están hechas de gotitas de aceite dispersadas en una fase acuosa continua. Las gotitas de aceite dispersas están estabilizadas por moléculas surfactantes que forman una capa de adsorción alrededor de las gotitas de aceite. Para dispersar la fase de aceite en la fase acuosa continua se usan homogeneizadores capaces de producir gotitas de aceite en varios intervalos de tamaño (con un radio que varía desde unos 100 nm hasta varios cientos de micrómetros). La formación de la capa de adsorción alrededor de las  
20 gotitas de aceite en la etapa de homogeneización estabiliza cinéticamente las gotitas de aceite contra coalescencia, floculación o coagulación. Los materiales surfactantes empleados en los productos basados en emulsiones aceite-en-agua pueden ser surfactantes hidrófilos de bajo peso molecular, tales como polisorbatos, lisolecitinas, derivados de monoglicéridos, etc., o polímeros tales como proteínas, p.ej. gelatina o proteínas lácteas, o polisacáridos como goma arábiga o xantana, o mezclas de ellos.

25 Los productos basados en emulsiones aceite-en-agua están presentes en alimentación, cosmética o farmacia. Como productos basados en emulsiones aceite-en-agua son importantes, por ejemplo, la leche, la mayonesa, los aliños para ensaladas o las salsas. En la industria cosmética o farmacéutica tienen importancia como productos basados en emulsiones aceite-en-agua las lociones, cremas, píldoras, tabletas, etc. En estos productos las gotitas de aceite  
30 suelen ser, por ejemplo, de triglicéridos, diglicéridos, ceras, ésteres de ácidos grasos, ácidos grasos, alcoholes, aceites minerales o hidrocarburos.

Las emulsiones se utilizan como material de partida, producto intermedio o producto final, o como aditivo a un  
35 producto final.

Emulsiones para suministro

Uno de los usos industriales de las emulsiones es el suministro de compuestos activos tales como condimentos,  
40 vitaminas, antioxidantes, productos nutracéuticos, productos fitoquímicos, fármacos, etc. La administración de los componentes activos requiere el uso de un vehículo apropiado para llevar una cantidad efectiva del componente activo al lugar de acción deseado. Las emulsiones aceite-en-agua son sistemas corrientes de suministro porque aprovechan la mayor solubilidad de los compuestos activos lipófilos en el aceite. En la patente EP 1116515, como ejemplo del uso de emulsiones para controlar la acción de los saborizantes, un ingrediente activo hidrófobo tal como un condimento se añade mediante una extrusora a una matriz en forma de emulsión aceite-en-agua, con el fin de  
45 aumentar la estabilidad del ingrediente activo incorporado durante la subsiguiente elaboración del producto. En la patente WO 00/59475, como ejemplo de una emulsión farmacéutica aceite-en-agua, se describe una composición y un método para suministrar agentes terapéuticos hidrófobos ionizables, los cuales se mezclan con un agente ionizante, un surfactante y un triglicérido para formar una emulsión aceite-en-agua. La patente WO 99/63841, como ejemplo del uso de emulsiones en el sector alimenticio, describe composiciones de fitosterol que tienen mejor  
50 solubilidad y dispersabilidad en fase acuosa debido a la formación de una emulsión o microemulsión.

Además, si las gotitas de aceite en las emulsiones aceite-en-agua son ultra-pequeñas, p.ej. del orden de varios nanómetros hasta unos 200 nm de diámetro, la emulsión se denomina micro- o nanoemulsión aceite-en-agua (Evans, D.F.; Wennerström, H. (Eds.); "The Colloidal Domain" [*El dominio coloidal*], Wiley-VCH, Nueva York, (1999)).  
55 Estas emulsiones son transparentes y termodinámicamente estables y por tanto, para el especialista, son de un tipo diferente de las emulsiones corrientes, que son termodinámicamente inestables y en general turbias.

Otro tipo de sistemas de suministro son las partículas de mesofase surfactante descritas por Gustafsson y otros (Gustafsson, J.; Ljusberg-Wahren, H.; Almgren, M.; Larsson, K.; Langmuir (1997), 13, 6964-6971).  
60

Monduzzi M. y otros, Langmuir, vol. 16, 2000, páginas 7355-7358, y Gustafsson J. y otros, Langmuir, vol. 13, 1997, páginas 6964-6971, son artículos de investigación del mismo grupo investigador de K. Larsson. Ambos artículos revelan partículas coloidales con estructuras cristalinas líquidas de tipo cúbico o hexagonal inverso de la fase C.L. Las partículas coloidales reveladas en estos artículos tienen una relación  $\alpha$  de (LPA) / (LPA más aceite) \* 100 de 96  
65 y 88.

Nakano M. y otros, Langmuir, vol. 17, 2001, páginas 3917-3922, y Nakano M. y otros, Langmuir, vol. 18, 2002, páginas 9283-9288, son artículos de investigación del mismo grupo investigador. El primer artículo describe dispersiones acuosas de partículas con fases cúbicas bicontinuas (cubosomas) de monooleína en combinación con un copolímero tribloque Pluronic F127. Sin embargo no se revela ninguna emulsión aceite-en-agua, puesto que las dispersiones no llevan un aceite. El segundo artículo revela los mismos cubosomas y hexosomas que en las fases cristalinas líquidas liotrópicas (estructuras C.L.) anteriores, pero preparadas con una mezcla de monooleína y el ácido graso oleico. Al igual que antes no se describe ninguna emulsión aceite-en-agua, porque las dispersiones reveladas no llevan un aceite.

## DESCRIPCIÓN DE LA PRESENTE INVENCION

En el estado técnico las gotitas de aceite dispersas en emulsiones aceite-en-agua se usan como vehículo para moléculas lipófilas que se disuelven en las gotitas de aceite. El inconveniente de este tipo de emulsiones como vehículo es que no son capaces de albergar moléculas cristalinas (es decir, presentes en forma cristalina), hidrófilas o ligeramente anfífilas, solas o en combinación con compuestos lipófilos, debido a la falta de solubilidad molecular de los agentes activos en la fase aceite. Resulta particularmente difícil el suministro de compuestos cristalinos, anfífilos o hidrotrópicos, porque tienden a perturbar la función estabilizadora de los emulsionantes y por lo tanto pueden desestabilizar la emulsión.

La presente invención se basa en el hallazgo de nuevas estructuras nanométricas autoensambladas en el interior de gotitas de aceite corrientes. Las estructuras se forman por adición de un aditivo lipófilo (LPA) a las gotitas de aceite. Dichas estructuras pueden solubilizar no solo componentes lipófilos sino también, al mismo tiempo, componentes hidrófilos y/o anfífilos o hidrotrópicos o cristalinos. Las estructuras nanométricas autoensambladas en el interior de las gotitas de aceite pueden consistir en dominios nanométricos hidrófilos y termodinámicamente estables, p.ej. gotitas, barras o canales de agua. Los dominios nanométricos formados espontáneamente dentro de las gotitas de aceite de la emulsión (por acción termodinámica) son estabilizados por el LPA. La parte hidrófila de la molécula de LPA forma parte de la estructura del dominio hidrófilo. Los dominios hidrófilos pueden tener un diámetro de 0,5 hasta 200 nm, preferiblemente de 0,5 hasta 150 nm, con mayor preferencia de 0,5 hasta 100 nm y sobre todo de 0,5 hasta 50 nm.

Tal como se usa aquí, el "dominio hidrófilo" está formado por dominios acuosos y la parte del grupo hidrófilo principal por moléculas de LPA. Además, por su tamaño ultra-pequeño, presentan una gran área superficial que constituye un lugar adecuado para la solubilización de varios compuestos distintos.

Las emulsiones de la presente invención se diferencian claramente de las emulsiones usuales conocidas como emulsiones dobles agua-aceite-agua. Las emulsiones dobles w/o/w (agua-aceite-agua) son emulsiones de aceite-en-agua en que las gotitas de aceite contienen gotitas de agua de tamaño micrométrico (Garti, N.; Bisperink, C.; Curr. Opinion in Colloid & Interface Science (1998), 3, 657-667). La introducción (dispersión) de gotitas de agua en las gotitas de aceite dispersadas de la doble emulsión se efectúa mediante aporte de energía mecánica, p.ej. por homogenización, y en consecuencia son termodinámicamente inestables y no están autoensambladas. En una emulsión doble w/o/w el diámetro de las gotitas de agua interiores es superior a 300 nm. Las emulsiones de la presente invención se pueden distinguir fácilmente de las emulsiones dobles w/o/w comunes, ya que la formación de la nanoestructura autoensamblada en el interior de las gotitas de aceite de la emulsión según la presente invención es espontánea y termodinámicamente inducida, y el diámetro medio de las gotitas o canales de agua es inferior a 200 nm.

Por tanto la presente invención se refiere a gotitas de aceite que contienen una nanoestructura autoensamblada con dominios hidrófilos. La idea de "auto-ensamblaje" o "auto-organización" se refiere a la formación espontánea de agregados (agrupaciones) por moléculas separadas. En las estructuras autoensambladas las moléculas encuentran su ubicación adecuada solamente por sus propiedades estructurales y químicas, debido a fuerzas intermoleculares existentes, por ejemplo de tipo hidrófobo, de hidratación o electrostáticas (Evans, D.F.; Wennerström, H. (Eds.); "The Colloidal Domain", Wiley-VCH, Nueva York, (1999)). El resultado del auto-ensamblaje no depende del proceso en sí mismo y corresponde a un estado de mínima energía (equilibrio estable) del sistema.

La patente JP 2004 008837 revela una emulsión aceite-en-agua que contiene partículas sólidas hidrosolubles dentro de las gotitas de aceite. El tamaño de las partículas está comprendido en el intervalo de 20 nm hasta 10 µm. Las partículas se preparan en una emulsión agua-en-aceite (w/o) por deshidratación (es decir no mediante un proceso espontáneo) antes de dispersar toda la suspensión de partículas/aceite (S/O) en una fase acuosa, empleando el proceso de emulsión con membranas porosas.

La patente WO 02/076441 revela el uso de una microemulsión alcohol-en-hidrocarburo fluorado como precursor de la preparación de nanopartículas sólidas. Las nanopartículas tienen un diámetro inferior a 200-300 nanómetros. La formación de las nanopartículas no es espontánea y se provoca enfriando la microemulsión precursora por debajo de unos 35°C o evaporando el alcohol en la microemulsión precursora o bien diluyéndola en un disolvente polar adecuado.

La patente US 2004/022861 revela una emulsión doble w/o/w cuyas gotitas de aceite contienen una fase acuosa microscópica que lleva proteína u otro agente hidrófilo. Toda la emulsión doble se atomiza, por ejemplo en nitrógeno líquido a través de una boquilla capilar, para producir micropartículas cargadas de proteína.

5 Todos estos ejemplos describen la formación no espontánea de (nano)partículas hidrófilas sólidas mediante el uso de microemulsiones w/o o emulsiones dobles w/o/w que necesitan un desencadenante externo para solidificar los dominios hidrófilos dentro de las gotitas de aceite. Una vez preparadas, las (nano)partículas son muy insensibles a factores ambientales tales como temperatura, pH o propiedades del fluido externo. Debe mencionarse que las microemulsiones w/o corrientes en que las gotitas de agua no están solidificadas, es decir que son fluidas, se ven  
10 muy afectadas por dichos factores ambientales.

Muchas investigaciones científicas han demostrado que el tipo de emulsión (o/w o w/o) formado por homogenización del respectivo sistema Winsor (Winsor I (microemulsión o/w más exceso de aceite) o Winsor II (microemulsión o/w más exceso de agua)) es el mismo que se forma en la fase de la microemulsión que está en equilibrio con su exceso de fase continua. Por ejemplo, la emulsificación de una microemulsión w/o más exceso de agua (sistema Winsor II) a concentraciones suficientemente altas de surfactante, es decir mayores que la concentración crítica del surfactante en la fase aceite  $c_{\mu C_{aceite}}$ , da una emulsión w/o cuya propia fase continua es una microemulsión w/o (B.P. Binks, Langmuir (1993) 9, 25-28). Esto significa que al diluir una microemulsión w/o corriente con una fase acuosa se forma preferentemente una emulsión w/o antes que una emulsión o/w. Binks y otros (B.P. Binks, Langmuir (1993) 9, 25-28) explicaron este comportamiento refiriéndose a la partición del surfactante entre las fases acuosa y oleosa según la regla de Bancroft (W.D. Bancroft, J. Phys. Chem. (1913) 17, 501): si el surfactante se acumula en la fase aceite, es decir, si se disuelve mejor en la fase aceite que en la fase acuosa, el tipo de emulsión formado siempre es w/o y no o/w. Para formar una emulsión o/w a partir de una microemulsión w/o o de un sistema Winsor II (microemulsión w/o más exceso de agua) es necesario que el surfactante experimente una inversión de fase, es decir un cambio de su solubilidad, de liposoluble (formación de la emulsión w/o) a hidrosoluble (formación de una emulsión o/w) (P. Izquierdo y otros, Langmuir (2002) 18, 26-30). Si se usan surfactantes no iónicos como los etoxilatos de alquilo, p.ej. C<sub>12</sub>EO<sub>4</sub>, esto se puede conseguir enfriando el sistema de 40-50°C (temperatura PIT) hasta 25°C. Esto es totalmente diferente de la presente invención, que correlaciona el comportamiento de fase de un aditivo lipófilo (LPA; que forma una microemulsión w/o a temperatura ambiente) con la formación de una emulsión o/w donde las gotitas de aceite, que contienen dominios hidrófilos, son estabilizadas por un surfactante hidrosoluble corriente. En este caso los dominios hidrófilos son fluidos y no sólidos. La microemulsión w/o del aceite que contiene los dominios hidrófilos se puede diluir (dispersar) en una fase acuosa sin sufrir una inversión de fases perdiendo los dominios hidrófilos del interior de las gotitas de aceite dispersas y sin necesidad de solidificarlos antes de la etapa de dispersión.

35 Según la presente invención la formación espontánea de la estructura nanométrica autoensamblada dentro de las gotitas de aceite se puede realizar de maneras distintas. Una de ellas es añadir a la fase aceite, antes de la etapa de homogenización, un aditivo lipófilo (LPA) que permite la formación espontánea de la estructura nanométrica autoensamblada. La otra manera es añadir el aditivo lipófilo (LPA) al producto emulsionado antes o después de la etapa de homogenización. En este caso el aditivo lipófilo se disolverá en las gotitas de aceite y conducirá a la formación espontánea de la estructura nanométrica autoensamblada dentro de las gotitas de aceite. Como homogeneizador se puede emplear uno corriente de tipo industrial o de laboratorio, tal como un homogeneizador de pistones Rannie, un mezclador de rotor y estator Kinematica, un molino coloidal, un mezclador Stephan, una celda de cizallamiento Couette o un aparato emulsionador de membrana. Asimismo, para producir la emulsión descrita en la presente invención también sirven los ultrasonidos, la inyección de vapor o un mezclador de cocina. La formación espontánea de la estructura nanométrica autoensamblada dentro de las gotitas de aceite es independiente de la admisión de energía empleada para hacer la emulsión y de la secuencia de adición del LPA, lo cual significa que las técnicas de microfluídica también son adecuadas para preparar la emulsión de la presente invención.

Otra ruta para preparar la emulsión de la presente invención es el uso de hidrotropicos o rompedores de estructuras acuosas, o la emulsión espontánea inducida química o termodinámicamente (Evans, D.F.; Wennerström, H. (Eds.); 'The Colloidal Domain', Wiley-VCH, Nueva York, (1999)).

Otra ruta para preparar la emulsión de la presente invención consiste en combinar la formación espontánea de la estructura nanométrica autoensamblada dentro de las gotitas de aceite con la formación espontánea de las gotitas de aceite, es decir la emulsión completa de la presente invención, añadiendo copolímeros dibloque o biopolímeros apoproteicos tales como conjugados o coacervados de proteína-polisacárido, proteína-proteína, o bien híbridos de polisacárido-polisacárido o mezclas de polímeros o biopolímeros, o surfactantes de bajo peso molecular.

#### Formulación de emulsiones

60 La presente invención se refiere a una emulsión aceite-en-agua cuyas gotitas de aceite (con un diámetro en el intervalo de 5 nm hasta cientos de micrómetros) muestran una estructuración nanométrica con dominios hidrófilos formados por un aditivo lipófilo (LPA). El LPA puede añadirse como tal o hacerse in situ por medios químicos, bioquímicos, enzimáticos o biológicos. La cantidad de gotitas de aceite que hay en la emulsión de la presente invención (fracción volumétrica de gotitas de aceite) es la que se usa generalmente en los productos corrientes de emulsión aceite-en-agua.

De manera más precisa la presente invención se refiere a emulsiones aceite-en-agua que llevan gotitas de aceite dispersas con una estructura nanométrica interior autoensamblada y dominios líquidos hidrófilos con un diámetro comprendido en el intervalo de 0,5 a 200 nm. Las gotitas de aceite comprenden:

- 5 (i) un aceite elegido del grupo formado por aceites minerales, hidrocarburos, aceites vegetales, di-acilglicéridos, tri-acilglicéridos, aceites esenciales, aceites saborizantes, vitaminas lipófilas y mezclas de ellos;  
 (ii) un aditivo lipófilo (LPA) o mezclas de aditivos lipófilos e hidrófilos cuyo valor HLB resultante (balance hidrófilo-lipófilo) sea inferior a 10, escogiendo el LPA del grupo formado por monoglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos;  
 10 (iii) dominios hidrófilos en forma de gotitas o canales que contienen agua o un líquido polar no acuoso tal como un poliol;

siendo la relación  $\alpha = \text{LPA} / (\text{LPA más aceite}) \cdot 100$  inferior a 70, y la emulsión aceite-en-agua comprende una fase acuosa continua que contiene estabilizantes de la emulsión o emulsionantes.

15 Tal como se usa aquí, un "aditivo lipófilo" (abreviado también como LPA) se refiere a un agente lipófilo anfifílico que forma espontáneamente estructuras nanométricas autoensambladas estables en una fase de aceite dispersada. El aditivo lipófilo (mezcla) se elige del grupo formado por monoglicéridos y glicolípidos.

20 Según la primera forma de ejecución de la presente invención la emulsión aceite-en-agua muestra gotitas de aceite que tienen una estructura interna correspondiente al grupo formado por la estructura L2 o por una combinación de una estructura de L2 y aceite (microemulsión o gotitas líquidas isotrópicas) en el intervalo de temperatura de 0°C hasta 100°C.

25 Según la segunda forma de ejecución de la presente invención la emulsión aceite-en-agua muestra gotitas de aceite que tienen una estructura L2 (microemulsión o gotitas líquidas isotrópicas) en el intervalo de temperatura de 0°C hasta 100°C.

30 Según una tercera forma de ejecución de la presente invención la emulsión aceite-en-agua muestra gotitas de aceite que tienen una estructura interna correspondiente al grupo formado por la estructura L2 (microemulsión o gotitas líquidas isotrópicas) o una estructura cristalina líquida (LC) (p.ej. cúbica micelar inversa, cúbica bicontinua inversa o hexagonal inversa) y una combinación de las mismas en el intervalo de temperatura de 0°C hasta 100°C.

35 Según la cuarta forma de ejecución de la presente invención la emulsión aceite-en-agua muestra gotitas de aceite que tienen una estructura interna LC en el intervalo de temperatura de 0°C hasta 100°C.

40 Según una quinta forma de ejecución de la presente invención la emulsión aceite-en-agua muestra gotitas de aceite que tienen una estructura interna correspondiente al grupo formado por la estructura L3, una combinación de las estructuras L2 y L3, una combinación de la estructura cristalina líquida laminar ( $L_{\alpha}$ ) y la estructura L2, y una combinación de la estructura cristalina laminar y la estructura L2 en el intervalo de temperatura de 0°C hasta 100°C.

45 Según una sexta forma de ejecución de la presente invención la emulsión aceite-en-agua muestra gotitas de aceite con una estructura interna que es una combinación de las estructuras anteriormente descritas, en el intervalo de temperatura de 0°C hasta 100°C.

50 Todas las estructuras internas arriba mencionadas pueden determinarse sin ninguna duda por análisis SAXS y crio-TEM (Qiu y otros, Biomaterials (2000) 21, 223-234, Seddon. Biochimica et Biophysica Acta (1990) 1031, 1-69, Delacroix y otros, J. Mol. Biol. (1996) 258, 88-103, Gustafsson y otros, Langmuir (1997) 13, 6964-6971, Portes. J. Phys: Condens Matter (1992) 4, 8649-8670) y por transformada rápida de Fourier (FFT) de imágenes de crio-TEM.

55 Para ciertas aplicaciones el uso de temperaturas superiores a 100°C (por ejemplo temperaturas de esterilización) también es posible y está cubierto por la presente invención. El aditivo lipófilo (LPA) también se puede mezclar con un aditivo hidrófilo (que tenga un valor HLB mayor de 10) hasta una cantidad tal que el valor HLB global de la mezcla no sea superior a 10 o preferiblemente a 8. El aditivo (mezcla) también puede generarse in situ por medios químicos, bioquímicos, enzimáticos o biológicos.

60 La cantidad de aditivo lipófilo añadido se define como  $\alpha$  y es la relación  $\text{LPA}/(\text{LPA} + \text{aceite}) \times 100$ . Preferiblemente  $\alpha$  es superior a 0,1, con mayor preferencia superior a 0,5, con aún mayor preferencia superior a 1, con aún mayor preferencia superior a 3, con aún mayor preferencia superior a 10 y sobre todo superior a 15. La relación  $\alpha = \text{LPA}/(\text{LPA} + \text{aceite}) \times 100$  es preferiblemente inferior a 70. Cualquier combinación de intervalo inferior y superior está incluida en el ámbito de la presente invención.  $\alpha$  se puede expresar en % e.p. o en % molar. El límite inferior y superior de  $\alpha$  depende de las propiedades del aceite y del LPA elegidos, p.ej. de la polaridad, del peso molecular, de la constante dieléctrica, etc., o de características físicas tales como la concentración crítica de agregación del LPA en la fase de gotitas de aceite.

65

La emulsión está estabilizada con un emulsionante (también llamado emulsionante primario) que es apropiado para la estabilización de las gotitas en una emulsión corriente de aceite-en-agua. La emulsión puede estar agregada (floculada) o no según el emulsionante empleado. El emulsionante se elige del grupo formado por emulsionantes de bajo peso molecular con un HLB > 8, gelatina, proteínas, p.ej. lácteas o de soja, péptidos, hidrolizados de proteínas, copolímeros en bloque, hidrocoloides tensoactivos tales como goma arábiga, goma xantana, copolímeros dibloque o biopolímeros de tipo apoproteico tales como los conjugados o coacervados de proteína-polisacárido o los híbridos, conjugados o coacervados de proteína-polisacárido, proteína-proteína o polisacárido-polisacárido, o mezclas de polímeros o de biopolímeros.

El emulsionante también se puede mezclar con el LPA o con el aceite o con el LPA y el aceite. Esto significa que el emulsionante también se puede encontrar parcialmente en el interior de la gotita de aceite y afectar a la estructura nanométrica interna autoensamblada.

La relación  $\beta = \text{emulsionante} / (\text{LPA} + \text{aceite} + \text{emulsionante}) \times 100$  indica la cantidad de emulsionante usado para estabilizar las gotitas de aceite respecto al aceite más el contenido de LPA.  $\beta$  es preferiblemente superior a 0,1, con mayor preferencia superior a 0,5, con aún mayor preferencia superior a 1 y, sobre todo, superior a 2.

La relación  $\beta = \text{emulsionante} / (\text{LPA} + \text{aceite} + \text{emulsionante}) \times 100$  es preferiblemente inferior a 90, con mayor preferencia inferior a 75 y sobre todo inferior a 50. Cualquier combinación de intervalo inferior y superior está incluida en el ámbito de la presente invención.  $\beta$  se puede expresar en % e.p. o en % molar. El límite inferior y superior de  $\beta$  depende de las propiedades del emulsionante, del aceite y del LPA elegidos.

En la estructura nanométrica autoensamblada en el interior de las gotitas de aceite se pueden solubilizar diversos componentes activos. Éstos pueden ser liposolubles, insolubles en aceite, cristalinos o componentes hidrosolubles elegidos del grupo constituido por nutracéuticos tales como luteína, ésteres de luteína,  $\beta$ -caroteno, tocoferol, acetato de tocoferol, tocotrienol, licopeno, coenzima-Q10, aceite de linaza, ácido lipoico, vitamina B12, vitamina D, ácidos grasos  $\alpha$ - y  $\gamma$ -poli-insaturados, fitosteroles, flavonoides, vitamina A, vitamina C o sus derivados, azúcares, suplementos alimenticios, ingredientes funcionales, aditivos alimentarios, extractos vegetales, medicamentos, fármacos, componentes farmacológicamente activos, componentes cosméticamente activos, péptidos, proteínas o hidratos de carbono, aromas, sales y saborizantes.

La emulsión aceite-en-agua de la presente invención suele tener forma líquida. Según otra forma de ejecución de la presente invención la emulsión se seca y queda disponible en polvo.

La emulsión aceite-en-agua según la presente invención es un producto final o un aditivo. La cantidad del aditivo en el producto final no es crítica y se puede variar.

La emulsión descrita en la presente invención es un nuevo tipo de emulsión que denominamos "ISAMULSIÓN" para señalar la naturaleza específica de las gotitas de aceite que contienen una estructura autoensamblada internamente y exceptuar la emulsión según la presente invención de las emulsiones aceite-en-agua o de las emulsiones dobles w/o/w corrientes, incluyendo nano-y microemulsiones, cuyas gotitas de aceite no tienen una estructura nanométrica autoensamblada con dominios hidrófilos. Las gotitas de la ISAMULSIÓN constan básicamente de gotitas de aceite que tienen una estructura nanométrica autoensamblada con dominios hidrófilos. Esta estructura puede ser de naturaleza líquido-cristalina laminar, cristalina laminar o de un tipo inverso que comprende la estructura L2, la microemulsión, la fase líquida isotrópica, la fase hexagonal, la fase cúbica micelar o la fase cúbica bicontinua. En la fase aceite dichas estructuras pueden aparecer como una sola estructura nanométrica o como una mezcla de estructuras nanométricas diferentes.

Por tanto un objeto de la presente invención es el de proporcionar una nueva formulación de emulsión aceite-en-agua que pueda usarse para suministrar ingredientes activos y/o funcionales en la industria alimentaria, de comida para animales, nutracéutica, de alimentación funcional, nutricosmética, cosmética, farmacéutica, de administración de fármacos o agroquímica.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La fig. 1 muestra la estructura encontrada en el interior de las gotitas de aceite de la ISAMULSIÓN como función de  $\alpha = 100 \times \text{LPA} / (\text{LPA} + \text{aceite})$ ,

La fig. 2 muestra una microfotografía por Crio-TEM de una ISAMULSIÓN típica.

La fig. 3 muestra el gráfico de dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) de una ISAMULSIÓN, de la fase aceite masiva (nanoestructurada por LPA) usada para preparar la ISAMULSIÓN y de la correspondiente emulsión ordinaria (sin LPA ni nanoestructura). En todas las figuras u.a. significa unidad arbitraria.

La fig. 4 muestra el gráfico de dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) de ISAMULSIONES que contienen distintas cantidades de LPA, es decir de valores  $\alpha$  ( $\alpha = 100 \times \text{LPA} / (\text{LPA} + \text{ACEITE})$ ).

La fig. 5 muestra la estabilidad de la estructura interna de las gotitas de aceite a lo largo del tiempo, determinada por dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) (analizando la misma ISAMULSIÓN citada en la fig. 3). Nótese que al cabo de 4 meses no hay ningún cambio apreciable en la estructura interna de las gotitas de aceite que forman la ISAMULSIÓN.

La fig. 6 muestra la reversibilidad de la estructura interna de las gotitas de la ISAMULSIÓN al calentarla y enfriarla, determinada por dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) (la misma ISAMULSIÓN citada en la fig. 3). Demuestra la reversibilidad de la formación de la estructura tras calentar y enfriar. Las curvas de SAXS obtenidas al enfriar a 58, 39 y 25°C coinciden respectivamente con las curvas de SAXS obtenidas al calentar a 58, 39 y 25°C.

La fig. 7 muestra una imagen Crio-TEM de gotitas de aceite de la ISAMULSIÓN (en presencia de un LPA, con nanoestructura) (a) en comparación con las gotitas de la correspondiente emulsión ordinaria (en ausencia de un LPA, sin nanoestructura) (b). Obsérvese que la estructura interna visible en el interior de las gotitas de ISAMULSIÓN (fig. 7a) es invisible en las gotitas de aceite normales (fig. 7b).

La fig. 8 (a) muestra el gráfico de dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) de la ISAMULSIÓN (con LPA y nanoestructura) empleada en la fig. 7 y (d) de la correspondiente emulsión ordinaria (sin LPA ni nanoestructura) empleada en la fig. 7. (b) y (c) la corresponden a ISAMULSIONES con alto y bajo contenido de LPA.

La fig. 9 muestra la dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) de una dispersión que solo contiene LPA, de una emulsión normal que contiene aceite (y ningún LPA), de una ISAMULSIÓN obtenida al mezclar y homogeneizar 60% de la dispersión de LPA y 40% de la emulsión normal.

La fig. 10 muestra el diagrama de fases pseudobinario de una mezcla de monoglicéridos saturados-insaturados en presencia de 20% de agua.

La fig. 11 muestra un esquema de una gotita de aceite de una ISAMULSIÓN, que contiene dominios hidrófilos. Obsérvese que los dominios hidrófilos pueden ser esféricos o no esféricos, p.ej. en forma de barras, discos o canales.

La fig. 12 muestra los gráficos de dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) de ISAMULSIONES que contienen gotitas de aceite con una estructura cúbica micelar inversa (grupo espacial  $fd3m$ ).

Las figs. 13-15 muestran los gráficos de dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) de ISAMULSIONES hechas con una mezcla de monolinoleína (MLO) y monooleato de glicerol (DGMO) como LPA.

La fig. 16 muestra los gráficos de dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) de ISAMULSIONES hechas con una mezcla de fosfolípidos (fosfatidilcolina (PC)) y monolinoleína (MLO) como LPA.

La fig. 17 muestra los gráficos de dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) de una ISAMULSIÓN hecha con una fosfatidilcolina (PC) como LPA y trioleína como fase aceite. La emulsión estaba compuesta por 95% e.p. de agua - 1,912% e.p. de trioleína - 2,643% e.p. de fosfatidilcolina (PC) de soja (Epikuron 200 de Lucas Meyer; LPA) - 0,375% e.p. de Pluronic F127.

La fig. 18 muestra los gráficos de dispersión de rayos X en ángulo pequeño (SAXS) de una ISAMULSIÓN hecha con una fosfatidilcolina (PC) como LPA y vitamina E como fase aceite. La emulsión estaba compuesta por 95% e.p. de agua - 1,912% e.p. de acetato de vitamina E - 2,643% e.p. de fosfatidilcolina (PC) de soja (Epikuron 200 de Lucas Meyer; LPA) - 0,375% e.p. de Pluronic F127.

La figura 1 representa la típica secuencia de estructuras que se encuentran en el interior de las gotitas de aceite dispersadas en la ISAMULSIÓN, en función del contenido de aditivo lipófilo en % (% de LPA =  $\alpha = 100 \times \text{LPA} / (\text{LPA} + \text{ACEITE})$ ) y de la temperatura. L2 designa una estructura del tipo microemulsión inversa; LC denota la existencia de una fase cristalina líquida o de una mezcla de diferentes fases cristalinas líquidas. Tal como muestra la figura 1, a una temperatura determinada y para una cantidad específica de aditivo lipófilo incorporado (valor  $\alpha$ ) se forma una estructura nanométrica autoensamblada definida dentro de las gotitas de aceite (para una descripción más detallada de dichas estructuras, véase Evans, D.F.; Wennerström, H. (Eds.); "The Colloidal Domain", Wiley-VCH, Nueva York, (1999)). La cantidad añadida de LPA permite controlar con precisión el tipo de estructura autoensamblada, la cantidad de agua presente en los dominios hidrófilos, la cantidad de interfase interna y el tamaño y dimensión de la nanoestructura autoensamblada formada dentro de las gotitas de ISAMULSIÓN. Dependiendo del tipo de aceite y del tipo de aditivo lipófilo (LPA), la cantidad mínima de LPA ( $\alpha$ ) necesaria para iniciar la formación espontánea de la estructura autoensamblada en el interior de las gotitas oscila entre 0,1 y 15% e.p. respecto a la fase aceite.

La estructura nanométrica interna autoensamblada de las gotitas de aceite en la emulsión se puede detectar por medio de criomicroscopía de transmisión electrónica o por SAXS.

La imagen Crio-TEM de la figura 2 se obtuvo mediante la técnica estándar de Adrian y otros (Adrian y otros, Nature, (1984) 308, 32-36). Para congelar las muestras se empleó una guillotina casera. Sobre una rejilla de cobre cubierta por un film de carbono perforado con agujeros de unos 2  $\mu\text{m}$  de diámetro se depositó una gotita de 3  $\mu\text{l}$  de la muestra de dispersión. Sobre la cara de la rejilla con líquido se oprimió un papel de filtro (secante) para eliminar el exceso de muestra de la solución. Inmediatamente después de eliminar el líquido, la rejilla sujeta con pinzas se introdujo en etano líquido. Las rejillas congeladas se almacenaron en nitrógeno líquido y se transfirieron a un soporte criogénico mantenido a  $-180^\circ\text{C}$ . El análisis de la muestra se realizó en un aparato Philips CM12 TEM a un voltaje de 80 kV. Se aplicaron métodos con dosis bajas para minimizar el daño por radiación. En algunos casos (figura 7, ejemplos 1, 4 y 5) se utilizó una cámara ambiental de construcción casera similar a una descrita por Egelhaaf y otros (Egelhaaf y otros, J. Microsc. (2000) 200, 128-139). Antes de la preparación de la muestra fina y vitrificada se ajustó la temperatura a  $25^\circ\text{C}$  y la humedad al 100%. La ISAMULSIÓN se puede identificar por la presencia de pequeñas formas brillantes dentro de las gotitas de aceite. Las figuras 2, 7a son microfotografías Crio-TEM de ISAMULSIONES típicas que muestran unas distancias características de unos 7-8 nm entre las formas brillantes. Debe destacarse que estas formas brillantes no se observan en las emulsiones corrientes no estructuradas y que no existe ningún contraste en el interior de las gotitas de las emulsiones no estructuradas (fig. 7b).

Las curvas SAXS de la figura 3 se obtuvieron mediante un equipo estándar (Bergmann y otros, J. Appl. Cryst. (2000) 33, 869-875), usando un generador de rayos X (Philips PW 1730/10) que funcionaba a 40 kV y 50 mA con un ánodo tubular de Cu sellado. Se utiliza un espejo Göbel para convertir el haz de rayos X policromático divergente en un haz lineal focalizado de radiación  $K_\alpha$  de Cu ( $\lambda = 0,154$  nm). El patrón de dispersión 2D se registra con un detector de placas de imagen y se integra en la función de dispersión unidimensional  $I(q)$  por medio del programa SAXSQuant (Anton Paar, Graz, Austria), donde  $q$  es la longitud del vector de dispersión, definida por  $q = (4\pi/\lambda) \cdot \sin\theta/2$ , siendo  $\lambda$  la longitud de onda y  $\theta$  el ángulo de dispersión. Los picos anchos de las curvas de dispersión se resolvieron ajustando estos datos con el método generalizado de transformación inversa de Fourier (Bergmann y otros, (2000), 33, 1212-1216). Las distancias características están expresadas por  $d = 2\pi/q$ . La figura 3 muestra los patrones de dispersión de rayos X en ángulo pequeño de una ISAMULSIÓN (la misma investigada en la figura 2) junto con su correspondiente fase aceite masiva no dispersada (nanoestructurada por LPA) y la respectiva emulsión corriente (sin LPA, sin nanoestructura). Se puede apreciar que la ISAMULSIÓN presenta los picos en la misma posición que su correspondiente fase aceite masiva no dispersada. La distancia característica es de aproximadamente 7,5 nm para ambas. Esta distancia característica es mayor que el diámetro del dominio hidrófilo. Por tanto los dominios hidrófilos tienen un diámetro inferior a 7 nm. Para el especialista, este pequeño tamaño de los dominios hidrófilos demuestra que la estructura interna de la gotita de aceite es termodinámicamente estable. Por otra parte la respectiva emulsión corriente, que no lleva LPA añadido (sin nanoestructura), no presenta ningún pico, lo cual es otra prueba de la presencia de una estructura nanométrica autoensamblada dentro de las gotitas de aceite de una ISAMULSIÓN. Esta estructura no cambia cuando se realiza una dispersión en agua, lo cual indica que la estructura interna de la gotita de ISAMULSIÓN se halla en un estado de equilibrio termodinámico.

Tampoco se observa ningún cambio en la nanoestructura de la gotita de ISAMULSIÓN, incluso tras varios meses de almacenamiento del producto (véase figura 5), lo cual es un indicio del equilibrio termodinámico de la estructura nanométrica interna autoensamblada de la gotita. La reversibilidad de la formación de la estructura interna en las gotitas de ISAMULSIÓN al calentarla y enfriarla (véase figura 6) es otro indicio del equilibrio termodinámico de la estructura nanométrica interna autoensamblada de la gotita de aceite. La fig. 11 muestra un esquema de una gotita de aceite nanoestructurada por adición de un LPA. La definición estructural de dominio hidrófilo está especificada en la fig. 11. Los dominios hidrófilos incluyen la parte polar (el grupo de cabeza) del LPA (pero no la región de cola hidrocarbonada ni la parte acuosa). El diámetro mínimo de un dominio hidrófilo puede estar alrededor de 0,5 nm, que es más o menos la sección transversal de 2 grupos de cabeza sin moléculas de agua. El tamaño mínimo de la parte polar de un aditivo lipófilo es de unos 0,2 nm. El diámetro de una molécula de agua es de unos 0,3 nm.

#### EJEMPLOS:

Las diversas formas de ejecución de la presente invención proporcionan una emulsión aceite-en-agua en la cual las gotitas de aceite dispersadas muestran una estructura nanométrica autoensamblada en los dominios hidrófilos, debido a la presencia de un aditivo lipófilo (LPA). Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención, definido en las reivindicaciones adjuntas.

#### EJEMPLO 1: ejemplos genéricos de una ISAMULSIÓN obtenida por homogenización

Se añadió normalmente 1-5% e.p. de un aceite mineral tal como el tetradecano a 95% e.p. de agua que ya contenía 0,375% e.p. de emulsionante (Tween 80 o Pluronic F127 de BASF). Luego se agregó a la mezcla 0,5-4% e.p. de LPA (monolinoleato de glicerol). La cantidad total de moléculas lipófilas (aceite mineral + LPA) fue de 4,625% e.p.

Después se ultrasonizó durante 20 minutos. El carácter de ISAMULSIÓN de las emulsiones fue confirmado por imágenes de crio-TEM y curvas de SAXS como las de las figs. 2 y 3-4. Las figs. 2, 3, 5 y 6 se obtuvieron de ejemplos genéricos con una composición de 2,4% e.p. de aceite mineral (tetradecano) – 2,2% e.p. de LPA – 0,375% e.p. de emulsionante primario (Pluronic F127) - 95% e.p. de agua. Además se prepararon y analizaron las correspondientes muestras granel (muestras no dispersadas que contenían el aceite y el LPA, pero no el emulsionante estabilizador).

La relación ponderal aceite (tetradecano)/LPA (monolinoleato de glicerol) fue de 1,1/1,0. La mezcla aceite-LPA-agua se calentó y se mezcló con un agitador vórtex hasta que la mezcla quedó homogénea. Después de añadir 0, 5, o 10% e.p. de agua a la mezcla aceite/LPA la mezcla quedó transparente, lo cual indica que el agua se había disuelto totalmente en la mezcla aceite/LPA formándose una microemulsión w/o. Tras la adición de mayores cantidades de agua se produjo una separación de fases en la muestra. Se observó que las muestras que contenían 15 y 20% e.p. de agua daban las mismas curvas de SAXS que la correspondiente muestra de ISAMULSIÓN (2,4% e.p. de aceite mineral – 2,2% e.p. de LPA – 0,375% e.p. de emulsionante), lo cual demuestra que las gotitas de la ISAMULSIÓN tienen la misma distancia característica de 7,5 nm vista en las respectivas fases masivas (véanse las figs. 2 y 3). La fig. 5 demuestra que la estructura interna de la ISAMULSIÓN permanece estable durante más de 4 meses. La fig. 6 demuestra que la ISAMULSIÓN se puede calentar y enfriar a temperatura ambiente, manteniendo exactamente la misma estructura interna. Esto demuestra que la estructura interna de las gotitas de aceite de la ISAMULSIÓN está en equilibrio termodinámico. Además la fig. 4 demuestra que las ISAMULSIONES ya se forman (p.ej. se observa un pico en la curva de SAXS) con una cantidad relativamente baja de LPA y altos contenidos de aceite (p.ej. 3,9% e.p. de aceite mineral (tetradecano) – 0,725% e.p. de LPA (monolinoleato de glicerol) – 0,375% e.p. de emulsionante (Pluronic F127) - 95% de agua. Sin embargo en ausencia de LPA no se forma una ISAMULSIÓN, tal como muestra la fig. 3 (composición 4,625% e.p. de aceite (tetradecano), 0,375% e.p. de Pluronic F127, 95% e.p. de agua). Con mayores proporciones de LPA (valores  $\alpha$ ) (ejemplos de composición: composición 1: 1,32% e.p. de tetradecano – 3,3% e.p. de LPA - 0,375% e.p. de Pluronic F127; composición 2: 1,75% e.p. de tetradecano – 2,9% e.p. de LPA - 0,375% e.p. de Pluronic F127) también se forma una ISAMULSIÓN. La estructura es más ordenada que la vista con un valor  $\alpha$  inferior (contenido de LPA) y presenta una disposición cúbica micelar inversa de los dominios hidrófilos, tal como muestran las curvas de SAXS (fig. 12).

#### EJEMPLO 2: ejemplos genéricos de una ISAMULSIÓN obtenida por la vía hidrotópica

Se disolvió un 1% e.p. de emulsionante (Pluronic F127) en 89% e.p. de agua, formando la solución acuosa. Se disolvió un 2,5% e.p. de aceite mineral (tetradecano) y un 2,5% e.p. de LPA en 5% e.p. de etanol, formando la solución lipídica. La solución acuosa se añadió lentamente a la solución lipídica agitando con vórtex. Al final del proceso se ha formado espontáneamente la ISAMULSIÓN, es decir, gotitas con una estructura nanométrica interna autoensamblada.

#### EJEMPLO 3: ISAMULSIÓN que contiene un aceite saborizante

Se introdujo un 2% e.p. de un aceite esencial (R + limoneno) en 95% e.p. de agua que ya contenía 0,4 % e.p. de emulsionante (Pluronic F127). Se incorporó a la mezcla un 2,6% e.p. de LPA (monolinoleato de glicerol) y se ultrasonizó durante 20 minutos, formándose una dispersión. Al igual que en el ejemplo 1, la SAXS reveló el carácter de ISAMULSIÓN. La ISAMULSIÓN se forma espontáneamente durante la etapa de ultrasonificación. Este ejemplo demuestra que los aceites saborizantes como el limoneno se pueden usar como fase aceite para la formación de una estructura de ISAMULSIÓN.

#### EJEMPLO 4: ISAMULSIÓN que contiene un nutriente

Se introdujo un 2% e.p. de aceite (acetato de D-alfa tocoferilo) en 84,625% e.p. de agua que ya contenía 0,375% e.p. de emulsionante (Pluronic F127) y 10% e.p. de maltodextrina. Se añadió a la mezcla un 2,5% e.p. de LPA (DimodanU/J (aprox. 62% de monolinoleato de glicerol, 22% de monooleato de glicerol, 14% de monoglicérido saturado) Danisco, Dinamarca) y 0,5% de ácido ascórbico. Luego se ultrasonizó durante 2 minutos. Al igual que en el ejemplo 1, la SAXS revela el carácter de ISAMULSIÓN. La estructura nanométrica autoensamblada en el interior de las gotitas de aceite se forma espontáneamente durante la etapa de ultrasonificación. Esta ISAMULSIÓN se puede atomizar o liofilizar, obteniéndose un polvo que fluye libremente. Este ejemplo demuestra que los aceites nutrientes como la vitamina E se pueden usar como fase aceite para la formación de una estructura de ISAMULSIÓN.

#### EJEMPLO 5: ISAMULSIONES con el uso de un aceite triglicérido

También se pueden formar ISAMULSIONES con otros aceites, por ejemplo con aceites diglicéridos y triglicéridos. Se mezcló un 0,5-4,5% e.p. de aceite de soja con 0,5-4,5% e.p. de LPA (Dimodan U/J, Danisco, Dinamarca). Esta mezcla se agregó a 95% de agua que contenía 0,375% e.p. de emulsionante (Pluronic F127). La cantidad total de moléculas lipófilas (aceite + LPA) fue del 4,625% e.p.

La mezcla se sometió a cizallamiento durante 5 minutos, empleando un aparato Polytron (Kinematica, Suiza).

El carácter de ISAMULSIÓN de las emulsiones fue confirmado por imágenes de crio-TEM (fig.7a), por SAXS (fig.8a) y examinando las respectivas muestras granel (tal como se hizo para el ejemplo 1). Las figs. 7a-8a se obtuvieron de aquellos ejemplos genéricos con una composición de 1,525% e.p. de aceite triglicérido – 3,1% e.p. de LPA – 0,375% e.p. de emulsionante primario (Pluronic F127) - 95% e.p. de agua. La SAXS demuestra que las ISAMULSIONES también se forman a contenidos de LPA inferiores, tales como 2,775% e.p. de aceite triglicérido y 1,85% e.p. de LPA en presencia de 0,375% e.p. de emulsionante primario (Pluronic F127) y 95% e.p. de agua (fig.8b) y como 3,2375% e.p. de aceite triglicérido – 1,3875% e.p. de LPA - 0,375% e.p. de emulsionante primario (Pluronic F127) - 95% e.p.

de agua (fig.8c). No se observa ninguna estructura interna dentro de las gotitas de aceite de soja corrientes, p.ej. en ausencia de LPA (fig.7b; fig.8d).

En la figura 9 se muestran las curvas SAXS de 3 dispersiones distintas: (i) de una dispersión que solo contiene LPA y emulsionante (4,625% e.p. de LPA - 0,375% de emulsionante - 95% de agua), (ii) de una emulsión normal que contiene aceite, pero ningún LPA (4,625% e.p. de aceite - 0,375% de emulsionante - 95% de agua) y (iii) de una mezcla de la dispersión (i) con (ii), en concreto 60% de (i) y 40% de (ii). La mezcla (iii) se agitó durante 5 minutos mediante un Polytron. La curva SAXS de la mezcla (iii) (fig.9) demuestra que su estructura interna es muy diferente de las respectivas estructuras internas de la dispersión de LPA (i) y de la emulsión normal (ii) (fig.8a), lo cual demuestra que la estructura interna obtenida en las gotitas de ISAMULSIÓN es independiente de la secuencia con que se efectúa la mezcla y el proceso.

EJEMPLO 6: ISAMULSIÓN que contiene una mezcla de 2 LPAs, en concreto de un monoglicérido saturado y otro insaturado

Se añadió un 0-1,8% de aceite mineral (tetradecano) a 0,2-2% de LPA. El LPA era una mezcla de monoglicéridos saturados (Dimodan HR (monoglicéridos saturados que contienen un 90% de monoestearato de glicerol), Danisco, Dinamarca) y monoglicéridos insaturados (Dimodan U/J, Danisco, Dinamarca). La cantidad total de moléculas lipófilas (aceite+ LPA) fue del 3%. La mezcla se agregó a 96,7% de agua que contenía 0,3% de Tween 80 como emulsionante. Se ultrasonizó durante 2 minutos. Tal como indica el diagrama de fases pseudobinario de la mezcla monoglicérido saturado (Dimodan HR)-monoglicérido insaturado (Dimodan U/J) obtenida con 20% de agua (fig. 10) se puede formar una fase L2 estable a temperaturas altas tras la adición del monoglicérido saturado a la muestra de monoglicérido insaturado, lo cual indica que las ISAMULSIONES basadas en L2 pueden formarse a temperaturas elevadas. Así, por ejemplo, para las composiciones de 1% de tetradecano - 1% de monoglicéridos saturados - 1% de monoglicéridos insaturados - 0,3% de Tween 80 y 1% de tetradecano hay ISAMULSIONES que son estables a temperaturas superiores a 60°C.

EJEMPLO 7: ISAMULSIONES preparadas con un monoglicérido (MLO) y monooleato de diglicerol (DGMO)

Se añadieron mezclas de aceite mineral (tetradecano), monolinoleato de glicerol y monooleato de diglicerol (DGMO) a 95,375 % e.p. de agua que ya contenía 0,375% de emulsionante (Pluronic F127). Luego se ultrasonizó durante 20 minutos.

La SAXS revela el carácter de ISAMULSIÓN de las mezclas (figs.13-15). En comparación con las ISAMULSIONES hechas con solo monooleato de glicerol y sin DGMO (figs. 13-15) los picos de SAXS se desplazan hacia distancias mayores cuando se usa DGMO, lo cual demuestra que los dominios hidrófilos se hacen más grandes y que en presencia de DGMO se puede solubilizar una mayor cantidad de agua en las gotitas. Este ejemplo demuestra que se pueden utilizar mezclas de distintos LPAs para formar la estructura característica de las gotitas de aceite de la ISAMULSIÓN y que el tamaño característico del dominio hidrófilo se puede ajustar regulando el LPA empleado.

EJEMPLO 8: ISAMULSIONES preparadas con un monoglicérido y un fosfolípido

Se añadieron mezclas de aceite mineral (tetradecano), fosfatidilcolina de aceite de soja (PC) y monolinoleína (MLO) a 95,375 % e.p. de agua que ya contenía 0,375% de emulsionante (Pluronic F127). Luego se ultrasonizó durante 20 minutos.

La SAXS revela el carácter de ISAMULSIÓN de las mezclas (fig.16). Este ejemplo demuestra que se pueden utilizar fosfolípidos para formar la estructura característica de las gotitas de aceite de la ISAMULSIÓN.

EJEMPLO 9: solubilización de moléculas difícilmente solubles a temperatura ambiente en el aceite

Una mezcla de 1,1% e.p. de aceite de soja, 0,3% e.p. de fitosterol libre (ADM, USA) y 1,7% e.p. de LPA (Dimodan U) se calentó a 130°C hasta que la solución quedó transparente. Luego se enfrió a 80°C y se agregó a una solución de Tween 80 al 0,2% a 80°C. Se ultrasonizó durante 2 minutos. La dispersión se enfrió hasta temperatura ambiente. Por microscopía de luz polarizada no se vieron conglomerados ni cristales (o muy pocos). El sistema emulsionado de referencia (el aceite no lleva LPA, contiene 2,8% e.p. de aceite de soja - 0,31% e.p. de fitosterol - 0,2% e.p. de Tween 80) mostró muchos cristales de fitosterol de tamaño hasta milimétrico, al observarlos al microscopio de luz polarizada. Este ejemplo demuestra que pueden solubilizarse ingredientes o nutrientes lipófilos cristalinos en el interior de la estructura de las gotitas de aceite de la ISAMULSIÓN con su forma molecular, retardando o evitando su recristalización.

EJEMPLO 10: ISAMULSIÓN que contiene polisacáridos

Primero se mezcló, calentó y homogenizó con vórtex 1,2% e.p. de aceite de soja - 1,7% e.p. de Dimodan U (LPA) - 0,0075% e.p. de Dextran de Fluka (de peso molecular 1500 D) - 0,14% e.p. de agua hasta formar una solución clara y homogénea. La solución se agregó a 96,75% e.p. de agua en la cual se había dispersado 0,2% e.p. de Tween 80.

La mezcla se trató por ultrasonificación durante 2 minutos y se formó una ISAMULSIÓN. Este ejemplo demuestra que se pueden solubilizar moléculas poliméricas en la ISAMULSIÓN.

EJEMPLO 11: ISAMULSIÓN que contiene un aminoácido

Primero se mezcló, calentó y homogenizó con vórtex 0,51% e.p. de aceite de soja – 2,49% e.p. de Dimodan U (LPA) – 0,01% e.p. de L-leucina – 0,5% e.p. de agua hasta formar una solución clara y homogénea. La solución se agregó a 96,29% e.p. de agua en la cual se había dispersado 0,2% e.p. de Tween 80. La mezcla se trató por ultrasonificación durante 2 minutos y se formó una ISAMULSIÓN.

EJEMPLO 12: ISAMULSIÓN que contiene un azúcar

Primero se mezcló, calentó y homogenizó con vórtex 0,02% e.p. de aceite de soja – 2,98% e.p. de Dimodan U (LPA) – 0,02% e.p. de xilosa – 0,35% e.p. de agua y luego se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. Esta solución se agregó a 96,43% e.p. de agua en la cual se había dispersado un 0,2% e.p. de Tween 80. La mezcla se trató por ultrasonificación durante 2 minutos y se formó una ISAMULSIÓN. Este ejemplo demuestra que se pueden solubilizar ingredientes hidrófilos en la ISAMULSIÓN.

EJEMPLO 13: ISAMULSIÓN que contiene un antioxidante

Primero se calentó y se mezcló con vórtex 0,51% e.p. de aceite de soja – 2,49% e.p. de Dimodan U (LPA) – 0,03% e.p. de Lyc-O-Mato de Lycored (que contiene 10% de licopeno) hasta formar una solución homogénea. La solución se agregó a 96,77% e.p. de agua en la cual se había disuelto un 0,2% e.p. de Tween 80. La mezcla se trató por ultrasonificación durante 2 minutos y se formó una ISAMULSIÓN con el licopeno solubilizado en la nanoestructura interna de las gotitas de aceite. Este ejemplo demuestra que se pueden solubilizar antioxidantes lipófilos dentro de la estructura de las gotitas de aceite de la ISAMULSIÓN, dando lugar a una emulsión homogénea.

EJEMPLO 14: ISAMULSIÓN con el uso de fosfatidilcolina (PC) como LPA

Se mezclaron 0,1912 g de trioleína – 0,2643 g de fosfatidilcolina (PC) de soja (Epikuron 200 de Lucas Meyer; LPA) con 9,5 g de agua y 0,0375 g de Pluronic F127 (emulsionante), y se ultrasonificó durante 20 minutos. La emulsión resultante tenía las características de una ISAMULSIÓN, es decir gotitas con una estructura nanométrica interna autoensamblada que se había formado espontáneamente, tal como reveló la SAXS (véase fig. 17). También se obtuvo una ISAMULSIÓN mezclando 0,1912 g de acetato de vitamina E – 0,2643 g de fosfatidilcolina (PC) de soja (Epikuron 200 de Lucas Meyer; LPA) con 9,5 g de agua y 0,0375 g de Pluronic F127 (emulsionante) y ultrasonificando durante 20 minutos (fig. 18).

EJEMPLO 15: ISAMULSIÓN con el uso de mezclas de fosfolípidos como LPA y una mezcla de distintos aceites

Se mezcló un 2,2% e.p. de fosfatidilcolina de yema de huevo y soja (Lucas Meyer) con 2,2% e.p. de dioleína y 0,6% e.p. de tetradecano. Esta mezcla se añadió a 94,625% e.p. de agua que contenía 0,0375% e.p. de emulsionante (Pluronic F127). Luego se ultrasonificó durante 40 minutos y se formó una emulsión con las características típicas de una ISAMULSIÓN. La PC también se puede mezclar con fosfatidiletanolamina (PE) o con otro fosfolípido, para lograr las características de ISAMULSIÓN. Se puede utilizar cualquier combinación de distintos fosfolípidos y aceites para producir las características típicas de ISAMULSIÓN descritas en la presente invención.

EJEMPLO 16: ISAMULSIÓN con el uso de fosfoetanolamina (PE) como LPA y aceite

Se mezcló un 2,2% e.p. de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (AvantiPolar Lipids) con 0,8% e.p. de aceite de soja. Esta mezcla se añadió a 96,7% e.p. de agua que contenía 0,0375% e.p. de emulsionante (Pluronic F127). Después se ultrasonificó durante 40 minutos y se formó una emulsión que tenía las características típicas de una ISAMULSIÓN.

En todos los ejemplos descritos el tamaño de los dominios hidrófilos en las gotitas dispersadas de la emulsión está comprendido en el intervalo de 0,5 nm hasta 15 nm.

Las ISAMULSIONES preparadas según los ejemplos anteriores se pueden usar como tales o como aditivo.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Emulsión aceite-en-agua que contiene gotitas de aceite dispersadas cuyo diámetro está comprendido en el intervalo de 5 nm hasta unos cientos de micrómetros, las cuales poseen una estructura nanométrica interna auto-ensamblada con dominios hidrófilos líquidos cuyo diámetro está comprendido en el intervalo de 0,5 hasta 200 nm y contienen:
- 10 (i) un aceite elegido del grupo formado por aceites minerales, hidrocarburos, aceites vegetales, di-acilglicéridos, tri-acilglicéridos, aceites esenciales, aceites saborizantes, vitaminas lipófilas y mezclas de ellos;
- 15 (ii) un aditivo lipófilo (LPA) o mezclas de aditivos lipófilos e hidrófilos cuyo valor HLB resultante (balance hidrófilo-lipófilo) es inferior a 10, escogiendo el LPA del grupo formado por monoglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos;
- (iii) dominios hidrófilos en forma de gotitas o canales que contienen agua o un líquido polar no acuoso tal como un poliol,
- siendo la relación  $\alpha = \text{LPA} / (\text{LPA} \text{ más aceite}) \cdot 100$  inferior a 70,
- y la emulsión aceite-en-agua comprende una fase acuosa continua que contiene estabilizantes de la emulsión o emulsionantes.
- 20 2. Emulsión aceite-en-agua según la reivindicación 1, en la cual las gotitas de aceite tienen una estructura interna L2 en el intervalo de temperatura de 0°C hasta 100°C.
- 25 3. Emulsión aceite-en-agua según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la cual las gotitas de aceite contienen material liposoluble, insoluble en aceite o hidrosoluble elegido del grupo constituido por saborizantes, precursores de saborizantes, fármacos, nutracéuticos, luteína, ésteres de luteína,  $\beta$ -caroteno, tocoferol, acetato de tocoferol, tocotrienol, licopeno, co-Q10, aceite de linaza, ácido lipoico, vitamina B12, vitamina D, ácidos grasos  $\alpha$ - y  $\gamma$ -poli-insaturados, fitosteroles, extractos vegetales, aromas y precursores de aromas.
- 30 4. Emulsión aceite-en-agua según una de las reivindicaciones 1 a 3, cuyo estabilizante o emulsionante está escogido del grupo formado por emulsionantes de bajo peso molecular con un HLB > 8, proteínas lácteas o de soja, péptidos, hidrolizados de proteínas, copolímeros en bloque, hidrocoloides tensoactivos tales como goma arábica y goma xantana.
- 35 5. Emulsión aceite-en-agua según una de las reivindicaciones 1 a 4, que está en forma de polvo.
6. Emulsión aceite-en-agua según una de las reivindicaciones 1 a 5, la cual es un material de partida, un producto intermedio o un aditivo para un producto final.
- 40 7. Uso de la emulsión aceite-en-agua según una de las reivindicaciones 1 a 6 para incorporar ingredientes activos y/o funcionales a un producto alimentario, de comida para animales, nutracéutico, de alimentación funcional, nutricosmético, cosmético, farmacéutico o agroquímico.
- 45 8. Producto alimenticio que incluye la emulsión aceite-en-agua según una de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Producto cosmético que incluye la emulsión aceite-en-agua según una de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Producto farmacéutico que incluye la emulsión aceite-en-agua según una de las reivindicaciones 1 a 6.

Figura 1

Temperatura  
(°C)

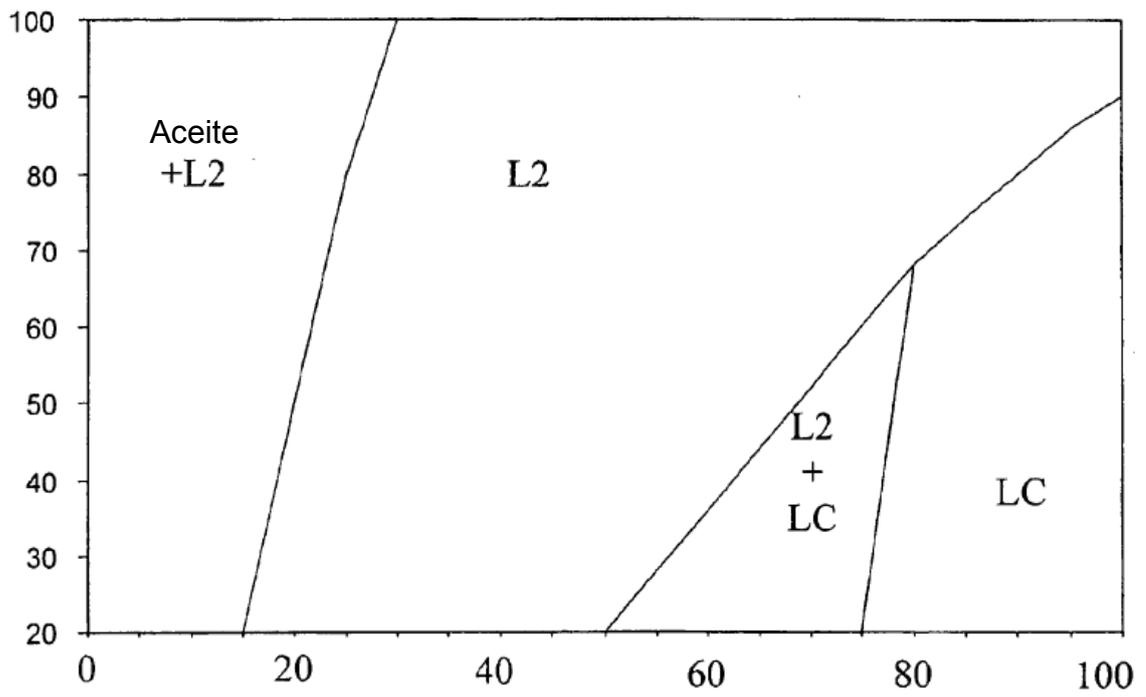


Figura 2

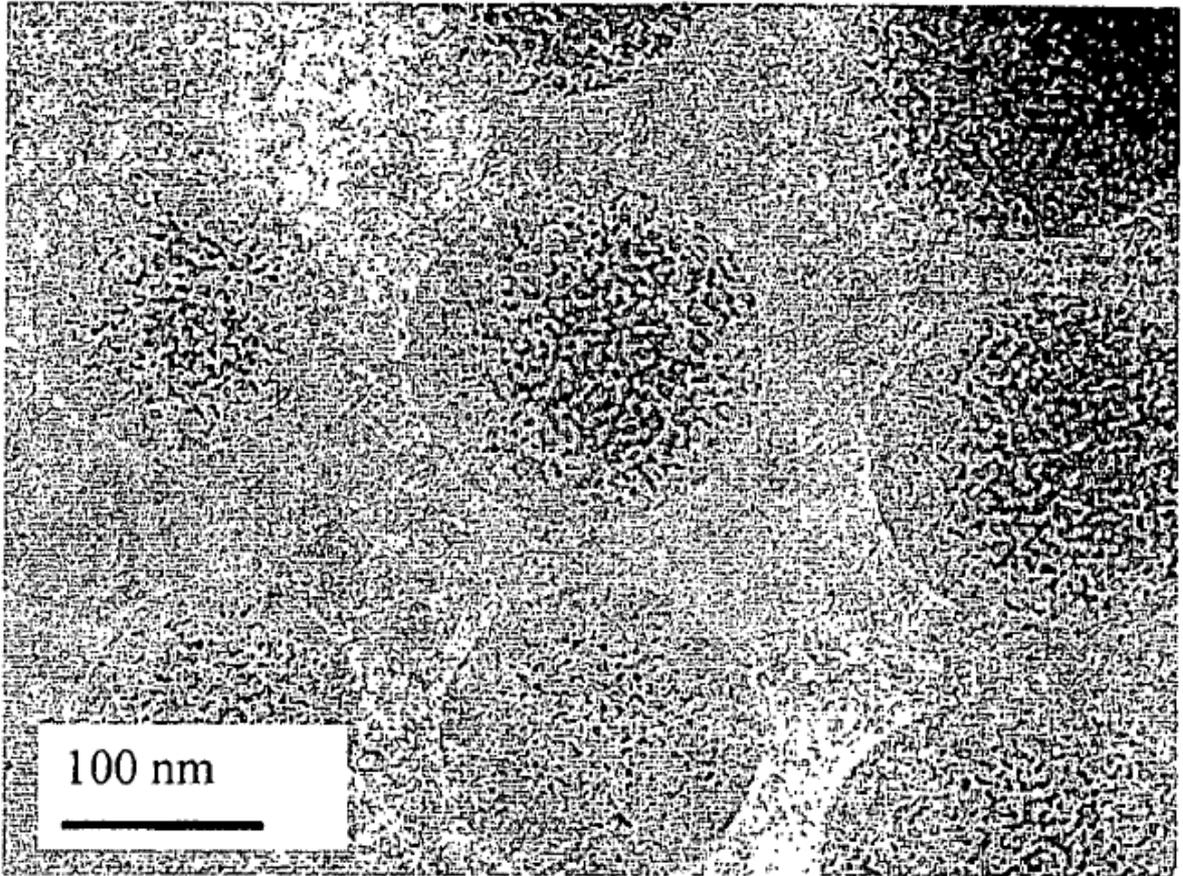


Figura 3

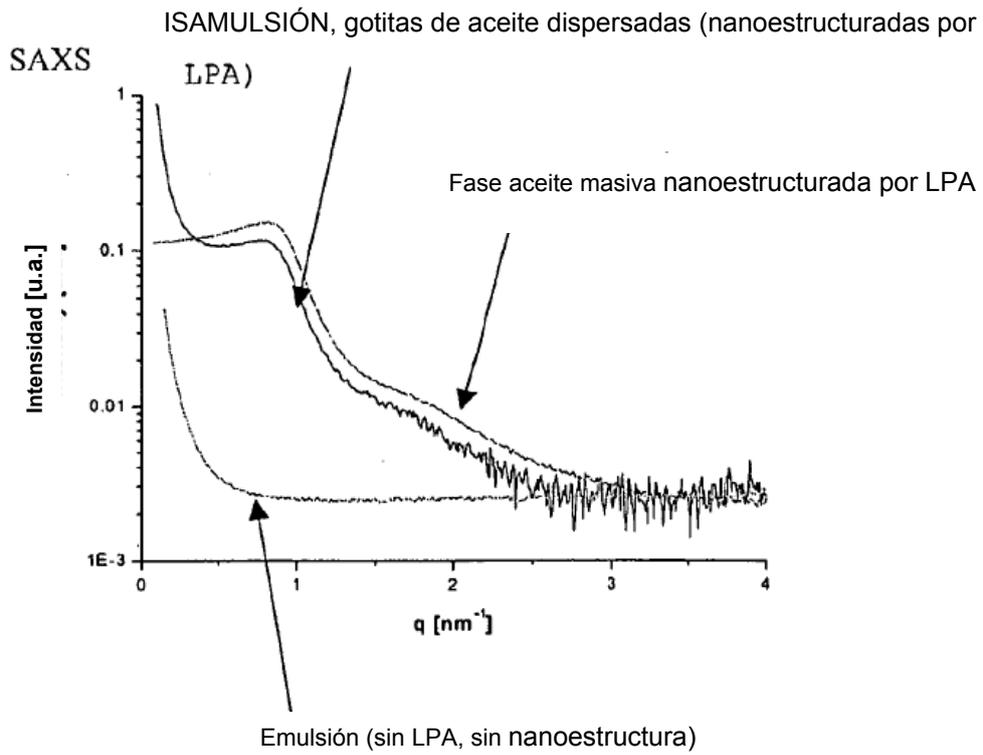


Figura 4

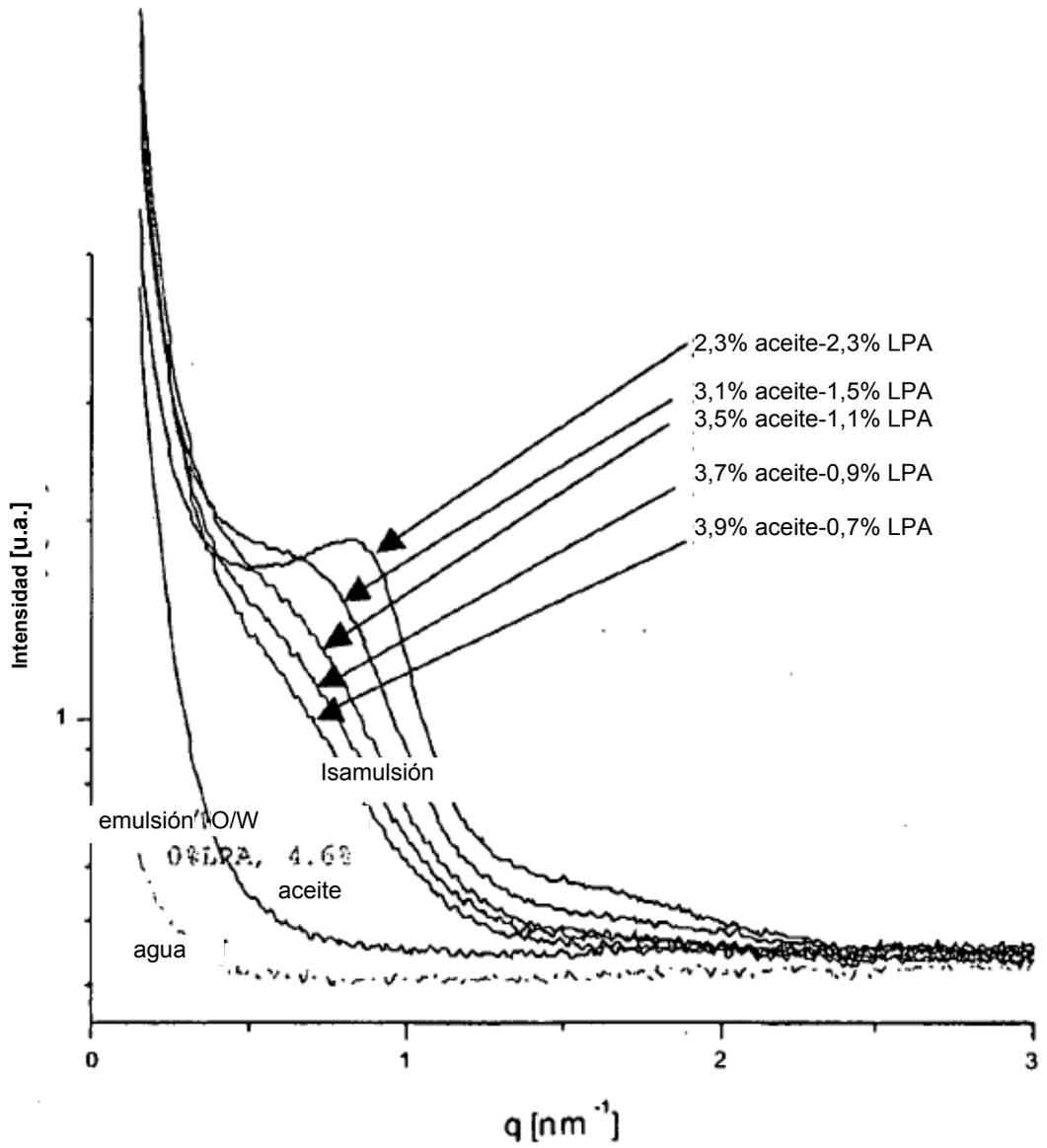


Figura 5

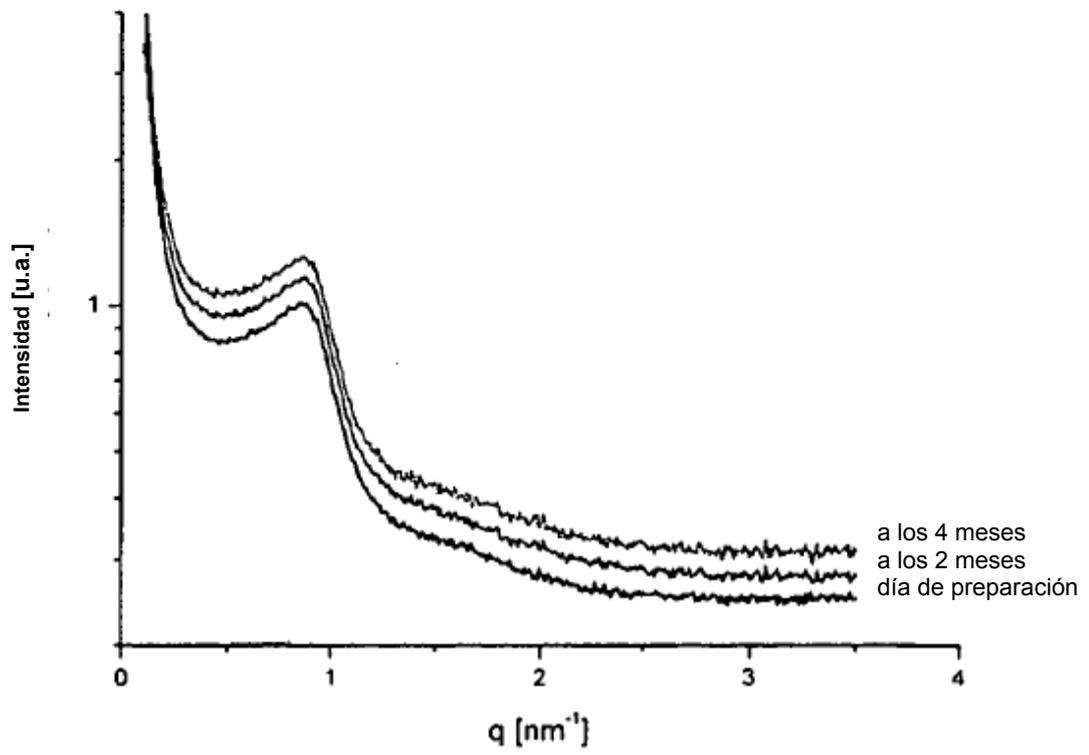


Figura 6

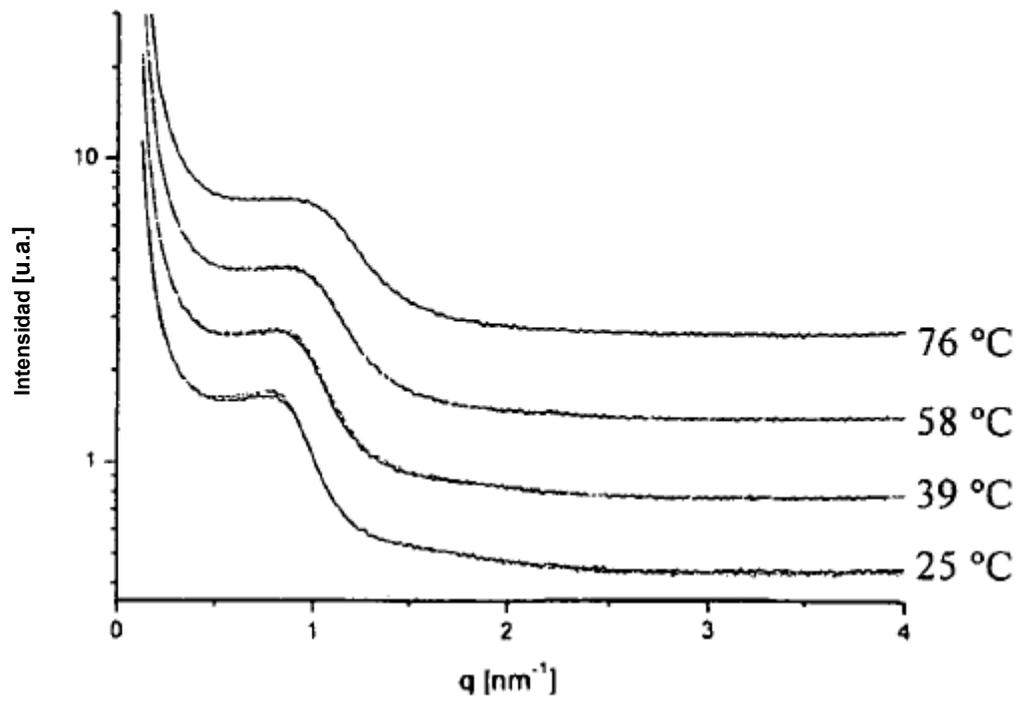


Figura 7

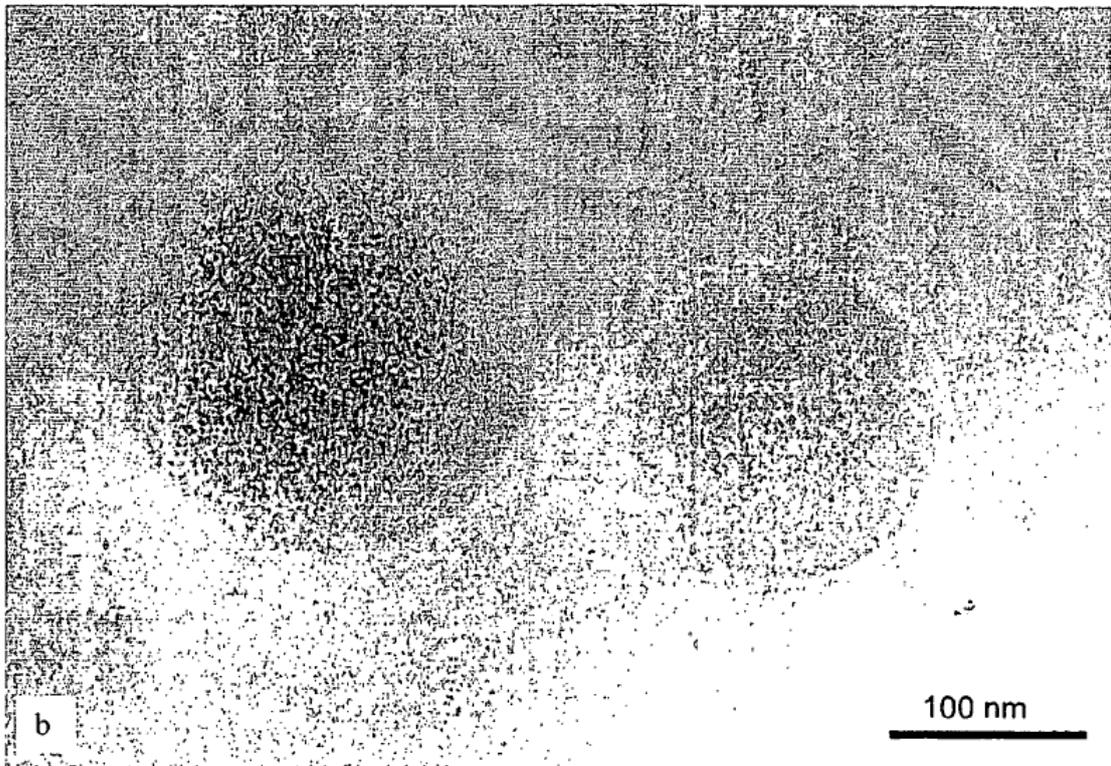
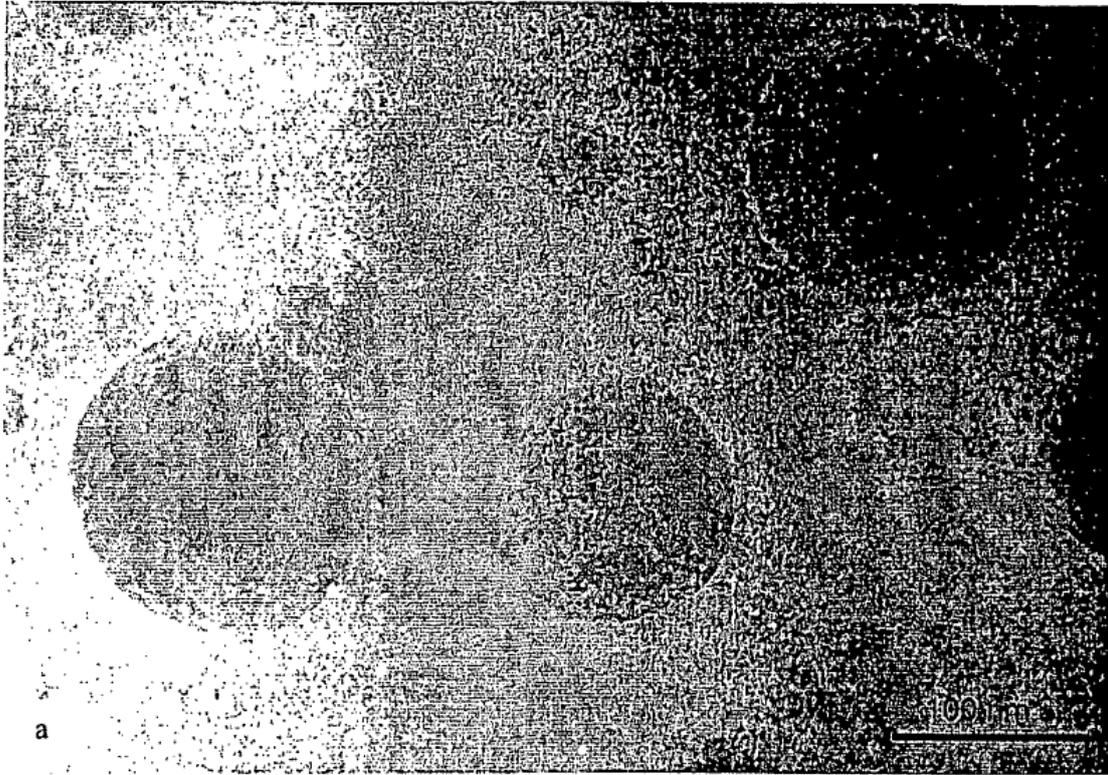


Figura 8

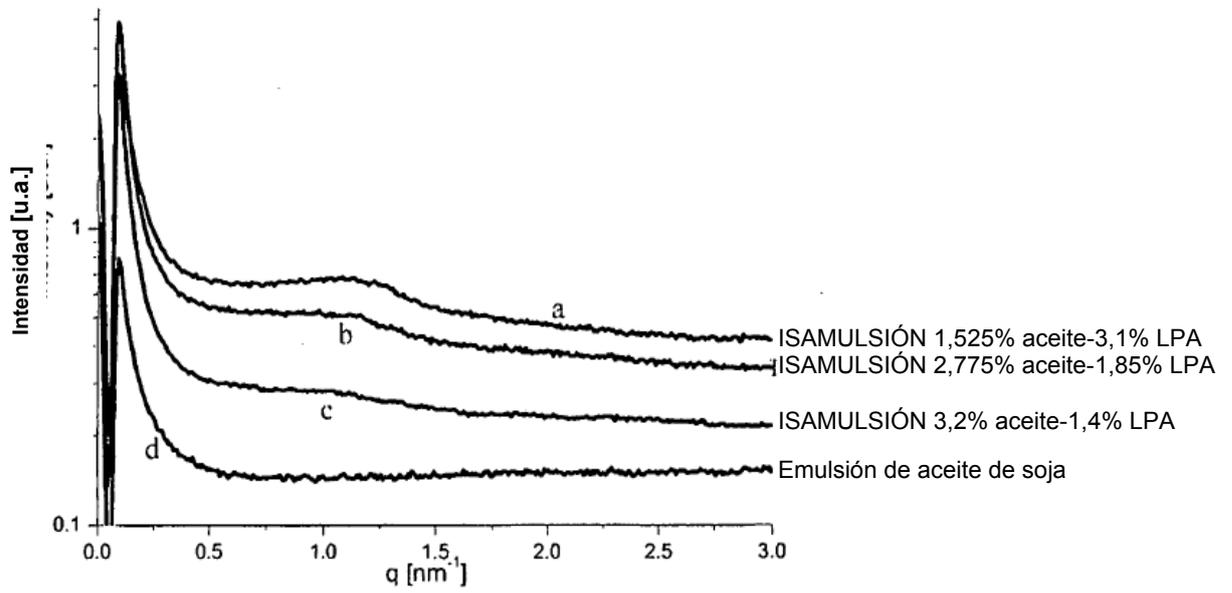


Figura 9

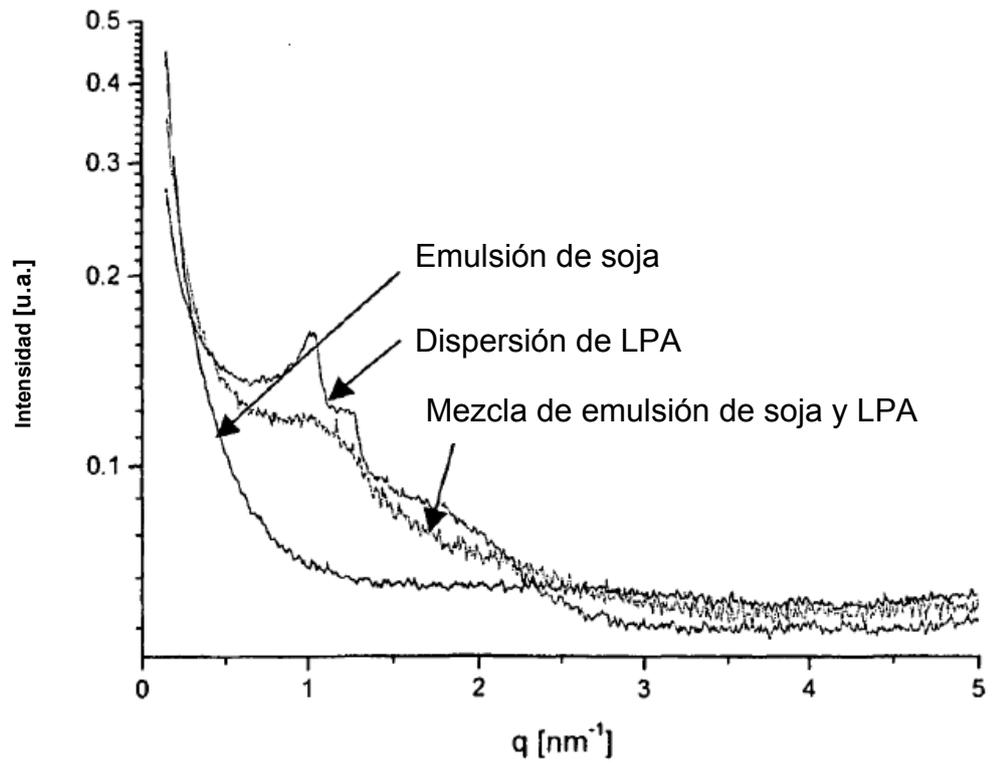


Figura 10

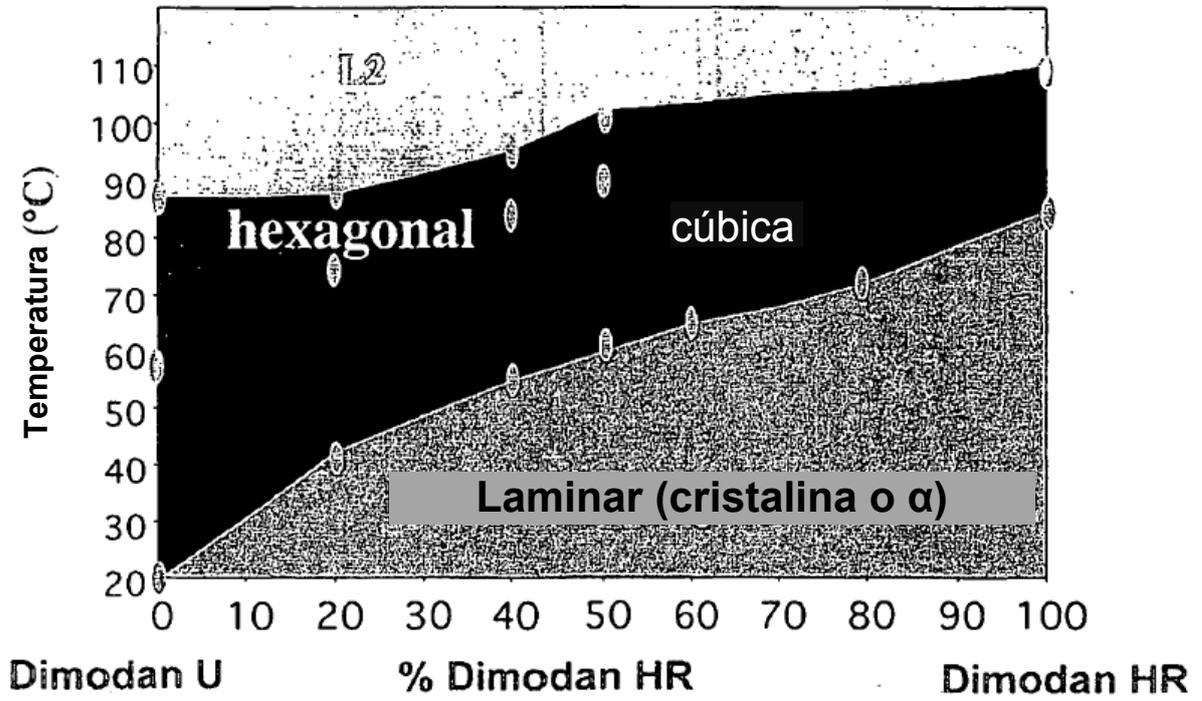


Figura 11

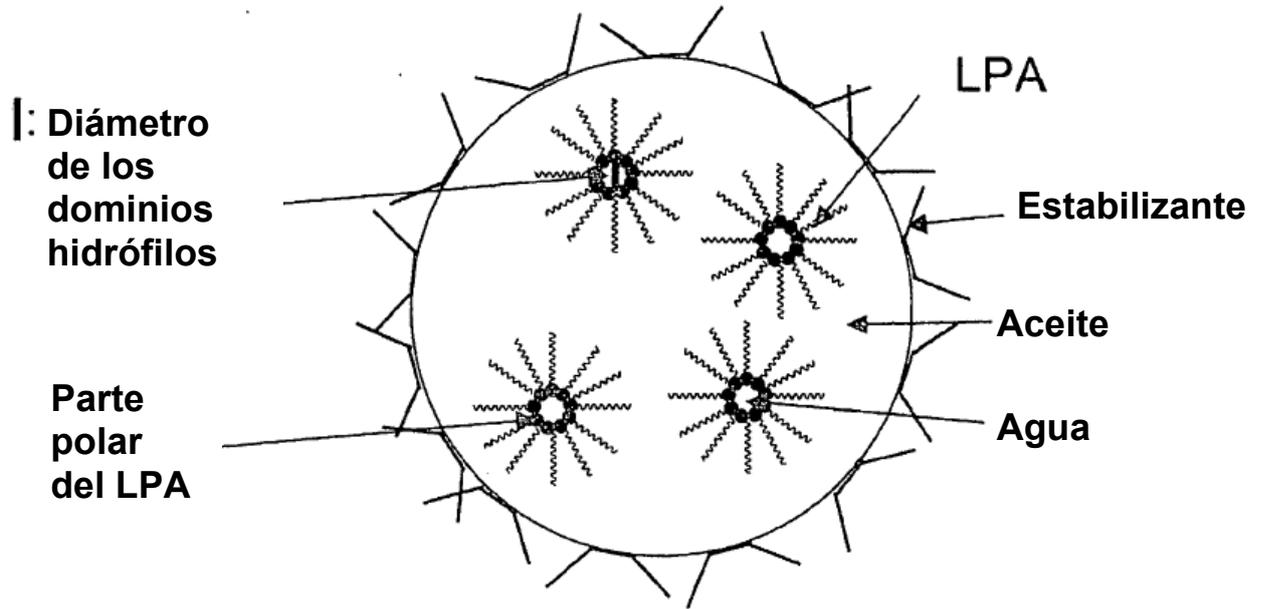


Figura 12

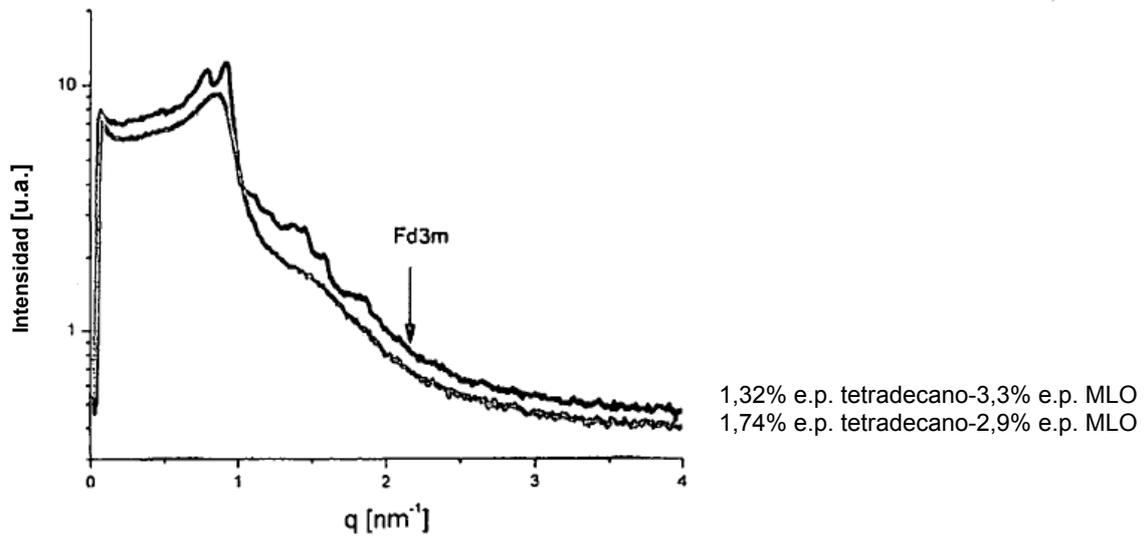


Figura 13

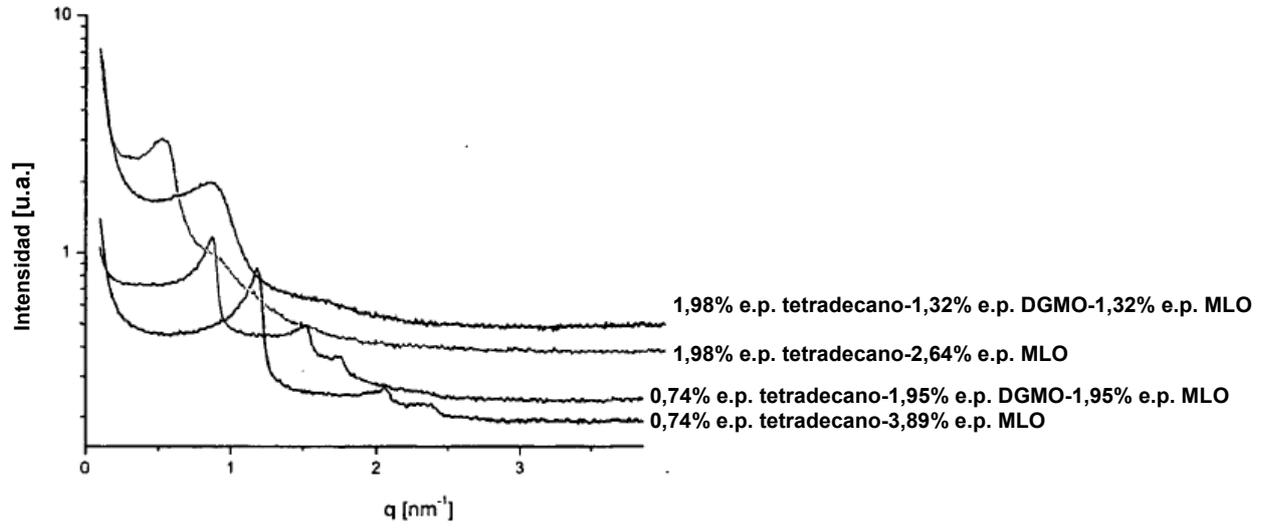


Figura 14

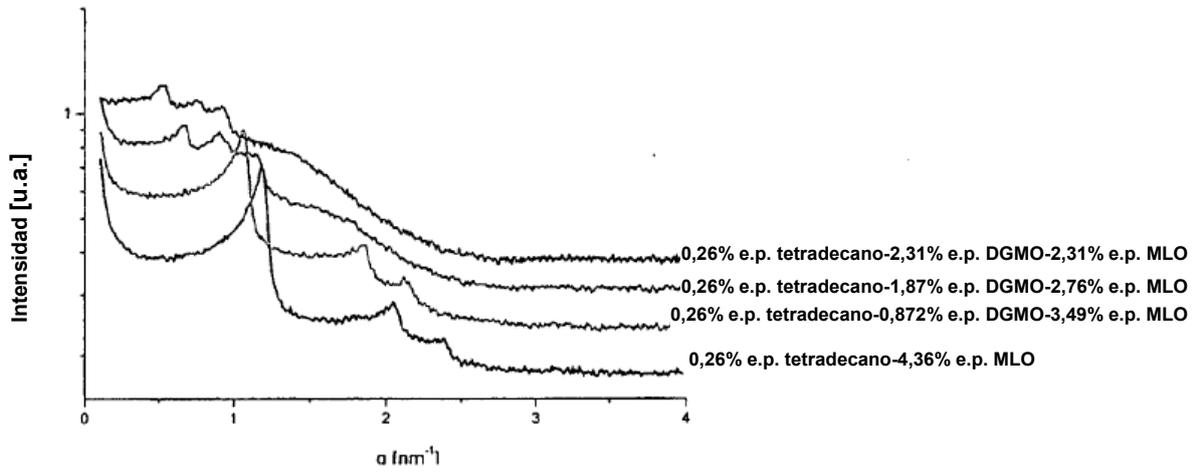


Figura 15

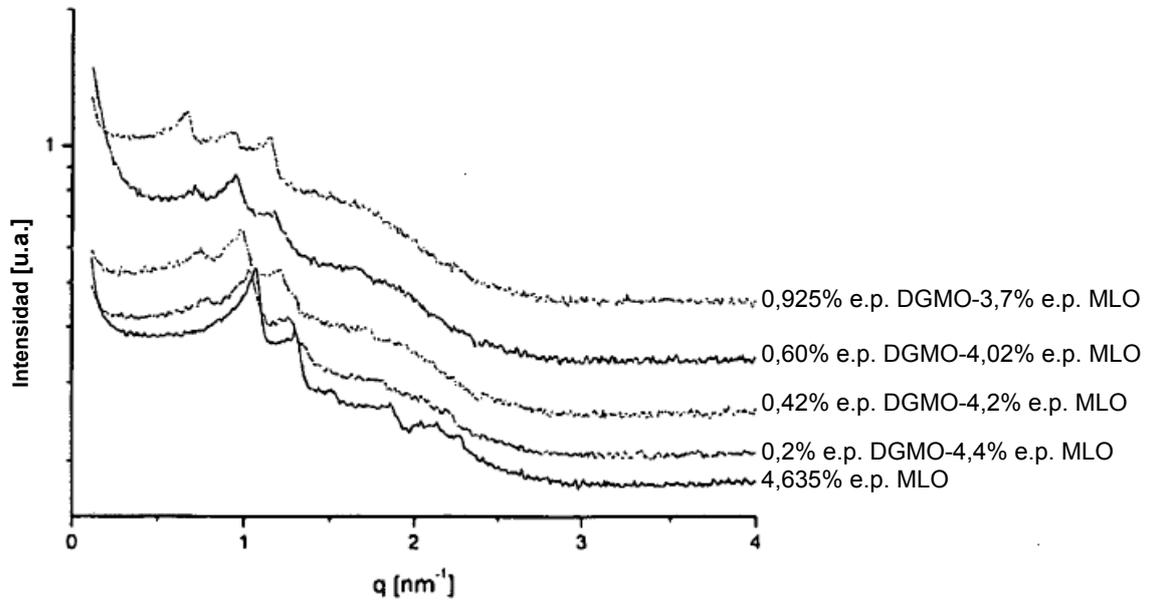


Figura 16

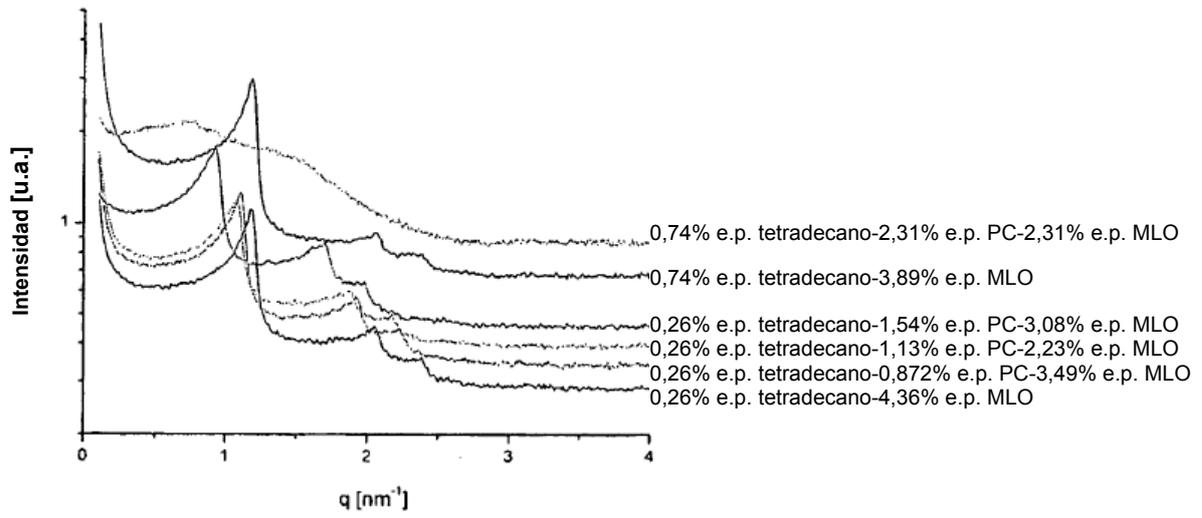


Figura 17

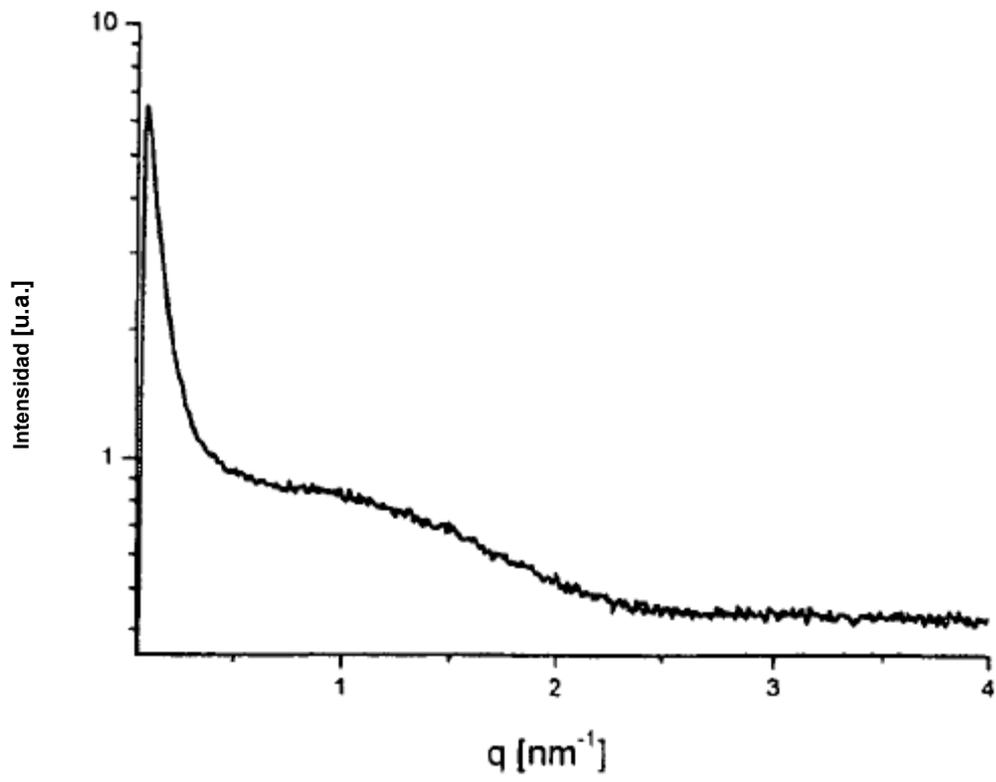


Figura 18

