



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 596 284

51 Int. Cl.:

A23L 2/52 (2006.01)
A23L 33/15 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01)
A61K 31/4188 (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61K 31/51 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 10.06.2013 PCT/IB2013/054730

(87) Fecha y número de publicación internacional: 03.01.2014 WO14001932

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 10.06.2013 E 13742281 (2)

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 20.07.2016 EP 2866588

54 Título: Nanogel que comprende principios activos hidrosolubles

(30) Prioridad:

27.06.2012 WO PCT/CN2012/000881 10.10.2012 EP 12187990

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 05.01.2017 (73) Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%) Het Overloon, 1 6411 TE Heerlen, NL

(72) Inventor/es:

DING, XUZHE; VIDONI, OLIVIA y YAO, PING

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

DESCRIPCIÓN

Nanogel que comprende principios activos hidrosolubles

10

15

20

25

30

35

45

La presente invención se refiere a una composición de nanogel que comprende al menos un ingrediente activo hidrosoluble, una o más proteínas vegetales y uno o más polisacáridos de soja solubles. Estas composiciones se pueden utilizar para el enriquecimiento y/o el refuerzo de alimentos, bebidas, alimentos para animales y/o cosméticos y permitir la estabilización del ingrediente activo. La presente invención se refiere también al procedimiento para la preparación de tales composiciones de nanogel. La presente invención se refiere, además, a un procedimiento para la fabricación de una bebida mediante la mezcla de las composiciones con ingredientes de bebidas. La presente invención se refiere también a las bebidas que se pueden obtener mediante este procedimiento.

Las composiciones para enriquecer o reforzar los alimentos, bebidas, cosméticos, alimentos para animales o cosméticos que contienen ingredientes activos hidrosolubles, por ejemplo ácido fólico, son conocidos en la técnica (S.M. Lopera et al. (2009), Vitae 16, p55-65). Se han utilizado perlas de alginato en la microencapsulación de los folatos, ya que son fáciles de preparar a escala de laboratorio, es proceso hidrogelificante suave y relativamente seguro para el uso en formulaciones de alimentos (K. Kasipathy, 2008, Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals. Capítulo 13, p.331-341). Sin embargo, las microcápsulas de alginato tiene una naturaleza porosa que conduce a fugas de ácido fólico y a una estabilidad moderada de ácido fólico cuando se expone a la luz y en condiciones ácidas típicas de bebidas (pH 3-5). De hecho, el ácido fólico es bien conocido por su inestabilidad (escisión del enlace C9-N10) cuando se expone a radiación ultravioleta. Además de ello, el ácido fólico es poco soluble en el intervalo de pH de bebidas ácidas en el intervalo de pH 2-4.

Composiciones de nanogel para el suministro de sustancias activas, que se basan en material proteico y, opcionalmente, polisacáridos, se describen en los documentos US 2012/093933 y CN 1654510.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de composiciones que comprenden ingredientes activos hidrosolubles para el enriquecimiento y/o refuerzo de alimentos, bebidas, alimentos para animales o cosméticos que no muestran los problemas arriba mencionados.

Por lo tanto, era un objeto de la presente invención proporcionar composiciones de ingredientes activos hidrosolubles que tengan las propiedades deseadas tal como se ha indicado anteriormente, p. ej., muy buenas propiedades referentes a la estabilidad del ingrediente activo en pH de carácter ácido (3-5), la estabilidad del ingrediente activo cuando se expone a la luz (fotoestabilidad), y la claridad óptica cuando se utiliza en una bebida. También era un objetivo de la invención mejorar el procedimiento para la preparación de composiciones de ingredientes activos hidrosolubles.

Este objetivo se ha resuelto mediante una composición de nanogel que comprende:

- a) 0,1 a 5% en peso, basado en el peso seco de la composición, de al menos un ingrediente activo hidrosoluble seleccionado de ácido ascórbico, biotina, ácido fólico, ácido nicotínico, tiamina y vitamina B6;
- b) 9 a 40% en peso, basado en el peso seco de la composición, de una o más proteínas vegetales elegidas del grupo de las proteínas adecuadas para la aplicación a alimentos; y
 - c) 50 a 90% en peso, basado en el peso seco de la composición, de uno o más polisacáridos de soja solubles; en donde la relación ponderal de proteína(s) a polisacárido(s), basada en la composición de materia seca se elige como 1: b, con la condición de que b esté comprendido entre 1 y 6.
- 40 El término "nanogel" en la presente invención se refiere a una nanopartícula compuesta de una red reticulada de un heteropolímero hidrofílico (hidrogel).

Ingredientes activos hidrosolubles adecuados para la composición de acuerdo con la presente invención son ingredientes activos hidrosolubles que tienen un pKa que oscila entre 4 y 6 y se seleccionan de ácido ascórbico (vitamina C, pKa 4,17); biotina (vitamina B8, pKa 5,33); ácido fólico (vitamina B9, pKa 4,7); ácido nicotínico (niacina o vitamina B3, pKa 4,9); tiamina (vitamina B1, pKa 4,8); vitamina B6, pKa 5,33, así como mezclas de los mismos. El ingrediente activo hidrosoluble más preferido para todas las realizaciones de la presente invención es el ácido fólico.

De acuerdo con la presente invención la o las proteínas vegetales preferidas se derivan de soja, altramuz (p. ej., L. albus, L. angustifolius o variedades de las mismas), guisante y/o patata. Las proteínas se pueden aislar de cualquier parte de la planta, incluyendo frutos (p. ej., tales como habas de soja), semillas (incluyendo semillas preparadas o procesadas) y similares; o a partir de harina entera o productos desgrasados, tales como tiras, escamas, etc.

Para la composición de la presente invención, son especialmente preferidas las proteínas de la soja y del guisante, la proteína de la soja incluso más preferida es la "proteína de soja soluble en ácidos" (Soyasour 4000K, con un contenido en proteínas mayor que o igual a 60% en peso). La más preferida es Soyasour 4000K con un contenido en proteínas mayor que o igual a 80% en peso, con una humedad inferior o igual a 7,5% en peso, grasa inferior o igual a 1,5% en peso, pH 3,6 a 6,4). Se puede adquirir de Jilin Fuji Protein Co. Ltd. Una fuente de proteína de guisante preferida es de Cosucra SA (Warcoing, Bélgica).

La expresión "polisacárido de soja soluble", tal como se utiliza en esta memoria se refiere a polisacárido de soja soluble con un contenido mayor que o igual a 60% en peso de polisacáridos. El polisacárido de soja soluble más preferido es el polisacárido de soja soluble con un contenido mayor que o igual a 70% en peso de polisacáridos, inferior o igual a 10% en peso de proteína, inferior o igual a 1% en peso de grasa, inferior a o igual a 8% en peso de humedad, inferior o igual a 8% en peso de cenizas, y un pH comprendido entre 3 y 6. Éste se puede adquirir de Fuji Co., Ltd.

Para la composición de acuerdo con la presente invención, se prefiere elegir la relación ponderal de proteína(s) a polisacárido(s), basado en la composición en materia seca tal como 1:b, con la condición de que b esté comprendido entre 1 y 5, de manera especialmente preferida, b se compone entre 2 y 4, incluso más preferida, b es 3.

20 En una realización especialmente preferida de la presente invención, el tamaño medio de partícula del nanogel es de entre 120 y 250 nm, medido por dispersión de la luz dinámica.

La invención también se refiere a un procedimiento para la fabricación de una composición de nanogel estable tal como se ha indicado anteriormente, que comprende las siguientes etapas (el procedimiento puede llevarse a cabo utilizando los ingredientes en cantidades tales como se especifican en esta memoria):

- 1) mezclar en agua uno o más polisacáridos de soja solubles en forma de una disolución a un pH de alrededor de 7,4 con una disolución de al menos un ingrediente activo hidrosoluble seleccionado de ácido ascórbico, biotina, ácido fólico, ácido nicotínico, tiamina y vitamina B6; y una disolución de proteína(s) vegetal(es), en donde la concentración de la proteína de soja es de 1 a 10 g/l, la relación ponderal de proteína a polisacárido es de 1:1 a 1:6 y la concentración de ingrediente activo hidrosoluble es de entre 0,02 y 0,2 g/l,
- 30 II) agitar opcionalmente la mezcla de la etapa I) durante 1 minuto a 8 horas;
 - III) ajustar el pH de la mezcla de la etapa I) o II) a pH de alrededor de 4, y repetir el ajuste de pH después de 2 a 3 horas;
 - IV) homogeneizar la mezcla de la etapa III) con un proceso de homogeneización convencional conocido por la persona experta en la técnica, seguido de calentamiento a 90°C durante 1 hora;
- 35 V) calentar el nanogel a una temperatura comprendida entre 70 y 95°C durante al menos 45 minutos;
 - VI) secar opcionalmente el nanogel resultante de la etapa V).

15

De acuerdo con la presente invención, las proteínas preferidas son proteínas vegetales tal como se describió anteriormente.

En una realización preferida, la concentración de proteína(s) vegetal(es) es de 4 a 6 g/l. La relación ponderal preferida de proteína a polisacárido es de 1:2 a 1:4, incluso más preferida es 1:3. La concentración de ingrediente activo hidrosoluble está preferiblemente entre 0,01 y 0,15 g/l, y el ingrediente activo hidrosoluble preferido es ácido fólico.

El ajuste del pH repetido a pH de alrededor de 4 en la etapa III) se puede realizar por cualquier ácido permitido en alimentos, y preferiblemente se utiliza ácido clorhídrico.

45 La homogeneización de la etapa IV) se puede realizar mediante cualquier procedimiento de homogeneización conocido por la persona experta en la técnica tal como ultrasonidos o la homogeneización a alta presión.

El tratamiento con ultrasonidos genera ondas alternantes de baja presión y alta presión en los líquidos, conduciendo a la formación y el colapso violento de pequeñas burbujas de vacío. Este fenómeno, denominado cavitación, provoca una alta velocidad de chorros de líquido incidentes y fuertes fuerzas de cizallamiento hidrodinámicas, combinadas con la compresión, la aceleración, la caída de presión y el impacto, provocando la desintegración de las partículas y la dispersión por todo el producto, así como la mezcladura de reactivos. (Encyclopedia of emulsion technology, 1983, Vol 1, P. Walstra, página 57, Comp. P. Becher, ISBN: 0-8247-1876-3).

5

10

15

20

40

En el caso del proceso de homogeneización a alta presión, la mezcla se hace pasar a través de un hueco en la válvula de homogeneización; esto crea condiciones de alta turbulencia y cizallamiento, en combinación con la compresión, la aceleración, la caída de presión y el impacto, provocando la desintegración de las partículas y la dispersión por todo el producto. El tamaño de las partículas depende de la presión de funcionamiento utilizada durante el procedimiento y el tipo de hueco seleccionado. (Food and Bio Process Engineering, Dairy Technology, 2002, H.G. Kessler, Comp. A. Kessler, ISBN 3-9802378-5-0).

La homogeneización más preferida para llevar a cabo la presente invención es la homogeneización a alta presión de acuerdo con (Donsi et al J. Agric. Food Chem., 2010, 58:10653-10660), a la vista de la eficiencia y el alto rendimiento de esta tecnología para producir nanoemulsiones. Más preferiblemente, se lleva a cabo a 500 a 700 bares durante al menos 1 minuto, incluso más preferiblemente a 600 bares durante al menos 2 minutos.

El nanogel de la etapa V) se puede utilizar como tal o se puede secar para su uso posterior. La etapa de secado puede llevarse a cabo con cualquier procedimiento de secado convencional conocido por la persona experta en la técnica, se prefiere el secado por pulverización y/o un proceso de captura de polvo en el que las gotitas de suspensión pulverizadas están atrapadas en un lecho de un adsorbente tal como almidón o silicato de calcio o ácido silícico o carbonato de calcio o mezclas de los mismos, y posteriormente se secan.

La presente invención también se refiere a un nanogel obtenible por un procedimiento tal como se describe anteriormente, y preferiblemente en el que la proteína vegetal es proteína de soja o guisante y el ingrediente activo soluble en agua es ácido fólico.

La presente invención también se dirige al uso de nanogeles tal como se describen anteriormente para el enriquecimiento y/o refuerzo de alimentos, bebidas, alimentos para animales y/o cosméticos, preferiblemente para el enriquecimiento, y/o el refuerzo de bebidas, incluso más preferiblemente bebidas de carácter ácido (pH 3 a 5).

Otros aspectos de la invención son alimentos, bebidas, alimentos para animales, cosméticos que contienen una composición tal como se ha descrito anteriormente.

Bebidas, en las que las formas del producto de la presente invención se pueden utilizar como un ingrediente aditivo pueden ser bebidas carbonatadas, p. ej., aguas seltzer saborizadas, bebidas no alcohólicas o bebidas minerales, así como bebidas no carbonatadas, p. ej., aguas saborizadas, zumos de frutas, ponches de frutas y formas concentradas de estas bebidas. Pueden estar basadas en zumos de frutas o vegetales naturales o en sabores artificiales. También se incluyen bebidas alcohólicas y los polvos para bebidas instantáneas. Además, también se incluyen bebidas que contienen azúcar, bebidas dietéticas con edulcorantes no calóricos y artificiales.

Además, productos lácteos, obtenidos de fuentes naturales o sintéticas, están dentro del alcance de los productos alimenticios, en donde las formas del producto de la presente invención se pueden utilizar como un ingrediente nutricional. Ejemplos típicos de tales productos son las bebidas de leche, helado, queso, yogur y similares. Productos sustitutivos de la leche tales como las bebidas de leche de soja y productos de tofu están comprendidos también dentro de esta gama de aplicaciones.

También se incluyen los dulces que contienen las formas de producto de la presente invención como un ingrediente aditivo, tal como productos de confitería, caramelos, gomas de mascar, postres, p. ej., helado, jaleas, pudines, polvos de pudín instantáneo y similares.

También se incluyen los cereales, aperitivos, galletas, pasta, sopas y salsas, mayonesa, aderezos para ensaladas y similares que contienen las formas del producto de la presente invención como un colorante o un ingrediente alimenticio. Por otra parte, también se incluyen las preparaciones de frutas utilizadas para productos lácteos y cereales.

La concentración final del uno o más ingredientes activos hidrosolubles, preferiblemente ácido fólico, que se añade a través de las composiciones de la presente invención a los productos alimenticios puede ser preferentemente de 0,1 a 50 ppm, particularmente de 1 a 30 ppm, más preferiblemente 3 a 20 ppm, p. ej., aproximadamente 6 ppm, basado en el peso total de la composición alimenticia y dependiendo del producto alimenticio particular a ser reforzado y el nivel de refuerzo deseado.

Las composiciones alimenticias de esta invención se obtienen preferiblemente mediante la adición a un producto alimenticio del ingrediente activo soluble en agua en forma de una composición de esta invención. Para el refuerzo de un producto alimenticio se puede utilizar una composición de esta invención de acuerdo con métodos conocidos per se para la aplicación de formas de producto sólido hidrodispersables.

En general, la composición se puede añadir ya sea como una disolución madre acuosa, una mezcla de polvo seco o una pre-mezcla con otros ingredientes alimenticios apropiados de acuerdo con la aplicación específica. La mezcladura debe realizarse, por ejemplo, utilizando un mezclador de polvo seco, un mezclador de bajo cizallamiento, un homogeneizador de alta presión o un mezclador de alto cizallamiento, dependiendo de la formulación de la aplicación final. Como resultará fácilmente evidente tales tecnicismos están dentro de la habilidad del experto.

La invención también se refiere a un procedimiento para la fabricación de una bebida, que comprende las etapas de homogeneizar la composición de acuerdo con la presente invención y mezclar 1 a 50 ppm, basado en el contenido de ingrediente activo hidrosoluble, preferiblemente 5 ppm de la emulsión con más ingredientes habituales de bebidas.

Además, la presente invención se refiere a bebidas que se pueden obtener mediante el procedimiento para la fabricación de una bebida tal como se describió anteriormente. Preferiblemente, la bebida tiene un pH comprendido entre 2 y 8, más preferiblemente entre 3 y 5,5.

Breve descripción de las figuras:

La <u>Figura 1</u> muestra espectros UV de proteína individual (Assp), polisacárido individual (SSP) y disoluciones de nanogel (NPS) complejo de proteína/polisacárido después de la ultrafiltración.

La <u>Figura 2</u> muestra espectros UV del ácido fólico liberado de nanogeles de ácido fólico/proteína/polisacárido, nanogeles de ácido fólico/polisacárido y nanogeles de ácido fólico/proteína a pH 7,4. El ácido fólico liberado fue aislado por ultrafiltración. Las disoluciones de ácido fólico preparadas a pH 7,4 se utilizaron directamente como controles.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes.

Ejemplos

40

45

5

Ejemplo 1: Interacción de ácido fólico con nanogel complejo de proteína de soja, polisacárido de soja o proteína de soja/polisacárido de soja a pH 7,4.

La proteína de soja es de Jilin Fuji Protein Co. Ltd. (Soyasour 4000K, proteína de soja soluble en ácido; ASSP) con contenido de proteína de 88% (base seca). Tiene un punto isoeléctrico de alrededor de pH 4,7. Polisacáridos de soja solubles (SSP) con 70 a 80% en peso de polisacáridos se obtuvieron de Fuji Co., Ltd.

Considerando la solubilidad del ácido fólico, se investigó la interacción a pH 7,4. La disolución de proteína individual, la disolución de polisacárido individual y la disolución de nanogel complejo de proteína/polisacárido se ajustaron primero a pH 7,4. A continuación, se añadió el ácido fólico, se disolvió en tampón fosfato 10 mM pH 7,4 y la mezcla se incubó con agitación a temperatura ambiente durante la noche. La concentración final de proteína en la mezcla era de 4 mg/ml y la concentración de polisacárido era de 12 mg/ml. El ácido fólico libre en la mezcla fue aislado mediante una membrana de ultrafiltración de flujo alto (peso molecular de corte de 3 kDa, MicroconYM-3, Millipore), y se recogió en el ultrafiltrado. Disolución de ácido fólico individual también se hizo pasar a través de la membrana de ultrafiltración; 97% del ácido fólico (Tabla 1) en el ultrafiltrado confirma la recuperación del ácido fólico. La proteína individual, el polisacárido individual y disoluciones de nanogel complejo de proteína/polisacárido también se

hicieron pasar a través de la membrana de ultrafiltración; sus espectros UV de los ultrafiltrados (Figura 1) muestran la absorbancia en la región UV, indicando pequeños péptidos en los ultrafiltrados. La concentración de FA en el ultrafiltrado se calculó restando la absorbancia a 280 nm tal como se muestra en la Figura 1 a partir de la absorbancia a 280 nm del ultrafiltrado. La Tabla 1 demuestra que aproximadamente el 10% del FA se une a la proteína o el nanogel; casi nada de ácido fólico se une al polisacárido a pH de 7,4.

5

15

20

25

35

40

Tabla 1. Concentración de ácido fólico (FA) libre en diferentes mezclas a pH 7,4. El ácido fólico libre en la mezcla se aisló mediante ultrafiltración.

Muestra	Muestra Concentración de FA en la C		FA recuperado en la	
	alimentación (mM)	ultrafiltración (mM)	ultrafiltración (%)	
Proteína + FA	0,25	0,215 ± 0,005	86 ± 2	
	0,5	0,435 ± 0,005	87 ± 2	
Polisacárido + FA	0,25	0,241 ± 0,01	96 ± 4	
	0,5	0,506 ± 0,01	101 ± 2	
Nanogel de	0,25	0,228 ± 0,005	89 ± 2	
proteína/polisacárido + FA	0,5	0,447 ± 0,01	89 ± 2	
FA	0,5	0,485 ± 0,01	97 ± 2	

Ejemplo 2: Interacción de ácido fólico con proteína de soja, polisacárido de soja o nanogel complejo de proteína de soja/polisacárido de soja a pH 4.

- Los nanogeles son relativamente hidrofóbicos a pH 4 caracterizados por fluorescencia de pireno, el ácido fólico es también un compuesto hidrofóbico a pH de 4. Por lo tanto, los nanogeles pueden unir ácido fólico a través de una interacción hidrofóbica. Considerando la solubilidad dependiente del pH, se añadió ácido fólico en una relación ponderal 1:3 de disolución de nanogel en 3 métodos diferentes de la siguiente manera.
 - (1) La relación ponderal 1:3 de disolución de nanogel se ajustó a pH 7,4 y después se añadió ácido fólico sólido para alcanzar la concentración final de ácido fólico 1 mM, la concentración de proteína de 4 mg/ml y la concentración de polisacárido 12 mg/ml. Después de agitar durante una noche para disolver el ácido fólico, la mezcla se cambió a pH 4.0.
 - (2) El ácido fólico se disolvió en tampón fosfato 10 mM pH 7,4. La disolución de ácido fólico se añadió gota a gota a la disolución de nanogel con pH 4,0 para alcanzar la concentración de ácido fólico 0,25, 0,5 ó 1 mM, seguido de agitación durante la noche. El pH de la mezcla era aproximadamente 4,0.
 - (3) El ácido fólico se disolvió en tampón fosfato 10 mM pH 7,4. La disolución de nanogel se ajustó a pH 7,4. La disolución de ácido fólico se mezcló con la disolución de nanogel para alcanzar la concentración de ácido fólico 0,1, 0,5 ó 1 mM, después de agitación durante la noche, el pH de la mezcla se ajustó a 4,0.
 - Precipitados amarillos de ácido fólico aparecieron a pH 4,0 después de un almacenamiento de corta duración para todas las mezclas anteriores. Los mismos precipitados amarillos también se observaron para las mezclas de ácido fólico con la proteína individual y el polisacárido individual. Para la proteína individual, el sobrenadante presenta un color amarillo, mientras que los otros son incoloros. Estos resultados indican que a pH de 4,0, la proteína puede unirse/estabilizar una parte del ácido fólico, el nanogel y el polisacárido de soja apenas pueden unirse/estabilizar el ácido fólico.

30 Ejemplo 3: Preparación de nanogel de ácido fólico/proteína de soja/polisacárido de soja

Debido a que la proteína de soja se puede unir a una parte de ácido fólico a pH 4, pero los nanogeles no pueden, se prepararon nanogeles de ácido fólico/proteína/polisacárido mezclando ácido fólico con la proteína y el polisacárido a un pH de 7,4, seguido de ajuste del pH, homogeneización a alta presión y calentamiento. A continuación se presentan detalles de la preparación: 7,88 g de disolución de polisacárido de soja con una concentración de 50 mg/ml se añadieron a 5 ml de agua, seguido de la adición de 6,25 ml de disolución de ácido fólico 1 mM pH 7,4 y 6.25 ml de disolución de proteína de soja con una concentración de 20 mg/ml bajo agitación. En la mezcla, la concentración de proteína final era de 5 mg/ml, la concentración de polisacárido era de 15 mg/ml, la concentración de ácido fólico era 0,25 mM y el volumen era 25 ml. El pH de la mezcla se ajustó a 4,0, después de agitación durante 3 h, el pH se ajustó a 4,0 de nuevo. La mezcla se homogeneizó mediante homogeneización a alta presión a 600 bares durante 2 min y luego se calentó a 90°C durante 1 h para obtener nanogeles de proteína de soja/polisacárido de soja encapsulado con ácido fólico. Proteína individual y polisacárido individual también se

utilizaron para preparar nanogeles de ácido fólico/proteína y nanogeles de ácido fólico/polisacárido utilizando este método.

La disolución de nanogel de ácido fólico/proteína/polisacárido resultante, la disolución de nanogel de ácido fólico/proteína y la disolución de nanogel de ácido fólico/polisacárido se cambiaron a pH 7,4 para liberar el ácido fólico de los nanogeles; el ácido fólico liberado fue aislado por ultrafiltración. La concentración de ácido fólico en el ultrafiltrado se midió como se describe anteriormente y las disoluciones de ácido fólico 0,25 y 0,5 mM preparadas a pH 7,4 se utilizaron directamente como controles. El resultado en la Figura 2 demuestra que los espectros de ácido fólico no cambian después de la mezcladura, el ajuste del pH, la homogeneización y el proceso de calentamiento. La intensidad disminuye para la mezcla que contiene proteína o nanogeles, en consonancia con el resultado de la unión de ácido fólico a pH de 7,4 (Tabla 1), es decir, alrededor de 10% de FA unido con la proteína y los nanogeles.

Ejemplo 4: Estabilidad de nanogeles de ácido fólico/proteína de soja/ polisacárido de soja

5

10

15

30

35

Se realizó una dispersión dinámica de la luz (DLS) para medir el tamaño de nanogeles de ácido fólico/proteína/polisacárido a pH 4,0. Los datos de la Tabla 2 demuestran que los nanogeles con la concentración de ácido fólico de 0,25 y 0,5 mM tienen un tamaño similar al de los nanogeles sin ácido fólico. Después de 1 mes de almacenamiento, las nanogeles no cambian su tamaño.

Tabla 2. Resultado de DLS de nanogeles de FA/proteína/polisacárido con concentración de ácido fólico (FA) de 0,25 y 0,5 mM. Los nanogeles de proteína/polisacárido se utilizaron como controles.

Muestra de nanogel	Concentración de FA en los	Tiempo de	D _h (nm)	PDI
	nanogeles (mM)	almacenamiento		
Proteína/polisacárido	0	Preparada reciente	178 ± 2	0,16 ± 0,01
FA/proteína/polisacárido	0,25		170 ± 4	$0,13 \pm 0,02$
FA/proteína/polisacárido	0,5		175 ± 1	$0,12 \pm 0,02$
Proteína/polisacárido	0	2 semanas	183 ± 1	$0,17 \pm 0,01$
FA/proteína/polisacárido	0,25		173 ± 2	$0,14 \pm 0,03$
FA/proteína/polisacárido	0,5		175 ± 1	$0,12 \pm 0,02$
Proteína/polisacárido	0	1 mes	181 ± 1	$0,14 \pm 0,01$
FA/proteína/polisacárido	0,25		181 ± 1	$0,17 \pm 0,01$
FA/proteína/polisacárido	0,5		177 ± 2	0,14 ± 0,01

Ejemplo 5: Protección de ácido fólico de la degradación UV en nanogeles de ácido fólico/proteína de soja/polisacárido de soja.

Tal como se mencionó anteriormente, el ácido fólico es sensible a la radiación UV. A causa del enfriamiento brusco de la fluorescencia intramolecular, el ácido fólico tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia extremadamente bajo, aproximativamente 0,005. Pterinas, que se forman después de la escisión del enlace C9-N10 en la molécula de ácido fólico, tiene un pico de fluorescencia incrementado de alrededor de 445 nm. El rendimiento cuántico de fluorescencia de 6-formil-pterina (FPT) es casi 0,1 y el de ácido pterina-6-carboxílico (PCA) es de aproximadamente 0,2. La fluorescencia en la región de 445 nm se incrementa con la formación de FPT como resultado de la escisión del enlace C9-N10, seguido de la conversión foto-inducida de FPT en PCA [M.K. Off et al, Journal of Photochemistry and Photobiology B:. Biology 80 (2005) 47-55].

En este estudio se investigó la degradación UV de ácido fólico. La disolución de nanogel de ácido fólico/proteína/polisacárido a pH 4,0 que contiene ácido fólico 0,25 ó 0,5 mM se colocó en un frasco de vidrio de 7 ml a una distancia de 30 cm de un radiómetro UV (500 w, pico λ = 365 nm) durante 1 h. También se investigó el ácido fólico individual disuelto en tampón fosfato 10 mM pH 7,4 con una concentración de FA de 0,25 ó 0,5 mM. También se investigó la mezcla de 5 mg/ml de proteína y ácido fólico 0,25 mM a pH 7,4, y la mezcla de 15 mg/ml de polisacárido y ácido fólico 0,25 mM a pH 7,4. Después de la radiación UV, la disolución de nanogel de ácido fólico/proteína/polisacárido se ajustó a pH 7,4 para liberar el ácido fólico. El ácido fólico liberado en la disolución se aisló mediante ultrafiltración y se analizó como se describe a continuación. Después de la dilución durante 10 y 20 veces de ácido fólico 0,25 y 0,5 mM, respectivamente, se midió la intensidad de fluorescencia a 450 nm del ultrafiltrado excitado a 348 nm. Todas las muestras para la investigación de la degradación del ácido fólico no contienen azida de sodio.

La Tabla 3 muestra la relación de intensidad de fluorescencia de ácido fólico antes y después de la radiación UV. Para la disolución de ácido fólico individual, después de la radiación UV, la intensidad de fluorescencia a 450 nm aumenta 89 y 85 veces cuando la concentración de ácido fólico era de 0,25 y 0,5 mM, respectivamente. El promedio de 87 veces del aumento de la intensidad de fluorescencia después de la radiación UV indica la degradación del ácido fólico en el interior del frasco de vidrio. El aumento de la concentración de ácido fólico de 0,25 a 0,5 mM no influye en la degradación de manera significativa. Aunque la proteína individual sólo se puede unir alrededor del 10% del ácido fólico y el polisacárido individual no se puede unir con ácido fólico a un pH de 7,4 (Tabla 1), el resultado en la Tabla 3 demuestra que la proteína individual y el polisacárido individual pueden reducir en gran medida la degradación de ácido fólico. En comparación con el ácido fólico individual, la degradación del ácido fólico se reduce a 30% y 22% en presencia de polisacárido y la proteína a pH 7,4, respectivamente. Nanogeles de ácido fólico/proteína/polisacárido pueden proteger eficazmente el ácido fólico de la degradación a pH 4.0; sólo el 12% del ácido fólico cargado se degradó después de la misma radiación UV. Los autores de la invención también investigaron los nanogeles de ácido fólico/proteína/polisacárido después de 1 mes de almacenamiento; la intensidad de fluorescencia del ácido fólico no cambia después de que el ácido fólico fue liberado y aislado, en comparación con los nanogeles de ácido fólico/proteína/polisacárido recién preparados. El ácido fólico liberado y aislado de los nanogeles de ácido fólico/proteína/polisacárido fue irradiado mediante la luz UV. Después de la misma radiación, la fluorescencia de ácido fólico cambió como la disolución de ácido fólico preparado a pH 7,4 directamente. Este resultado demuestra, además, que nanogeles de ácido fólico/proteína/polisacárido pueden proteger eficazmente el ácido fólico frente a la degradación por UV a pH 4,0.

10

15

30

35

40

Tabla 3. Grado de degradación del ácido fólico (FA) en diferentes muestras después de irradiación UV. El grado de degradación se obtuvo midiendo la intensidad a 450 nm de los espectros de emisión de fluorescencia de ácido fólico antes y después de la radiación UV. El ácido fólico fue liberado a pH 7,4 y fue aislado mediante ultrafiltración. La longitud de onda de excitación de fluorescencia era de 348 nm.

Muestra	Concentración FA en la alimentación	$I_{UV}/I^{1)}$	Grado de
	(mM) y radiación UV pH		degradación (%)
FA	0,25, pH 7,4	89 ± 3	100
FA	0,5, pH 7,4	85 ± 2	100
Polisacárido + FA	0,25, pH 7,4	27 ± 4	30 ± 5
Proteína+ FA	0,25, pH 7,4	20 ± 2	22 ± 3
Nanogeles de	0,25, pH 4,0	11 ± 1	12 ± 1
FA/proteína/polisacárido			
Nanogeles de	0,5, pH 4,0	9 ± 2	11 ± 2
FA/proteína/polisacárido			

¹⁾ La relación de intensidad de fluorescencia FA después de la radiación UV a la intensidad antes de la radiación UV.

25 **Ejemplo 6:** Preparación de nanogel de ácido fólico/proteína de guisante/polisacárido de soja y protección de ácido fólico de la degradación UV.

Proteína de guisante se disolvió en agua y el pH se ajustó a pH 3,25. Después del equilibrio durante la noche, la disolución se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos para separar la proteína sin resolver. El sobrenadante contenía 15 mg/ml de proteína de guisante. Nanogeles de ácido fólico/proteína de guisante/polisacárido de soja se prepararon mezclando disolución de polisacárido de soja con disolución de ácido fólico y disolución de proteína de guisante a pH 7,4 con agitación. En la mezcla, la concentración final de proteínas de guisante era de 5 mg/ml, concentración de polisacárido de 15 mg/ml, concentración de ácido fólico 0,25 mM y el volumen era de 25 ml. El pH de la mezcla se ajustó a 4,0, después de 3 h de agitación, el pH se ajustó a 4,0 de nuevo. La mezcla se homogeneizó mediante homogeneización a alta presión a 600 bares durante 2 min y luego se calentó a 90°C durante 1 h para obtener nanogeles de proteína de guisante encapsulada con ácido fólico/polisacárido de soja. Los nanogeles resultantes tienen un tamaño de 203 nm y PDI 0.23 (Tabla 5).

Se investigó la degradación UV de ácido fólico. En comparación con el ácido fólico individual, la degradación del ácido fólico se reduce a 19% en presencia de proteína de guisante (Tabla 4). Nanogeles de ácido fólico/proteína de guisante/polisacárido pueden proteger eficazmente el ácido fólico de la degradación a pH 4,0; sólo el 13% del ácido fólico cargado se degrada después de la misma radiación UV.

Tabla 4. Grado degradación del ácido fólico (FA) en diferentes muestras después de la radiación UV. El grado de degradación se obtuvo midiendo 450 nm intensidad de los espectros de emisión de fluorescencia de ácido fólico antes y después de la radiación UV. El ácido fólico fue liberado a pH 7,4 y se aisló a través de ultrafiltración. La longitud de onda de excitación de fluorescencia era 348 nm.

Muestra	Concentración de FA en la alimentación	$I_{UV}/I^{1)}$	Grado de
	(mM) y radiación UV pH		degradación (%)
FA	0,25, pH 7,4	91	100
Nanogeles de FA/proteína de guisante	0,25, pH 4,0	17,5	19
Nanogeles de FA/proteína de guisante/polisacárido	0,25, pH 4,0	11,5	13

¹⁾La relación de intensidad de fluorescencia FA después de la radiación UV a la intensidad antes de la radiación UV.

Ejemplo 7: Estabilidad de disolución de nanogel de ácido fólico/proteína de guisante/polisacárido de soja y disolución de nanogel de ácido fólico/proteína de soja/polisacárido de soja a pH de 3.0, 3.5 y 4.0, y capacidad de redispersión de las nanogeles después de liofilización.

Disolución de nanogel de ácido fólico/proteína de guisante/polisacárido de soja y disolución de nanogel de ácido fólico/proteína de soja/polisacárido preparadas a pH 4,0 se cambiaron a pH de 3,5 y 3,0, por separado, para investigar la estabilidad. Los datos de la Tabla 5 demuestran que los tamaños de nanogel no cambian después de una semana de almacenamiento en medios a pH 3 y 3,5, indicando que los nanogeles son estables en condiciones de pH de bebidas. Además, los nanogeles se congelaron en seco y luego volvieron a dispersarse en agua. Después de la re-dispersión, los tamaños de nanogel no cambian significativamente, sugiriendo que los nanogeles pueden almacenarse y utilizarse en forma de polvo seco.

Tabla 5. Resultados de DLS de nanogeles de ácido fólico/proteína de guisante/polisacárido de soja y nanogeles de ácido fólico/proteína de soja/polisacárido de soja en medios a pH de 3,0, 3,5 y 4,0, y re-dispersión después de liofilización en medio a pH 4.0. La concentración de ácido fólico era de 0,25 mM.

Muestra		pH disolución	Dh (nm)	PDI
Recién preparada	FA/proteína de soja/polisacárido	4,0	170	0,11
		3,5	173	0,15
		3,0	177	0,16
	FA/proteína de	4,0	203	0,23
	guisante/polisacárido	3,5	204	0,19
		3,0	207	0,19
Después de una semana de	FA/proteína de soja/polisacárido	4,0	174	0,15
almacenamiento		3,5	172	0,21
		3,0	174	0,18
	FA/proteína de	4,0	204	0,23
	guisante/polisacárido	3,5	202	0,23
		3,0	201	0,20
Después de liofilización y re-dispersión	FA/proteína de soja/polisacárido	4,0	186	0,18
	FA/proteína de guisante/polisacárido	4,0	206	0,16

REIVINDICACIONES

- 1. Una composición de nanogel, que comprende:
- a) 0,1 a 5% en peso, basado en el peso seco de la composición, de al menos un ingrediente activo hidrosoluble seleccionado de ácido ascórbico, biotina, ácido fólico, ácido nicotínico, tiamina y vitamina B6;
- 5 b) 9 a 40% en peso, basado en el peso seco de la composición, de una o más proteínas vegetales elegidas del grupo de las proteínas adecuadas para la aplicación a alimentos; y
 - c) 50 a 90% en peso, basado en el peso seco de la composición, de uno o más polisacáridos de soja solubles; en donde la relación ponderal de proteína(s) a polisacárido(s), basada en la composición de materia seca, se elige como 1: b, con la condición de que b esté comprendido entre 1 y 6.
- 2. Composición de nanogel de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ingrediente activo hidrosoluble es ácido fólico.
 - 3. Composición de nanogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la una o más proteínas vegetales se seleccionan del grupo que consiste en proteína de soja, proteína de altramuz, proteína de guisante y proteína de patata.
- 4. Composición de nanogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la una o más proteínas vegetales son proteína de soja y/o guisante.
 - 5. Composición de nanogel de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el tamaño medio de partícula está entre 120 y 250 nm, según se mide por dispersión dinámica de la luz.
- 6. Procedimiento para la fabricación de un nanogel estable que contiene al menos un ingrediente activo hidrosoluble seleccionado de ácido ascórbico, biotina, ácido fólico, ácido nicotínico, tiamina y vitamina B6; que comprende las siguientes etapas:
 - mezclar en agua uno o más polisacáridos de soja solubles en forma de una disolución a un pH de alrededor de 7,4 con una disolución de al menos un ingrediente activo hidrosoluble seleccionado de ácido ascórbico, biotina, ácido fólico, ácido nicotínico, tiamina y vitamina B6, y una disolución de proteína vegetal, en donde la concentración de la proteína de soja es de 1 a 10 g/l, la relación ponderal de proteína a polisacárido es de 1:1 a 1:6 y la concentración de ingrediente activo hidrosoluble es de entre 0.001 y 0.2 g/l.
 - II) agitar opcionalmente la mezcla de la etapa I) durante 1 minuto a 8 horas;
 - III) ajustar el pH de la mezcla de la etapa I) o II) a pH de alrededor de 4, y repetir el ajuste de pH después de 2 a 3 horas:
- 30 IV) homogeneizar la mezcla de la etapa III) con un proceso de homogeneización convencional conocido por la persona experta en la técnica, seguido de calentamiento a 90°C durante 1 hora;
 - V) calentar el nanogel a una temperatura comprendida entre 70 y 95°C durante al menos 45 minutos;
 - VI) secar opcionalmente el nanogel resultante de la etapa V).

25

- 7. Procedimiento para la fabricación de un nanogel estable de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la concentración de la proteína vegetal es de 4 a 6 g/l.
 - 8. Procedimiento para la fabricación de un nanogel estable de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en el que la relación ponderal de proteína a polisacárido es de 1:2 a 1:4.
 - 9. Procedimiento para la fabricación de un nanogel estable de acuerdo con la reivindicación 6 a 8, en el que la concentración de ingrediente activo está entre 0,01 y 0,15 g/l.
- 40 10. Un nanogel, obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
 - 11. Un nanogel de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la proteína vegetal es proteína de soja y el ingrediente activo es ácido fólico.
 - 12. Uso de un nanogel según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para el enriquecimiento y/o refuerzo de alimentos, bebidas, alimentos para animales y composiciones cosméticas.

ES 2 596 284 T3

- 13. Procedimiento para la fabricación de una bebida, que comprende la etapa de mezclar una composición de nanogel de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con ingredientes habituales de bebidas adicionales.
- 14. Bebida, obtenible mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13.
- 5 15. Bebida de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el pH de la bebida está entre 3 y 5,5.

Figura 1

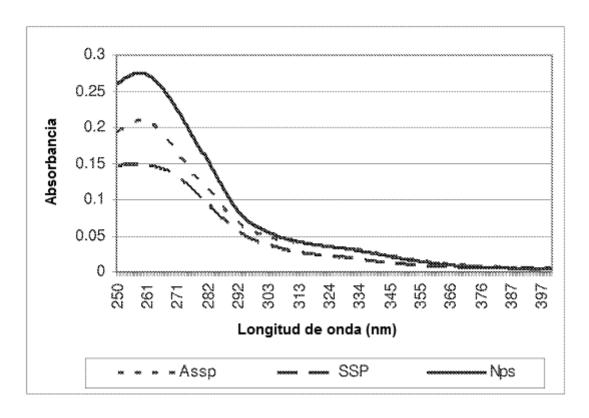
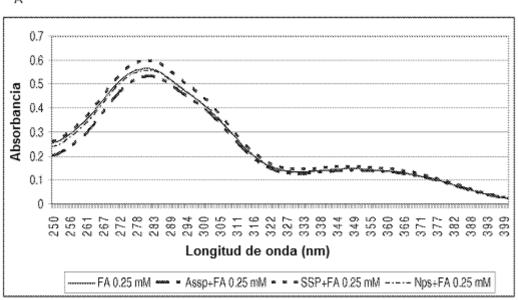


Figura 2

Α



В

