

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 202**

21 Número de solicitud: 201631590

51 Int. Cl.:

**A23L 23/10** (2006.01)

**A23L 3/46** (2006.01)

**A23L 33/115** (2006.01)

**B01J 13/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**15.12.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**25.01.2017**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)  
Vicerrectorado de Investigación, Transferencia e  
Innovación. Avda. de Elvas, s/n  
06006 Badajoz ES**

72 Inventor/es:

**PÉREZ PALACIOS, Trinidad;  
JIMÉNEZ MARTÍN, Estefanía;  
RUÍZ CARRASCAL, Jorge y  
ANTEQUERA ROJAS, Teresa**

54 Título: **EMULSIÓN Y MICROCÁPSULAS DE ACEITE DE PESCADO, PROCEDIMIENTO DE  
OBTENCIÓN DE LAS MISMAS Y COMPOSICIÓN ALIMENTARIA QUE LAS CONTIENE**

57 Resumen:

La presente invención se encuadra dentro del sector agroalimentario y más particularmente dentro del sector de la industria cárnica. En concreto la invención se refiere a emulsiones y microcápsulas de aceite de pescado, rico en ácidos grasos omega-3 y a su empleo en la elaboración de composiciones alimentarias como productos cárnicos u otros alimentos sólidos que presenten propiedades nutricionales mejoradas.

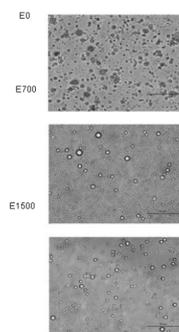


Figura 3

**EMULSIÓN Y MICROCÁPSULAS DE ACEITE DE PESCADO, PROCEDIMIENTO DE  
OBTENCIÓN DE LAS MISMAS Y COMPOSICIÓN ALIMENTARIA QUE LAS CONTIENE**

**DESCRIPCIÓN**

5

**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuadra dentro del sector agroalimentario. En concreto la invención se refiere a emulsiones y microcápsulas de aceite de pescado, rico en ácidos grasos omega-3 y a su empleo en la elaboración de composiciones alimentarias como productos cárnicos u otros alimentos sólidos que presenten propiedades nutricionales mejoradas.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-3 ( $\omega$ -3) de cadena larga como los, ácidos eicosapentaenoico (EPA C20:5  $\omega$ -3) y docosahexaenoico (DHA C22:6  $\omega$ -3), tienen propiedades bioactivas y efectos beneficiosos para la salud humana. La ingesta de alimentos con alto contenido de EPA y DHA, como el salmón, la sardina, el atún o la caballa no es lo suficientemente elevada para alcanzar la dosis diaria de EPA y DHA recomendada para obtener dichos beneficios.

Por esta razón, hay un interés creciente en distintos sectores, (industria alimentaria, consumidores, industria farmacéutica), en el desarrollo de alimentos funcionales y suplementos como fuente de EPA y DHA. Los procedimientos utilizados para incorporar AGPI  $\omega$ -3 a los alimentos son variados, desde la suplementación a través de la alimentación animal en el caso de alimentos como carne o productos cárnicos y huevos, hasta la adición directa de vegetales y aceites a distintos alimentos o bien la incorporación de estos últimos en forma de pre-emulsión. El enriquecimiento en AGPI  $\omega$ -3 mediante estas estrategias da lugar a alimentos más susceptibles a la oxidación, en los que se desarrollan aromas desagradables que producirían un rechazo por parte de los consumidores.

Una estrategia posible para proteger los ácidos grasos  $\omega$ -3 frente a la oxidación es la microencapsulación de éstos, limitando así el contacto del sustrato fácilmente oxidable con el agua, O<sub>2</sub>, catalizadores metálicos como el Fe<sup>3+</sup> y otros catalizadores de la oxidación, “envolviendo” los ingredientes funcionales en una matriz que actúa como estructura protectora.

Una de las técnicas de microencapsulación de ingredientes alimentarios más popular en cuanto a su uso industrial es la atomización mediante secado por aspersion o “spray-drying”.

5 Por ejemplo la solicitud de patente WO2016133410 se refiere a un procedimiento de microencapsulación de EPA y DHA con origen en aceite de pescado, comprendiendo dicho procedimiento formar una emulsión acuosa estable de aceite con una mezcla de emulsionantes; y secar la emulsión formada, por atomización y pulverización, a fin de producir microcápsulas estables con un tamaño de partícula pequeño.

10

Los emulsificantes más comunes utilizados en la industria alimentaria son proteínas, polisacáridos, fosfolípidos y pequeñas moléculas que actúan como surfactantes. En cuanto a materiales de pared para la microencapsulación, los polisacáridos y las proteínas son los más utilizados, seguidos por lípidos y ceras, así como combinaciones de todos ellos.

15

Entre las proteínas comúnmente empleadas como material de pared se encuentran las caseínas, siendo el caseinato sódico la caseína soluble en agua más utilizada. Por ejemplo la patente con número de publicación US6234464 describe el microencapsulado de ácidos grasos insaturados. Las paredes de las cápsulas tiene dos capas, la capa interna está  
20 compuesta de gelatina, caseína o un alginato y la capa exterior se compone de gelatina, goma arábiga, pectina o quitosano.

25

En cuanto a la microencapsulación de AGPI  $\omega$ -3, la mayoría de los estudios se centran en el estudio de las características de las microcápsulas, mientras que su uso para el  
enriquecimiento de alimentos con AGPI  $\omega$ -3 ha sido poco probado.

30

A la vista de lo expuesto anteriormente, es evidente que sigue existiendo la necesidad de optimizar el proceso de emulsificación para la elaboración de microcápsulas de aceite de pescado rico en ácidos grasos  $\omega$ -3 mediante spray-drying, para conseguir una idónea  
vehiculación de estos compuesto bioactivos a matrices alimentarias y desarrollar productos  
35 más saludables, tecnológicamente viables, estables y con características de calidad semejantes a los productos no enriquecidos.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

35

En este sentido los inventores han desarrollado un procedimiento para elaborar microcápsulas de aceite de pescado rico en ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga a partir de

emulsiones multicapa homogenizadas de aceite de pescado empleando lecitina, quitosano y maltodextrina, para el enriquecimiento en ácidos grasos  $\omega$ -3 de composiciones alimentarias.

5 La microencapsulación de AGPI  $\omega$  -3 mediante spray-drying a partir de una emulsión simple o monocapa comienza con la producción de una emulsión de aceite en agua en la que el material de pared está disuelto en el agua.

10 Para incrementar la protección de los ácidos grasos  $\omega$  -3 se han desarrollado emulsiones multicapa. En estas emulsiones las gotas lipídicas están rodeadas por dos capas de material de cobertura con cargas eléctricas opuestas. Un ejemplo de emulsiones multicapa podría ser el empleo de lecitina, polielectrolito con carga negativa, para la primera capa, y para la segunda el empleo de quitosano.

15 Por lo tanto un aspecto de la invención se refiere a emulsiones multicapa que comprenden aceite de pescado, como fuente de ácidos grasos  $\omega$ -3 como elemento encapsulado, y lecitina, quitosano y maltodextrina, como materiales de encapsulación. Igualmente es un aspecto de la invención las microcápsulas que comprenden aceite de pescado, como fuente de ácidos grasos  $\omega$ -3 como elemento encapsulado, y lecitina, quitosano y maltodextrina, como materiales de encapsulación.

20 Tanto en las emulsiones como en las microcápsulas, el quitosano previene el contacto entre las capas de lecitina de las distintas gotas, y aumenta las fuerzas electrostáticas de repulsión y la viscosidad, lo que da lugar a una disminución en la movilidad de las gotas de la emulsión, evitando su agregación y manteniendo así la estabilidad. Además, la maltodextrina, utilizada como material de recubrimiento en las emulsiones múltiples, es un polisacárido que tiene capacidad para formar emulsiones estables.

25 El procedimiento para obtener las emulsiones de la invención comprende en primer lugar, la elaboración de las emulsiones multicapa sometidas a un proceso de homogeneización. Se emplea como fuente de ácidos grasos  $\omega$ -3 aceite de pescado (material a encapsular) y lecitina-quitosano y maltodextrina como material encapsulante. Se parte de 3 disoluciones: 30 A: aceite de pescado y lecitina, B: quitosano y ácido acético y C: maltodextrina y agua. La cantidad relativa de estas disoluciones puede variar entre amplios márgenes, dependiendo en parte de la necesidad de obtener mayor o menor cantidad de emulsión y sus correspondientes microcápsulas. Se comienza preparando la emulsión primaria, añadiendo 35 a la disolución A ácido acético en agitación continua hasta formar una emulsión. Esta emulsión primaria se homogeniza, empleando para ello un homogeneizador de uso alimentario. A partir de la emulsión primaria homogeneizada se prepara la emulsión

secundaria. Para ello, se añadirá la disolución B sobre la emulsión primaria, manteniéndose en agitación hasta obtener una emulsión homogénea. Finalmente, se añade la disolución C sobre la emulsión secundaria, manteniéndose en agitación hasta obtener una emulsión homogénea, que será la emulsión final.

5

Por lo tanto, el procedimiento para obtener las emulsiones de la invención comprende las etapas de:

- a) preparación de una disolución de aceite de pescado en lecitina;
- b) preparación de una disolución de quitosano en ácido acético;
- 10 c) preparación de una disolución de maltodextrina en agua;
- d) preparación de la emulsión por adición de ácido acético a la disolución de la etapa a) y homogenización de dicha mezcla; adición de la disolución de la etapa b) y homogenización de la mezcla; y adición de la disolución de la etapa c) y homogenización de la mezcla.

15 Para la fabricación de las microcápsulas se empleará un sistema de secado por atomización (equipo spray-dryer). La emulsión final es aspirada hasta el atomizador, donde se produce su atomización/pulverización para pasar como micro gotas a la torre de desecación. Allí se produce su deshidratación y se forman las microcápsulas (polvo).

20 Finalmente, las microcápsulas son separadas mediante un ciclón y recogidas en el vaso colector.

Por lo tanto el procedimiento para obtener las microcápsulas de la invención comprende las etapas de:

- 25 a) preparación de una disolución de aceite de pescado en lecitina;
- b) preparación de una disolución de quitosano en ácido acético;
- c) preparación de una disolución de maltodextrina en agua;
- d) preparación de la emulsión por adición de ácido acético a la disolución de la etapa a) y homogenización de dicha mezcla; adición de la disolución de la etapa b) y homogenización
- 30 de la mezcla; y adición de la disolución de la etapa c) y homogenización de la mezcla;
- e) spray-drying de las emulsiones resultantes de la etapa (d).

Igualmente la invención se refiere a las emulsiones y a las microcápsulas obtenidas por los procedimientos antes descritos y en sus realizaciones preferentes y particulares.

35

Las microcápsulas de la invención elaboradas a partir de las emulsiones desarrolladas han demostrado su eficacia como método de enriquecimiento de ácidos grasos  $\omega$ -3 en

composiciones alimentarias, mejorando su perfil lipídico y sin afectar la estabilidad oxidativa ni las características sensoriales de los mismos. Por lo tanto un último aspecto de la invención se refiere a una composición alimentaria que comprende las microcápsulas de la invención.

5

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 muestra una gráfica del Creaming index (CI) (%) de emulsiones monocapa (MoE) y multicapa con 0,5 y 1 % de quitosano (MuE1 y MuE2, respectivamente).

10

La Figura 2 muestra una gráfica del Creaming index (CI) (%) de emulsiones no homogenizadas (E0) y homogenizadas a 700 y 1500 Ba (E700 y E1500, respectivamente).

15

La Figura 3 muestra imágenes de microscopía óptica de emulsiones finales no homogenizadas (E0) y homogenizadas a 700 y 1500 Ba (E700 y E1500, respectivamente).

20

La Figura 4 muestra el nivel de oxidación lipídica en nuggets y hamburguesas no enriquecidos (columna en blanco) y enriquecidos en ácidos grasos  $\omega$ -3 mediante microcápsulas de aceite de pescado (columna rallada) y adición directa de aceite de pescado (columna negra).

25

La Figura 5 muestra los resultados del análisis sensorial de nuggets no enriquecidos (línea continua) y enriquecidos en ácidos grasos  $\omega$ -3 mediante microcápsulas de aceite de pescado (línea discontinua) y adición directa de aceite de pescado (línea trazo largo- trazo corto). Las características que se analizan son: a) apariencia oleosa, b) intensidad de olor, c) olor a frito, d) olor a pescado, e) olor a rancio, f) jugosidad, g) intensidad de flavor, h) flavor a carne, i) flavor a aceite, j) flavor a especies, k) flavor a rancio y l) flavor a pescado.

30

La Figura 6 muestra los resultados del análisis sensorial de hamburguesas no enriquecidas (línea continua) y enriquecidas en ácidos grasos  $\omega$ -3 mediante microcápsulas de aceite de pescado (línea discontinua) y adición directa de aceite de pescado (línea trazo largo- trazo corto). Las características que se analizan son: a) apariencia oleosa, b) intensidad de olor, c) olor a pescado, d) olor a cocido, e) jugosidad, f) dureza, g) sabor salado, h) intensidad de flavor, i) flavor a pescado, j) flavor a cocido, k) intensidad de flavor.

35

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las emulsiones y las microcápsulas de la invención de manera preferente como material encapsulado presentan aceite de pescado.

5

De manera particular las cantidades utilizadas en las emulsiones y microcápsulas de la invención son: aceite de pescado 20g, lecitina en concreto lecitina de soja 6g, quitosano 2g, maltodextrina 120g.

10 Como se ha dicho, el procedimiento para obtener las emulsiones de la invención comprende las etapas de:

a) preparación de una disolución de aceite de pescado en lecitina;

b) preparación de una disolución de quitosano en ácido acético;

c) preparación de una disolución de maltodextrina en agua;

15 d) preparación de la emulsión por adición de ácido acético a la disolución de la etapa a) y homogenización de dicha mezcla; adición de la disolución de la etapa b) y homogenización de la mezcla; y adición de la disolución de la etapa c) y homogenización de la mezcla.

La homogenización de las emulsiones y la presión de homogeneización empleada también  
20 afectan a las características de calidad y estabilidad oxidativa de las emulsiones y sus correspondientes microcápsulas. La homogenización en un rango comprendido entre 1300 Ba y 1700Ba incrementa la homogeneidad y estabilidad de las emulsiones, mejorando la morfología de las gotas de aceite y favoreciendo la eficiencia y estabilidad oxidativa de las microcápsulas durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Además, las emulsiones  
25 homogenizadas en dicho rango de presión muestran una mayor estabilidad y dan lugar a microcápsulas con mayor eficiencia y estabilidad oxidativa.

Por lo tanto, de manera preferente en el procedimiento de la invención las homogenizaciones de la etapa d) se realizan en un rango de presiones comprendido entre  
30 1300 Ba y 1700Ba. A dicha presión las microcápsulas obtenidas son más regulares, mayor número de menor tamaño y mayor eficacia de encapsulamiento.

La presencia y concentración de quitosano influyen sobre las características de calidad y estabilidad oxidativa de las emulsiones y sus correspondientes microcápsulas. De manera  
35 preferente la concentración de quitosano se encuentra comprendida entre un 0,8% y un 1,2%. La adición de quitosano en dicho rango incrementa la estabilidad de las emulsiones

así como la eficiencia de la microencapsulación y ejerce un efecto protector frente a la oxidación lipídica durante el almacenamiento a temperaturas moderadas.

5 Además, la combinación de lecitina-quitosano en dicho rango produciría un incremento del grosor de las capas que rodean las gotas de aceite, permitiendo mantener la estructura de la emulsión estable. Esto a su vez evita pérdidas de aceite y previene el contacto con agentes prooxidantes, mejorando la eficiencia de la microencapsulación y su estabilidad oxidativa.

10 La viabilidad de adicionar las microcápsulas de aceite de pescado rico en ácidos grasos  $\omega$ -3 elaboradas mediante el procedimiento de la invención en productos cárnicos también ha sido demostrada.

15 El enriquecimiento de nuggets y hamburguesas con microcápsulas de aceite de pescado rico en ácidos grasos  $\omega$ -3 supone un aumento en las cantidades de EPA y DHA, mientras que la estabilidad oxidativa y las características sensoriales de estos productos no se ven comprometidas. Así, se han observado cantidades superiores de EPA y DHA en nuggets y hamburguesas enriquecidos con microcápsulas que en los enriquecidos mediante adición directa de aceite de pescado y que en un grupo control sin enriquecer. Esto demuestra que el enriquecimiento con microcápsulas de aceite de pescado fue efectivo.

20 Por lo tanto de manera particular la composición alimentaria es un producto cárnico que comprende las microcápsulas de la invención.

25 Ejemplo 1. Evaluación del efecto de la adición de quitosano y de su concentración en la elaboración de emulsiones multicapa sobre las características de las mismas y de sus correspondientes microcápsulas

30 Se prepararon dos tipos diferentes de emulsiones de aceite de pescado: emulsión monocapa (con lecitina como emulsificante y maltodextrina como material de pared) y emulsión multicapa (con lecitina-quitosano como emulsificante y maltodextrina como material de pared).

35 Se comienza preparando la emulsión primaria, añadiendo a la disolución A (20g aceite de pescado y 6g lecitina de soja), ácido acético 1 % hasta un peso total de 200 g y homogenizando (20000 rpm, 10 min) en un Ultraturrax. A partir de esta emulsión primaria se prepararon tres tipos de emulsiones secundarias: una monocapa y dos multicapa.

La emulsión secundaria monocapa se preparó mezclando la emulsión primaria con 200 g de ácido acético (1%). En el caso de las emulsiones multicapa secundarias, se mezcló la emulsión primaria con 200 g de disolución B, preparada con quitosano en ácido acético (1 %), probándose dos concentraciones de quitosano, 0,5 y 1 %. Esto dio lugar a dos tipos de emulsiones multicapa secundarias.

Cada emulsión secundaria fue mezclada con 400 g de la disolución C (solución de maltodextrina al 30 % en ácido acético (1%)), para obtener las correspondientes emulsiones finales: una monocapa (Mo) y dos multicapa con diferente concentración de quitosano, 0,5 % (MuE1) y 1 % (MuE2).

A partir de las emulsiones finales se elaboraron las correspondientes microcápsulas: monocapa (MoM), multicapa con 0,5% de quitosano (MuM1) y multicapa con 1% de quitosano (MuM2). Para ello se utilizó un equipo de spray-dryer (Mini spraydryer B-290, Buchi, Switzerland). Las emulsiones se mantuvieron en agitación constante y a temperatura ambiente durante el proceso de spray-drying. El ratio de aspiración se ajustó al 80% y el ratio de alimentación fue de 1L/h, con una temperatura interna de 180 °C y externa entre 85-90 °C. Las microcápsulas formadas (polvo) se recogieron en contenedores de plástico.

Los tres tipos de emulsiones y microcápsulas elaboradas fueron analizados para evaluar el efecto de la adición de quitosano y de su concentración sobre sus características de calidad y la estabilidad oxidativa.

#### Determinación del Creaming Index en las emulsiones

La estabilidad de las emulsiones se determinó mediante el método del Creaming Index (CI) (Surh, J. et al. 2006. Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 20, 607-618). Para ello se utilizaron tubos de 10 cm, que se llenaron con las diferentes emulsiones, manteniéndose durante una semana a temperatura ambiente (20°C ± 2). Diariamente se realizaron, con una regla, las siguientes mediciones: altura de la fracción inferior (HC) y altura total de la emulsión (HE). El cálculo de CI se realiza aplicando la fórmula:  $CI = (HE - HC / HE) * 100$ . Los resultados obtenidos se exponen en la figura 1.

Los resultados obtenidos muestran que las emulsiones preparadas con lecitina-quitosano (con 1% de quitosano) son más estables (menor creaming index).

Eficiencia de la microencapsulación cápsulas

La eficiencia de microencapsulación se determina en función de la cantidad de aceite encapsulado con respecto al contenido total de aceite en las microcápsulas. Para ello, se necesita determinar la cantidad de aceite total y aceite externo de las microcápsulas, y se calcula la eficiencia mediante la siguiente fórmula propuesta por (Dobarganes, M.C.et al. 2006. Heterogeneous aspects of lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1722–1729): Eficiencia (%) = ((aceite total – aceite externo)/ (aceite total))\*100.

Se considera aceite total a la suma del aceite externo más el encapsulado. Para esta determinación se siguió el procedimiento descrito por (Sankarikutty, B. 1988. Studies on microencapsulation of cardamom oil by spray drying technique. *Journal of Food Science and Technology*, 25, 352-356), empleando HCl 1N y éter de petróleo. La grasa total se calculó gravimétricamente.

El aceite externo en las microcápsulas es aquel que se encuentra en su superficie y que puede ser extraído con un solvente orgánico. Para la determinación del aceite externo de las microcápsulas se siguió el protocolo establecido por (Richardson, G.H. 1985. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Publ. *Health Assoc*, Washington, DC) empleando éter de petróleo. De nuevo, el porcentaje de aceite externo se calculó gravimétricamente.

Los resultados de la eficiencia de la microencapsulación se exponen en la tabla 1

**Tabla 1. Eficiencia de las microcápsulas elaboradas a partir de emulsiones monocapa (MoM) y multicapa con 0,5 y 1 % de quitosano (MuM1y MuM2, respectivamente)**

Emulsiones	MoM	MuM1	MuM2
Eficiencia (%)	52.03	45.72	61.90

Los resultados obtenidos muestran que las emulsiones preparadas con lecitina-quitosano (con 1% de quitosano) son más estables (menor creaming index) (ver Figura 1) y dan lugar a microcápsulas con mayor cantidad de aceite de pescado encapsulado (mayor eficiencia de la microencapsulación)) (ver Tabla 1) en comparación las emulsiones preparadas sin quitosano o con quitosano al 0.5%.

EJEMPLO 2: Evaluación del efecto de las condiciones de homogenización sobre las características y estabilidad oxidativa de las emulsiones y de sus correspondientes microcápsulas

5 Se prepararon tres emulsiones multicapa con 1% de quitosano (ver ejemplo 1), dos de ellas homogenizadas a dos presiones diferentes: 700 Ba (E700) y 1500 Ba (E1500) en un homogeneizador (SPX APV-2000a), y otra sin homogeneizar (E0), que es considerada como control. De cada tipo de emulsión se elaboraron las correspondientes microcápsulas (M0, M700 y M1500) mediante spray-drying (ver ejemplo 1).

10

Los tres tipos de emulsiones y microcápsulas elaboradas fueron analizadas para evaluar el efecto de las condiciones de homogenización sobre sus características de calidad y la estabilidad oxidativa.

15 Determinación del Creaming Index en las emulsiones.

Esta determinación se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento especificado en el Ejemplo 1 y los resultados se exponen en la figura 2. Las emulsiones homogenizadas a 1500 Ba muestran una mayor estabilidad (menor creaming index).

20 Análisis microscópico de las emulsiones.

Se realizó un estudio visual mediante un microscopio óptico Eclipse-E200 equipado con una cámara digital DS-Fi2 con resolución 5,24 megapixels (21fps) y con el programa Nis, que permite realizar mediciones y almacenar las fotografías realizadas. Las imágenes obtenidas de las emulsiones se muestran en la figura 3. En las imágenes de microscopía óptica puede apreciarse una mayor cantidad de agregados y menor homogeneidad en cuanto al tamaño de las gotas en las emulsiones no homogeneizadas que en las homogeneizadas. También puede observarse que las emulsiones homogeneizadas a 1500 Ba presentan un mayor número de gotas de menor diámetro y con una pared más regular que las homogeneizadas a 700 Ba.

30

Eficiencia de la microencapsulación.

Esta determinación se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento especificado en el Ejemplo 1 y los resultados se exponen en la tabla 2

35 **Tabla 2. Eficiencia de las microcápsulas elaboradas a partir de emulsiones no homogenizadas (M0) y homogenizadas a 700 y 1500 Ba (M700 y M1500, respectivamente)**

Emulsiones	M0	M700	Mu1500
Eficiencia (%)	15.91	53.29	64.58

### Ensayo de oxidación

5 Las microcápsulas elaboradas a partir de las emulsiones sin homogenizar y homogenizadas a 700 y 1500 Ba se sometieron a un ensayo de oxidación para evaluar su estabilidad a lo largo del tiempo. Se tomaron dos alícuotas de cada tipo de microcápsulas, una de ellas se almacenó a -80°C el mismo día que se tomó (t0), que sería el grupo control, y la otra se mantuvo en un envase hermético a temperatura ambiente (20±2 °C) durante 30 días (t30).  
 10 En estas microcápsulas se llevó a cabo la determinación del índice de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) (Hu, Z., & Zhong, Q. 2010. Determination of thiobarbituric acid reactive substances in microencapsulated products. *Food Chemistry*, 123, 794-799) con algunas modificaciones (Díaz, P. et al. 2014, TBARs distillation method: Revision to minimize the interference from yellow pigments in meat products. *Meat Science*, 98, 569-573), empleando 1-butanol:isopropanol:HCl 0,5 M (2:2:1, v/v/v) (TSM), una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,8% en agua para la preparación de las muestras.

También se realizó una curva de calibración de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) (0,2-20 µM). La absorbancia de las muestras y de los puntos de la curva se midió a 532 nm en un espectrofotómetro, usando como blanco el TSM. El nivel de oxidación en las emulsiones y microcápsulas se expresó como mmol TMP/kg aceite. Los resultados de este ensayo se recogen en la tabla 3.

**Tabla 3. Niveles de oxidación (mmol TMP/kg aceite) en las microcápsulas procedentes de emulsiones no homogenizadas (M0) y homogenizadas a 700 y 1500 Ba (M700 y M1500, respectivamente) a tiempo 0 (t0) y después de un ensayo de almacenamiento a temperatura ambiente durante 30 días (t30).**

Emulsión	M0	M700	Mu1500
t0	92.55	69.31	53.62
t30	95.42	88.12	54.22

EJEMPLO 3. Enriquecimiento en ácidos grasos ω-3 mediante la adición de microcápsulas elaboradas siguiendo el procedimiento de invención en productos cárnicos.

Los productos cárnicos elegidos fueron nuggets de pollo y hamburguesas de cerdo. Se prepararon 3 lotes de cada producto: sin enriquecer (grupo control), enriquecido en ácidos grasos  $\omega$ -3 mediante la adición de las microcápsulas elaboradas y enriquecido en ácidos grasos  $\omega$ -3 mediante la adición directa de aceite. En los lotes enriquecidos, la adición de las microcápsulas y del aceite de pescado se realizó mediante incorporación en la fórmula del producto. Los tres lotes de los dos tipos de productos se elaboraron siguiendo protocolos previamente descritos con algunas modificaciones (Medina, M, et al. 2014. Quality characteristics of fried lamb nuggets from low-value meat cuts: Effect of formulation and freezing storage. *Food Science and Technology International*, 21, 503-511; Garrido, M.A. y Bañón, S. 2001. Hamburguesas y Albóndigas. Tecnología de elaboración. Garantía de calidad, defectos y alteraciones. En *Enciclopedia de la Carne y de los Productos Cárnicos* (S. Martín Bejarano ed), 1031-1046). Finalmente los productos fueron cocinados: los nuggets mediante fritura en freidora con aceite de girasol mientras que las hamburguesas se hicieron a la plancha.

Los productos cocinados fueron analizados para evaluar el efecto del tipo de enriquecimiento sobre las características de calidad de los productos cárnicos del ensayo.

#### 20 Perfil de ácidos grasos.

En primer lugar se extrae la grasa empleando cloroformo:metanol (2:1) como disolvente de extracción, y siguiendo el método descrito por (Pérez-Palacios, T. et al. 2008. Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food Chemistry*, 110, 1025–1029). La cantidad de grasa se calculó de forma gravimétrica.

A continuación se preparan los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante transesterificación básica con hexano e hidróxido potásico 2N para ser analizados mediante cromatografía gaseosa y detector de ionización de llama, con inyector en columna y usando una columna capilar de polietileno (60 m 0.32 mm i.d.× 0.25 $\mu$ m). La temperatura inicial del horno del cromatógrafo fue 180 °C, aumentando a 5°C/min hasta 200°C, temperatura a la que se mantiene 40 min, y después aumenta otra vez a razón de 5°C/min hasta 250°C, manteniéndose a esta temperatura durante los 21 min finales. La temperatura del inyector y del detector es de 255°C. El gas portador es helio y su flujo 0.8 ml/min. Los picos de los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron identificados comparando sus tiempos de retención frente a los de patrones. Se midió el área de cada pico, y los

resultados se expresan como porcentaje de área con respecto al área total de picos identificados.

5 En las muestras analizadas se detectaron 21 ácidos grasos, mostrándose en la tabla 4 el porcentaje obtenido para EPA y DHA en los tres lotes de nuggets y hamburguesas cocinados.

10 **Tabla 4. Porcentaje de EPA y DHA en nuggets y hamburguesas no enriquecidos (C) y enriquecidos en ácidos grasos  $\omega$ -3 mediante microcápsulas de aceite de pescado (M) y adición directa de aceite de pescado (A).**

	NUGGETS			HAMBURGUESAS		
	C	A	M	C	A	M
EPA	0,02	0,02	0,08	-	0.031	0.072
DHA	0,04	0,44	0,56	-	0.033	0.099

#### Estabilidad oxidativa

15 Para evaluar la oxidación lipídica se llevará a cabo el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) (Salih, A.M. et al. 1987. Modified extraction 2-Thiobarbituric Acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poultry Science*, 66, 1483–1488) utilizando para la cuantificación una curva de calibración de 1,1,3,3-tetraoxopropano (TEP) en ácido perclórico 3,86%, y ácido perclórico 3,86% y butilhidroxitolueno (BHT) para  
20 preparar las muestras. La absorbancia de las muestras y de los puntos de la curva se midió a 532nm en el espectrofotómetro. Los resultados se expresan en mg malondialdehído (MDA) por kg de muestra.

25 Los resultados de esta determinación para los tres lotes de nuggets y hamburguesas se muestran en la Figura 4. Los valores indicativos de la oxidación lipídica fueron similares en los productos no enriquecidos y en los enriquecidos con microcápsulas de aceite de pescado rico en ácidos grasos  $\omega$ -3, y mucho menores en comparación con los nuggets y hamburguesas enriquecidos mediante adición directa de aceite de pescado.

Análisis sensorial.

Se llevó a cabo un Análisis Cuantitativo Descriptivo con el objetivo de evaluar el efecto del tipo enriquecimiento sobre atributos sensoriales relacionados con la apariencia, el olor, la  
5 textura, el sabor y el flavor de nuggets y hamburguesas. Las sesiones de evaluación sensorial se llevan a cabo en una sala de catas que cumple con la Norma UNE (1979). Se cuenta con un panel de catadores entrenados con una amplia experiencia en la evaluación sensorial de productos cárnicos. No obstante se realizaron varias sesiones previas de  
10 entrenamiento y discusión con los panelistas, sobre todo para la familiarización del mismo con los posibles olores y sabores derivados de la incorporación de los ácidos grasos  $\omega$ -3. Para el desarrollo de estas sesiones se utiliza el software FIZZ.

Los resultados del análisis sensorial cuantitativo-descriptivo de los tres lotes de nuggets y  
15 hamburguesas se muestran en las figuras 5 y 6, respectivamente. En los atributos sensoriales relacionados con la apariencia, el olor, la textura y el flavor de los nuggets y las hamburguesas, no se apreciaron diferencias significativas entre los tres lotes de productos evaluados: sin enriquecer y enriquecidos con microcápsulas y mediante adición directa de aceite de pescado.

**REIVINDICACIONES**

1. Emulsión multicapa que comprenden aceite de pescado, como fuente de ácidos grasos  $\omega$ -3 como elemento encapsulado, y lecitina, quitosano y maltodextrina, como materiales de encapsulación.
- 5
2. Microcápsula que comprende aceite de pescado, como fuente de ácidos grasos  $\omega$ -3 como elemento encapsulado, y lecitina, quitosano y maltodextrina, como materiales de encapsulación.
- 10
3. Procedimiento de elaboración de la emulsión definida en la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
- a) preparación de una disolución de aceite de pescado en lecitina;
- b) preparación de una disolución de quitosano en ácido acético;
- 15 c) preparación de una disolución de maltodextrina en agua;
- d) preparación de una emulsión por adición de ácido acético a la disolución de la etapa a) y homogenización de la mezcla; a la que se añade la disolución de la etapa b) y homogenización de la mezcla; a la que se añade la disolución de la etapa c) y homogenización de la mezcla.
- 20
4. Procedimiento según la reivindicación 3 caracterizado porque la concentración de quitosano en la disolución de la etapa b) está comprendida entre un 0,8% y un 1,2% en peso.
- 25
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3-4 caracterizado porque las homogenizaciones de la etapa d) se realizan en un rango de presiones comprendido entre 1300 Ba y 1700Ba.
6. Procedimiento de la obtención de la microcápsula definida en la reivindicación 2 que comprende una etapa de spray-drying de la emulsión obtenida en las reivindicaciones 3-5
- 30
7. Composición alimentaria que comprende la microcápsula de la reivindicación 2.
8. Composición alimentaria según la reivindicación 7 donde la composición alimentaria es un producto cárnico.
- 35

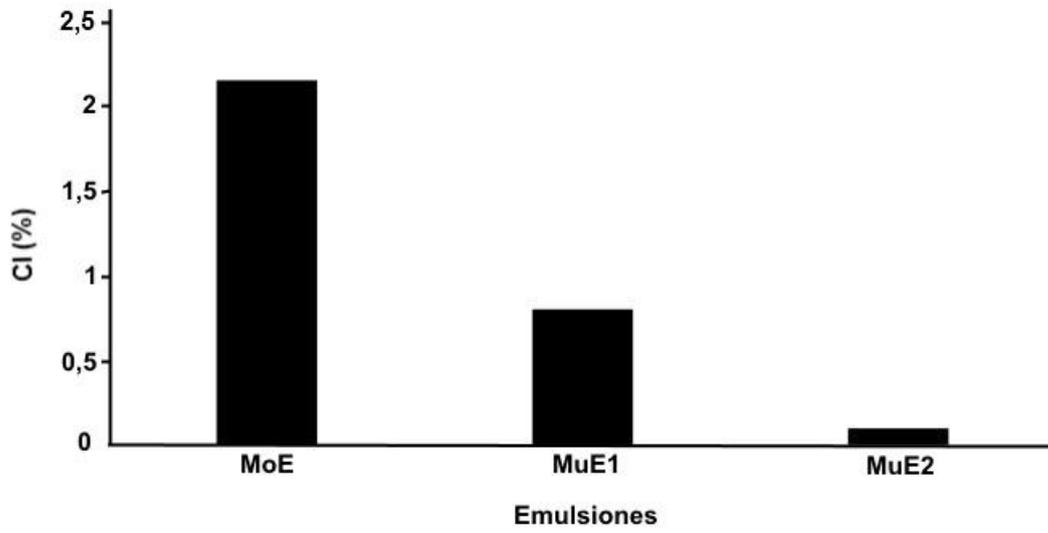


Figura 1

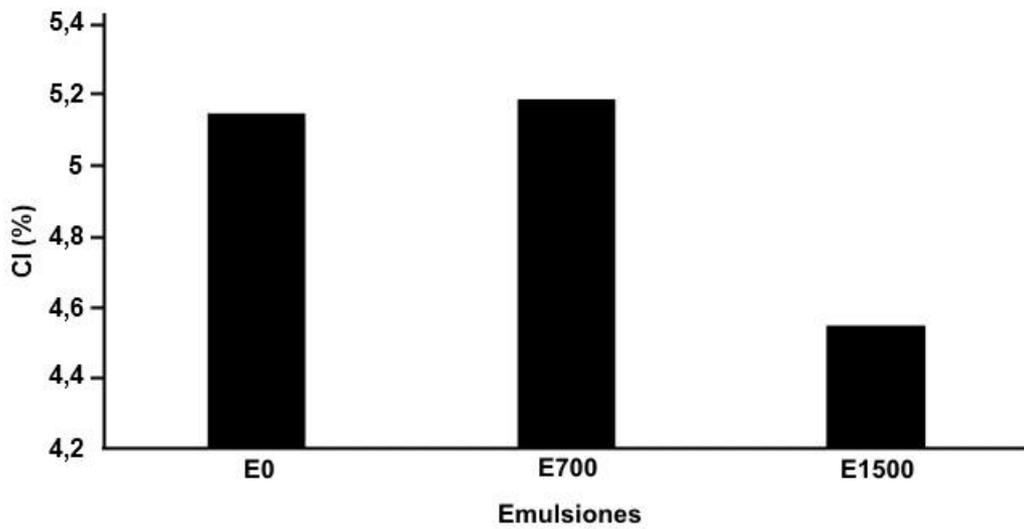
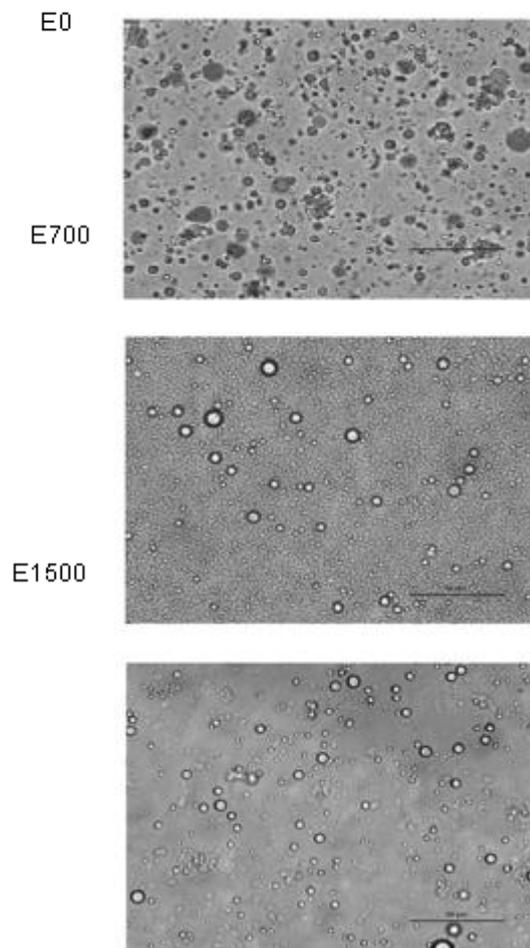


Figura 2



**Figura 3**

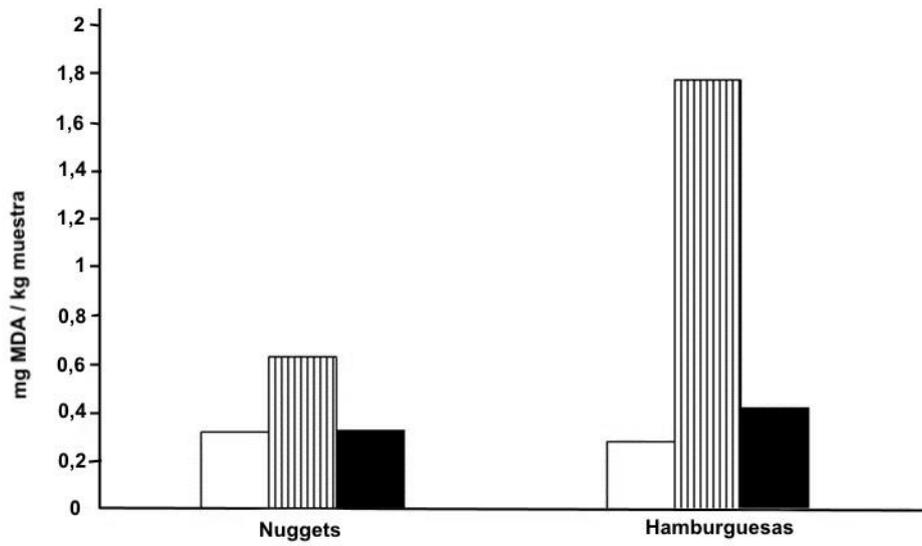


Figura 4

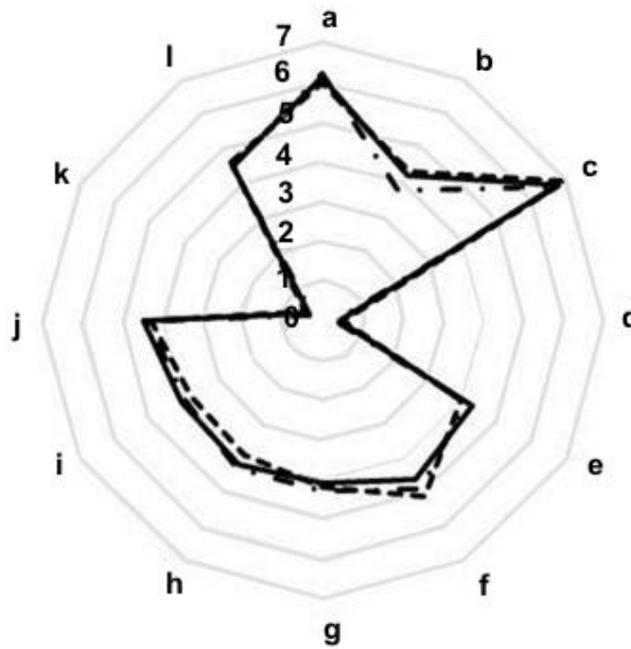
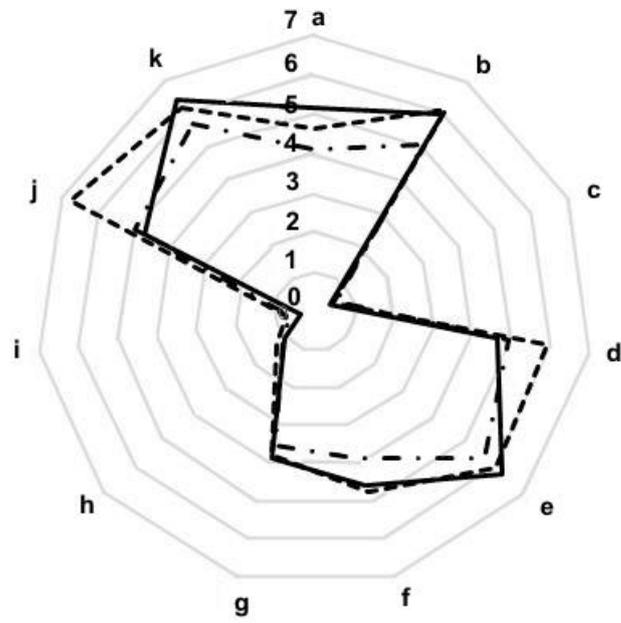


Figura 5



**Figura 6**



②① N.º solicitud: 201631590

②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.12.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JIMÉNEZ-MARTÍN Estefanía, et al. Suitability of using monolayered and multilayered emulsions for microencapsulation of $\omega$ -3 fatty acids by spray drying: effect of storage at different temperatures. Food and bioprocess technology, 2015, vol. 8, no 1, p. 100-111. Resumen. Figura 1.	1-8
X	KLINKESORN Uta, et al. Impact of lipase, bile salts, and polysaccharides on properties and digestibility of tuna oil multilayer emulsions stabilized by lecithin–chitosan. Food Biophysics, 2010, vol. 5, no 2, p. 73-81. Emulsion Preparation, pagina. 75, columna izquierda	1-8
X	KLINKESORN Utai, et al. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. Food Research International, 2006, vol. 39, no 4, p. 449-457. Introducción, pagina 450, columna izquierda.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
17.01.2017

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A23L23/10** (2016.01)

**A23L3/46** (2006.01)

**A23L33/115** (2016.01)

**B01J13/04** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23L, B01J, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.01.2017

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-8	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-8	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JIMÉNEZ-MARTÍN, Estefanía, et al. Suitability of using monolayered and multilayered emulsions for microencapsulation of $\omega$ -3 fatty acids by spray drying: effect of storage at different temperatures. Food and bioprocess technology, 2015, vol. 8, no 1, p. 100-111. Resumen. Figura 1.	2015
D02	KLINKESORN, Uta, et al. Impact of lipase, bile salts, and polysaccharides on properties and digestibility of tuna oil multilayer emulsions stabilized by lecithin–chitosan. Food Biophysics, 2010, vol. 5, no 2, p. 73-81. Emulsion Preparation, pag. 75, columna izquierda	2010
D03	KLINKESORN, Uta, et al. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. Food Research International, 2006, vol. 39, no 4, p. 449-457. Introducción, pag 450, columna izquierda.	2006

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de las reivindicaciones 1-8 carece de novedad y actividad inventiva, a la luz de lo divulgado en los documentos del estado de la técnica.

D01 hace referencia a la formación de cápsulas multicapa de quitosan, lecitina y maltodextrina para la encapsulación de ácidos grasos omega 3 contenidos en aceite de pescado. El procedimiento de elaboración se llevó a cabo utilizando las mismas etapas y condiciones que las mencionadas en las reivindicaciones 3-6 (figura 1, páginas 102, 103).

D02 divulga unas cápsulas de aceite de atún preparadas mediante la elaboración de una primera emulsión de lecitina y aceite de atún en agua, y utilizando una solución acuosa tamponada de acetato (100 mM, a pH 3.0). Esa primera emulsión se diluyó después en una solución de quitosan, y los flóculos resultantes fueron recubiertos con una solución de maltodextrina a varias concentraciones (página 75).

D03 describe un procedimiento de microencapsulación de aceite de atún, a base de quitosan, lecitina y maltodextrina, mediante la técnica de spray-drying.

Así pues, la presente invención no cumpliría con los requisitos de novedad y actividad inventiva tal y como se menciona en los arts. 6 y 8 de la ley 11/1986.