

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 929**

51 Int. Cl.:

A23P 10/30 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A23L 33/15 (2006.01)

A23L 33/155 (2006.01)

A23L 33/175 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2011 PCT/ES2011/070118**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO11104410**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2011 E 11719583 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2540169**

54 Título: **Nanopartículas para encapsulación de compuestos, su preparación y usos**

30 Prioridad:

26.02.2010 ES 201030286

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

23.12.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE NAVARRA (50.0%)
Campus Universitario s/n
31009 Pamplona (Navarra), ES y
CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA Y
SEGURIDAD ALIMENTARIA LABORATORIO DEL
EBRO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AGÜEROS BAZO, MAITE;
ESPARZA CATALÁN, IRENE;
GONZÁLEZ FERRERO, CAROLINA;
GONZÁLEZ NAVARRO, CARLOS JAVIER;
IRACHE GARRETA, JUAN MANUEL y
ROMO HUALDE, ANA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

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

ES 2 594 929 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).

5

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas para encapsulación de compuestos, su preparación y usos

Campo de la invención

10

La presente invención se encuadra en los sectores alimentario, farmacéutico y cosmético y en el de la nanotecnología, y consiste en la encapsulación de compuestos biológicamente activos empleando caseína como agente de recubrimiento.

Antecedentes de la invención

15

La industria alimentaria necesita evolucionar tecnológicamente para satisfacer las nuevas demandas del consumidor. La nanotecnología presenta un gran potencial para revolucionar la industria alimentaria ya que, a través de esta tecnología es posible encapsular compuestos biológicamente activos [CBA], por ejemplo, sabores, vitaminas, minerales, aceites esenciales, compuestos antioxidantes, prebióticos, etc., con el fin de obtener numerosos beneficios, por ejemplo, incrementar la vida útil del producto; reducir la cantidad de CBA a utilizar; controlar su liberación; incrementar su biodisponibilidad; enmascarar sabores indeseados, etc.

20

A la hora de diseñar un vehículo adecuado para encapsular un CBA es muy importante seleccionar correctamente el material utilizado como agente de recubrimiento o matriz; para ello, se debe tener en cuenta, entre otros factores, la forma de administración, su toxicidad, el producto (alimenticio, cosmético, farmacéutico, etc.) en la que se va a incorporar la formulación, etc. En el campo de la nanotecnología alimentaria, no es recomendable emplear polímeros sintéticos ya que pueden presentar problemas de toxicidad. Los polímeros naturales no presentan esos inconvenientes; sin embargo, su utilización implica el desarrollo de métodos de producción de partículas más complicados; además, en la mayoría de los casos, el tamaño de partícula obtenido (superior a 100 µm en muchos casos) es difícil de controlar, por lo que tales nanopartículas pueden ser percibidas por el consumidor y alterar las características organolépticas del alimento diana.

25

Entre los materiales empleados tradicionalmente como agentes de recubrimiento de CBA se encuentran las proteínas. Se ha descrito el empleo de caseína como vehículo para encapsular CBA de carácter hidrófobo para su aplicación en alimentos (CA2649788 y EP2011472).

30

El documento US 5.173.322 se refiere a la producción de micelas de caseína reformada y al uso de dichas micelas como sustitución completa o parcial de la grasa en formulaciones de productos alimenticios.

35

El documento US 6.652.875 proporciona una formulación para la liberación de agentes bioactivos a superficies biológicas que comprenden al menos una caseína aislada y purificada y fosfoproteínas en forma de complejos de fosfato cálcico con caseína destinados a permanecer en la superficie de los tejidos de la cavidad oral o el tracto gastrointestinal.

El documento US 2002/0054914 describe un núcleo de fosfato cálcico/fármaco con micelas de caseína reconstruidas como agregados alrededor de los núcleos que forman estructuras micelares para la liberación de agentes farmacéuticos.

40

El documento WO2007/122613 proporciona micelas de caseína reensambladas como vehículos nanocapsulares para la liberación de compuestos biológicamente activos hidrofóbicos en comidas y bebidas. El procedimiento para obtener dichas micelas de caseína incluye la preparación de una solución acuosa que contiene una fuente de caseína, la adición de un codisolvente que comprende el compuesto biológicamente activo hidrofóbico a la solución de caseína y la adición posterior de iones citrato, iones fosfato e iones calcio a la mezcla previamente obtenida.

45

El ácido fólico (ácido pteroilmonoglutámico o vitamina B9), una vitamina hidrosoluble de tipo B incluida dentro del grupo de los folatos, es esencial para procesos bioquímicos importantes tales como la síntesis de DNA. Su carencia está asociada a la presencia de anemia megaloblástica, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, desórdenes de humor, algunos tipos de cáncer (colon, cuello uterino, leucemia, páncreas), defectos del tubo neural durante el desarrollo del feto, complicaciones en el embarazo e infertilidad masculina. Sin embargo, no puede ser sintetizado por el organismo, por lo que debe ser suministrado a través de diversos suplementos o de la dieta.

50

Aunque los folatos se encuentran presentes de un modo natural en los alimentos (por ejemplo, frutas y hortalizas), fundamentalmente en forma de poliglutamatos, su biodisponibilidad es incompleta, típicamente del 50 % o inferior. Por tanto, el consumo de alimentos fortificados con ácido fólico puede constituir una opción complementaria para incrementar la ingesta de dicha vitamina en aquellos casos en los que la ingesta de folatos sea inferior a la recomendada. No obstante, la biodisponibilidad del ácido fólico añadido a los alimentos no es total debido, entre otras causas, al efecto matriz (el ácido fólico puede enlazarse a algún componente del alimento impidiendo así su absorción), o bien a la presencia en el alimento de algún componente que reduzca su biodisponibilidad. Además, el ácido fólico no se absorbe bien cuando no se encuentra solubilizado en el intestino. Los suplementos o fortificaciones con ácido fólico administrados mediante cápsulas, comprimidos, etc., presentan el inconveniente de

55

5 que al disgregarse en el estómago debido a los ácidos gástricos, el ácido fólico precipita, convirtiéndose en su forma menos soluble, con lo que tan solo una parte del ácido fólico suministrado llega al intestino.

Por otra parte, la fortificación de alimentos con folatos o con ácido fólico es un proceso complicado debido a que tanto los folatos y sus derivados como el ácido fólico son sensibles a la temperatura, luz, y cambios de pH, entre otros factores, por lo que su estabilidad se ve comprometida por las condiciones de procesado del alimento y la cantidad bioactiva de la vitamina accesible para el consumidor puede resultar muy reducida. Así pues, a la hora de fortificar alimentos con dicha vitamina, es preciso tener en cuenta estos aspectos, ya que las mayores pérdidas pueden tener lugar durante el almacenamiento de los alimentos y su preparación.

Se ha descrito el enriquecimiento de alimentos con ácido fólico, fundamentalmente en productos lácteos y cereales. También se han descrito suplementos dietéticos (EP2002839) o alimentos enriquecidos con ácido fólico o folatos, como embutidos cárnicos (ES2302571), lácteos (EP1941804), alimentos infantiles (US4753926), o incluso alimentos enlatados a base de pollo, cerdo o vacuno (RU2223672 y RU2213493). Sin embargo, en los casos descritos no se contemplan las posibles interacciones de la vitamina con la matriz alimentaria, ni su biodisponibilidad.

También se ha descrito un método de obtención de microcápsulas de alginato y pectina que contienen ácido fólico para protegerlo de los factores medioambientales que dan lugar a su degradación, así como de las condiciones gástricas, consiguiendo su liberación en intestino. Sin embargo, las microcápsulas obtenidas son de tamaños excesivamente grandes, lo que incide en las características organolépticas del alimento diana. También se ha diseñado un método para encapsular el ácido fólico en nanosferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y conseguir una liberación sostenida de la misma; aunque los resultados fueron positivos, su aplicación en alimentos queda comprometida por el empleo de ese polímero, ya que está restringido a las áreas de medicina y farmacia.

25 Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar sistemas de encapsulación de CBA, preferentemente hidrosolubles, más preferentemente CBA hidrosolubles ácidos, por ejemplo, ácido fólico, que superen la totalidad o parte de los inconvenientes previamente mencionados.

Sumario de la invención

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que nanopartículas formadas con caseína que comprenden, además, un aminoácido básico (por ejemplo, arginina o lisina) y un metal apto para alimentación (por ejemplo, calcio), constituyen un nuevo sistema de encapsulación y estabilización de compuestos biológicamente activos (CBA), tanto hidrosolubles como liposolubles, preferentemente hidrosolubles, más preferentemente CBA hidrosolubles ácidos, para su aplicación en alimentos, en cosmética y en farmacia.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para producir nanopartículas que comprenden una matriz de caseína, un aminoácido básico y un metal de grado alimentario seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones. Dicho procedimiento es sencillo y aplicable a escala industrial. Ventajosamente, dicho procedimiento no incluye polímeros sintéticos ni reactivos que no estén aprobados como aditivos alimentarios, minimizando la inclusión de tensioactivos o emulgentes, y permite obtener nanopartículas de escala nanométrica, con un tamaño de partícula controlable.

Las nanopartículas obtenidas según el procedimiento de la invención pueden ser utilizadas como aditivos tecnológicos; además, tienen la capacidad de encapsular un CBA, preferentemente, un CBA hidrosoluble, más preferentemente un CBA hidrosoluble ácido, como por ejemplo una vitamina de tipo B o C, tal como ácido fólico, ácido pantoténico y ácido ascórbico, u otros compuestos de carácter hidrofílico, aunque también pueden incorporar CBA liposolubles.

Dichas nanopartículas son estables y capaces de proteger el CBA de su degradación por agentes externos, por ejemplo, luz, cambios de pH, oxidación, etc., tanto durante el procesado del producto (por ejemplo, alimento, producto farmacéutico o cosmético) como durante su almacenamiento, y, además, cuando se aplican en alimentación, protegen el CBA de las condiciones ácidas del estómago, impidiendo su liberación a lo largo del tracto gástrico, evitando así su precipitación y, por lo tanto, que su biodisponibilidad se vea reducida. Además, se ha encontrado que dichas nanopartículas son capaces de disolverse en medio intestinal (simulado) facilitando la completa liberación del CBA en el intestino para su correcta absorción, y evitando además problemas de toxicidad de cualquier tipo. Ventajosamente, dichas nanopartículas son inertes en el alimento en el que se introducen, evitando de este modo que el CBA reaccione con los distintos componentes de la matriz y se reduzca su biodisponibilidad.

Adicionalmente, una de las características más importantes de las nanopartículas obtenidas por el procedimiento de la invención radica en el aprovechamiento de la caseína como vehículo natural para la protección del CBA tanto de las condiciones ambientales como de las condiciones gástricas, facilitando su liberación en el intestino y mejorando así su biodisponibilidad, ya que la caseína per se posee demostradas propiedades nutricionales, de modo que complementa los efectos beneficiosos del propio CBA.

5 En una realización particular, dicho procedimiento comprende, además, el secado de la suspensión que contiene dichas nanopartículas con el objetivo de obtener la formulación en forma de polvo, manteniendo estable en el tiempo el CBA; este tipo de formulación en forma de polvo es particularmente adecuado para su empleo en alimentos sólidos. Ventajosamente, dicho tratamiento de secado se lleva a cabo en presencia de un agente protector de las nanopartículas. Las nanopartículas conteniendo un CBA así obtenidas se pueden resuspender con facilidad en
10 medio acuoso, protegiendo el CBA de su degradación en disolución. El producto final obtenido es estable y protege al CBA durante largos periodos de almacenamiento y, además, es aplicable a distintos tipos de alimentos, tanto líquidos (por ejemplo, bebidas, etc.) como sólidos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende dichas nanopartículas para su empleo en los sectores alimentario, farmacéutico o cosmético. De hecho, dichas nanopartículas pueden incorporarse
15 en cremas, geles e hidrogeles, con el fin de obtener preparados cosméticos estables y adecuados para su empleo en este campo. Asimismo, dichas nanopartículas pueden formularse con excipientes adecuados para la administración de dichas nanopartículas por vía tópica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un producto alimenticio, que comprende dicha composición a base de nanopartículas de caseína proporcionadas por esta invención. En una realización particular, dicho producto
20 alimenticio se encuentra en forma líquida, semisólida o sólida.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una representación esquemática de una realización particular del procedimiento de la invención aplicado a la obtención de las nanopartículas de caseína conteniendo ácido fólico.

La figura 2 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de caseína vacías. La barra negra situada en el margen inferior izquierdo de las imágenes corresponde a una referencia de 100
25 nm.

La figura 3 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de caseína conteniendo ácido fólico. La barra negra situada en el margen inferior izquierdo de las imágenes corresponde a una referencia de 100 nm.

La figura 4 muestra la relación entre la cantidad de ácido fólico encapsulada y la cantidad de caseína por cada mg de ácido fólico añadido a la formulación. En todas las formulaciones la proporción en peso entre la lisina y la proteína, antes de la adición de la solución de ácido fólico, es de 1:12.

La figura 5 muestra las micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas de caseína conteniendo ácido fólico y con lisina en su formulación sin tratamiento de altas presiones (A y B), con tratamiento a
35 100 MPa, 5 minutos (C), con tratamiento a 400 MPa, 5 minutos (D) y con tratamiento a 800 MPa, 5 min (E).

La figura 6 muestra la micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas de caseína conteniendo ácido fólico y con arginina en su formulación con tratamiento a 400 MPa, 5 minutos.

La figura 7 muestra la liberación de ácido fólico desde las nanopartículas de caseína sin tratamiento de altas presiones tras su incubación en medios gástrico simulado (FGS) (durante las 2 primeras horas: 0-2 h) e intestinal simulado (FIS) (2 a 24h) a 37 ± 1 °C. Los datos muestran la media \pm desviación típica (n=6).

La figura 8 muestra la liberación de ácido fólico desde las nanopartículas de caseína con tratamiento de altas presiones (A) 150 MPa, 5 minutos y B) 400MPa, 5 minutos) tras su incubación en medios gástrico simulado (FGS) (durante las 2 primeras horas: 0-2 h) e intestinal simulado (FIS) (2 a 8h) a 37 ± 1 °C. Los datos muestran la media \pm desviación típica (n=4).

La figura 9 muestra la concentración de ácido fólico en suero (ng/mL) en función del tiempo, tras la administración de las distintas formulaciones de la vitamina en animales de laboratorio. Los resultados muestran la media \pm desviación estándar (n = 5).

A) Vía intravenosa, dosis 1 mg/kg.

B) Vía oral, dosis 1 mg/kg: ácido fólico no encapsulado disuelto en agua (●); ácido fólico encapsulado en nanopartículas de caseína dispersas en agua (■); ácido fólico encapsulado en nanopartículas de caseína tratadas por altas presiones dispersas en agua (▲).
50

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona unas nanopartículas de caseína y unos métodos para la encapsulación de compuestos biológicamente activos (CBA), con el objetivo de preservarlos de la degradación por agentes externos,
55 tales como luz, cambio de pH, oxidación, etc.

Definiciones

5 Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se expone el significado de algunos términos y expresiones tal como se utilizan en el contexto de la invención.

Un “aminoácido básico”, tal como aquí se utiliza, incluye lisina, arginina e histidina.

10 “Caseína”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una proteína conjugada que constituye aproximadamente el 80 % del total de proteínas de la leche. Se trata de una proteína de tipo fosfoproteína que entra dentro de la definición de globulinas; es soluble; posee una gran capacidad de retención de agua y precipita a un pH aproximado de 4,6 a 20 °C. Se encuentra constituida por cuatro fracciones fundamentales (α s1-caseína, α s2-caseína, β -caseína y κ -caseína) diferenciadas entre sí por su composición en aminoácidos, su distribución de cargas y su tendencia a formar agregados en presencia de calcio. En la leche, las caseínas se encuentran formando grandes partículas coloidales de entre 50 a 600 nm de diámetro (150 nm aproximados en promedio) denominadas “micelas de caseína”. Estas 15 partículas se forman por interacciones hidrofóbicas y por formación de complejos del fosfato de calcio por parte de los radicales de fosfoserina presentes en la estructura de la caseína. Dichas micelas constituyen un sistema coloidal muy estable en la leche, siendo una de las principales causas de su color, estabilidad al calor y coagulación por renina.

20 Un “compuesto biológicamente activo” o “CBA”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier compuesto que presenta una actividad nutricional, terapéutica y/o cosmética, tanto liposoluble como hidrosoluble. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de CBA de acuerdo con la presente invención incluyen aminoácidos, antimicrobianos, aromatizantes, conservantes, edulcorantes, esteroides, fármacos, hormonas, lípidos, péptidos, polinucleótidos, polisacáridos, proteínas, proteoglicanos, saborizantes, vitaminas, etc.

25 Un “compuesto biológicamente activo hidrosoluble” o “CBA hidrosoluble”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un compuesto que presenta una actividad nutricional, terapéutica y/o cosmética y que es soluble (muy soluble, fácilmente soluble, soluble, bastante soluble o poco soluble) en una solución acuosa según los criterios definidos por la Real Farmacopea Española:

Términos descriptivos	Volúmenes aproximados de disolvente en mililitros (mL) por gramo de soluto, referido a una temperatura comprendida entre 15 °C y 25 °C
Muy soluble	Inferior a 1
Fácilmente soluble	de 1 a 10
Soluble	de 10 a 30
Bastante soluble	de 30 a 100
Poco soluble	de 100 a 1.000
Muy poco soluble	de 1.000 a 10.000
Prácticamente insoluble	mayor que 10.000

30 Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de CBA hidrosolubles incluyen vitaminas, por ejemplo, vitaminas de las familias B o C, y sus derivados, sales o ésteres; ácido hialurónico, condroitín sulfato, ácido tióctico, sus sales o ésteres, etc. En una realización particular, dicho CBA hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina, ácido pantoténico, tiamina monofosfato, tiamina pirofosfato, tiamina trifosfato, ácido 35 ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos (derivados del ácido fólico: poliglutamatos de folato; folatos de poliglutamato), ácido folínico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico (ácido alfa-lipoico), ácido p-cumárico, ácido cafeico, sus derivados, ésteres o sales farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas.

40 Un “compuesto biológicamente activo liposoluble” o “CBA liposoluble”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un compuesto que presenta una actividad nutricional, terapéutica y/o cosmética y que es soluble (muy soluble, fácilmente soluble, soluble, bastante soluble o poco soluble) en grasas y aceites, según los criterios definidos por la Real Farmacopea Española. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de CBA liposolubles incluyen vitaminas, por ejemplo, vitaminas de las familias A, D, E, K y sus derivados, fosfolípidos, carotenoides (carotenos, licopeno, luteína, capsantina, zeaxantina etc.), ácidos grasos omega-3 (ácido docosahexanoico (DHA), ácido eicosapentanoico (EPA), etc.), fitostanoles y fitosteroles (sitosterol, campesterol, estigmasterol, etc.), polifenoles (quercetina, rutina, 45 resveratrol, kaempferol, miricetina, isoramnetina, etc.) y sus derivados.

5 Un producto se dice que es de “grado alimentario” cuando es seguro para su empleo en alimentación, humana o animal, según el Código Alimentario (Codex Alimentarius) de un país o de una organización, por ejemplo, de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) o de la Organización Mundial de la Salud (OMS); en consecuencia, un producto de “grado alimentario” es un producto no tóxico “apto para su empleo en alimentación” por lo que ambas expresiones son sinónimas y se utilizan indistintamente en esta descripción.

10 Un “metal divalente”, tal como aquí se utiliza, incluye a cualquier elemento metálico cuya valencia es 2, por ejemplo, un metal alcalinotérreo, por ejemplo, calcio, magnesio, zinc, etc., o, si tiene varias valencias, una de ellas es 2, por ejemplo, hierro, etc., con la condición de que sea farmacéutica o cosméticamente aceptable, o apto para su empleo en alimentación.

15 Un “metal trivalente”, tal como aquí se utiliza, incluye a cualquier elemento metálico cuya valencia es 3, o, si tiene varias valencias, una de ellas es 3, por ejemplo, hierro, etc., con la condición de que sea farmacéutica o cosméticamente aceptable, o apto para su empleo en alimentación.

“Nanopartícula”, tal como aquí se utiliza, se refiere a sistemas coloidales de tipo esferas o formas similares de tamaño inferior a 1 micrómetro (μm), preferentemente del orden de 10 a 900 nanómetros (nm).

20 “Tamaño medio”, tal como aquí se utiliza, se refiere al diámetro promedio de la población de nanopartículas que se mueve conjuntamente en un medio acuoso. El tamaño medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos por el experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental (véase más adelante). Las nanopartículas de la invención se caracterizan por presentar un tamaño medio de partícula inferior a 1 μm , comprendido, típicamente, entre 1 y 999 nm, preferentemente entre 10 y 900 nm, más preferentemente entre 50 y 500 nm, aún más preferentemente entre 100 y 200 nm. En una realización particular, las nanopartículas de la invención presentan un tamaño medio de partícula comprendido entre 50 y 200 nm, preferentemente de alrededor de 140 nm aproximadamente.

Procedimiento de obtención de nanopartículas

30 En un aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de nanopartículas que comprenden una matriz de caseína, un aminoácido básico y un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones (nanopartículas de la invención), en adelante “procedimiento [1] de la invención”, que comprende:

- a) preparar una solución acuosa que contiene una fuente de caseína y un aminoácido básico; y
- b) añadir una disolución acuosa de un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones a la solución de la etapa a).

35 Asimismo, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de nanopartículas que comprenden una matriz de caseína, un aminoácido básico, un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones, y un compuesto biológicamente activo (nanopartículas cargadas de la invención), en adelante “procedimiento [2] de la invención”, que comprende:

- 40 a) mezclar (i) una solución acuosa que contiene una fuente de caseína y un primer aminoácido básico con (ii) una solución que contiene un compuesto biológicamente activo; y
- b) añadir una disolución acuosa de un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones a la mezcla resultante de la etapa a).

45 En la etapa a) del procedimiento [1] de la invención se prepara una solución acuosa que contiene una fuente de caseína y un aminoácido básico por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, mediante la adición de dicha fuente de caseína y el aminoácido básico a un medio acuoso.

50 En la etapa a) del procedimiento [2] de la invención se mezcla una solución acuosa (i) que contiene una fuente de caseína y un aminoácido básico, con una solución (ii) que contiene un CBA. La naturaleza y composición de dicha solución (ii) que contiene el CBA puede variar en función del tipo y naturaleza del CBA. Así, en una realización particular, cuando el CBA es un CBA hidrosoluble, dicha solución (ii) que contiene el CBA es una solución acuosa; en otra realización particular, cuando el CBA es un CBA hidrosoluble ácido, dicha solución (ii) que contiene el CBA es una solución acuosa que comprende, además, un segundo aminoácido básico; y, en otra realización particular, cuando el CBA es un CBA liposoluble, dicha solución (ii) que contiene el CBA es una suspensión del mismo en medio acuoso o preferentemente una solución orgánica, más preferentemente una solución orgánica de un disolvente miscible con agua, tal como un alcohol, por ejemplo, etanol.

55 La caseína que puede ser utilizada para la puesta en práctica de ambos procedimientos [procedimientos [1] y [2] de la invención] puede proceder prácticamente de cualquier fuente de caseína, por ejemplo, leche, judías, etc. La caseína puede encontrarse en dicha solución en forma de ácido caseínico o caseinato. En una realización particular, dicha fuente de caseína comprende caseína en forma de caseinato, preferiblemente caseinato sódico. Aunque el

5 caseinato cálcico y el fosfocálcico también se podrían utilizar, en la práctica resultan menos ventajosos ya que el calcio se emplea para formar las nanopartículas tras mezclar el caseinato con el principio activo por lo que si la solución de caseinato cuenta ya con calcio en el medio, la puesta en práctica de dichos procedimientos puede verse seriamente comprometida.

10 La cantidad de caseína que puede contener la solución acuosa formada en la etapa a) del procedimiento [1] de la invención, así como la solución acuosa (i) [que contiene una fuente de caseína y un primer aminoácido básico] utilizada en la etapa a) del procedimiento [2] de la invención, puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de caseína contenida en dicha solución acuosa está comprendida entre 0,1 % y 10 % (p/v), preferentemente entre 0,5 % y 5 %, más preferentemente entre 1 % y 3 %.

15 El aminoácido básico contribuye a la disolución de la caseína y, en su caso, del CBA, en particular, de CBA hidrosolubles ácidos, por lo que desempeña un papel muy importante en la producción de las nanopartículas, tanto cargadas con CBA como no cargadas, de la invención. Efectivamente, parece que el aminoácido básico, al aumentar el pH de la solución permite disolver el caseinato sin necesidad de tener que utilizar sales inorgánicas, y, además, actúa como base para mantener los extremos hidrófilos de las fracciones kappa (κ) de la caseína en forma aniónica, de modo que las partículas con carga superficial negativa se mantienen en suspensión y no se agregan
20 debido a repulsiones electrostáticas.

El aminoácido básico que puede ser utilizado para la puesta en práctica de ambos procedimientos [procedimientos [1] y [2] de la invención] se selecciona del grupo que consiste en arginina, lisina, histidina, y sus mezclas, preferentemente, entre arginina, lisina y sus mezclas. El aminoácido básico, que puede estar dentro o fuera de las nanopartículas de la invención, juega un papel fundamentalmente tecnológico ya que facilita la disolución de los
25 componentes antes de la formación de las nanopartículas y mantiene el pH apropiado tras su obtención, a ambos lados de la nanopartícula (interior y exterior). A modo ilustrativo, el ácido fólico es poco soluble en agua, pero fácilmente soluble en solución acuosa ligeramente alcalina, por lo que la presencia del aminoácido básico ayuda a disolver el ácido fólico.

30 En una realización particular del procedimiento [2] de la invención, cuando el CBA es un CBA hidrosoluble ácido, dicha solución (ii) que contiene el CBA es una solución acuosa que comprende, además, un segundo aminoácido básico (con el fin de evitar que precipite el CBA). Aunque en ese caso se contempla la posibilidad de utilizar dos aminoácidos básicos diferentes, en una realización particular, el aminoácido básico utilizado en la elaboración de la solución acuosa que contiene una fuente de caseína (primer aminoácido básico) y el utilizado en la elaboración de la solución acuosa que contiene un CBA (segundo aminoácido básico) es el mismo y se selecciona del grupo que
35 consiste en arginina, lisina, histidina, y sus mezclas, preferentemente, entre arginina, lisina y sus mezclas.

La cantidad de aminoácido básico que puede contener la solución formada en la etapa a) del procedimiento [1] de la invención y en la solución (i) de la etapa a) del procedimiento [2] de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, y, en general, depende del aminoácido básico empleado. Por tanto, aunque la relación en peso aminoácido básico:caseína puede variar ampliamente, en una realización particular, la relación en peso aminoácido
40 básico:caseína en la solución formada en la etapa a) del procedimiento [1] de la invención o en la solución (i) del procedimiento [2] de la invención está comprendida entre 1:1 y 1:50, preferentemente entre 1:10 y 1:40, más preferentemente de aproximadamente 1:12 cuando el aminoácido básico utilizado es lisina o de aproximadamente 1:25 cuando el aminoácido básico utilizado es arginina.

45 Cuando el CBA es un CBA hidrosoluble ácido, la solución (ii) de la etapa a) del procedimiento [2] de la invención, que contiene dicho CBA, comprende, además, un segundo aminoácido básico, que, como se ha mencionado previamente, puede ser igual o diferente a dicho primer aminoácido básico; en este caso, la relación aminoácido básico:caseína en el procedimiento [2] de la invención, es decir, tras la mezcla de las soluciones (i) y (ii) de la etapa a) de dicho procedimiento, está comprendida entre 1:1 y 1:50, preferentemente entre 1:5 y 1:20, más preferentemente de aproximadamente 1:6 cuando el aminoácido básico utilizado es lisina o de aproximadamente 1:9
50 cuando el aminoácido básico utilizado es arginina.

Tanto el procedimiento [1] de la invención como el procedimiento [2] de la invención comprenden la etapa de añadir a la solución de la etapa a) una disolución acuosa de un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones [etapa b)]. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría se cree que dicho metal, tal como un metal divalente (por ejemplo, calcio) permite crear un puente que ayuda a estabilizar el CBA, en particular, cuando el CBA es un CBA hidrosoluble, preferentemente, un CBA hidrosoluble ácido, o un CBA
55 hidrosoluble capaz de interactuar con dicho metal (por ejemplo, calcio), por ejemplo, ácido fólico, ácido pantoténico o una vitamina del grupo B o C, o sus derivados, en el interior de la nanopartícula cargada de la invención; en este caso, parece que dicho metal, por ejemplo, dicho metal divalente (por ejemplo, calcio), actúa de puente entre la caseína (en forma de caseinato) y el CBA, preferentemente un CBA hidrosoluble, más preferentemente un CBA hidrosoluble ácido, o un CBA hidrosoluble capaz de interactuar con dicho metal, dejando
60 a dicho CBA atrapado en la fracción hidrofóbica de las nanopartículas cargadas de la invención.

- 5 En una realización particular, dicho metal es un metal divalente seleccionado entre calcio, magnesio, zinc, hierro en forma divalente, y sus combinaciones, preferentemente, calcio. En otra realización particular, dicho metal es un metal trivalente tal como hierro en forma trivalente.

10 Aunque prácticamente cualquier disolución acuosa de calcio, ventajosamente de grado alimentario [véase la “Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios” GSFA Online para una relación de sales cálcicas empleadas en alimentación-microencapsulación], puede ser utilizada en la puesta en práctica de dichos procedimientos [1] y [2] de la invención, en una realización particular, dicha solución acuosa de una sal cálcica se selecciona del grupo que consiste en cloruro cálcico, acetato cálcico, gluconato cálcico, lactato cálcico, sorbato cálcico, ascorbato cálcico, citrato cálcico, propionato cálcico, sulfato cálcico y sus mezclas, preferentemente cloruro cálcico. En la práctica, el carbonato cálcico o el alginato cálcico no resultan recomendables ya que se trata de sales insolubles o muy poco
15 solubles en agua. Análogamente, cualquier disolución acuosa de magnesio, zinc o hierro en forma divalente o trivalente, de grado alimentario, puede ser utilizada en la puesta en práctica de dichos procedimientos [1] y [2] de la invención.

20 La relación en peso metal:caseína, en donde “metal” se refiere a dicho metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones, puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la relación en peso metal:caseína está comprendida 1:5 y 1:15, preferentemente entre 1:7 y 1:10, más preferentemente alrededor de 1:8,5. En una realización particular, dicho metal es un metal divalente.

25 El procedimiento [2] de la invención conduce a la obtención de nanopartículas cargadas de la invención y, por ello, la etapa a) comprende la mezcla de (i) una solución acuosa que contiene una fuente de caseína y un primer aminoácido básico con (ii) una solución que contiene un CBA. Las características de dicho CBA ya han sido mencionadas previamente. En una realización particular, dicho CBA es un CBA hidrosoluble, preferentemente, un CBA hidrosoluble ácido, por ejemplo, ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina o vitamina B3, ácido pantoténico o vitamina B5, tiamina monofosfato, tiamina pirofosfato, tiamina trifosfato, ácido ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos (derivados del ácido fólico: poliglutamatos de folato; folatos de poliglutamato), ácido folínico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, sus derivados, ésteres o sales farmacéuticamente o
30 cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas. En otra realización particular, dicho CBA es un CBA liposoluble, por ejemplo, una vitamina de las familias A, D, E, K y sus derivados, un fosfolípido, un carotenoide (por ejemplo, carotenos, licopeno, luteína, capsantina, zeaxantina, etc.), un ácido graso omega-3 (por ejemplo, DHA, EPA, etc.), un aminoácido (por ejemplo, iso-leucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, y valina), un fitostanol o un fitosterol (por ejemplo, sitosterol, campesterol, estigmasterol, etc.), un polifenol (quercetina, rutina, resveratrol, kaempferol, miricetina, isoramnetina, etc.) o sus derivados.

35 La relación en peso CBA:caseína en la nanopartícula cargada de la invención, puede variar dentro de un amplio intervalo; a modo ilustrativo, no limitativo, la relación en peso CBA:caseína en la nanopartícula cargada de la invención puede estar comprendida entre 1:1 y 1:200, preferentemente entre 1:10 y 1:80, más preferentemente entre aproximadamente 1:15 y 1:35. En una realización particular, el CBA es un CBA hidrosoluble, y la relación en peso CBA (hidrosoluble):caseína en la nanopartícula cargada de la invención, está comprendida entre 1:1 y 1:50, preferentemente entre 1:10 y 1:30, más preferentemente entre aproximadamente 1:15 y 1:20. En otra realización particular, el CBA es un CBA liposoluble, y la relación en peso entre CBA (liposoluble):caseína en la nanopartícula cargada de la invención, está comprendida entre 1:1 y 1:200, preferentemente entre 1:10 y 1:80, más preferentemente entre aproximadamente 1:20 y 1:35.

45 Asimismo, la relación en peso aminoácido básico:CBA (correspondiente a la solución acuosa (ii) que contiene un CBA hidrosoluble ácido y un segundo aminoácido básico, utilizada en la etapa a) del procedimiento [2] de la invención) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la relación en peso aminoácido básico:CBA (hidrosoluble ácido) en dicha solución (ii) está comprendida 1:0,1 y 1:3, preferentemente entre 1:0,5 y 1:1, más preferentemente alrededor de 1:0,75.

50 Las nanopartículas obtenidas de acuerdo con los procedimientos de la invención, tanto las que están cargadas con un CBA como las que no lo están, pueden incorporar en su formulación un antioxidante, por ejemplo, ácido ascórbico (vitamina C), etc., con el fin de incrementar su estabilidad frente a la temperatura y la oxidación. En este caso, dicho antioxidante podría ser introducido co-encapsulado con el CBA (en su caso) o en la cubierta de las nanopartículas de la invención; para ello, dichos procedimientos [1] y [2] de la invención se adaptarán
55 adecuadamente para incorporar el antioxidante en la formulación de las nanopartículas, por ejemplo, añadiendo el antioxidante a la solución acuosa que contiene dicho CBA y un aminoácido básico.

60 En una realización particular, el CBA es el ácido fólico y el antioxidante es el ácido ascórbico que parece actuar protegiendo al ácido fólico de la degradación por radiación ultravioleta, cambio de pH, calor, oxígeno, etc., proporcionando, además, el aporte nutricional del propio ácido ascórbico. Dicho antioxidante podría ser introducido co-encapsulado con el CBA o en la cubierta de las nanopartículas de la invención.

Adicionalmente, si se desea, tanto el procedimiento [1] de la invención como el procedimiento [2] de la invención, pueden incluir una o más etapas adicionales de estabilización de las nanopartículas obtenidas mediante el uso de distintos tratamientos.

5 En una realización particular, dicho tratamiento de estabilización comprende someter la suspensión que contiene las nanopartículas de la invención formadas, tanto las que están cargadas con un CBA como las que no lo tienen, a un tratamiento de alta presión, por ejemplo, a una presión comprendida entre 100 y 800 MPa, típicamente entre 350 y 600 MPa. En una realización particular, dicho tratamiento comprende someter la suspensión de nanopartículas a ciclos de 3 a 5 minutos, a una presión de 100 MPa a 800 MPa, típicamente entre 350 y 600 MPa; de hecho, una
10 presión de 400 MPa proporciona buenos resultados.

En otra realización particular, dicho tratamiento de estabilización comprende someter la suspensión que contiene las nanopartículas de la invención formadas, tanto las que están cargadas con un CBA como las que no lo tienen, a un tratamiento UHT (temperatura ultraalta), por ejemplo, a una temperatura comprendida entre 130 °C y 140 °C durante 2 a 5 segundos, seguido de un rápido enfriamiento.

15 Asimismo, si se desea, tanto el procedimiento [1] de la invención como el procedimiento [2] de la invención, pueden incluir una etapa de secado de la suspensión que contiene las nanopartículas formadas, con el fin de obtener las nanopartículas de la invención, tanto las que están cargadas con un CBA como las que no lo tienen, en forma de un polvo. Esta forma de presentación de dichas nanopartículas contribuye a su estabilidad y, además, resulta particularmente útil para su eventual aplicación en alimentos sólidos, tales como harina, pan, productos de bollería,
20 cereales, leche en polvo, etc., así como en productos cosméticos y/o farmacéuticos.

Prácticamente cualquier método o técnica convencional adecuado para secar suspensiones que contienen nanopartículas puede ser utilizado para realizar esta etapa de secado; no obstante, en una realización particular, el secado de la suspensión que contiene nanopartículas se lleva a cabo mediante secado por pulverización o mediante liofilización. En general, este tratamiento se lleva a cabo añadiendo a la suspensión de las nanopartículas un agente protector de dichas nanopartículas adecuado, tal como un sacárido, por ejemplo, lactosa, trehalosa, manitol, sacarosa, maltodextrina, glucosa, sorbitol, maltosa, etc., y sus mezclas. Dicho agente protector protege a las nanopartículas de la invención tanto frente a la degradación térmica como frente a la oxidación durante el proceso de secado.
25

La relación en peso caseína:sacárido puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la relación en peso caseína:sacárido está comprendida 1:1 y 1:4, preferentemente alrededor de 1:2.
30

Asimismo, en una realización particular, la solución que contiene el sacárido podría contener, además, un agente antioxidante, tal como ácido ascórbico (vitamina C), etc.; en este caso, la relación en peso caseína:sacárido:agente antioxidante, por ejemplo, vitamina C, podrían ser 1:0,75-2,5:0,01-1,5, preferentemente 1:2,0:0,10.

Nanopartículas

35 Las nanopartículas obtenidas según el procedimiento [1] de la invención, es decir, las nanopartículas que comprenden una matriz de caseína, un aminoácido básico y un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones, producida mediante un procedimiento que comprende: a) preparar una solución acuosa que contiene una fuente de caseína y un aminoácido básico; y b) añadir una disolución acuosa de un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones, a la solución de la etapa
40 a), constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

En una realización particular, dicho aminoácido básico se selecciona del grupo que consiste en arginina, lisina, histidina, y sus mezclas.

En otra realización particular, dicho metal es, preferentemente, un metal divalente, de grado alimentario, seleccionado del grupo que consiste en calcio, magnesio, zinc, hierro (en su forma divalente), y combinaciones de los mismos.
45

En otra realización particular, dicho metal es un metal trivalente, de grado alimentario, tal como, por ejemplo, hierro en su forma trivalente.

Las nanopartículas de la invención pueden ser utilizadas como aditivos tecnológicos, por ejemplo, como sustitutos de grasa, etc. Además, las nanopartículas de la invención tienen la capacidad de encapsular un compuesto biológicamente activo (CBA).
50

Asimismo, las nanopartículas cargadas de la invención obtenidas según el procedimiento [2] de la invención, es decir, las nanopartículas que comprenden una matriz de caseína, un aminoácido básico, un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones, y un CBA, producidas mediante un procedimiento que comprende: a) mezclar (i) una solución acuosa que contiene una fuente de caseína y un primer aminoácido básico con (ii) una solución que contiene un CBA; y b) añadir una disolución acuosa de un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones, a la mezcla resultante de la etapa a), constituyen un aspecto adicional de la presente invención.
55

Dicho CBA puede ser un CBA hidrosoluble o un CBA liposoluble; en este caso, la nanopartícula de la invención se identifica, en ocasiones, en esta descripción como "nanopartícula cargada de la invención".

- 5 En una realización particular, dicho CBA es un CBA hidrosoluble, preferentemente, un CBA hidrosoluble ácido. En una realización más particular, dicho CBA hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en:
- a) una vitamina de la familia B o C;
 - b) un derivado de una vitamina según a);
 - c) un compuesto seleccionado entre el ácido hialurónico, condroitín sulfato y el ácido tióctico;
 - 10 d) una sal o un éster de cualquiera de los compuestos a)-c) anteriores; y
 - e) combinaciones de los mismos.

En una realización concreta, dicho CBA hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina o vitamina B3, ácido pantoténico o vitamina B5, tiamina monofosfato, tiamina pirofosfato, tiamina trifosfato, ácido ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos (derivados del ácido fólico: poliglutamatos de folato; folatos de poliglutamato), ácido folínico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico o ácido alfa-lipoico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, sus derivados, ésteres o sales farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas.

En una realización concreta, dicho CBA es un CBA hidrosoluble ácido, tal como el ácido fólico, el ácido pantoténico, el ácido ascórbico, etc.

20 Aunque no se desea estar vinculado por ninguna hipótesis, se cree que, en presencia del metal, tal como el metal divalente (por ejemplo, calcio), las caseínas α y β se agregan debido a que pierden su hidrofilia y su carga superficial al unirse con el catión por parte de los radicales fosfoserina presentes en su estructura. El CBA hidrosoluble, preferentemente ácido (por ejemplo, ácido fólico), también interactúa electrostáticamente con dicho metal, por lo que quedaría atrapado en la matriz hidrofóbica generada por estos tipos de caseína. Por su parte, la caseína κ no reacciona con el metal (por ejemplo, calcio), por lo que quedaría unida por su parte hidrofóbica a la partícula, quedando su fracción hidrosoluble en contacto con el medio acuoso externo. Dicha fracción hidrosoluble cuenta con grupos polares correspondientes a los residuos serilo y treonilo unidos a tri- y tetra- sacáridos, además de una alta proporción de grupos carbonilos (grupos ácidos de aminoácidos como el glutámico o el aspártico). Así se considera que, tras la formación de las nanopartículas, el aminoácido básico (por ejemplo, lisina) presente en disolución quedaría adherido a la superficie de éstas por su interacción electrostática [por ejemplo, tras el calentamiento que sufren en su paso por el secador por pulverización (en su caso) pueden ser enlaces de carácter covalente] con los grupos carboxílicos de dicha fracción. La Figura 1 muestra una representación esquemática de unas nanopartículas cargadas de la presente invención que comprenden una matriz de caseína, lisina (aminoácido básico) y calcio (metal divalente).

35 En otra realización concreta, dicho CBA es un CBA liposoluble si bien, en este caso, sería necesario formar una suspensión, preferentemente homogénea, del CBA en medio acuoso, o bien, más preferentemente, disolver el CBA en una solución orgánica, añadir lentamente dicha suspensión acuosa o dicha solución orgánica sobre la solución que contiene la fuente de caseína (por ejemplo, caseinato), e incubar la mezcla.

40 El mecanismo de atrapamiento sería diferente del que se describe para los CBA hidrosolubles ya que los CBA liposolubles quedarían atrapados, independientemente de si tienen capacidad de interactuar con el metal (divalente o trivalente) o no, en la fracción hidrofóbica interna de las nanopartículas por afinidad entre ambas fracciones.

En una realización particular, dicho CBA es un CBA liposoluble seleccionado entre vitaminas, por ejemplo, vitaminas de las familias A, D, E, K y sus derivados, fosfolípidos, carotenoides (carotenos, licopeno, luteína, capsantina, zeaxantina, etc.), ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, DHA, EPA, etc.), aminoácidos (por ejemplo, iso-leucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, y valina), fitostanoles y fitosteroles (por ejemplo, sitosterol, campesterol, estigmasterol, etc.), polifenoles (por ejemplo, quercetina, rutina, resveratrol, kaempferol, miricetina, isoramnetina, etc.) y sus derivados.

La proporción en peso CBA:caseína en la nanopartícula cargada de la invención, puede variar dentro de un amplio intervalo; a modo ilustrativo, no limitativo, la proporción en peso CBA:caseína en la nanopartícula cargada de la invención puede estar comprendida entre 1:1 y 1:200, preferentemente entre 1:10 y 1:80, más preferentemente entre aproximadamente 1:15 y 1:35. En una realización particular, el CBA es un CBA hidrosoluble, y la proporción en peso CBA (hidrosoluble):caseína en la nanopartícula cargada de la invención, está comprendida entre 1:1 y 1:50, preferentemente entre 1:10 y 1:30, más preferentemente entre aproximadamente 1:15 y 1:20. En otra realización particular, el CBA es un CBA liposoluble, y la proporción en peso CBA (liposoluble):caseína en la nanopartícula cargada de la invención, está comprendida entre 1:1 y 1:200, preferentemente entre 1:10 y 1:80, más preferentemente entre aproximadamente 1:20 y 1:35.

Adicionalmente, si se desea, las nanopartículas de la invención, tanto las que están cargadas con un CBA como las que no lo están, pueden incorporar en su formulación un antioxidante, por ejemplo, ácido ascórbico (vitamina C), etc., con el fin de incrementar su estabilidad frente a la temperatura y la oxidación. En una realización particular, el

- 5 CBA es el ácido fólico y el antioxidante es el ácido ascórbico que parece actuar protegiendo al ácido fólico de la degradación por radiación ultravioleta, cambio de pH, calor, oxígeno, etc., y proporcionando además el aporte nutricional del propio ácido ascórbico. Dicho antioxidante podría ser introducido co-encapsulado con el CBA o en la cubierta de las nanopartículas de la invención.

Aplicaciones

- 10 Las nanopartículas de la invención pueden ser utilizadas como aditivos tecnológicos, por ejemplo, como sustitutos de grasa, etc. Además, tienen la capacidad de encapsular un CBA, por ejemplo, un CBA hidrosoluble o un CBA liposoluble.

- 15 En una realización particular, las nanopartículas de la invención posibilitan la encapsulación de un CBA, preferentemente, un CBA hidrosoluble, más preferentemente, un CBA hidrosoluble ácido, y su incorporación en composiciones farmacéuticas, cosméticas y alimentarias ya que en su preparación y en el producto final (nanopartículas) no se utilizan otros ingredientes que no sean polímeros naturales (evitando toxicidad asociada a polímeros sintéticos) e ingredientes de grado alimentario. Dichas nanopartículas protegen al CBA de su degradación frente a agentes externos (luz, cambios pH, oxidación, etc.).

- 20 Ventajosamente, las nanopartículas de la invención tienen un tamaño medio inferior a 1 µm, preferentemente comprendido entre 50 y 200 nm, más preferentemente de alrededor 140 nm, con el fin de evitar la alteración de propiedades organolépticas (textura al paladar).

Asimismo, las nanopartículas de la invención mejoran la biodisponibilidad del CBA en el intestino, protegiendo a dicho CBA de las condiciones ácido-pépticas del estómago y facilitando su disolución y liberación en el intestino.

- 25 Las nanopartículas de la invención se pueden resuspender en medio acuoso protegiendo al CBA de la degradación en disolución. Además, pueden presentarse en forma de un polvo seco, manteniendo estable el CBA y posibilitando su almacenamiento durante largos periodos de tiempo (en particular, para su incorporación en preparaciones alimenticias sólidas).

Adicionalmente, las nanopartículas de la invención son también adecuadas para la elaboración de composiciones cosméticas y farmacéuticas de uso tópico.

- 30 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, en adelante "composición de la invención", que comprende, al menos, una nanopartícula de la invención; en una realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanopartícula que comprende una matriz de caseína, un aminoácido básico y un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones; en otra realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanopartícula cargada de la invención, es decir, una nanopartícula que comprende una matriz de caseína, un aminoácido básico, un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones, y un CBA con actividad nutricional, terapéutica y/o cosmética, y un vehículo farmacéuticamente o cosméticamente aceptable o un vehículo apto para alimentación.

- 40 En una realización particular, dicho CBA se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos, antimicrobianos, aromatizantes, conservantes, edulcorantes, esteroides, fármacos, hormonas, lípidos, péptidos, polinucleótidos, polisacáridos, proteínas, proteoglicanos, saborizantes, vitaminas, y sus mezclas.

- 45 En una realización particular, dicho CBA es un CBA hidrosoluble, preferentemente, un CBA hidrosoluble ácido. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de CBA hidrosolubles incluyen vitaminas, por ejemplo, vitaminas de las familias B o C, y sus derivados, sales o ésteres; ácido hialurónico, condroitín sulfato, ácido tióctico, sus sales o ésteres, etc. En una realización particular, dicho CBA hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina, ácido pantoténico, tiamina monofosfato, tiamina pirofosfato, tiamina trifosfato, ácido ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos (derivados del ácido fólico: poliglutamatos de folato; folatos de poliglutamato), ácido folínico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, sus derivados, ésteres o sales farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas.

- 50 En otra realización particular, dicho CBA es un CBA liposoluble. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de CBA liposolubles incluyen vitaminas, por ejemplo de las familias A, D, E, K y sus derivados, fosfolípidos, carotenoides (carotenos, licopeno, luteína, capsantina, zeaxantina, etc.), ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, DHA, EPA, etc.), aminoácidos (por ejemplo, iso-leucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, y valina), fitostanoles y fitosteroles (por ejemplo, sitosterol, campesterol, estigmasterol, etc.), polifenoles (por ejemplo, quercetina, rutina, resveratrol, kaempferol, miricetina, isoramnetina, etc.) y sus derivados.

- 55 En una realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica adecuada para su administración por vía tópica; para ello, dicha composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más excipientes adecuados para su administración por vía tópica, por ejemplo, en forma de gel, pomada, crema, etc. Información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones farmacéuticas destinadas a su administración por vía tópica así como sobre la producción de dichas composiciones farmacéuticas puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de

5 Ediciones. La dosis a administrar de nanopartículas de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre aproximadamente 0,5 (g/cm² de zona a tratar) y aproximadamente 2 (g/cm² de zona a tratar), de una composición de la invención que contiene entre un 0,1 % y un 30 % de nanopartículas de la invención, preferentemente, entre 0,5 % y 5 %.

10 En otra realización particular, la composición de la invención es una composición cosmética adecuada para su administración por vía tópica; para ello, dicha composición comprende un vehículo cosméticamente aceptable que comprende uno o más excipientes adecuados para su administración por vía tópica, por ejemplo, en forma de gel, crema, champú, loción, etc. Información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones cosméticas destinadas a su administración por vía tópica así como sobre la producción de dichas composiciones farmacéuticas puede encontrarse en el libro "Manual de Cosmetología", de Octavio Díez Sales, 1ª Edición, 1998, Editorial Videocinco, S.A.

15 En otra realización particular, la composición de la invención es una composición alimenticia, tal como una preparación alimenticia sólida, líquida o semisólida.

En una realización particular, la composición de la invención comprende:

20 caseína, entre 10 % y 50 % en peso;
 ácido fólico, entre 0,9 % y 2,5 % en peso;
 calcio, entre 1 % y 6 % en peso; y
 un aminoácido básico, entre 1 % y 7 % en peso; y
 un sacárido, entre 30 % y 80 % en peso,

donde todas las proporciones son en peso respecto al total de la composición.

25 En otra realización particular, la composición de la invención comprende:

30 caseína, entre 10 % y 50 % en peso;
 ácido fólico, entre 0,9 % y 2,5 % en peso;
 calcio, entre 1 % y 6 % en peso; y
 un aminoácido básico, entre 1 % y 7 % en peso;
 un sacárido, entre 20 % y 55 % en peso; y
 ácido ascórbico, entre 1 % y 25 %,

donde todas las proporciones son en peso respecto al total de la composición.

35 Alternativamente, la composición de la invención puede ser incorporada en un producto alimenticio; por lo que, en otro aspecto, la invención se relaciona con un producto alimenticio que comprende una composición de la invención. Dicho producto alimenticio puede encontrarse en forma líquida, semisólida o sólida. Ventajosamente, con el fin de evitar o minimizar la disolución total o parcial de las nanopartículas de la invención y, de este modo, colaborar a su estabilidad, dicho producto alimenticio tiene un pH ácido, es decir, inferior a 7, preferentemente, igual o inferior a 6, más preferentemente, igual o inferior a 5. Ejemplos ilustrativos de productos alimenticios que puede ser enriquecidos o fortificados con la composición de la invención incluyen la leche y sus derivados (yogures, quesos, cuajadas, etc.), zumos, mermeladas, productos de panadería y bollería, cárnicos fermentados, salsas, etc. Igualmente, la composición de la invención puede ser incorporada en un producto para alimentación animal, por ejemplo, en piensos.

Ejemplos

45 Los siguientes ejemplos describen la producción de partículas de caseína que pueden incorporar un compuesto biológicamente activo, concretamente el ácido fólico, en su interior. Son capaces de proteger el compuesto de las degradaciones que pueda sufrir en el alimento por los múltiples factores anteriormente mencionados. Además, dichos ejemplos ponen de manifiesto la capacidad de estas nanopartículas de proteger el ácido fólico de las condiciones gástricas tras su ingestión y de liberarlo en medio intestinal.

Procedimiento general de producción de nanopartículas de caseína vacías

50 El procedimiento de producción de nanopartículas de caseína comprende la disolución de caseinato sódico (ANVISA, Madrid, España) en medio acuoso junto con una cantidad determinada de aminoácido básico, seguido de

- 5 la adición, bajo agitación magnética y con flujo constante, de un volumen determinado de la disolución cálcica, dando lugar a la formación de las nanopartículas bajo apariencia de una suspensión lechosa.

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

A continuación se describen los distintos estudios necesarios para conseguir una caracterización fisicoquímica completa de las nanopartículas.

- 10 Dentro de los ensayos fisicoquímicos, se determinó el tamaño y la carga superficial de las nanopartículas, siendo esta última determinada a través de la medida del potencial zeta. El primero de los parámetros fue obtenido por espectroscopia de correlación fotónica, utilizando un Zetasizer nano Z-S (Malvern Instruments/ Optilas, España), mientras que el potencial zeta fue medido empleando un Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, New York, EEUU).

- 15 El rendimiento del proceso de formación de nanopartículas se calculó a través de la cuantificación de la caseína libre restante tras la obtención de las mismas, recogida en los sobrenadantes obtenidos al centrifugar la formulación (17.000 x g, 20 minutos). Así, la cantidad de caseína que forma partículas en la formulación se estimó como la diferencia entre la cantidad inicial añadida y la cantidad cuantificada en los sobrenadantes recogidos durante la etapa de purificación. Dicha cuantificación se realizó por espectrofotometría ultravioleta (UV) a 282 nm (Agilent 8453, sistema de espectroscopia UV-visible.). El rendimiento se estimó como:

$$\text{Rendimiento (\%)} = [(\text{mg caseinato totales} - \text{mg caseinato en sobrenadante}) / \text{mg caseinato totales}] \times 100$$

[Eq. 1]

Para la realización de los distintos cálculos se utilizó una curva de calibrado entre 150 y 1.500 µg/mL (R2 = 0,9992; LD = 36 µg/mL; LC = 119 µg/mL).

- 25 Por otra parte, para confirmar los resultados obtenidos por diferencia entre el total y el contenido en caseinato del sobrenadante, se realizó un estudio de cuantificación del pellet obtenido tras la centrifugación. En este caso, para romper las partículas se empleó NaOH 0,05M, siendo este el mismo medio empleado para la preparación de la curva de calibrado. Así pues, en este caso el rendimiento se estimó como:

$$\text{Rendimiento (\%)} = [(\text{mg caseinato en pellet}) / \text{mg caseinato totales}] \times 100 \quad [\text{Eq. 2}]$$

- 30 El máximo de absorbancia encontrado para el caseinato preparado en dicho medio fue de 300 nm. Las concentraciones empleadas para la construcción de la recta de calibrado oscilaron también entre 150 y 1.500 µg/mL (R2 = 0,9996; LD = 26 µg/mL; LC = 85 µg/mL).

La morfología de las nanopartículas se observó por microscopia electrónica de barrido (Zeiss, DSM 940A Alemania). Para ello, las nanopartículas liofilizadas se cubrieron con una capa de oro molecular de unos 9 nm (Equipo Emitech K550, Sputter-Coater, Reino Unido) y las fotografías se realizaron con un microscopio Zeiss DMS 940 A (Estados Unidos).

Procedimiento general de producción de nanopartículas de caseína conteniendo ácido fólico

- 40 El procedimiento de producción de nanopartículas de caseína conteniendo ácido fólico comprende la disolución de caseinato sódico en medio acuoso junto con una cantidad determinada de aminoácido básico seguido de la adición, bajo agitación magnética, de un volumen determinado de una disolución de ácido fólico previamente preparada en medio acuoso con una determinada cantidad de aminoácido básico. Tras la incubación de la mezcla durante unos minutos, el último paso consiste en la adición de la sal cálcica, dando lugar a la formación de las nanopartículas bajo apariencia de una suspensión lechosa-amarillenta.

- 45 Opcionalmente, las nanopartículas formadas pueden ser sometidas a tratamientos de altas presiones hidrostáticas (Stansted Fluid Power, Modelo ISOLAB FPG11500B110; N° serie: 7844) en ciclos de entre 1 a 5 minutos entre 100 y 800 MPa, con el objetivo de estabilizarlas.

- 50 A continuación, y tras una homogeneización de 3 minutos mediante agitación, se añade, sin dejar de agitar, un volumen determinado de solución de un sacárido (lactosa, trehalosa, manitol, glucosa, sorbitol, maltodextrina o maltosa). Finalmente, la suspensión se liofiliza, o bien se pulveriza en un secador por pulverización (Büchi Mini Spray Drier B-191, Büchi Labortechnik AG, Switzerland) bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura de entrada de aire 60-100 °C
- Temperatura salida del aire: 30-90 °C
- Presión de aire 2-10 bares [2-10 x 10⁵ Pa]
- Velocidad de bombeo de la muestra 2-9 mL/min

- 5 - Aspiración: 30-100 %
- Flujo de aire 200-900 L/h

Opcionalmente, tras la adición del sacárido, las formulaciones pueden ser secadas mediante liofilización en lugar de mediante secado por pulverización.

Determinación de la cantidad de ácido fólico asociado a las partículas de caseína

- 10 La cantidad de ácido fólico asociado a las nanopartículas se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), de acuerdo con el procedimiento descrito por Faye [Faye Russell, L., Quantitative Determination of Water-Soluble Vitamins. En Food Analysis by HPLC, Nollet, L.M.L. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, Segunda Edición, Capítulo 10 (2000) pp. 444-445]. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo modelo 1100 series LC (Agilent, Waldborn, Alemania) acoplado a un sistema de detección UV de diodo-matriz. Los datos se analizaron en
- 15 un ordenador Hewlett-Packard mediante el software Chem-Station G2171. Para la separación de ácido fólico se empleó una columna Alltech C18 AlltimaTM (5µm, 150mm x 2,1 mm) calentada a 40 °C, con una precolumna compatible Gemini® C18 AJO-7596. La fase móvil se compuso de una mezcla de H₃PO₄ (33 mM, pH 2,3)/acetonitrilo en gradiente (Tabla 1) y fue bombeada a un flujo de 0,25 mL/min. La detección se realizó a 290 nm. El volumen de inyección de muestra fue de 10 µL. El tiempo de retención del ácido fólico es de 22,6 ± 0,5 minutos.

20

Tabla 1

Condiciones de gradiente para la fase móvil (A: H₃PO₄ 33 mM, B: Acetonitrilo)

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	95,0	5,0
8	95,0	5,0
33	82,5	17,5
45	95,0	5,0

25

Previamente a la cuantificación de las muestras se prepararon distintas rectas de calibrado de concentraciones entre 2 y 400 µg/mL, obteniendo resultados de precisión y exactitud superiores al 95 %, con la confirmación de que la presencia de caseína y/o aminoácidos en la disolución no interfería en la correcta cuantificación del ácido fólico.

30

Para el análisis de las muestras frescas (antes de su secado), se procedió a cuantificar los sobrenadantes obtenidos tras la filtración de un volumen determinado de la formulación a través de tubos de diálisis Vivaspin® 300,000 MWCO (VIVASPIN 2, Sartorius stedim Biotech, Alemania). Por su parte, el pellet se disolvió en NaOH 0,05M para romper las partículas y mantener tanto la caseína como el ácido fólico y el aminoácido en disolución y proceder así a su cuantificación. La suma del contenido en ácido fólico encontrado en ambas fracciones (sobrenadante y pellet) coincidió en todo momento con el total añadido inicialmente. Además, también fue posible cuantificar la cantidad total de ácido fólico disolviendo 1 mL de la formulación en 1 mL de NaOH 0,05 M. Este estudio permitió confirmar que las diferencias entre la cantidad de ácido fólico añadido y el obtenido por cuantificación a través del método cromatográfico descrito son inferiores al 10 % en todos los casos.

35

Por otra parte, para la cuantificación de las muestras en polvo se tomaron 10 mg de nanopartículas, se resuspendieron en 2 mL de agua y se centrifugaron, procediendo entonces de igual modo que con las muestras frescas.

Estudio de la cinética de liberación del ácido fólico desde las nanopartículas en medio gastrointestinal simulado

40

La cinética de liberación del ácido fólico desde las nanopartículas se llevó a cabo dispersando aproximadamente 10 mg de las mismas en 2 mL de medio gástrico simulado (0 a 2 h) (USP XXIII) a 37±1 °C. A determinados tiempos, las suspensiones de nanopartículas se centrifugaron (17,000 x g, 20 minutos) y la cantidad de ácido fólico en los sobrenadantes se cuantificó por el citado método de HPLC. Tras la eliminación de los sobrenadantes del medio gástrico, se añadió el medio intestinal simulado (2 a 24 horas) (USP XXIII) a 37±1 °C, procediendo entonces de igual modo que en el caso anterior.

45

El porcentaje de ácido fólico liberado en cada tiempo se calculó teniendo en cuenta el contenido total de la vitamina presente en la formulación tomada para cada estudio.

Estudios farmacocinéticos. Biodisponibilidad de ácido fólico encapsulado en nanopartículas de caseína

Los estudios farmacocinéticos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del comité ético de la Institución así como la legislación Europea en animales de experimentación (86/609/EU). Para ello, 25 ratas macho Wistar, de

5 peso medio 200 g, fueron sometidas a condiciones normales de luz-oscuridad (12 horas - 12 horas), y durante la semana previa al estudio fueron alimentadas a demanda con un pienso deficitario en ácido fólico (Folic Acid Deficient Diet. TD. 95247. Harlan, EE.UU.) y agua. Doce horas antes de la administración de las formulaciones, las ratas se aislaron en jaulas metabólicas sin acceso a comida, pero con acceso libre al agua de bebida.

10 Los animales fueron divididos en 5 grupos de tratamiento (5 ratas por grupo). Al primero de los grupos se le administró por vía oral únicamente 1 mL de PBS (Buffer Fosfato pH 7,4). Los tres grupos siguientes se trataron con dosis orales únicas de 1 mg/kg (200 µg/rata) de ácido fólico incorporado en alguna de las siguientes formulaciones: (i) ácido fólico libre (no encapsulado) (Aditio, Panreac Química, Barcelona, España); (ii) nanopartículas de caseína con ácido fólico encapsulado; (iii) nanopartículas de caseína tratadas por altas presiones con ácido fólico encapsulado. Se administró 1 mL de cada una de las distintas formulaciones dispersas en agua a través de una
15 cánula gastroesofágica. Por último, al quinto grupo se le administró por vía intravenosa en la vena safena la misma dosis de ácido fólico libre (1 mg/kg) disuelto en suero salino (0,5 mL).

Antes de la administración de las formulaciones, se extrajo sangre de la vena safena de la cola con el fin de comprobar el nivel basal de la vitamina en cada rata. Tras la administración se procedió a extraer, a diferentes
20 tiempos, un volumen de sangre de aproximadamente 500 µL utilizando tubos de separación del suero (SARSTEDT Microtube 1,1 mL Z-Gel). En todos los casos, para evitar el dolor de las ratas, la extracción fue llevada a cabo tras dormir al animal con anestesia inhalatoria (isofluorano:oxígeno), comprobando en todo momento sus constantes.

Posteriormente, se repuso volemia administrando 500 µL de suero salino fisiológico vía intraperitoneal, previamente calentado a la temperatura del animal. Durante este periodo, se examinó el estado de los animales (movilidad, agresividad, reacciones alérgicas y temperatura) no observándose ningún cambio significativo.

25 Pretratamiento y cuantificación del ácido fólico de las muestras de suero

La cuantificación de ácido fólico en las muestras de suero, obtenidas tras centrifugar los tubos con sangre (6.000 rpm, 20 min, 20 °C), fue llevada a cabo mediante una técnica de inmunoensayo enzimático. Para ello se empleó un Kit Elisa (Diagnostic automation, INC. Calabasas, California EE.UU.), aprobado por la FDA para la determinación
30 cuantitativa de ácido fólico en alimentos. La muestra de suero fue cuantificada sin tratamiento previo y siguiendo las especificaciones del fabricante.

En vista de que el kit está concebido para su empleo en alimentos, se realizó una serie de estudios previos con el fin de confirmar su capacidad de cuantificación de la vitamina en muestras de suero. Dichos estudios consistieron en realizar una comparativa exhaustiva entre los resultados obtenidos mediante el kit y los obtenidos por el método de cromatografía líquida de alta resolución descrito en apartados anteriores, con el siguiente proceso previo de
35 preparación: a 50 µL de suero se le añadieron cantidades variables (0-300 µL) de ácido fólico disuelto en una solución de tetraborato sódico 50 mM preparada en ascorbato sódico al 1 % (p/v). La solución resultante se llevó a un volumen final de 350 µL (dilución del suero 1:7) con la solución de tetraborato sódico 50 mM. Cada mezcla se llevó a ebullición durante 30 minutos y posteriormente se enfrió a 2 °C y se conservó durante toda la noche a dicha temperatura.

40 Tras centrifugar las muestras resultantes a 20.000 rpm durante 20 minutos y filtrarlas a través de un filtro de 20 µm, su contenido en ácido fólico se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución empleando el método descrito previamente. En este caso, y debido a la baja concentración de la vitamina en suero, se empleó la técnica de adiciones estándar para minimizar los errores en la cuantificación y eliminar cualquier interferencia de la matriz.

45 En todos los casos estudiados las diferencias en las concentraciones de ácido fólico en suero encontradas por ambos métodos fueron inferiores al 10 %. Por ello se escogió la técnica de inmunoensayo enzimático para cuantificar la totalidad de las muestras, ya que requiere menor cantidad de suero para su análisis y se trata de una técnica más sencilla y rápida, cuyo límite de detección (2 ng/mL) es muy inferior al de la técnica cromatográfica.

Procedimiento general de producción de nanopartículas de caseína conteniendo una sustancia activa liposoluble: quercetina

50 El procedimiento de producción de nanopartículas de caseína conteniendo quercetina comprende la disolución de caseinato sódico en medio acuoso junto con una cantidad determinada de aminoácido básico seguido de la adición, bajo agitación magnética, de un volumen determinado de una disolución de ácido ascórbico y posteriormente quercetina previamente disuelta en etanol. Tras la incubación de la mezcla durante unos minutos, el último paso consiste en la adición de la sal cálcica, dando lugar a la formación de las nanopartículas bajo apariencia de una
55 suspensión lechosa-amarillenta.

Opcionalmente, las nanopartículas formadas pueden ser sometidas a tratamientos de altas presiones hidrostáticas (Stansted Fluid Power, Modelo ISOLAB FPG11500B110; N° serie: 7844) en ciclos de entre 1 a 5 minutos entre 100 y 800 MPa, con el objetivo de estabilizarlas.

60 A continuación, y tras una homogeneización de 3 minutos mediante agitación, se añade, sin dejar de agitar, un volumen determinado de solución de un sacárido (lactosa, trehalosa, manitol, glucosa, sorbitol, maltodextrina o

5 maltosa). Finalmente, la suspensión se liofiliza, o bien se pulveriza en un secador por pulverización (Büchi Mini Spray Drier B-191, Büchi Labortechnik AG, Switzerland) bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura de entrada de aire: 60-100 °C
- Temperatura salida del aire: 30-90 °C
- Presión de aire: 2-10 bares [2-10 x 10⁵ Pa]

- 10
- Velocidad de bombeo de la muestra: 2-9 mL/min
 - Aspiración: 30-100 %
 - Flujo de aire: 200-900 L/h

Opcionalmente, tras la adición del sacárido, las formulaciones pueden ser secadas mediante liofilización en lugar de mediante secado por pulverización.

15 Determinación de la cantidad de quercetina asociada a las partículas de caseína

La cantidad de quercetina asociada a las nanopartículas se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), de acuerdo con el procedimiento descrito por Lacopini (Lacopini y col., J Food Comp Anal 2008;21:589-598), aunque con algunas variaciones. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo modelo 1100 series LC (Agilent, Waldborn, Germany) acoplado a un sistema de detección UV de diodo-matriz. Los datos se analizaron en un ordenador Hewlett-Packard mediante el software Chem-Station G2171. Para la separación de quercetina se empleó una columna Alltech C18 AlltimaTM (5 µm, 150 mm x 2,1 mm) calentada a 40 °C, con una precolumna compatible Gemini® C18 AJO-7596 y una mezcla de agua/metanol/ácido acético glacial en gradiente (véase la Tabla 2) como fase móvil bombeada a un flujo de 0,25 mL/min. La detección se realizó a 260 nm, el volumen de inyección de muestra fue de 10 µL y el tiempo de retención de la quercetina fue de 24,2 ± 0,2 minutos.

25 Tabla 2

Condiciones de gradiente para la fase móvil
(A: agua, B: metanol, C: acético glacial)

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	80	15	5
15	70	25	5
20	10	85	5
30	10	85	5
35	80	15	5
40	80	15	5

30 Previamente a la cuantificación de las muestras se prepararon distintas rectas de calibrado de concentraciones entre 1 y 100 µg/mL en medio hidroalcohólico (75 % de etanol), obteniendo resultados de precisión y exactitud superiores al 95 %.

Para el análisis de las muestras frescas (antes de su secado), los sobrenadantes obtenidos tras el proceso de purificación de las nanopartículas por filtración (17000 rpm, 20 min) se diluyeron hasta la obtención de una solución hidroalcohólica con un contenido en etanol del 50 % (p/v).

35 Finalmente, la cantidad de quercetina asociada a las nanopartículas [eficacia de encapsulación (E.E.)] se calculó como la diferencia entre la cantidad de la quercetina (Q) añadido inicialmente y la cantidad del mismo cuantificada en los sobrenadantes, según la siguiente ecuación:

$$E.E. (\%) = \frac{mg Q_{totales} - mg Q_{en\ sobrenadante}}{mg Q_{totales}} \cdot 100$$

5 **Ejemplo 1**Preparación y caracterización de nanopartículas de caseína vacías. Rendimiento del proceso de obtención. Influencia del tipo de aminoácido empleado en la estabilidad y las características fisicoquímicas de las nanopartículas

10 Se disolvió 1 g de caseinato sódico, junto con 90 mg de lisina, en 75 mL de agua. Posteriormente, sobre esta disolución, se añadieron 40 mL de CaCl₂ al 0,8 % bajo agitación magnética y flujo constante. Este procedimiento fue realizado por triplicado.

La Figura 2 (A y B) muestra las imágenes obtenidas por microscopia electrónica de transmisión de las partículas de caseína obtenidas por este método.

15 Por otra parte, se realizó el mismo estudio en ausencia de aminoácido, o bien empleando 50 mg de arginina en lugar de lisina, con el fin de conocer la influencia del tipo de aminoácido en las características fisicoquímicas de las partículas.

La Tabla 3 resume los parámetros fisicoquímicos principales de las nanopartículas resultantes.

Tabla 3

20 Características físico-químicas de las nanopartículas de caseína (media \pm SD, n=10). La relación en peso entre el aminoácido, lisina o arginina, y la proteína es de 1:11 y 1:20 respectivamente

Formulación	Tamaño (nm)	PDI ^a	Potencial zeta (mV)	Rendimiento ^b (%)
NP Caseína (sin aminoácido)	154 \pm 30	0,24 \pm 0,04	-17,6 \pm 0,3	---
NP Caseína (lisina)	138 \pm 13	0,19 \pm 0,02	- 14,0 \pm 0,5	95 \pm 3
NP Caseína (arginina)	157 \pm 19	0,21 \pm 0,03	- 17,5 \pm 0,6	97 \pm 1

^a PDI: polidispersión;

^bRendimiento: Porcentaje de proteína transformado en nanopartículas.

25 Los estudios estadísticos realizados (test de muestras independientes no paramétrico: Kruskal-Wallis) revelaron que no hay evidencias estadísticamente significativas para afirmar que existen diferencias entre los parámetros fisicoquímicos de las formulaciones. De este modo, se pudo concluir que el tipo de aminoácido no interfiere en dichas características de las nanopartículas vacías.

30 Este mismo estudio se llevó a cabo variando la proporción de aminoácido añadido a la formulación, alcanzando conclusiones similares, es decir, que la proporción y el tipo de aminoácido no interfiere en las características finales de las partículas vacías.

Con el fin de conocer la estabilidad de las formulaciones se midieron los parámetros fisicoquímicos de los tres tipos de nanopartículas a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos quedan recogidos en la Tabla 4.

5

Tabla 4

Características físico-químicas de las nanopartículas de caseína (media \pm SD, n=6) a lo largo del tiempo. La relación en peso entre el aminoácido, lisina o arginina, y la proteína es de 1:11 y 1:20 respectivamente

Tiempo (horas)	NP Caseína (sin aminoácido)		NP Caseína (lisina)		NP Caseína (arginina)	
	Tamaño	PDI	Tamaño	PDI	Tamaño	PDI
0	165 \pm 40	0,25 \pm 0,05	138 \pm 13	0,19 \pm 0,02	157 \pm 21	0,21 \pm 0,04
2	323 \pm 64	0,45 \pm 0,15	155 \pm 11	0,14 \pm 0,02	176 \pm 12	0,16 \pm 0,04
16	317 \pm 6	0,40 \pm 0,03	157 \pm 5	0,18 \pm 0,03	175 \pm 2	0,14 \pm 0,02
24	231 \pm 5	0,36 \pm 0,03	155 \pm 5	0,13 \pm 0,02	183 \pm 4	0,25 \pm 0,02
30	295 \pm 60	0,73 \pm 0,06	157 \pm 3	0,13 \pm 0,02	195 \pm 4	0,32 \pm 0,03
48	255 \pm 20	0,79 \pm 0,02	157 \pm 4	0,16 \pm 0,01	205 \pm 3	0,33 \pm 0,04

PDI: polidispersión.

10 En el momento de su obtención, los tres tipos de nanopartículas presentaban tamaños del mismo orden y polidispersiones relativamente bajas (considerando que para valores de PDI inferiores a 0,3 la distribución de tamaño de partícula es homogénea). Estos valores de tamaño y dispersión no muestran variaciones significativas a lo largo de todo el estudio en el caso de las nanopartículas formuladas con aminoácido. Sin embargo, a partir de las dos horas desde su obtención, las nanopartículas que no fueron formuladas con aminoácido presentaban incrementos notables tanto en su tamaño medio como en su polidispersión (para valores de polidispersión superiores a 0,3 el valor de tamaño de partícula no es representativo, sólo orientativo, ya que hay una gran heterogeneidad de diámetros), llegando a alcanzar valores de polidispersión muy elevados tras la finalización del estudio. Dichos incrementos son indicativos de la existencia de fenómenos de agregación entre las partículas. Estos fenómenos se confirman incluso a escala macroscópica, ya que al observar las tres formulaciones a lo largo del tiempo se comprobó que las nanopartículas sin aminoácido precipitan dando lugar a la formación de una capa lechosa, mientras que las nanopartículas formuladas con aminoácido permanecen formando una suspensión homogénea. En vista de estos resultados, se considera que la presencia del aminoácido es esencial para obtener partículas estables en el tiempo.

25 Por otra parte, se prepararon de nuevo los tres tipos de formulaciones y se estudiaron sus características fisicoquímicas tras ser secadas mediante la técnica de secado por pulverización. Las condiciones del proceso fueron:

- Temperatura de entrada de aire: 90 °C
- Temperatura salida del aire: 49 °C
- Presión de aire: 6 bar [6×10^5 Pa]
- 30 - Velocidad de bombeo de la muestra: 4,5 mL/min
- Aspiración: 100 %
- Flujo de aire: 600 L/h

35 Este estudio se realizó con el propósito de conocer la influencia del aminoácido cuando las nanopartículas se desecan en el momento de su obtención, ya que en ese instante ninguna de las formulaciones presenta fenómenos de agregación. Los resultados obtenidos quedan recogidos en la Tabla 5.

5

Tabla 5

Características físico-químicas de las nanopartículas de caseína (media \pm SD, n=3) secadas mediante secado por pulverización. La relación en peso entre el aminoácido, lisina o arginina, y la proteína es de 1:11 y 1:20 respectivamente

Formulación	Tamaño (nm)	PDIa	Potencial zeta (mV)
NP Caseína (sin aminoácido)	305 \pm 56	0,45 \pm 0,02	-9,8 \pm 0,2
NP Caseína (lisina)	170 \pm 7	0,25 \pm 0,02	-11,9 \pm 0,9
NP Caseína (arginina)	184 \pm 2	0,25 \pm 0,01	-9,4 \pm 0,2

10

Al resuspender en medio acuoso las nanopartículas con aminoácido desecadas en polvo, se observó que la distribución de tamaño continúa monodispersa y sus tamaños son ligeramente superiores a los que presentaban sus homólogas antes de ser desecadas por secado por pulverización. Sin embargo, las nanopartículas formuladas sin aminoácido presentan valores altos de tamaño y polidispersión, lo que indica que durante el secado han podido sufrir fenómenos de agregación. Así pues, la presencia de aminoácido es también necesaria cuando las partículas se desecan mediante secado por pulverización.

15

En vista de todo ello se concluye que las características físicoquímicas de las nanopartículas con aminoácido difieren de aquellas que no lo contienen, tienen menor tendencia a la agregación y por lo tanto son las formulaciones escogidas para proceder a la encapsulación de compuestos biológicamente activos.

20

Ejemplo 2

Preparación y caracterización de nanopartículas de caseína conteniendo ácido fólico. Influencia del contenido en lisina y de ácido fólico en la eficacia de encapsulación

Se prepararon distintas disoluciones, todas ellas conteniendo 100 mg de caseinato sódico y cantidades variables de lisina (0 – 8,5 mg), en un volumen final de 7,5 mL de agua.

25

Por otra parte, se disolvieron 300 mg de ácido fólico conjuntamente con 400 mg de lisina en 50 mL de agua.

Posteriormente, se añadió 1 mL de la disolución de ácido fólico sobre la de caseinato. Pasados 5 minutos de incubación se añadieron sobre la mezcla 4 mL de CaCl₂ al 0,8 % bajo agitación magnética y flujo constante. Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada tipo de formulación.

30

La Figura 3 muestra las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de las partículas de caseína, con ácido fólico encapsulado, obtenidas por este método.

La Tabla 6 recoge las características físicoquímicas obtenidas en cada caso:

Tabla 6

Características físico-químicas de las nanopartículas de caseína con ácido fólico y cantidades variables de lisina (media \pm SD, n = 6). La relación en peso entre el ácido fólico y la proteína es de 1:17

35

Relación en peso lisina:caseínaa	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en Ácido Fólico μ g AF/ mg NP	Eficacia de encapsulación
0:100	159 \pm 6	0,16 \pm 0,04	- 7,9 \pm 2,4	---	---
1:26	139 \pm 1	0,11 \pm 0,05	- 17,5 \pm 0,5	22,1 \pm 0,9	32,2 \pm 0,8

1:22	140 ± 1	0,10 ± 0,05	- 16,8 ± 0,7	22,3 ± 0,4	32,3 ± 0,4
1:12	136 ± 4	0,08 ± 0,02	- 16,4 ± 0,7	25,7 ± 3,2	37,6 ± 4,8

5 a Antes de la adición de la solución de ácido fólico

AF: Ácido fólico; NP: Nanopartícula

Los estudios estadísticos realizados (test de muestras independientes no paramétrico: Kruskal-Wallis) revelaron que no hay evidencias estadísticamente significativas para considerar que hay diferencias en las características fisicoquímicas de las tres últimas formulaciones incluidas en la tabla (con contenidos en lisina de 3,9; 4,5; y 8,5 mg).
10 En el primero de los casos, se comprobó que, a pesar de que la solución de ácido fólico cuenta con lisina, la ausencia del aminoácido en la solución inicial de caseinato favorece la precipitación parcial del ácido fólico con el calcio, lo que implica la obtención de errores en la cuantificación de la vitamina, ya que no todo el ácido fólico encontrado en el pellet tras la centrifugación se encuentra encapsulado.

Estudios adicionales permitieron comprobar que, cuando la solución de la vitamina contiene aminoácido pero la de caseinato no, la cantidad máxima de ácido fólico que se puede incorporar en la formulación sin que precipite es de 4 mg, obteniéndose entonces resultados similares a los que se presentan en la Tabla 6 ($25,5 \pm 1 \mu\text{g}$ AF/mg NP y eficacia de encapsulación: $68,7 \pm 0,5$). Así pues, se comprueba que la presencia de aminoácido no influye en la cantidad de vitamina encapsulada. Sin embargo, en vista de que las nanopartículas formuladas sin aminoácido son menos estables y tienen mayor tendencia a la agregación (ver Ejemplo 1), las formulaciones se llevarán a cabo en presencia de éste.
15

Con objeto de conocer la influencia de la cantidad de ácido fólico añadido a la formulación en las características fisicoquímicas de las partículas, se realizó el mismo estudio pero variando únicamente la cantidad de disolución de ácido fólico añadida, siendo en todos los casos la cantidad de aminoácido constante en la solución inicial de caseína: 8,5 mg.
20

25 La Figura 4 muestra la relación entre la cantidad de ácido fólico encapsulada en función de la cantidad de vitamina añadida a la formulación.

Los tamaños encontrados en las formulaciones estudiadas oscilan entre 132 y 140 nm, con una polidispersión inferior a 0,2 en todos los casos. En este ejemplo los valores de eficacia de encapsulación no son comparables, ya que la cantidad de ácido fólico añadido a cada formulación es diferente. El máximo valor encontrado fue de $73,1 \pm 7,5$ para una relación en peso caseína ácido fólico de 13,5:1.
30

Como consecuencia de este estudio se pudo concluir que conforme se reduce la relación mg caseína/mg AF en la formulación (es decir, conforme se incrementa la cantidad inicial de ácido fólico añadida a la formulación) se obtiene un aumento de la cantidad de ácido fólico encapsulado en el interior de las nanopartículas. No obstante, cuando la cantidad de caseína presente en la formulación (en mg) por cada mg de ácido fólico es inferior a los valores experimentados se observa la obtención de precipitados y formulaciones inestables, al igual que ocurría en ausencia de lisina.
35

Ejemplo 3

Preparación y caracterización de nanopartículas de caseína conteniendo ácido fólico secadas por secado por pulverización. Influencia del proceso de secado en la formulación final

40 Se prepararon dos disoluciones, ambas conteniendo 1.000 mg de caseinato sódico y 90 mg de lisina, en un volumen final de 75 mL de agua.

Por otra parte, se disolvieron 600 mg de ácido fólico conjuntamente con 800 mg de lisina en 100 mL de agua.

Posteriormente, se añadieron 7,5 mL de la disolución de ácido fólico sobre cada disolución de caseinato. Pasados 5 minutos de incubación se añadieron sobre la mezcla 40 mL de CaCl_2 al 0,8 % bajo agitación magnética y flujo constante.
45

Finalmente, una de las formulaciones fue centrifugada para la cuantificación de ácido fólico en sobrenadante y pellet, mientras que a la otra se le añadieron 1.900 mg de lactosa antes de secarla mediante el empleo del secado por pulverización. Las condiciones del proceso fueron:

- Temperatura de entrada de aire: 90 °C
- 50 - Temperatura salida del aire: 45 °C
- Presión de aire: 6 bar [6×10^5 Pa]
- Velocidad de bombeo de la muestra: 4,5 mL/min

- 5 - Aspiración: 95 %
- Flujo de aire: 600 L/h

Las características fisicoquímicas observadas en ambos casos quedan recogidas en la Tabla 7.

Tabla 7

10 Características físico-químicas de las nanopartículas de caseína con ácido fólico cuantificadas en fresco o tras su secado por secado por pulverización (media \pm SD, n = 6). La proporción en peso entre la lisina y la proteína en la formulación final es de 1:7, y la proporción entre el ácido fólico y la caseína es de 1:22

Tipo de Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en Ácido Fólico μ g AF/ mg NP	Eficacia de encapsulación
secado por pulverización	157 \pm 5	0,17 \pm 0,01	- 15,7 \pm 0,3	18,6 \pm 3,4	41,4 \pm 7,6
Fresca	137 \pm 3	0,08 \pm 0,02	- 16,7 \pm 0,7	27,6 \pm 0,7	58,7 \pm 1,4

AF: Ácido fólico; NP: Nanopartícula

15 Los estudios estadísticos realizados (test de muestras independientes no paramétrico: Kruskal-Wallis) revelaron que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las eficacias de encapsulación obtenidas para ambas formulaciones. Esta diferencia encontrada puede ser debida a que el proceso de secado de la formulación por secado por pulverización a las temperaturas indicadas provoca una degradación parcial de las nanopartículas de caseína, dando lugar a una liberación de parte del ácido fólico previamente encapsulado.

20 Estos resultados muestran la necesidad de aplicar un método para reticular las partículas, ya que con ello se puede mejorar su estabilidad y evitar la citada disminución de la eficacia de encapsulación en el proceso de centrifugado o secado de la formulación.

Ejemplo 4

Preparación y caracterización de nanopartículas de caseína con lisina, conteniendo ácido fólico estabilizadas por altas presiones y secadas mediante la técnica de secado por pulverización. Influencia del tratamiento en las características fisicoquímicas de las nanopartículas

25 Se prepararon distintas disoluciones, todas ellas conteniendo 1.000 mg de caseinato sódico y 90 mg de lisina, en un volumen final de 75 mL de agua.

Por otra parte, se disolvieron 600 mg de ácido fólico conjuntamente con 800 mg de lisina en 100 mL de agua.

30 Posteriormente, se añadieron 7,5 mL de la disolución de ácido fólico sobre la disolución de caseinato. Pasados 5 minutos de incubación se añadieron sobre la mezcla 40 mL de CaCl₂ al 0,8 % bajo agitación magnética y flujo constante.

Una vez formadas las partículas, las formulaciones fueron trasvasadas a bolsas de plástico selladas y sometidas a un tratamiento de altas presiones hidrostáticas (0 MPa; 100 MPa, 5 min; 200 MPa, 5 min; 400 MPa, 5 min; 600 MPa, 5 min, ó 800 MPa, 5 min).

35 Una vez finalizado el proceso, se añadieron a cada formulación 1.900 mg de lactosa disueltos en agua, y se procedió a su secado empleando la técnica de secado por pulverización bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura de entrada de aire: 85 °C
- Temperatura salida del aire: 45 °C
- Presión de aire: 6 bar [6 x 10⁵ Pa]
- Velocidad de bombeo de la muestra: 4,5 mL/min
- 40 - Aspiración: 95 %
- Flujo de aire: 600 L/h

La Tabla 8 resume las características fisicoquímicas principales de las nanopartículas resultantes.

5

Tabla 8

Características físico-químicas de las nanopartículas de caseína con ácido fólico y distintos tratamientos de altas presiones (media \pm SD, n = 6). La proporción final en peso entre la lisina y la caseína es de 1:7, y la proporción entre el ácido fólico y la caseína es de 1:22

Tipo de Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Rendimiento (% en masa)	Contenido en Ácido Fólico μ g AF/mg NP	Eficacia de encapsulación	μ g AF/mg Formulación
Sin altas presiones	157 \pm 5	0,17 \pm 0,01	- 15,7 \pm 0,3	56,4	18,6 \pm 3,4	41,4 \pm 7,6	12,1 \pm 0,4
100 MPa	144 \pm 3	0,13 \pm 0,01	-13,6 \pm 0,2	54,1	25,3 \pm 4,5	55,1 \pm 7,6	11,5 \pm 1,4
5 min							
200 MPa	139 \pm 1	0,22 \pm 0,02	-13,2 \pm 0,5	67,6	23,2 \pm 0,9	52,1 \pm 2,1	11,2 \pm 1,4
5 min							
400 MPa	121 \pm 3	0,14 \pm 0,01	-13,3 \pm 0,5	68,2	25,5 \pm 3,2	58,7 \pm 4,8	11,9 \pm 1,4
5 min							
600 MPa	111 \pm 2	0,15 \pm 0,01	-12,8 \pm 0,4	47,7	30,8 \pm 3,0	67,8 \pm 5,5	11,8 \pm 0,9
5 min							
800 MPa	115 \pm 3	0,12 \pm 0,01	- 14,2 \pm 0,8	---	31,4 \pm 3,5	65,8 \pm 8,1	12,1 \pm 1,5
5 min							

AF: Ácido fólico; NP: Nanopartícula

- 10 Como puede observarse en la Tabla 8, independientemente del tipo de tratamiento aplicado a las formulaciones, las nanopartículas presentan cargas de superficie similares. Sin embargo, los datos permiten detectar que conforme se incrementa la presión aplicada en el tratamiento, el tamaño de partícula obtenido es inferior, llegando a una reducción máxima de un 7 %. Sin embargo, la cantidad de vitamina encapsulada (y por lo tanto la eficacia de encapsulación) alcanza valores superiores conforme aumenta la presión aplicada, llegándose a obtener incrementos del 65 % respecto a las formulaciones sin tratar (en el caso de las muestras tratadas con 800 MPa).

- 15 Por otra parte, la Figura 5 muestra las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las formulaciones sin tratamiento de altas presiones y las tratadas con 100, 400 y 800 MPa. En ellas se comprueba cómo las nanopartículas sin tratamiento de altas presiones hidrostáticas se encuentran parcialmente alteradas por los distintos procesos a los que han sido sometidas tras su obtención (secado por pulverización, centrifugación, realización de micrografías en cuyo proceso se alcanzan temperaturas altas), mientras que las que han sido sometidas a los distintos tratamientos de altas presiones son más estables.

- 20 Estos resultados ponen de manifiesto que los tratamientos de altas presiones hidrostáticas aplicados consiguen reticular las nanopartículas haciéndolas más estables y evitando, por tanto, que se degraden tras la centrifugación, secado y fotografiado. Todo ello explica la obtención de eficacias de encapsulación superiores en las muestras tratadas, ya que la degradación parcial de las nanopartículas en alguno de estos procesos de secado o centrifugación implicaría la liberación del ácido fólico y, por lo tanto, la obtención de eficacias de encapsulación inferiores.

Ejemplo 5

- 30 Preparación y caracterización de nanopartículas de caseína con arginina, conteniendo ácido fólico empleando altas presiones, secadas por secado por pulverización. Influencia del aminoácido empleado en el resultado final

5 Se preparó una disolución de 3.065 mg de caseinato sódico y 123 mg de arginina, en un volumen final de 210 mL de agua.

Por otra parte, se disolvieron 605 mg de ácido fólico conjuntamente con 800 mg de arginina en 100 mL de agua.

10 Posteriormente, se añadieron 27 mL de la disolución de ácido fólico sobre la disolución de caseinato. Pasados 5 minutos de incubación se añadieron sobre la mezcla 120 mL de CaCl₂ al 0,8 % bajo agitación magnética y flujo constante.

Una vez formadas las partículas, se trasvasó la formulación a una bolsa de plástico sellada y se sometió a un tratamiento de altas presiones hidrostáticas, consistente en un ciclo de 5 minutos a 400 MPa.

15 Una vez finalizado el proceso, a 300 mL de la formulación tratada por altas presiones se le añadieron 5.880 mg de manitol disueltos en agua, y se procedió a su secado empleando la técnica de secado por pulverización bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura de entrada de aire : 85 °C
- Temperatura salida del aire : 45 °C
- Presión de aire : 6 bar [6 x 10⁵ Pa]
- Velocidad de bombeo de la muestra : 4,5 mL/min
- 20 - Aspiración : 95 %
- Flujo de aire : 600 L/h

Las características fisicoquímicas principales de la formulación resultante se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9

25 Características físico-químicas de las nanopartículas de caseína con arginina y ácido fólico tratadas por altas presiones y secadas mediante secado por pulverización (media ± SD, n = 6). La proporción final en peso entre la arginina y la proteína es de 1:9, y la proporción entre el ácido fólico y la caseína es de 1:19

Tipo de Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Rendimiento (% en masa)	Contenido en Ácido Fólico µg AF/mg NP	Eficacia de encapsulación	µg AF/mg Formulación
400 MPa 5 min	137 ± 6	0,20 ± 0,01	-11,9 ± 0,1	---	33,5 ± 2,2	59,8 ± 3,9	13,9 ± 0,6

AF: Ácido fólico; NP: Nanopartícula

La Figura 6 muestra una micrografía de microscopia electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas de caseína conteniendo ácido fólico y con arginina en su formulación con tratamiento a 400 MPa, 5 minutos.

30 Tal como se puede comprobar, la formulación resultante presenta características similares a las nanopartículas obtenidas empleando lisina en lugar de arginina.

Ejemplo 6

Estudio de la cinética de liberación del ácido fólico desde las nanopartículas en medio gastrointestinal simulado. Influencia del tratamiento de altas presiones en la cinética de liberación

35 Para la realización de los estudios de liberación se tomaron las formulaciones en polvo descritas en el Ejemplo 4 (sin tratamiento por altas presiones, tratadas a 100 MPa y a 400 MPa).

40 La Figura 7 muestra la cinética de liberación obtenida para el caso de las muestras sin tratamiento por altas presiones. En ella se comprueba que, tras dos horas de incubación en medio gástrico, se alcanzan como máximo valores de liberación de ácido fólico de un 4 %. Sin embargo, en condiciones intestinales, las partículas de caseína se disuelven liberando un porcentaje elevado de la vitamina (llegando hasta un 90 % a las 24 horas del estudio). Además, en este medio, las muestras centrifugadas tras su incubación prácticamente no presentaban pellet de caseína, lo que evidencia su disolución, y por lo tanto, la liberación de la vitamina. De este modo se comprueba que la formulación diseñada consigue que el ácido fólico permanezca encapsulado a lo largo del tracto gástrico, evitando que las condiciones del estómago reduzcan su biodisponibilidad. Además, las nanopartículas se disuelven en el

5 intestino, favoreciendo la liberación de la vitamina y eliminando cualquier problema de toxicidad que pudiera surgir por la presencia de nanopartículas.

En el caso de las muestras tratadas por altas presiones, la Figura 8 (A y B) muestra sus cinéticas de liberación. En ellas se puede comprobar que el perfil es muy similar al encontrado para las muestras sin tratar por altas presiones, siendo el máximo porcentaje de liberación tras 6 horas en medio intestinal simulado (70 %), ligeramente inferior al encontrado para las muestras sin tratamiento en este tiempo (80 %).

Así pues, la aplicación de altas presiones hidrostáticas a las nanopartículas de caseína para su reticulación, no modifica significativamente el perfil de liberación del ingrediente desde las mismas, aunque reduce en un 10 % la cantidad total de la vitamina liberada a las 6 horas.

Ejemplo 7

15 Estudio farmacocinético de ácido fólico encapsulado en nanopartículas de caseína

La Tabla 10 resume las características fisicoquímicas principales de las nanopartículas ensayadas en el estudio farmacocinético. Ambos tipos de nanopartículas (con y sin tratamiento de altas presiones) fueron obtenidos siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

Tabla 10

20 Características físico-químicas de las nanopartículas de caseína con ácido fólico (media \pm SD, n = 6) utilizadas en los estudios farmacocinéticos

Tipo de Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en Ácido Fólico $\mu\text{g AF/ mg NP}$
NP Cas AF	134 \pm 3	0,17 \pm 0,02	-11,8 \pm 0,2	24,2 \pm 1,1
NP Cas AF HP	134 \pm 3	0,23 \pm 0,03	- 14,4 \pm 2,3	29,5 \pm 1,8

AF: Ácido fólico; NP: Nanopartícula; NP Cas AF: Nanopartículas de caseína con ácido fólico encapsulado; NP Cas AF HP: nanopartículas de caseína con ácido fólico encapsulado tratadas por altas presiones (400 MPa, 5 min).

25 El estudio farmacocinético se dividió en tres fases. La primera de ellas consistió en administrar por vía intravenosa 1 mg/kg de ácido fólico disuelto en tampón fosfato; la segunda de ellas consistió en administrar a las ratas 1 mL de tampón fosfato por vía oral a un grupo de 5 ratas macho Wistar (en este grupo de ratas se estudiaron los niveles basales de la vitamina en el tiempo). Por último, la tercera fase consistió en administrar por vía oral 1 mg/kg de (i) ácido fólico disuelto en agua, (ii) ácido fólico encapsulado en nanopartículas de caseína, y (iii) ácido fólico encapsulado en nanopartículas de caseína tratadas por altas presiones, a grupos de ratas compuestos de 5 animales.

30 Tras la administración, se procedió a extraer a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 8 y 24 horas) un volumen de sangre de aproximadamente 500 μL y recogerla en tubos de separación del suero, recuperando posteriormente la volemia del animal con un volumen equivalente de suero salino vía intraperitoneal. El análisis farmacocinético de los datos obtenidos tras la administración de ácido fólico se realizó utilizando el procedimiento de ajuste no compartimental del programa de ajuste farmacocinético WinNonlin 1.5 (Pharsight Corporation, Mountain View, Estados Unidos).

35 Los resultados obtenidos (después de restar los niveles basales) quedan recogidos en la Figura 9. Como se puede observar, la administración i.v. del ácido fólico (Figura 9A) muestra un pico de concentración de fármaco en suero en la primera toma de muestra, seguido de una disminución drástica de los niveles en suero. Los perfiles obtenidos cuando se administra la vitamina por vía oral (Figura 9B) son diferentes, ya que los máximos de concentración encontrados, significativamente inferiores, aparecen a tiempos superiores y descienden de forma más gradual. Sin embargo, al comparar los niveles de vitamina encontrados tras la administración oral del ácido fólico en su forma libre (sin encapsular) o encapsulado en nanopartículas de caseína (tratadas o sin tratar por altas presiones), se encontraron perfiles de concentración en el tiempo similares, pero los valores máximos fueron superiores cuando la vitamina se administró encapsulada.

45 La Tabla 11 recoge los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras realizar un análisis no compartimental de los datos experimentales del presente estudio.

5

Tabla 11

Parámetros farmacocinéticos de las diferentes formulaciones ensayadas (media \pm SD, n = 5)

Formulación	Tmax (min)	C max (ng/mL)	AUC (x 104) (ng x min/mL)	MRT (min)	FR (%)
AF no encaps	58,8 \pm 36,0	191,3 \pm 41,0	7,8 \pm 1,5	383,8 \pm 47,5	36,3 \pm 7,2
NP Cas AF	70,0 \pm 24,5	240,9 \pm 71,7	11,2 \pm 2,8*	485,8 \pm 267,1	52,1 \pm 13,0*
NP Cas AF HP	52,8 \pm 20,8	331,3 \pm 45,7**	11,3 \pm 2,5*	560,4 \pm 124,7*	52,7 \pm 11,6*
IV	----	4227,1 \pm 1651,5**	21,5 \pm 2,8**	57,8 \pm 15,5**	100**

* p < 0.05 vs. Ácido fólico no encapsulado. Test U de Mann Whitney.

** p < 0.01 vs. Ácido fólico no encapsulado. Test U de Mann Whitney.

AUC : área bajo la curva de concentración en suero

10 Cmax: concentración máxima

Tmax: tiempo en el cual se alcanza la Cmax

MRT: tiempo de residencia media

FR: Biodisponibilidad relativa en porcentaje.

15 Como se puede observar, los valores de AUC experimentan variaciones significativas en función del tipo de formulación empleada. Cuando la vitamina se encuentra encapsulada en nanopartículas de caseína, los valores de AUC son significativamente superiores a los encontrados tras administrar el ácido fólico libre y además éstos se mantienen en el tiempo hasta las 24 h post administración. Se observó que el tiempo medio de residencia (MRT) del ácido fólico en plasma fue similar en las dos formulaciones de nanopartículas y superior si lo comparamos con la forma libre (tanto oral como i.v.).

20 Según estos resultados se calculó la biodisponibilidad oral de las nanopartículas de caseína con ácido fólico encapsulado, que fue de un 52 % en ambas formulaciones, un 45 % superior a los valores obtenidos tras administración oral del ácido fólico libre por vía oral.

Ejemplo 8Preparación cosmética [1] con nanopartículas de caseína con ácido fólico encapsulado

25 Se preparó una disolución conteniendo 200 mg de caseinato sódico y 18 mg de lisina, en un volumen final de 15 mL de agua.

Por otra parte, se disolvieron 600 mg de ácido fólico conjuntamente con 800 mg de lisina en 100 mL de agua.

30 Posteriormente, se añadieron 1,5 mL de la disolución de ácido fólico sobre la disolución de caseinato. Pasados 5 minutos de incubación se añadieron sobre la mezcla 8 mL de CaCl₂ al 0,8 % bajo agitación magnética y flujo constante.

Finalmente, la formulación fue centrifugada a 17.000 x g, 20 minutos. El sobrenadante fue desechado y el pellet se resuspendió en 25 mL de agua.

35 Por otra parte, se preparó una disolución que contenía 7 g de glicerina y 0,2 g de nipagín sódico en 42 mL de agua. La disolución se calentó en baño maría hasta los 50 °C y posteriormente se le añadió la disolución acuosa de nanopartículas de caseína conteniendo ácido fólico, obteniéndose una disolución acuosa final con la que se preparará la formulación cosmética.

40 Además, por otra parte, se calentaron 25 g de Neo PCL O/W a 70 °C hasta su completa fusión. Una vez fundida esta fase grasa, se le añadió la disolución acuosa anterior bajo agitación constante, hasta obtener una emulsión O/W correcta y estable en el tiempo. La evaluación organoléptica de la crema resultante fue positiva, presentando una apariencia homogénea y sin grumos.

Este mismo estudio también fue realizado a partir de la formulación de nanopartículas tratadas por altas presiones (400 MPa, 5 minutos) y secadas por secado por pulverización descrita en el Ejemplo 4. Se tomaron 600 mg de la

5 formulación y se resuspendieron en 25 mL de agua, procediendo a partir de entonces del mismo modo ya descrito en las líneas anteriores. La crema resultante obtenida presentó también una apariencia homogénea y sin grumos.

Ejemplo 9

Preparación cosmética [2] con nanopartículas de caseína con ácido fólico encapsulado

10 Se preparó una disolución conteniendo 200 mg de caseinato sódico y 18 mg de lisina, en un volumen final de 15 mL de agua.

Por otra parte, se disolvieron 600 mg de ácido fólico conjuntamente con 800 mg de lisina en 100 mL de agua.

Posteriormente, se añadieron 1,5 mL de la disolución de ácido fólico sobre cada disolución de caseinato. Pasados 5 minutos de incubación se añadieron sobre la mezcla 8 mL de CaCl₂ al 0,8 % bajo agitación magnética y flujo constante.

15 Finalmente, la formulación fue centrifugada a 17.000 x g, 20 min. El sobrenadante fue desechado y el pellet se resuspendió en 25 mL de agua.

20 Por otra parte, se disolvieron 0,5 g de Carbopol Ultrez 10 en 75 mL de agua. A la disolución obtenida se le añadió la suspensión de nanopartículas. Una vez homogeneizada la mezcla, se añadió la cantidad suficiente de trimetilamina hasta la obtención de un pH de 10. La mezcla fue homogeneizada hasta la obtención de un gel de Carbopol homogéneo y estable, de color ligeramente amarillento.

25 Este mismo ensayo también fue realizado a partir de la formulación de nanopartículas tratadas por altas presiones (400 MPa, 5 minutos) y secadas por secado por pulverización descrita en el Ejemplo 4. Se tomaron 600 mg de la formulación y se resuspendieron en 25 mL de agua, procediendo a partir de entonces del mismo modo ya descrito en las líneas anteriores. El gel resultante presentó también un color ligeramente amarillento y una apariencia homogénea y estable.

Ejemplo 10

Preparación cosmética [3] con nanopartículas de caseína con ácido fólico encapsulado

Se mezclaron 3 g de monoestearato de glicerilo con 5 g de miristato de isopropilo y 2 g de alcohol cetílico. La mezcla fue calentada a baño maría a 70 °C.

30 Por otra parte, se calentaron a 50 °C en baño maría 87 g del gel de Carbopol conteniendo las nanopartículas de caseína con ácido fólico descrito en el Ejemplo 8, junto con 3 g de sorbitol líquido. Esta disolución se añadió sobre la anterior, agitando suavemente hasta obtener una emulsión homogénea.

Ejemplo 11

Preparación y caracterización de nanopartículas de caseína conteniendo quercetina

35 Se preparó una disolución conteniendo 100 mg de caseinato sódico y 8,5 mg de lisina (o bien 5,5 mg de arginina) en 7,5 mL de agua.

Por otra parte, se preparó en agua una solución de ascorbato sódico de concentración 12 mg/mL, de la que se añadieron 0,5 mL a la mezcla de caseinato y lisina. El objetivo del empleo del ascorbato sódico fue evitar la oxidación de la quercetina durante el proceso de obtención de las nanopartículas.

40 Por otra parte, se disolvieron 50 mg de quercetina en 5 mL de etanol.

Posteriormente, se añadieron 0,15 mL de la disolución de quercetina sobre la de caseinato. Pasados 5 minutos de incubación se añadieron sobre la mezcla 4 mL de CaCl₂ al 0,8 % bajo agitación magnética y flujo constante. Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada tipo de formulación.

La Tabla 12 recoge las características fisicoquímicas obtenidas en cada caso.

45 Tabla 12

Características físico-químicas de las nanopartículas de caseína con quercetina, aminoácido y ácido ascórbico (media ± SD, n = 3). La relación en peso entre la quercetina y la proteína es de 1:67; la relación en peso entre la quercetina y el ácido ascórbico es de 1:3,4

Formulación	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en Quercetina	Eficacia de encapsulación
-------------	-------------	-----	---------------------	-------------------------	---------------------------

	µg Q/ mg NP				
NP Caseína (lisina)	115 ± 5	0,21 ± 0,03	-15,5 ± 0,3	11,1 ± 0,3	86,7 ± 2,6
NP Caseína (arginina)	112 ± 3	0,20 ± 0,02	-17,1 ± 0,3	11,7 ± 0,4	88,1 ± 2,5

5 Q: Quercetina; NP: Nanopartícula

Los resultados obtenidos revelaron que las nanopartículas de la invención son también adecuadas para la encapsulación de compuestos biológicamente activos con características liposolubles y permiten obtener altos porcentajes de eficacias de encapsulación.

10 Por otra parte, los resultados permiten comprobar que la presencia de uno u otro aminoácido no influye en las características fisicoquímicas de las nanopartículas resultantes.

Con el fin de incrementar la cantidad de quercetina encapsulada se repitió el estudio empleando lisina como aminoácido y cantidades variables de quercetina (entre 0,05 y 0,50 mL de la solución etanólica de quercetina). Los resultados obtenidos quedan recogidos en la Tabla 13.

Tabla 13

15 Características físico-químicas de las nanopartículas de caseína con lisina, ácido ascórbico y cantidades variables de quercetina (media ± SD, n = 3). La relación en peso entre el ácido ascórbico y la proteína (caseína) es de 1:17

Relación en peso quercetina:caseína	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en quercetina µg Q/ mg NP	Eficacia de encapsulación
1:180	147 ± 14	0,21 ± 0,03	-17,6 ± 0,3	4,3 ± 0,2	83,2 ± 4,2
1:67	115 ± 5	0,21 ± 0,03	-15,5 ± 0,3	11,1 ± 0,3	86,7 ± 2,6
1:20	---	---	---	38,0 ± 1,3	89,3 ± 3,1

Q: Quercetina; NP: Nanopartícula

20 Los resultados obtenidos muestran que conforme se incrementa la cantidad de quercetina en la formulación, la cantidad de la misma encapsulada aumenta en la misma proporción, mientras que la eficacia de encapsulación se mantiene constante.

25 Adicionalmente, se realizaron ensayos siguiendo el procedimiento descrito previamente pero dispersando la quercetina en agua (en lugar de disolviéndola en etanol) antes de su adición a la solución de caseinato. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que parte de la quercetina fue encapsulada en las nanopartículas de caseína aunque la eficacia de encapsulación fue menor que en el caso anterior, en el que la quercetina se disolvía en etanol antes de su adición a la solución de caseinato.

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir nanopartículas que comprenden una matriz de caseína, un aminoácido básico y un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones de los mismos, que comprende:
- a) preparar una solución acuosa que contiene una fuente de caseína y un aminoácido básico; y
- 10 b) añadir una disolución acuosa de un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y combinaciones de los mismos a la solución de la etapa a).
2. Un procedimiento para producir una nanopartícula que comprende una matriz de caseína, un aminoácido básico, un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente, y combinaciones de los mismos y un compuesto biológicamente activo, que comprende:
- 15 a) mezclar (i) una solución acuosa que contiene una fuente de caseína y un primer aminoácido básico con (ii) una solución que contiene un compuesto biológicamente activo; y
- b) añadir una disolución acuosa de un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y sus combinaciones a la mezcla resultante de la etapa a).
- 20 3. Una nanopartícula que comprende una matriz de caseína, un aminoácido básico y un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y combinaciones de los mismos, obtenida mediante un procedimiento según la reivindicación 1.
4. Una nanopartícula que comprende una matriz de caseína, un aminoácido básico, un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y combinaciones de los mismos, y un compuesto biológicamente activo, obtenida mediante un procedimiento según la reivindicación 2.
- 25 5. La nanopartícula según la reivindicación 3 o 4, en la que dicho aminoácido básico se selecciona del grupo que consiste en arginina, lisina, histidina, y mezclas de los mismos.
6. La nanopartícula según la reivindicación 3 o 4, en la que dicho metal es un metal divalente seleccionado del grupo que consiste en calcio, magnesio, cinc, hierro en forma divalente, y combinaciones de los mismos, preferentemente, calcio.
- 30 7. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha solución acuosa de un metal seleccionado entre un metal divalente, un metal trivalente y combinaciones de los mismos es una solución acuosa de una sal cálcica seleccionada del grupo que consiste en cloruro cálcico, acetato cálcico, gluconato cálcico, lactato cálcico, sorbato cálcico, ascorbato cálcico, citrato cálcico, propionato cálcico, sulfato cálcico y mezclas de los mismos.
- 35 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende, además, someter la suspensión que contiene las nanopartículas formadas a, al menos, un ciclo de presión hidrostática, a una presión comprendida entre 100 y 800 MPa.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además desecar la suspensión que contiene las nanopartículas formadas.
- 40 10. Una composición que comprende, al menos, una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, o una nanopartícula obtenida según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, y un vehículo aceptable en alimentación, farmacia o cosmética.
11. La composición según la reivindicación 10 seleccionada del grupo que consiste en:
- una composición que comprende:
- 45 caseína, entre 10 % y 50 % en peso;
- ácido fólico, entre 0,9 % y 2,5 % en peso;
- calcio, entre 1 % y 6 % en peso;
- un aminoácido básico, entre 1 % y 7 % en peso; y
- un sacárido, entre 30 % y 80 % en peso,
- 50 en la que todas las proporciones son en peso respecto al peso total de la composición; y
- una composición que comprende:

- 5 caseína, entre 10 % y 50 % en peso;
ácido fólico, entre 0,9 % y 2,5 % en peso;
calcio, entre 1 % y 6 % en peso; y
un aminoácido básico, entre 1 % y 7 % en peso;
un sacárido, entre 20 % y 55 % en peso; y
- 10 ácido ascórbico, entre 1 % y 25 %, en la que todas las proporciones son en peso respecto al peso total de la composición.
12. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en la que dichas nanopartículas están en forma de un polvo seco.
13. Un producto alimenticio, que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.
- 15 14. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho compuesto biológicamente activo se selecciona entre un compuesto biológicamente activo hidrosoluble y un compuesto biológicamente activo liposoluble.
15. El procedimiento según la reivindicación 14, en el que dicho compuesto biológicamente activo hidrosoluble se selecciona del grupo que consiste en:
- 20 a) una vitamina de la familia B o C;
b) un derivado de una vitamina según a);
c) un compuesto seleccionado de ácido hialurónico, condroitín sulfato y ácido tióctico;
d) una sal o un éster de cualquiera de los compuestos a)-c) mencionados anteriormente; y
e) combinaciones de los mismos.

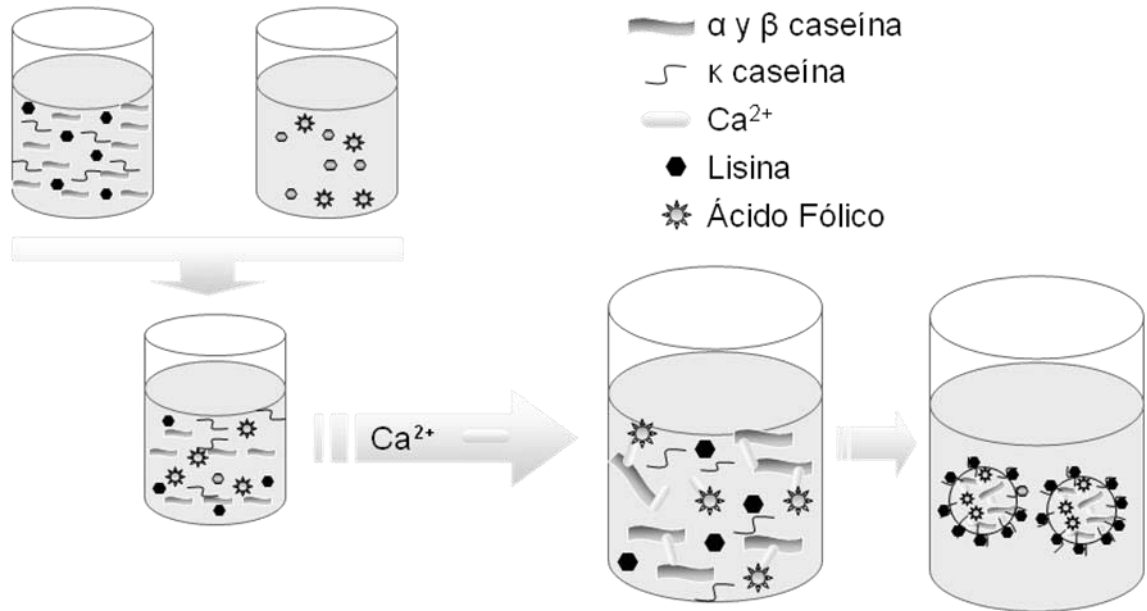
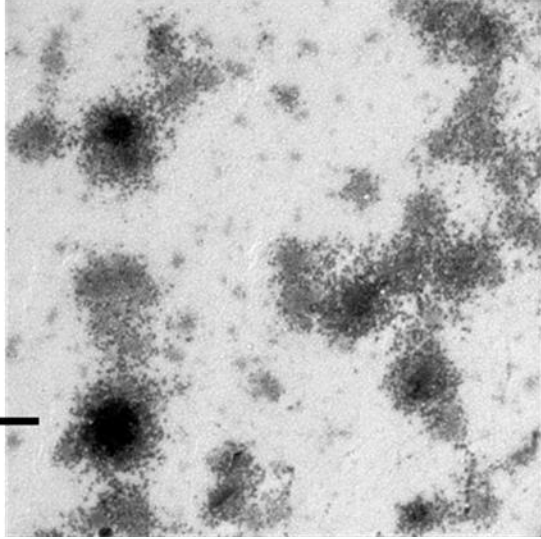


Figura 1

A



B

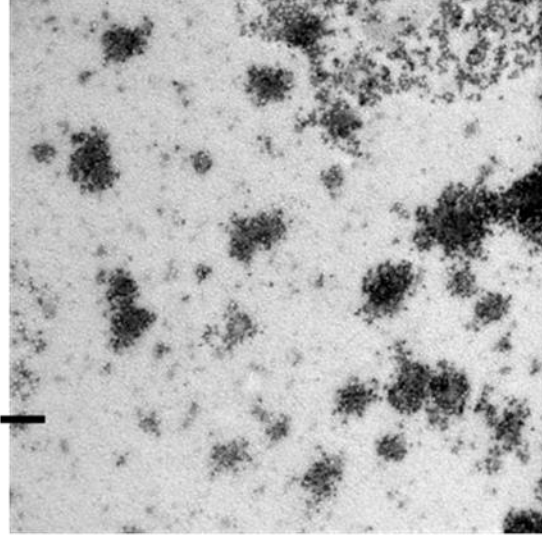
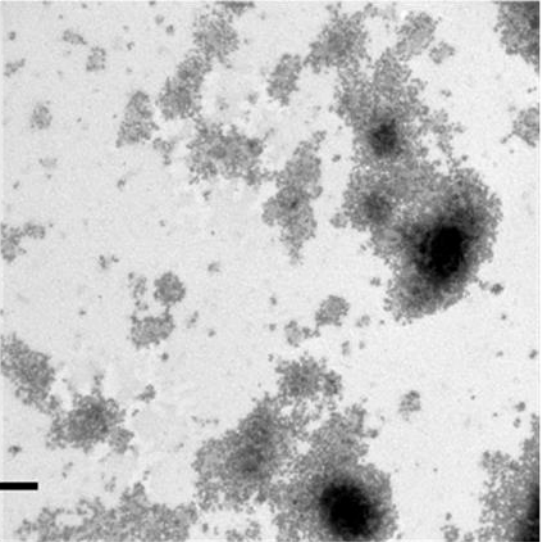


Figura 2

A



B

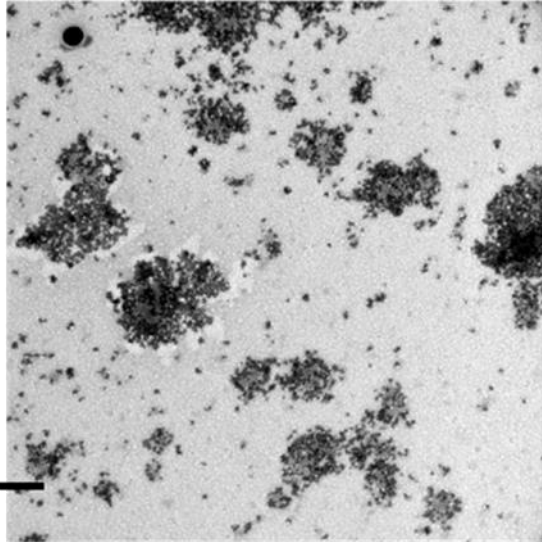


Figura 3

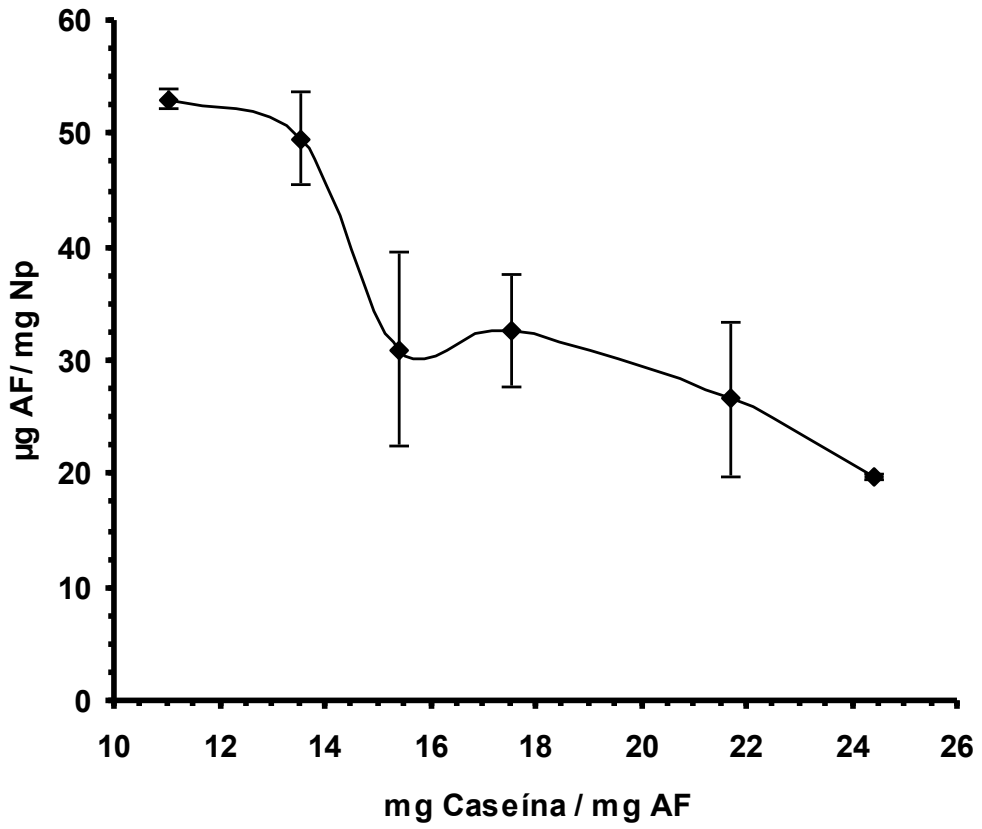


Figura 4

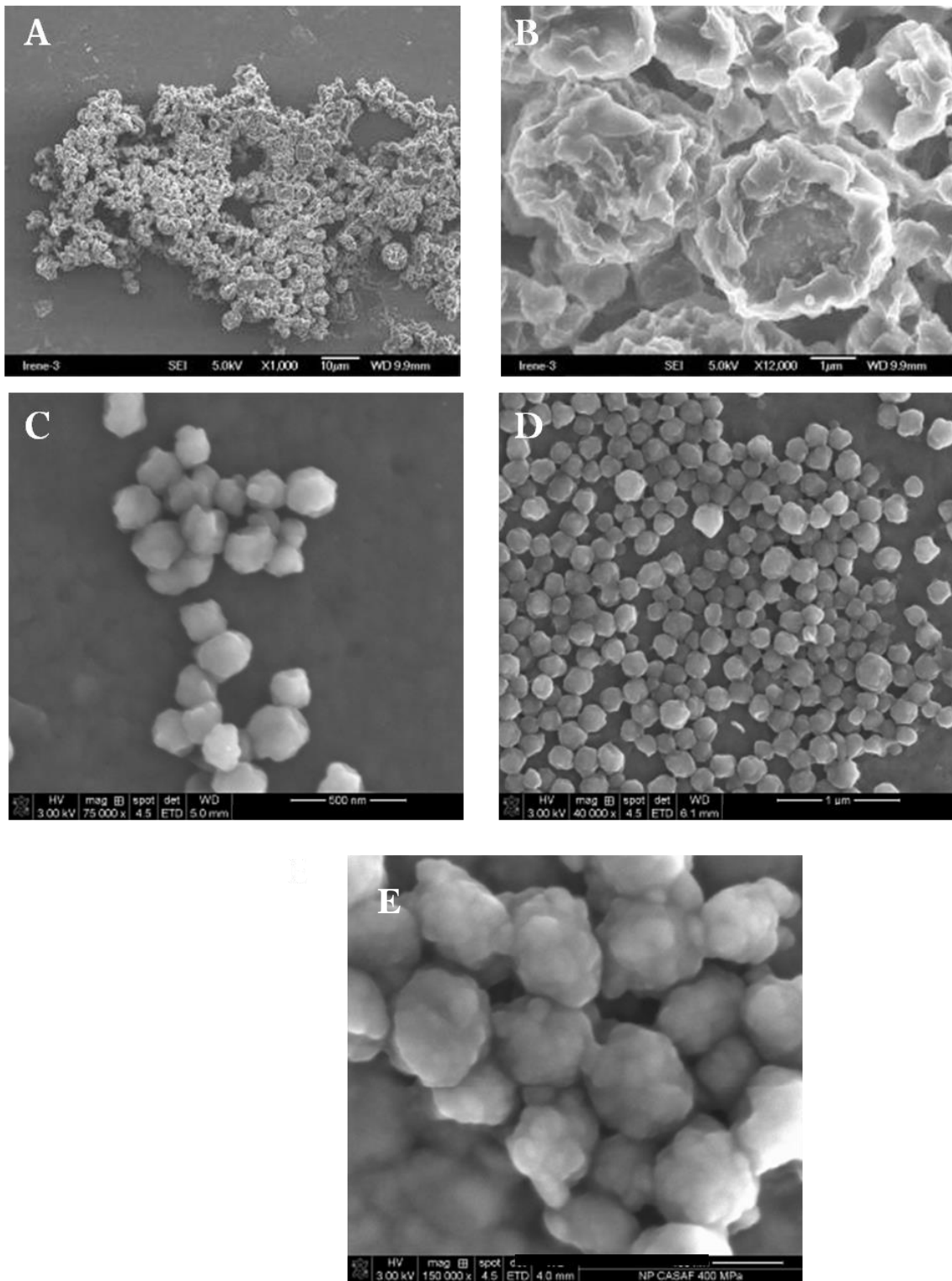


Figura 5

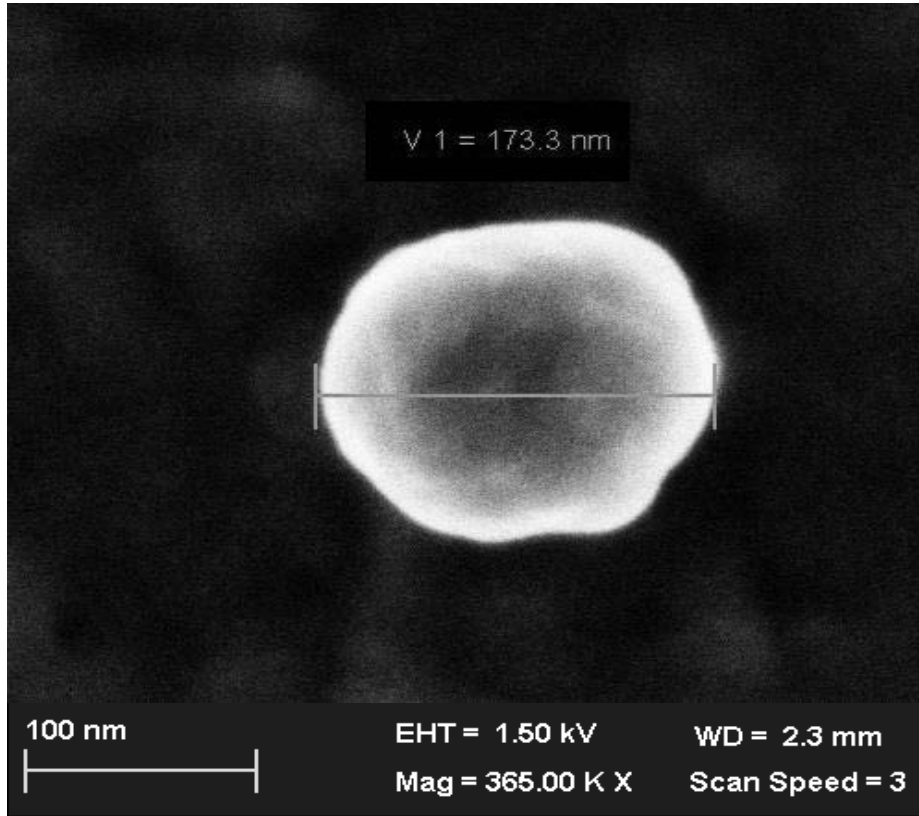


Figura 6

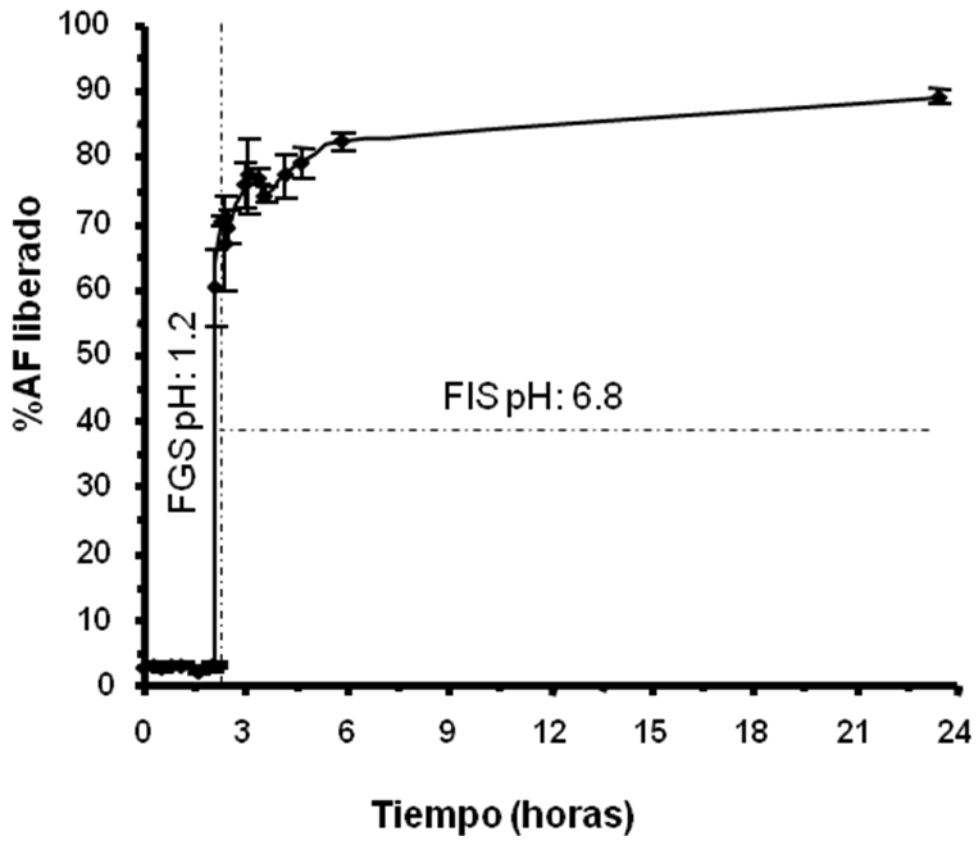
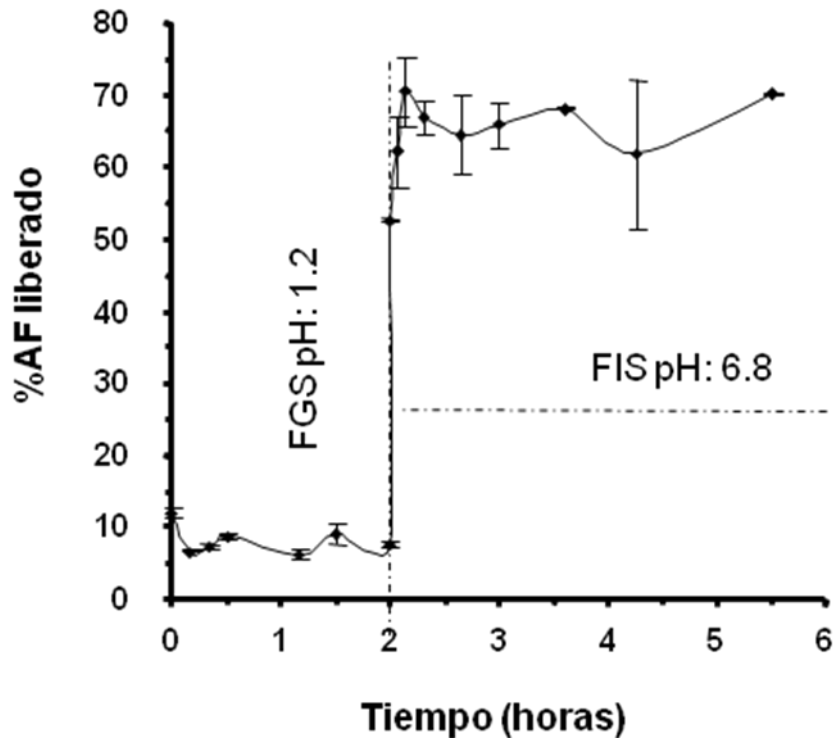


Figura 7

A



B

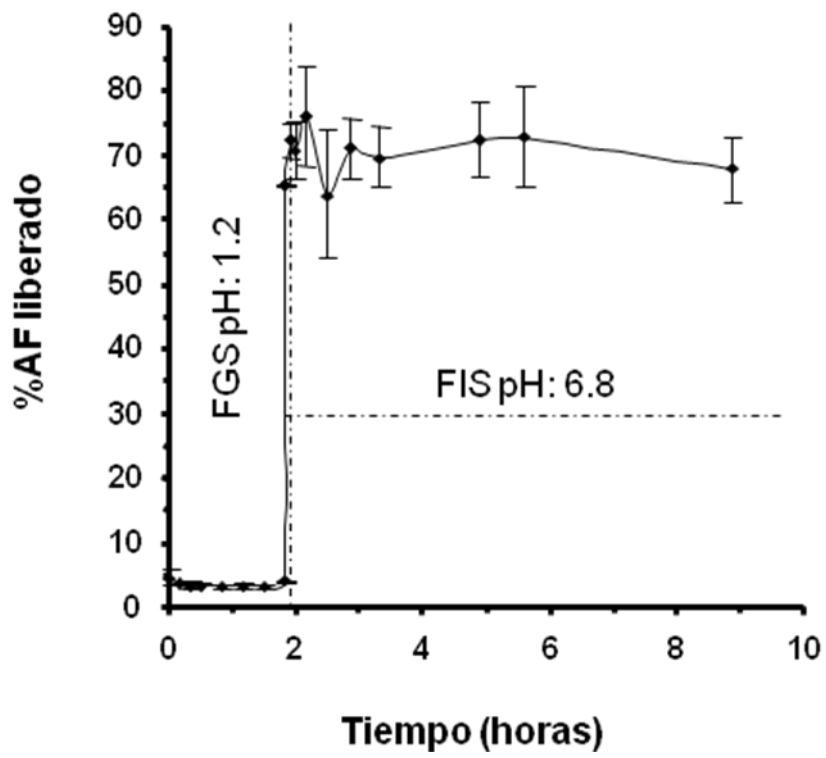


Figura 8

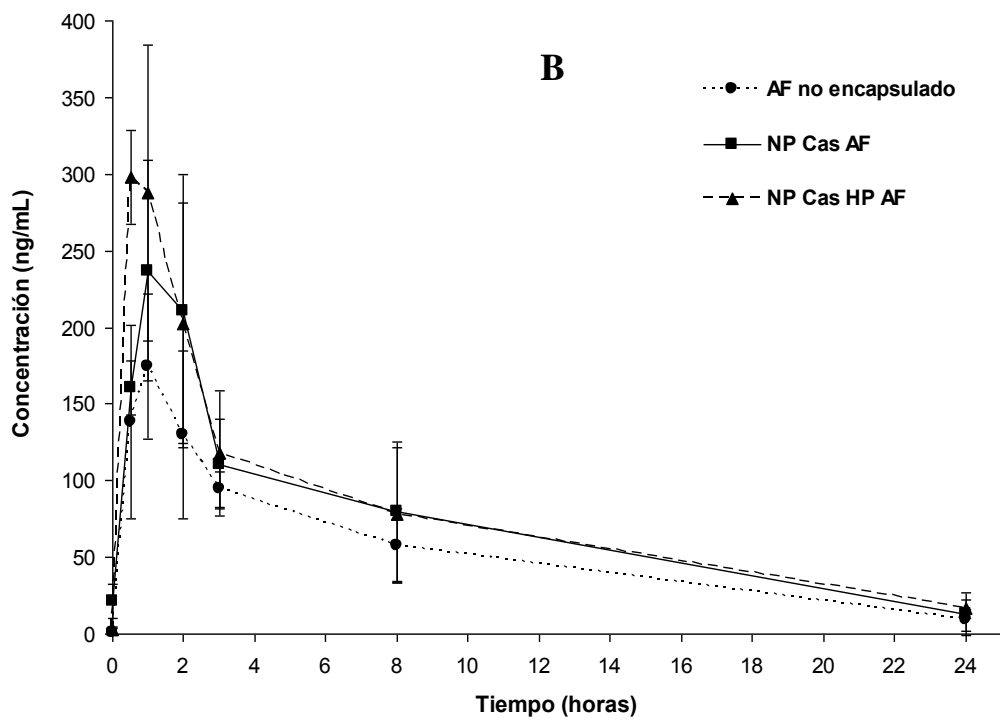
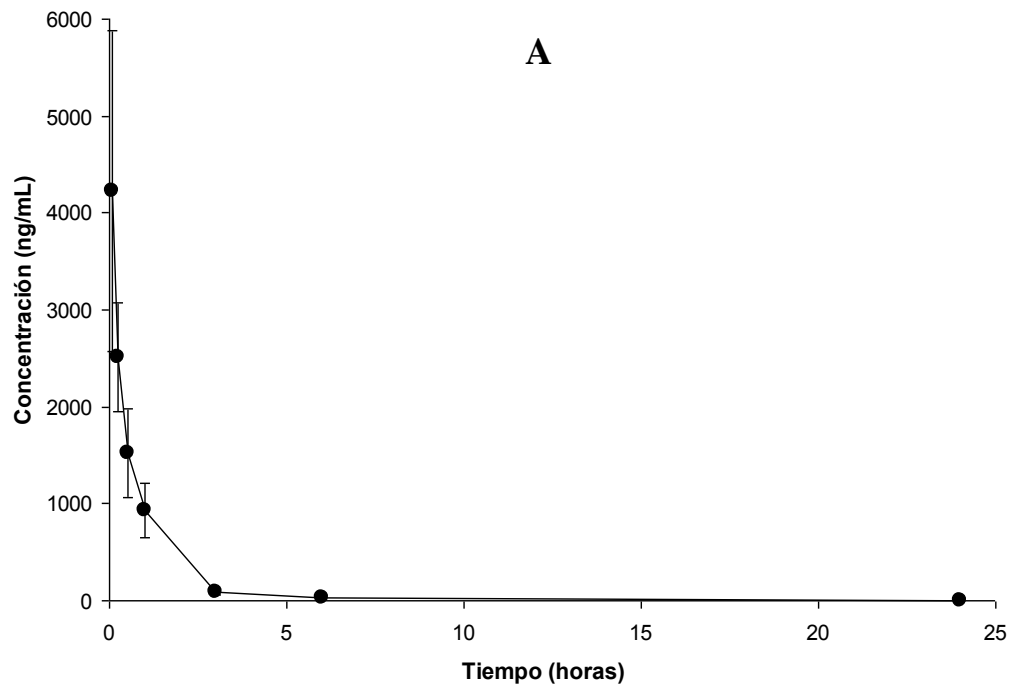


Figura 9