

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 091**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A61K 47/10 | (2007.01) |
| A61K 47/42 | (2007.01) |
| A61P 17/00 | (2006.01) |
| A61K 8/34 | (2006.01) |
| A61Q 19/00 | (2006.01) |
| A61K 9/127 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2009 PCT/US2009/002243**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2009 WO09126302**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2009 E 09729878 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2274014**

54 Título: **Preparados de oleosomas estabilizados y métodos de fabricación de los mismos**

30 Prioridad:

11.04.2008 US 44141 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2017

73 Titular/es:

**BOTANECO INC. (100.0%)
134, 2985 23rd Ave NE
Calgary, AB T1Y 7L3, CA**

72 Inventor/es:

**GUTH, JACOB;
BOOTHE, JOSEPH;
BEAZER, MITCH y
SHAFER, KENT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 626 091 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparados de oleosomas estabilizados y métodos de fabricación de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas composiciones que comprenden oleosomas y a una metodología para fabricarlas. Dichas composiciones son útiles en relación con los productos de aplicación tópica cutánea en el cuerpo humano.

10

Antecedentes de la invención

Los aceites de semillas vegetales, tales como el aceite de palma, el aceite de girasol y el aceite de colza, son un producto agrícola principal en todo el mundo, con una gran variedad de usos industriales y nutricionales. Más de 6,8 mil millones de kilos de aceite de semilla vegetal se producen anualmente solo en Estados Unidos. Wallis J., *et al.*, "Seed oils and their metabolic engineering", en: SEED TECHNOLOGY AND ITS BIOLOGICAL BASIS, M. Black y J. D. Bewley (eds.), Sheffield Biological Sciences (2000). El noventa y ocho por ciento de la producción de aceite de semilla vegetal en Estados Unidos se usa con fines nutricionales, tal como en la fabricación de aceite de cocina y margarina. El resto de aceites vegetales se usa como materia prima en la fabricación de productos industriales tales como jabones, plastificantes, polímeros, tensioactivos y lubricantes.

20

Los aceites vegetales son triacilglicerol, es decir, una fracción glicerol en la que cada uno de los grupos hidroxilo está esterificado en un ácido graso. La estructura principal de glicerol del triacilglicerol es invariable en estructura, pero los ácidos grasos unidos al glicerol varían considerablemente dependiendo del aceite vegetal.

25

La estructura del ácido graso determina las propiedades físicas y químicas del aceite vegetal. Por ejemplo, el número de dobles enlaces de un ácido graso, una variable que, con frecuencia, se denomina "grado de insaturación", afecta al punto de fusión de los aceites, mientras que la longitud de la cadena de un ácido graso afecta a su viscosidad, lubricidad y solubilidad.

30

Las moléculas de triacilglicerol son insolubles en ambientes acuosos y tienden a unirse en gotitas de aceite. Para almacenar estos triacilglicerol insolubles en agua, las plantas han desarrollado compartimentos únicos de almacenamiento de aceite de semilla de aproximadamente 1 a 10 μm de diámetro dentro de las células de las semillas vegetales, conocidas como "cuerpos oleosos", "oleosomas", "cuerpos lipídicos" y "esferosomas" (en conjunto, "oleosomas"). Véase Huang, *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 43: 177-200 (1992). Además del aceite vegetal, estos oleosomas comprenden dos constituyentes químicos: fosfolípidos y una clase de proteínas, conocida en la técnica como proteínas del cuerpo oleoso. Desde un punto de vista estructural, los oleosomas son un núcleo de triacilglicerol encapsulado por una membrana de media unidad de fosfolípidos, en la que están incrustadas las proteínas del cuerpo oleoso. Se cree que las proteínas de cuerpo oleoso desempeñan un papel en la prevención de la coalescencia de los oleosomas en gotitas de aceite mucho más grandes.

35

40

Para la extracción de los aceites vegetales de extracto, se trituran o se prensan las semillas y, después, se refinan usando procesos que normalmente implican el uso de disolventes orgánicos para separar el aceite vegetal de otros constituyentes de la semilla tales como las proteínas y los hidratos de carbono de las semillas. También se han desarrollado metodologías de extracción de aceite vegetal a base de disolventes no orgánicos, como se describe, por ejemplo, por Embong y Jelen, *Can. Inst. Food Sci. Techn. J.* 10: 239-43 (1977).

45

Puesto que el objetivo primario de estos procesos de extracción es obtener aceite vegetal puro, sin embargo, normalmente alteran el oleosoma estructural. Por lo tanto, en general, las composiciones convencionales preparadas a partir de aceites vegetales no comprenden oleosomas intactos.

50

Por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.683.740 y n.º 5.613.583, concedidas a Voultoury *et al.*, desvelan emulsiones preparadas a partir de semillas machacadas de plantas oleaginosas que comprenden vesículas lipídicas. En el transcurso del proceso de aplastamiento descrito en dichas patentes, los oleosomas pierden esencialmente su integridad estructural. Por consiguiente, se desvela que, en el proceso de aplastamiento se libera del 70 % al 90 % del aceite de las semillas en forma de aceite libre.

55

Por otra parte, los oleosomas que se aíslan de semillas vegetales en una forma estructuralmente intacta tienen una utilidad práctica reconocida. En particular, los oleosomas permiten la formulación de mezclas complejas de compuestos acuosos y aceite en ausencia de emulsionantes exógenos, a temperatura ambiente, véase la solicitud PCT 2005/097059, concedida a Guth *et al.*, y los oleosomas pueden cargarse con principios activos, según lo descrito por Murray *et al.*, solicitud PCT 2005/030169.

60

Se desvela una metodología no destructiva de preparación de oleosomas por parte de Deckers *et al.*, en las patentes de EE.UU. n.º 6.146.645, n.º 6.183.762, n.º 6.210.742, n.º 6.372.234, n.º 6.582.710, n.º 6.596.287, n.º 6.599.513 y n.º 6.761.914 (denominadas en conjunto "patentes de Deckers"). De acuerdo con las patentes de

65

Deckers, se puede obtener un preparado de oleosomas purificado y usarlo para preparar emulsiones en presencia de una multiplicidad de otras sustancias, con el fin de conseguir un equilibrio deseable de emulsión, viscosidad y aspecto, y volver estas emulsiones adecuadas para productos cosméticos, alimentos, productos farmacéuticos y aplicaciones industriales, entre otros.

Las solicitudes PCT 2007/122421 y 2007/122422, concedidas a Gray *et al.* y Galley *et al.*, respectivamente, se refieren a una composición que contiene oleosomas para su formulación y la administración a un mamífero. La composición de oleosoma desvelada, denominada "cuajada de aceite", se puede preparar a partir de plantas y granos oleaginosos, y comprende además material vegetal extrínseco, tal como proteínas de semillas vegetales incluyendo albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, e hidratos de carbono. Estos últimos, de acuerdo con la solicitud 2007/122421, confieren ciertas propiedades deseables, tales como una mayor estabilidad y compatibilidad de la emulsión con ciertos productos químicos, en particular, detergentes.

Para las aplicaciones prácticas, un preparado de oleosomas preferentemente no experimenta cambios físicos ni químicos no deseados cuando pueden darse diversas condiciones, como durante el almacenamiento prolongado, cuando el preparado de oleosomas sufre fluctuaciones de temperatura, como ocurre comúnmente durante el transporte o cuando el preparado de oleosomas se usa como un ingrediente en los procesos de formulación que pueden implicar el uso de fuerzas de cizalla, etapas de calentamiento y enfriamiento o la adición de agentes químicos reactivos. En este último aspecto, generan una preocupación especial los agentes biológicos tales como bacterias, hongos, micoplasmas y similares, ya que su exposición a los preparados de cuerpos oleosos puede provocar la degradación de los oleosomas.

Para proteger los oleosomas de la exposición a agentes biológicos, se pueden añadir conservantes a los preparados de oleosomas. Sin embargo, las preocupaciones de seguridad y reactividad/interacción química con el recubrimiento proteico de oleosomas descalifican muchos conservantes bien conocidos, tales como las sales de amonio cuaternario, los compuestos liberadores de formaldehído, los compuestos clorados y los ftalatos, de uso en aplicaciones alimentarias o en cosmética, cuidado de la piel, aplicaciones farmacéuticas tópicas y similares. Por consiguiente, los conservantes más ampliamente aceptados y deseados para estas aplicaciones son las sales de ácido, tales como benzoatos, salicilatos, sorbatos, propionatos, y los ácidos tales como el ácido deshidroacético y ácido ferúlico.

Para actuar como conservantes, los agentes conservantes de ácido o sal de ácido deben estar esencialmente en su forma ácida, es decir, a un pH inferior a 6,0 y preferentemente entre 4,0 y 5,0. Sin embargo, los presentes inventores han observado que, dentro de este intervalo de pH ácido, un preparado de oleosomas carece de estabilidad física, en el sentido de que la estructura de los oleosomas se debilita y el aceite "se escapa" de los oleosomas; Por lo tanto, resulta problemático mezclar en otros ingredientes, con lo que se prepara una formulación acabada compuesta de oleosomas intactos.

Este problema es especialmente agudo cuando se introducen oleosomas en productos de cuidado de la piel, que, con frecuencia, se formulan para su compatibilidad con la piel humana, para los que el pH varía entre 4,1 y 5,8. Véase Segger, *et al.*, IFSCC 10: 2 (2007). Algunos productos tópicos, tales como los exfoliantes de la piel que contienen ácidos como el ácido láctico, los ácidos glicólicos y el ácido salicílico tienen un pH aún más bajo, en un intervalo de 3,5 a 4,5, que es muy inferior al valor al que los oleosomas generalmente son físicamente estables.

Además, en presencia de alcoholes monovalentes, los presentes inventores han observado que la estructura del oleosoma se debilita, dando como resultado una fuga de aceite del oleosoma. Por consiguiente, los preparados de oleosomas típicos no son físicamente estables en productos tales como desinfectantes de manos, que requieren altos niveles de un alcohol monohídrico.

A un preparado de oleosomas, de acuerdo con las patentes de Deckers, se pueden añadir Glydant Plus®, Phenonip®, metilparabeno, propilparabeno, Germall 115®, Germaben II®, ácido fítico y mezclas de los mismos para conseguir la estabilidad en presencia de bacterias, hongos y otros agentes biológicos. Sin embargo, las patentes de Deckers no especifican el impacto de estos agentes sobre la integridad física del preparado constituyente de oleosomas.

En resumen, existen deficiencias en los métodos convencionales para la fabricación de preparados de oleosomas. En particular, existe la necesidad de una metodología mejorada para estabilizar los preparados de oleosomas contra cambios físicos o químicos no deseados que, de otro modo, ocurren en una variedad de condiciones. De acuerdo con la práctica convencional, no está claro si y cómo se puede obtener un preparado de oleosomas que se conserva desde un punto de vista microbiano y que sea estable con respecto a los aspectos físicos de un preparado en un intervalo de pH ácido y en presencia de altos niveles de alcohol monohídrico, como se ha descrito anteriormente.

El documento US 6.051.250 desvela un proceso de estabilización de vesículas de lípidos anfífilos y composiciones para la aplicación tópica que contienen dichas vesículas estabilizadas.

El documento US 2002/0183400 desvela composiciones para la aplicación tópica que comprenden al menos un hidroxiestilbeno y al menos un poliol para disolver el hidroxiestilbeno.

El documento WO2005/097059 enseña un método de preparación de emulsiones cosméticas.

5

Sumario de la invención

La presente invención ofrece un sistema que permite la conservación de oleosomas a un pH inferior a 6,0 sin comprometer significativamente su estabilidad física.

10

De acuerdo con un aspecto de la invención, por lo tanto, se proporciona un método de preparación de un preparado estabilizado de oleosomas. La metodología de la invención comprende (a) proporcionar un preparado de oleosomas y, luego, (b) mezclar el preparado de oleosomas en presencia de (i) un alcohol multihídrico e (ii) un compuesto ácido capaz de reducir el pH de dicho preparado de oleosomas a un pH inferior a 6,0.

15

Un preparado estabilizado de oleosomas de la invención puede comprender el 20 % en volumen del alcohol multihídrico. En una realización preferida, el alcohol multihídrico es un compuesto no halogenado. En otra realización preferida, el alcohol multihídrico es un diol no aromático, un triol no aromático o un poliol no aromático.

20

En el presente documento, se enseñan nuevas composiciones que comprenden oleosomas, un alcohol multihídrico y una concentración $[H^+]$ de 10^{-6} moles por litro.

25

Un preparado de oleosomas desvelado en el presente documento puede ser estable desde un punto de vista microbiano, así como en sus aspectos físicos, cuando se almacena durante períodos prolongados a temperatura ambiente. Por lo tanto, al almacenar el preparado estabilizado de oleosomas a temperatura ambiente durante 2 años, preferentemente el 95 % o más en volumen del contenido total de aceite del preparado estará presente dentro de los oleosomas.

30

Los preparados de oleosomas obtenidos de acuerdo con la presente invención son útiles en la fabricación de una multiplicidad de formulaciones acabadas, incluyendo, productos cosméticos, productos alimentarios, productos farmacéuticos y productos industriales, entre otros.

35

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se ha de entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan meramente a modo ilustrativo, puesto que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia a partir de la presente descripción detallada.

40

Descripción detallada de la invención

45

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a métodos mejorados para la conservación de preparados de oleosomas. Los presentes inventores han encontrado que, sorprendentemente, se puede obtener un preparado de oleosomas estable microbiológicamente que sea además estable con respecto a sus aspectos físicos dentro del intervalo de pH ácido. Dicho preparado mejorado de oleosomas acomoda el almacenamiento en condiciones ácidas, presenta una estabilidad mejorada cuando se expone a cambios repentinos de temperatura, y puede formularse en formulaciones acabadas que contienen oleosomas (i) que tienen un pH ácido, por ejemplo, productos para la aplicación tópica en la piel humana que, con frecuencia, son ácidos en su forma final; o (ii) que contienen altos niveles de alcohol monohídrico. Además, estos preparados de oleosomas mejorados permiten un preparado más eficaz de una formulación final que incorpore el preparado de oleosomas como ingrediente. En particular, la mezcla de la fase acuosa requiere esencialmente menos energía y tiempo en los procesos de formulación en los que se mezcla una fase acuosa con el preparado de oleosomas que comprende una fase oleosa añadida exógenamente.

50

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método de preparación de un preparado estabilizado de oleosomas que comprende:

55

(a) proporcionar un preparado de oleosomas; y

(b) mezclar el preparado de oleosomas en presencia de (i) un alcohol multihídrico e (ii) un compuesto ácido capaz de reducir el pH del preparado de oleosomas a un pH inferior a 6,0.

60

El preparado de oleosomas obtenido de acuerdo con la invención es estable desde el punto de vista microbiano y desde el punto de vista físico. Preferentemente, el aspecto físico del preparado de oleosomas no experimenta ningún cambio significativo cuando se almacena a temperatura ambiente durante 2 años o a 45 °C durante 2 meses. También se prefiere que, durante el almacenamiento en las condiciones anteriores, el 95 % o más en volumen del contenido total de aceite de un preparado de oleosomas de la invención permanezca dentro de los oleosomas; más

65

preferentemente el 99 % o más y, lo más preferentemente, el 100 % en volumen esté presente dentro de los oleosomas.

Preparado de oleosomas

El término "oleosoma", en el presente documento, designa cualquier aceite subcelular diferenciado y orgánulo de almacenamiento de cera que se puede obtener a partir de una célula viva. Los oleosomas pueden obtenerse a partir de cualquier célula que contenga dichos orgánulos, incluyendo células vegetales, células fúngicas, células de levadura (Leber, R. *et al.*, 1994, "Yeast" 10: 1421-28), células bacterianas (Pieper-Furst *et al.*, 1994, *J. Bacteriol.* 176: 4328 - 37) y células de algas (Roessler, P. G., 1988, *J. Phycol.* (Londres) 24: 394-400).

En realizaciones preferidas de la invención, los oleosomas se obtienen a partir de una célula vegetal, en las que el término "célula" incluye células de polen, esporas, semillas y órganos vegetales vegetativos, respectivamente, en las que están presentes oleosomas. En general, véase Huang, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 43: 177-200 (1992). Más preferentemente, los oleosomas empleados en la invención se obtienen a partir de una semilla vegetal.

Entre las semillas vegetales útiles en el presente documento, se prefieren aquellas semillas que se pueden obtener de especies vegetales seleccionadas del grupo de especies vegetales que consiste en almendra (*Prunus dulcis*); anís (*Pimpinella anisum*); aguacate (*Persea* sp.); hayuco (*Fagus sylvatica*); borraja (*Borago officinalis*); nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*); nuez de la India (*Aleuritis tiglium*); carapa (*Carapa guineensis*); anacardo (*Anacardium occidentale*); ricino (*Ricinus communis*); coco (*Cocus nucifera*); cilantro (*Coriandrum sativum*); semilla de algodón (*Gossypium* spp.); crambe (*Crambe abyssinica*); *Crepis alpina*; croton (*Croton tiglium*); pepino (*Cucumis sativus*); *Cuphea* sp.; eneldo (*Anethum gravealis*); *Euphorbia lagascae*; onagra (*Oenothera biennis*); *Dimorphoteca pluvialis*; lino falso (*Camolina sativa*); hinojo (*Foeniculum vulgare*); cacahuete (*Arachis hypogaea*); avellana (*Coryllus avellana*); cáñamo (*Cannabis sativa*); lunaria (*Lunaria annua*); jojoba (*Simmondsia chinensis*); Ceiba (*Ceiba pentandra*); kukui (*Aleuritis moluccana*); *Lesquerella* sp.; linaza/lino (*Linum usitatissimum*); altramuz (*Lupinus* spp.); nuez de macadamia (*Macademia* sp.); maíz (*Zea mays*); espuma de la pradera (*Limnanthes alba*); mostaza (*Brassica* sp. y *Sinapis alba*); aceituna (*Olea* spp.); palma de aceite (*Elaeis guineensis*); oiticia (*Licania rigida*); pawpaw (*Assimina triloba*); pacana (*Juglandaceae* sp.); perilla (*Perilla frutescens*); piñón de tempate (*Gatropha curcas*); almendro de java (*Canarium ovatum*); piñón (*pine* sp.); pistacho (*Pistachia vera*); pongam (*Bongamin glabra*); semilla de amapola (*Papaver soniferum*); calabaza (*Cucurbita pepo*); semilla de colza (*Brassica* sp.); cártamo (*Carthamus tinctorius*); semilla de sésamo (*Sesamum indicum*); soja (*Glycine max*); calabacín (*Cucurbita maxima*); sala (*Shorea rubusha*); Stokes aster (*Stokesia laevis*); girasol (*Helianthus annuus*); tukuma (*Astocarya* sp.); nuez peluda (*Aleuritis cordata*); vernonia (*Vernonia galamensis*); y sus mezclas. Lo más preferentemente, las semillas vegetales son del grupo de especies vegetales que comprenden: semilla de colza (*Brassica* sp.), soja (*Glycine max*), girasol (*Helianthus annuus*), palma de aceite (*Elaeis guineensis*), semilla de algodón (*Gossypium* sp.), cacahuete (*Arachis hypogaea*), coco (*Cocus nucifera*), ricino (*Ricinus communis*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), mostaza (*Brassica* sp. y *Sinapis alba*), cilantro (*Coriandrum sativum*), calabacín (*Cucurbita maxima*), linaza/lino (*Linum usitatissimum*), nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), jojoba (*Simmondsia chinensis*), maíz (*Zea mays*), crambe (*Crambe abyssinica*) y eruca (*Eruca sativa*). Los más preferidos en el presente contexto son los cuerpos oleosos preparados a partir de cártamo (*Carthamus tinctorius*).

Para preparar oleosomas a partir plantas, se cultivan dichas plantas y se deja que establezcan las semillas usando prácticas de cultivo agrícola bien conocidas por el experto en la materia. Tras cosechar la semilla y, si se desea, retirar el material tal como las piedras o las cascarillas de las semillas (descascarillado), por ejemplo, mediante el tamizado o lavado y, opcionalmente, el secado de la semilla, las semillas se procesan posteriormente mediante molienda mecánica. Preferentemente, se añade una fase líquida antes de la molienda de las semillas. Esto se conoce como "molienda en húmedo". Se ha informado de la molienda en húmedo en los procesos de extracción de aceite para las semillas de una variedad de especies vegetales incluyendo mostaza (Aguilar *et al.* 1991, *J. Texture Studies* 22: 59-84), la soja (patente de EE.UU. n.º 3.971.856, Cater *et al.*, 1974, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51: 137-41), cacahuete (patentes de EE.UU. n.º 4.025.658 y n.º 4.362.759), semilla de algodón (Lawhon *et al.*, 1977, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54: 75-80), y coco (Kumar *et al.*, 1995, *INFORM* 6: 1217-40).

Preferentemente, el líquido es agua, aunque también pueden usarse disolventes orgánicos tales como etanol. También puede ser ventajoso embeber las semillas durante un período de tiempo de aproximadamente quince minutos a aproximadamente dos días en una fase líquida antes de la molienda. La inmersión puede ablandar las paredes celulares y facilitar el proceso de molienda. La inmersión durante períodos de tiempo más largos puede imitar el proceso de germinación y dar lugar a ciertas alteraciones ventajosas en la composición de los constituyentes de la semilla.

Las semillas se muelen preferentemente usando un molino coloidal. Además de los molinos coloidales, también se pueden emplear en la invención descrita en el presente documento otros equipos de trituración y molienda capaces de procesar cantidades industriales de semillas, incluyendo: molinos de disco, molinos coloidales, molinos de púas, molinos orbitales, molinos IKA y homogenizadores a escala industrial. La selección del molino puede depender de los requisitos de rendimiento de las semillas, así como del origen de la semilla que se emplea.

De acuerdo con la invención, es importante que los cuerpos oleosos de semillas permanezcan intactos durante el proceso de molienda. Por lo tanto, cualesquiera de las condiciones operativas comúnmente empleadas en el procesamiento de semillas oleaginosas, que tienden a alterar los cuerpos oleosos, no son adecuadas para un

5 Las temperaturas de molienda están preferentemente entre 10 °C y 90 °C. Más preferentemente, están entre 15 °C y 50 °C y lo más preferentemente entre 18 °C y 30 °C, mientras que el pH se mantiene preferentemente entre 2,0 y 11,0, más preferentemente entre 6,0 y 9,0, y lo más preferentemente entre 7,0 y 9,0.

10 Los contaminantes sólidos, tales como las cáscaras de semilla, material fibroso, hidratos de carbono y proteínas no disueltos y otros contaminantes insolubles se eliminan de la fracción de semillas molidas. La separación de los contaminantes sólidos puede realizarse usando una centrifugadora de decantación. Dependiendo de los requisitos de rendimiento de las semillas, se puede variar la capacidad de la centrifugadora de decantación usando otros modelos de centrifugadoras de decantación, tales como decantadores trifásicos. Las condiciones operativas varían

15 dependiendo de la centrifugadora que se emplee en particular y deben ajustarse de manera que los materiales contaminantes insolubles se sedimenten y permanezcan sedimentados tras la decantación. En estas condiciones, puede observarse una separación parcial de la fase del cuerpo oleoso y de la fase líquida.

20 Tras la eliminación de los contaminantes insolubles, la fracción oleosómica se separa de la fase acuosa. En una realización de la invención, se emplea una centrifugadora de cuenco tubular. En una realización preferida, se emplea una centrifugadora de discos. Como alternativa, se pueden usar hidrociclones o una sedimentación de las fases bajo gravitación natural o cualquier otra técnica de separación basada en la gravedad. También es posible separar la fracción oleosómica de la fracción acuosa a través de un método de exclusión de tamaño, tal como filtración, por ejemplo, ultrafiltración de membrana y microfiltración de flujo cruzado.

25 Cuando se usa una centrifugadora con este fin, un parámetro importante es el tamaño del filtro de anillo usada para operar la centrifugadora. Los filtros de anillo son anillos extraíbles con una abertura circular central de tamaño variable, y regulan la separación de la fase acuosa de la fase de oleosoma, dirigiendo de este modo la pureza de la fracción oleosómica que se obtiene. El tamaño del filtro de anillo seleccionado depende del tipo de centrifugadora y del tipo de semilla oleaginosa usada, así como de la consistencia final deseada del preparado de oleosomas.

30

De acuerdo con una realización de la invención, el oleosoma de cártamo se obtiene usando una centrifugadora de disco SA-7 (Westfalia) junto con un tamaño del filtro de anillo de 69-75 mm. La eficacia de la separación se ve afectada además por el caudal, que, en dicha realización, se mantiene normalmente entre 0,5 y 7,0 l/min. Las

35 temperaturas se mantienen preferentemente entre 26 °C y 40 °C.

Dependiendo del modelo de centrifugadora usado, los caudales y los tamaños de los filtros de anillo se pueden ajustar de modo que se consiga una separación óptima de la fracción oleosómica de la fase acuosa. Estos ajustes serán fácilmente evidentes para una persona con conocimientos en el campo de la ingeniería de procesos.

40

La separación de sólidos y la separación de la fase acuosa de la fracción oleosómica se pueden llevar a cabo de manera concomitante. Esto puede hacerse por medio de un método de separación basado en la gravedad, tal como una centrifugadora de cuenco tubular trifásica, un decantador, un hidrociclón o un método de separación basado en la exclusión por tamaños.

45

En general, una composición de oleosoma obtenida en esta etapa del proceso de la invención está relativamente en bruto, y comprende numerosas proteínas de semillas, glicosiladas y no glicosiladas, y otros contaminantes tales como glucosinilatos o sus productos de descomposición. La invención comprende dicha composición, pero, en realizaciones preferidas, se elimina una cantidad sustancial de contaminantes de semillas antes de preparar un

50 preparado estabilizado de oleosomas.

Para realizar la eliminación del material de semillas contaminante, se lava al menos una vez un preparado de oleosomas de aceite obtenido tras la separación de la fase acuosa, como se ha descrito anteriormente, volviendo a suspender la fracción oleosómica en una fase líquida y centrifugando la fracción resuspendida, lo que produce un

55 "preparado de oleosomas lavado".

De acuerdo con la invención, las condiciones de lavado, en general, se seleccionan en función de la pureza deseada del preparado de oleosomas. En este sentido, las condiciones que pueden variarse de una manera controlada, con el fin de obtener preparados de oleosomas de diferentes grados de pureza del oleosoma, incluyen la composición de la fase líquida usada para el lavado, el tiempo de lavado, la proporción de la fase líquida con respecto a la fase del oleosoma y el pH. Por ejemplo, la fase líquida puede ser agua o un disolvente orgánico. Por lo general, resulta ventajoso seleccionar una fase líquida tamponada que (i) tenga un pH retirado al menos un punto de pH del punto isoelectrico de los oleosomas, punto que generalmente varía entre 4 y 6, dependiendo de la fuente de los oleosomas, debido a que dichas condiciones facilitan la separación entre oleosomas y contaminantes. También es ventajoso que una fase líquida tamponada (ii) tenga un pH al que los oleosomas sean estables, es decir, en general, en el intervalo de pH ligeramente básico (pH 7,0- 9,0).

60

65

Los sistemas tampón adecuados para la presente invención se ilustran mediante sistemas que comprenden cloruro sódico a concentraciones entre 0,01 M y 2 M, tampones de bicarbonato sódico a concentraciones entre 25 mM y 50 mM; y tampones bajos en sal tales como Tris-HCl 50 mM a pH 7,5. En un ejemplo, cuando se preparan oleosomas de cártamo, un tampón de bicarbonato sódico 45 mM a pH 8,2 es particularmente adecuado para obtener preparados de oleosomas relativamente puros.

Con dicho tampón se puede obtener, por ejemplo, un preparado de oleosomas que comprenda el 2 % o menos de proteínas de cuerpo no oleoso. Las condiciones adicionales que influyen en la pureza del oleosoma, de acuerdo con la presente invención, son el tiempo de lavado y las cantidades relativas de oleosoma/fase líquida. Al prolongar los tiempos de lavado y/o aumentar el número de lavados, y al usar grandes cantidades de fase líquida, normalmente es posible obtener un grado más alto de pureza del oleosoma, aunque a expensas del rendimiento, como apreciará el experto en ingeniería de procesos.

Las condiciones de lavado pueden ajustarse en función de la fuente de los oleosomas preparados. En particular, los parámetros anteriormente descritos de composición de tampón, tiempo de lavado, pH y similares se pueden variar para influir en la constitución del preparado de oleosomas, así como en los constituyentes contaminantes, ya que estos varían en función de la fuente.

Así pues, en función de las condiciones de lavado, se puede obtener un preparado de oleosomas "esencialmente puro"; es decir, las únicas proteínas presentes son las proteínas del cuerpo oleoso. En una realización preferida, la fracción oleosómica contiene menos del 30 % (p/p) de proteínas de cuerpo no oleoso, más preferentemente menos del 20 % (p/p) e incluso más preferentemente menos del 10 % (p/p). En una realización más preferida, la fracción oleosómica comprende el 2 % (p/p) o menos de proteínas de cuerpo no oleoso.

El lavado a varios valores de pH diferentes puede ser beneficioso, ya que esto permitirá la eliminación por etapas de los contaminantes, en particular, de las proteínas. Se pueden usar la electroforesis en gel de SDS u otras técnicas analíticas convenientemente para controlar la eliminación de proteínas de semillas y otros contaminantes al lavarse los oleosomas. Además, en los casos en que se lleve a cabo más de una etapa de lavado, las condiciones de lavado pueden variar para diferentes etapas de lavado.

No es necesario eliminar toda la fase acuosa entre las etapas de lavado, y el preparado de oleosomas lavado final puede suspenderse en agua, un sistema tampón, por ejemplo, Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, o cualquier otra fase líquida. Si se desea, el pH se puede ajustar a cualquier pH entre pH 2,0 y 11,0, preferentemente entre 6,0 y 9,0, y lo más preferentemente entre 7,0 y 8,5. La cantidad de agua en el preparado de oleosomas puede variarse y, dependiendo de la cantidad de agua, se puede obtener un preparado de oleosomas más o menos viscoso, de acuerdo con la invención. Por lo tanto, los preparados de oleosomas de la invención contienen preferentemente más del 10 % y menos del 65 % de agua en volumen, más preferentemente más de 15 % y menos de 50 % de agua en volumen y más preferentemente más de 20 % de agua en volumen y menos del 50 % de agua en volumen.

De acuerdo con la invención, el proceso de fabricación de un preparado de oleosomas puede realizarse en operaciones discontinuas o en un proceso de flujo continuo. En particular, cuando se usa una centrifugadora de discos, se configura convenientemente un sistema de bombas para generar un flujo continuo. Como ejemplos de las bombas que se pueden emplear están una bomba de doble diafragma accionada por aire y una bomba hidráulica de desplazamiento positivo o peristáltica.

Para mantener un suministro de consistencia homogénea a la centrifugadora de decantación y a la centrifugadora de cuenco tubular, se pueden añadir homogeneizadores tales como un homogeneizador IKA entre las etapas de separación. También se pueden añadir homogeneizadores en línea entre varias centrifugadoras o dispositivos de separación basados en la exclusión por tamaño que se emplean para lavar los preparados de cuerpos oleosos. Los tamaños de los filtros de anillo, las composiciones del tampón, la temperatura y el pH pueden diferir en cada etapa de lavado.

Un preparado de oleosomas obtenida de acuerdo con lo anterior puede estabilizarse mediante la metodología descrita con mayor detalle a continuación.

Alcoholes multihídricos

En la presente descripción, la expresión "alcohol multihídrico" significa un compuesto orgánico que contiene hidroxilo con dos o más grupos hidroxilo. Se puede usar cualquier alcohol multihídrico en la invención. Preferentemente, el alcohol multihídrico es un alcohol multihídrico no halogenado, hidrosoluble, de peso molecular de bajo a medio, y menos de 200.000 Da.

Por consiguiente, el alcohol multihídrico empleado es adecuadamente un diol, triol o poliol no aromático. Cuando el alcohol multihídrico es un diol, puede ser glicol o un derivado de glicol no aromático. Los derivados de glicol adecuados incluyen butilenglicol, polietilenglicol, propilenglicol, hexilenglicol, dipropilenglicol, hexanodiol o polibutilenglicol. Cuando el alcohol multihídrico es un triol, es adecuadamente 1,2,6-hexanotriol o glicerol. También

se pueden usar polímeros de glicerol, incluyendo cualquiera de di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, septa-, octa-, nona- y decaglicerol. También se pueden usar derivados ligeramente sustituidos de glicerol y sus polímeros. Son derivados ligeramente sustituidos de glicerol y sus polímeros aquellas moléculas en las que se ha modificado uno de cada seis grupos hidroxilo dentro de esas moléculas. Las sustituciones particularmente deseables son las esterificaciones

5 Cuando el alcohol multihídrico es un poliol, preferentemente al menos un átomo de carbono no tiene un grupo hidroxilo unido al mismo. El glicerol y los azúcares tales como el sorbitol son ejemplos de polioles que tienen un grupo hidroxilo unido a cada átomo de carbono. De hecho, el glicerol y sus análogos poliméricos lineales y no lineales (ramificados) (poligliceroles), son alcoholes multihídricos preferidos en la presente invención. Algunos
10 productos etoxilados de dichos polioles son adecuados para su uso en las formulaciones de la presente invención, sin embargo, siempre que sean líquidos a temperatura ambiente o sean hidrosolubles, por ejemplo sorbeth 6, sorbeth 20, sorbeth 30 y sorbeth 40. Los alcoholes polivinílicos son ilustrativos de otros polioles adecuados en el presente contexto.

15 También es posible usar azúcares multihídricos de acuerdo con la invención, incluyendo azúcares monosacáridos, tales como glucosa y fructosa, y azúcares disacáridos tales como sacarosa, así como azúcares multihídricos complejos tales como almidón y celulosa. Además, se pueden usar ésteres de azúcares ligeramente sustituidos, siempre que dichos ésteres permanezcan multihídricos.

20 También es posible usar péptidos y polipéptidos exógenos como alcohol multihídrico de acuerdo con la presente invención, siempre que dichos péptidos y polipéptidos comprendan dos o más restos de aminoácidos que contienen alcohol, seleccionados entre treonina y serina. Cuando se emplean péptidos o polipéptidos que contienen serina o treonina, son preferentemente hidrosolubles y tienen una masa molecular de entre 80 Da y 200.000 Da. Se prefiere además que carezcan de estructura secundaria o terciaria. De acuerdo con la invención, los péptidos y polipéptidos
25 que contienen serina y treonina, respectivamente, se usan preferentemente en forma purificada, aunque pueden emplearse mezclas de dos o más polipéptidos.

A la luz de la descripción anterior, un experto en química será capaz de identificar alcoholes multihídricos adecuados. Además, dichos expertos reconocerán que se pueden usar otros alcoholes multihídricos no
30 mencionados específicamente, así como mezclas de alcoholes multihídricos, sin apartarse del espíritu ni del alcance de la presente invención.

Compuesto ácido

35 De acuerdo con la presente invención, es adecuado cualquier compuesto ácido o sal de ácido que, cuando se disuelva en un preparado de oleosomas como se ha descrito anteriormente, reduzca el pH del preparado hasta menos de aproximadamente 6,0, es decir, que produzca un preparado de oleosomas que tenga una concentración $[H^+]$ de aproximadamente 10^{-6} moles por litro. En una realización preferida, el compuesto ácido se escoge por su capacidad para reducir así el pH de la composición oleosómica hasta entre aproximadamente 5,0 y
40 aproximadamente 6,0, más preferentemente entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 4,0, y lo más preferentemente entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 3,5. En el presente contexto, son ilustrativos de la clase de compuestos ácidos adecuados el ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido benzoico, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido retinoico, ácido láctico, ácido sórbico, ácido glucónico, ácido deshidroacético, ácido hialurónico, ácido málico, ácido fumárico y ácido salicílico, y cualquier mezcla de los mismos. Para un preparado de
45 oleosomas destinado a formularse en forma de un producto cosmético con propiedades de exfoliación, se prefiere el uso de ácido glicólico, ácido láctico, ácido retinoico y/o ácido salicílico.

Preparación de preparados de oleosomas estabilizados

50 Un preparado de oleosomas de la invención comprende preferentemente al menos un 1 % en volumen de oleosomas. Más preferentemente, un preparado de oleosomas comprende al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 75 % en volumen de oleosomas.

55 Para estabilizar dichos preparados, de acuerdo con la invención, se añade preferentemente un alcohol multihídrico al preparado de oleosomas antes de añadir el compuesto ácido. Tras su adición, el alcohol multihídrico se dispersa en el preparado de oleosomas simplemente mediante mezclado o agitación, usando un agitador de hélice de un agitador magnético de baja cizalla (normalmente inferior a 500 rpm) y una barra de agitación, por ejemplo. En operaciones mayores se puede emplear un mezclador en línea o homogeneizador convencional, o cualquier otro medio que sea eficaz para obtener una mezcla homogénea, siempre que las fuerzas de cizalla generadas durante el
60 proceso de mezcla o agitación sean moderadas y los oleosomas permanezcan intactos.

Como se ha mencionado anteriormente, la cantidad de la fase acuosa dentro de un preparado de oleosomas puede variar. El alcohol multihídrico forma parte de la fase acuosa del preparado de oleosomas. Cuando se usa un diol, triol o poliol no proteico, la concentración de alcohol multihídrico varía preferentemente entre el 15 % y 95 % en volumen de la fase acuosa del preparado de oleosomas, y más preferentemente entre el 25 % y 75 % en volumen e incluso más preferentemente entre el 40 % y 60 % en volumen de la fase acuosa. Lo más preferentemente, el alcohol

multihídrico no proteico y el agua están presentes en partes iguales dentro del preparado de oleosomas estabilizado. Cuando el alcohol multihídrico es un péptido o un polipéptido, entonces la concentración de alcohol multihídrico varía preferentemente entre el 0,5 % y 10 % en volumen de la fase acuosa del preparado de oleosomas, más preferentemente entre el 0,5 % y el 5 % en volumen e incluso más preferentemente entre 0,5 % y 3,5 % en volumen.

Con la mezcla completamente mezclada de oleosomas y alcohol multihídrico así obtenida, se ajusta el pH del preparado mediante la adición de un compuesto ácido capaz de reducir el pH a 6 o menos y la dispersión del ácido en el preparado de oleosomas. El volumen de compuesto ácido requerido depende del compuesto ácido o de la mezcla de compuestos ácidos usados, pero, en general, está limitado preferentemente al 10 % en volumen. Se pueden emplear instrumentos convencionales tales como un medidor de pH electrónico convencional, para controlar el pH del preparado durante la adición del compuesto ácido, con el fin de garantizar que se consiga el pH deseado. Como se ha mencionado anteriormente, el alcohol multihídrico se añade preferentemente antes del compuesto ácido, ya que se desea ajustar el pH como la etapa final. Sin embargo, es posible invertir el orden o añadir ambos compuestos juntos, una vez que se haya establecido un proceso reproducible y se sepa qué cantidad del compuesto ácido se requiere.

El proceso anterior de estabilización de oleosomas se puede realizar a temperatura y presión ambiente, y se realiza preferentemente inmediatamente después de obtenerse el preparado de oleosomas a partir de su fuente biológica. Sin embargo, el proceso puede realizarse a la hora de la obtención del preparado de oleosomas, o incluso en las 12 horas siguientes a la obtención del preparado de oleosomas. El proceso de estabilización también puede incluirse como parte del proceso continuo para el aislamiento de oleosomas, como se ha descrito anteriormente.

Para evaluar la estabilidad de los oleosomas, se puede controlar la aparición del aceite libre mediante examen visual, es decir, mediante la aparición de gotitas de aceite dentro del preparado de oleosomas o mediante una metodología analítica más cuantitativa, por ejemplo, extracción con hexano (véase el Ejemplo 4 que figura más adelante). Preferentemente, el aspecto físico de un preparado de oleosomas de la invención, cuando se almacena a temperatura ambiente durante 2 años o a 45 °C durante 2 meses, no experimenta cambios significativos y no cambia ninguna de las propiedades oleosómicas ni la constitución química. Al almacenar un preparado de oleosomas de la invención a 45 °C durante 2 meses, preferentemente el 95 % o más en volumen del contenido total de aceite del preparado de oleosomas permanece dentro de los oleosomas (es decir, menos del 5 % en volumen de aceite libre), más preferentemente, el 99 % o más en volumen (menos del 1 % en volumen de aceite libre) y lo más preferentemente, el 100 % en volumen (sin aceite libre).

La presente invención comprende además nuevas preparadas de oleosomas. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un preparado de oleosomas con (i) un alcohol multihídrico e (ii) una concentración $[H^+]$ de 10^{-6} moles por litro o más. Dicha composición puede comprender una concentración $[H^+]$ de 10^{-5} moles por litro o más, o una concentración $[H^+]$ de 10^{-4} moles por litro o más, o una concentración $[H^+]$ de $10^{-3.5}$ moles por litro o más. La composición puede contener cualquiera de los ácidos y alcoholes multihídricos anteriormente mencionados.

Utilidad de los preparados de oleosomas estabilizados

El preparado de oleosomas estabilizado obtenido de acuerdo con la presente invención se puede usar como ingrediente para preparar una multitud de formulaciones finales, como se describe, por ejemplo, en las patentes de Deckers, en la solicitud PCT 2005/030169 y en la solicitud PCT 2005/097059, mediante la adición al preparado de oleosomas de uno o más compuestos adicionales. La expresión "formulación final" designa aquella formulación, lista para su uso final previsto.

Una formulación final se puede presentar en una amplia variedad de formas, incluyendo, pero sin limitación, una crema, un gel, una loción, un sólido ceroso, una pomada, un bálsamo, una pasta, un pulverizado o una leche. Ventajosamente, el preparado de dicha formulación puede realizarse en ausencia de emulsionantes exógenos.

Las formulaciones finales de la presente invención se ilustran mediante formulaciones de aplicación tópica en la superficie de un mamífero, incluyendo productos de cuidado personal, productos cosméticos, productos farmacéuticos aplicados por vía tópica, productos para el cuidado de la piel, productos cosmocéuticos, productos dermatológicos y productos veterinarios aplicados por vía tópica. Otros productos que se pueden formular usando un preparado de oleosomas como se ha descrito anteriormente son productos alimentarios, nutracéuticos y suplementos nutricionales, así como productos farmacéuticos e industriales.

Como se ha mencionado anteriormente, los oleosomas preparados de acuerdo con la presente invención son particularmente útiles en la fabricación de productos que se mantienen a un pH ácido en su forma final. En particular, productos para el cuidado de la piel que comúnmente se formulan en forma de un producto final a un intervalo de pH de la piel humana, entre aproximadamente 5,0 y 6,0. Otros productos para el cuidado personal que se pueden formular ventajosamente con los oleosomas preparados de acuerdo con la invención son productos exfoliantes, que normalmente tienen un pH de entre 3,5 y 4,5 y tratamientos del acné, que también tienen un pH < 5. Además, los preparados de oleosomas de la invención son útiles en la fabricación de formulaciones finales, ilustradas por

productos de cuidado personal tales como desinfectantes para manos, que contienen un alto porcentaje en volumen de alcohol monohídrico, incluyendo alcohol etílico.

5 La presente invención se describe además haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que son solo ilustrativos y no limitantes de la invención.

Ejemplo 1. Obtención de un preparado de oleosomas a partir del cártamo

10 El presente ejemplo describe la recuperación de la fracción oleosómica del cártamo. El preparado resultante contiene oleosomas lavados intactos.

15 *Descontaminación de las semillas.* Se lavó un total de 45 kg de semilla de cártamo seco (*Carthamus tinctorius*) dos veces usando aproximadamente 120 l de agua corriente a 65 °C y una vez usando aproximadamente 120 l de agua corriente a aproximadamente 15 °C. El lavado se llevó a cabo en un barril con malla de tamiz para separar las aguas residuales.

20 *Molienda de las semillas.* Se vertieron las semillas lavadas a través de la tolva de un molino coloidal (Molino coloidal, MZ-130 (Fryma), capacidad: 350 kg/h), que estaba dotado de un conjunto de molienda de rotor/estator dentado transversal MZ-130 y una tolva de carga superior, mientras que se suministraban aproximadamente 100 l de tampón de bicarbonato sódico 45 mM a pH 8,2 a través de una manguera conectada externamente antes de la molienda. El funcionamiento del molino se realizó con un ajuste de separación de 1R, escogido para conseguir un tamaño de partícula inferior a 100 micrómetros a 18 °C y 30 °C. Se molió el total de los 45 kg de semillas en 10 minutos.

25 *Homogenización y extracción de sólidos.* Se bombeó la suspensión resultante a un homogeneizador en línea de cuchillas (Dispax Reactor® DR 3-6/A, IKA® Works, Inc.) a una velocidad de aproximadamente 7 l/min. La suspensión de salida se introdujo directamente en una centrifugadora de decantación (NX-314B-31, Alfa-Laval) después de llevar la centrifugadora a una velocidad de funcionamiento de 3.250 rpm. En 25 minutos, se decantaron aproximadamente 160 kg de suspensión molida de semillas.

30 *Separación de los oleosomas.* La separación de la fracción oleosómica se realizó usando un separador de centrifugadora de disco (SB 7, Westfalia) dotado de un cuenco de separación y autolimpieza trifásico y una serie de filtros de anillo extraíbles; capacidad máxima: 83 l/min; filtro de anillo: 69 mm. La velocidad operativa fue de ~8.520 rpm. Se usó una bomba peristáltica Watson-Marlow (Modelo 704) para bombear la fase líquida decantada (DL) a la centrifugadora después de llevarla a la velocidad operativa. Esto produce la separación de la fase líquida decantada en una fase pesada (HP1) que comprende agua y proteínas de semillas solubles, y una fase ligera (LP1) que comprende cuerpos oleosos. La fracción oleosómica, que se obtuvo después de pasar una vez a través de la centrifugadora, se denomina preparado de oleosomas sin lavar. Se pasó entonces dicha fracción oleosómica sin lavar a través de un mezclador estático en línea, mezclando con tampón de bicarbonato sódico 45 mM (pH 8,2) (35 °C, 4 l/min) a un segundo separador de centrifugadora de discos (SA 7, Westfalia); capacidad máxima: 83 l/min; filtro de anillo: 73 mm. La velocidad operativa fue de ~8.520 rpm. Se pasó entonces la fase ligera separada (LP2) que comprende el oleosoma a través de otro mezclador estático en línea mezclando con pH 8, tampón de bicarbonato sódico 45 mM (pH 8,2) (35 °C, 4 l/min) al tercer separador de centrifugadora de discos (SA 7, Westfalia); capacidad máxima: 83 l/min; filtro de anillo: 75 mm. La velocidad operativa fue de ~8.520 rpm. Todo el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente. Todos los preparados obtenidos después de la segunda separación se denominan preparados de oleosomas lavados.

45

Ejemplo 2. Preparación de un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado a un pH de aproximadamente 4,5 en presencia de un alcohol multihídrico, glicerina

50 A 100 g de una dispersión de sólidos al 75 % de oleosomas de cártamo, se añadieron 25 g de glicerina pura (99 % + pureza) con mezcla de baja cizalla. Esto redujo el nivel total de oleosomas al 60 % (20 % de agua, 20 % de glicerina). El pH de esta dispersión normalmente es > 8,5. Se añadieron, a la dispersión con agitación de baja cizalla, 1,25 g de un conservante comercial Geogard Ultra que consiste en una mezcla de glucono-delta-lactona y ácido benzoico que redujo el pH de la dispersión a 4,2-4,5. Se sometió la dispersión a un ensayo de estimulación microbiana, y no se observó ninguna fuga de los oleosomas después de 6 meses a 25 °C.

55

Ejemplo 3. Preparación de un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado a un pH de aproximadamente 4,5 en presencia de un alcohol multihídrico, decaglicerina

60 A 100 g de una dispersión de sólidos al 75 % de oleosomas de cártamo, se añadieron 25 g de Natrulon H-10 (decaglicerina, de Lonza) bajo un propulsor a 400 rpm durante 10 minutos. Esto redujo el nivel total de oleosomas al 60 % (20 % de agua, 20 % de decaglicerina). El pH de esta dispersión era normalmente de 7,5. Se añadieron, a la dispersión con agitación de baja cizalla, 1,25 g de un conservante comercial Geogard® Ultra de Lonza, que consiste en una mezcla de glucono-delta-lactona y ácido benzoico. Una vez equilibrado, el conservante redujo el pH de la dispersión a 4,5.

65

Ejemplo 4. Estabilidad de un preparado de oleosomas de cártamo a un pH de aproximadamente 4,5 en presencia y en ausencia de un alcohol multihídrico

Los preparados de oleosomas estabilizados se prepararon de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2.

5

| | |
|--|---|
| Tipo de oleosoma | pH < 4,5 |
| Formulación de oleosomas estabilizada | La formulación es estable. Sin fugas (exploración visual) |
| Formulación de oleosomas no estabilizada | Separación de capa acuosa y oleosa (exploración visual) |

La siguiente metodología se puede usar para evaluar, de una manera cuantitativa, la estabilidad de un preparado de oleosomas:

- 10 1. Se marcan y se pesan 4 (cuatro) tubos de ensayo Pyrex con tapa de rosca, limpios y secos, de 16 x 100 mm ($\pm 0,0001$ g) por muestra. Se marcan con el nombre de la muestra A y T1, el nombre de la muestra B y T1, y luego se repite sustituyendo T1 con T2. Se registran los valores. Se añade 1 ml de muestra de oleosoma.
- 15 2. Se invierte el recipiente de muestra de 10 a 12 veces para mezclar bien la muestra y se aplica con una pipeta de inmediato 1 ml de muestra usando una punta de pipeta de 1 ml de ancho.
3. Se transfiere la muestra por duplicado a los números de tubo T1.
4. Se limpia cualquier muestra de la parte superior del tubo y se vuelven a pesar los tubos que contienen las muestras ($\pm 0,0001$ g). Se registran los valores.
5. Se añaden 3 ml de hexano puro a los tubos con la muestra, se tapa el tubo con tapa de teflón, se agita y se mezcla vigorosamente durante 30 segundos, tratando de incorporar cualquier muestra pegada a los lados del tubo.
- 20 6. Se centrifuga la muestra en una centrifugadora clínica a velocidad completa de 3.000 rpm durante 2 minutos hasta obtenerse una muestra de microgránulos. El aceite libre permanecerá en el hexano (capa superior) y los cuerpos oleosos/resto de la muestra se aglomerarán.
7. Usando una pipeta de transferencia de vidrio, se retira con cuidado la mayor cantidad de hexano que contenga el aceite libre de la parte superior de la muestra y se transfiere al tubo T2. Se coloca el tubo T2 en el bloque calefactor y se repiten las etapas 6 y 7. Las extracciones posteriores se colocarán en T2.
- 25 8. Se evapora el hexano de las muestras sometiendo los tubos a una corriente suave de gas N₂ de alta pureza (colector Pierce Reacti-Vap) mientras se calienta el bloque a 40-45 °C. Se evapora el hexano durante al menos una hora.
9. Se vuelven a pesar los tubos que contienen aceite libre y se vuelve a realizar la evaporación con N₂ durante 15 minutos.
- 30 10. Se vuelven a pesar los tubos hasta que dos lecturas sucesivas sean iguales ($\pm 0,0002$). Esto representa el aceite libre con todos los disolventes eliminados.

35 Cálculos de las muestras:

Masa de la muestra:

Masa del tubo 1: 11,9365 g
 Masa del tubo 1 + muestra: 12,4022 g
 Masa de la muestra: 0,4657 g

Masa del tubo 2: 12,0706 g
 Masa del tubo 2 + muestra: 12,0865 g
 Masa de la muestra: 0,0159 g

40 Descomposición de los cuerpos oleosos causada por el hexano puro = 0,0040 g por extracción.

Aceite libre como un % de la muestra: $(\text{masa de la muestra T2} - \text{corrección}) / (\text{muestra de T1}) \times 100$
 $= (0,0159 - 0,0120 / 0,4657) \times 100$
 $= 0,84 \%$

45 Ejemplo 5. Preparación de una crema para la piel que comprende un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado a un pH de aproximadamente 6 o inferior en presencia de un alcohol multihídrico

ES 2 626 091 T3

| <u>INGREDIENTE</u> | <u>PORCENTAJE</u> |
|--|-------------------|
| <u>Fase 1. Fase oleosa</u> | |
| Oleosomas estabilizados con glicerina (que consisten en oleosomas al 59,33 %, agua al 19,33 %, glicerina al 19,33 %, Geogard Ultra al 1 %) | 10,0 % |
| Decaoleato de decaglicerilo | 5,0 % |
| <u>Fase 2. Fase acuosa</u> | |
| Agua | 70,2 % |
| Decaglicerina | 5,0 % |
| NaOH (0,25 N) | 6,20 % |
| <u>Fase 3</u> | |
| Aristoflex AVC (Copolímero de acriloldimetiltaurato de amonio/VP) | 1,3 % |
| <u>Fase 4</u> | |
| Geogard Ultra (Glucono-delta-lactona y ácido benzoico) | 2,0 % |
| <u>Fase 5</u> | |
| Perfume | 0,30 % |

PROCEDIMIENTO

- 5 1. Se añaden los ingredientes de la Fase 1 juntos con agitación de baja cizalla.
2. Se añaden los ingredientes de la Fase 2 juntos, a pH de aproximadamente 11.
- 10 3. Se añade lentamente la Fase 2 a la Fase 1 con mezclado de baja cizalla. La homogeneidad se realizará muy rápidamente (normalmente en menos de un minuto).
4. Se añade lentamente la Fase 3 con un mezclado de alta pureza (500 rpm).
- 15 5. Se añaden la Fase 4 y la Fase 5, y se agita durante otros 5 minutos. Se comprueba el pH y se ajusta a entre 5 y 6.

Ejemplo 6. Preparación de un producto exfoliante que comprende un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado a un pH de aproximadamente 4.0 en presencia de un alcohol multihídrico

| <u>INGREDIENTE</u> | <u>PORCENTAJE</u> |
|--|-------------------|
| <u>Fase 1. Fase oleosa</u> | |
| Oleosomas estabilizados con glicerina (que consisten en oleosomas al 59,33 %, agua al 19,33 %, glicerina al 19,33 %, Geogard Ultra al 1 %) | 12,5 % |
| <u>Fase 2. Fase acuosa</u> | |
| Ácido glicólico (activo al 70 %) | 8,0 % |
| Agua | 74,25 % |
| Hidróxido sódico cs hasta pH 4,0 | 1,5 % |
| <u>Fase 3</u> | |
| Aristoflex AVC (Copolímero de acriloldimetiltaurato de amonio/VP) | 1,5 % |
| <u>Fase 4</u> | |
| Geogard Ultra (Glucono-delta-lactona y ácido benzoico) | 2,0 % |
| <u>Fase 5</u> | |
| Perfume | 0,25 % |

PROCEDIMIENTO

- 5 1. Se añaden los ingredientes de la Fase 2 juntos con enfriamiento y agitación. Se comprueba el pH, que debe ser de aproximadamente 4,0.
2. Se añade lentamente la Fase 2 a la Fase 1 con mezclado de baja cizalla. La homogeneidad se realizará muy rápidamente (normalmente en menos de un minuto).
- 10 3. Se añade lentamente la Fase 3 con un mezclado de alta pureza (500 rpm). Primero se coagulará, y luego se volverá a dispersar gradualmente y espesará la mezcla.
4. Se añaden la Fase 4 y la Fase 5, y se agita durante otros 5 minutos.

15 Ejemplo 7. Preparación de una loción hidratante que comprende un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado a un pH de aproximadamente 5,2 en presencia de un alcohol multihídrico

| <u>INGREDIENTE</u> | <u>PORCENTAJE</u> |
|---|-------------------|
| <u>Fase 1</u> | |
| Oleosomas estabilizados con glicerina (que consisten en oleosomas al 59,33 %, agua al 19,33 %, glicerina al 19,33 %, Geogard Ultra al 1 %) | 10 % |
| Decaoleato de decaglicerilo | 5 % |
| Metoxicinamato de octilo | 2 % |
| <u>Fase 2</u> | |
| Glicerina | 5 % |
| Agua | 74,9 % |
| <u>Fase 3</u> | |
| Aristoflex AVC (Copolímero de acriloldimetiltaurato de amonio/VP) | 1,1 % |
| <u>Fase 4</u> | |
| Geogard Ultra (Glucono-delta-lactona y ácido benzoico) | 2,0 % |
| NaOH | cs |

PROCEDIMIENTO

- 20 1. Se mezcla la Fase 1 durante 8-10 min a 300-500 rpm.
2. Se añade la Fase 2 a la Fase 1 en incrementos mientras se mezcla a 500 rpm durante 10 min.
- 25 3. Se añade la Fase 3 y se mezcla a 700 rpm durante otros 5 minutos.
4. Se añade la Fase 4 y se ajusta el pH hasta 5,0-5,5 con NaOH con agitación (700 rpm).
5. Viscosidad, 70.000 mPa.s (70.000 cp) (TC del huso a 2 rpm y 25 °C).
- 30 Ejemplo 8. Preparación de una crema exfoliante que comprende un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado a un pH de aproximadamente 4.0 en presencia de un alcohol multihídrico

| <u>INGREDIENTE</u> | <u>PORCENTAJE</u> |
|---|-------------------|
| <u>Fase 1</u> | |
| Oleosomas estabilizados con glicerina (que consisten en oleosomas al 59,33 %, agua al 19,33 %, glicerina al 19,33 %, Geogard Ultra al 1 %) | 10 % |
| Decaoleato de decaglicerilo | 5 % |
| Metoxicinamato de octilo | 2 % |
| <u>Fase 2</u> | |

ES 2 626 091 T3

| <u>INGREDIENTE</u> | <u>PORCENTAJE</u> |
|--|-------------------|
| Ácido glicólico (70 %) | 8 % |
| Agua | 73,5 % |
| <u>Fase 3</u> | |
| Aristoflex AVC (Copolímero de acriloldimetiltaurato de amonio/VP) | 1,1 % |
| <u>Fase 4</u> | |
| Ácido deshidroacético (DHA), ácido salicílico, ácido benzoico y cloruro de bencetonio (Geogard 361) | 0,4 % |
| NaOH | cs |

PROCEDIMIENTO

- 5 1. Se mezcla la Fase 1 durante 8-10 min a 300-500 rpm.
2. Se añade la Fase 2 a la Fase 1 en incrementos mientras se mezcla a 300-500 rpm durante 10 minutos.
3. Se añade la Fase 3 y se mezcla a 700 rpm durante otros 5 minutos.
- 10 4. Se añade la Fase 4 y se ajusta el pH hasta 4,0 con NaOH con agitación (700 rpm) durante 2 minutos.
5. Viscosidad, 150.000 mPa.s (150.000 cp) (TC del huso a 2 rpm y 25 °C).

15 Ejemplo 9. Preparación de una crema hidratante natural que comprende un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado a un pH de aproximadamente 5,3 en presencia de un alcohol multihídrico

| <u>INGREDIENTE</u> | <u>PORCENTAJE</u> |
|---|-------------------|
| <u>Fase 1</u> | |
| Oleosomas estabilizados con glicerina (que consisten en oleosomas al 59,33 %, agua al 19,33 %, glicerina al 19,33 %, Geogard Ultra al 1 %) | 10 % |
| Decaoleato de decaglicerilo | 5 % |
| TiO ₂ (modificado hidrófobamente) | 2 % |
| <u>Fase 2</u> | |
| Glicerina | 5 % |
| Agua | 74,9 % |
| <u>Fase 3</u> | |
| Carragenano (Genuvisco) | 1,1 % |
| <u>Fase 4</u> | |
| Geogard Ultra (Glucono-delta-lactona y ácido benzoico) | 2,0 % |
| NaOH | cs |

PROCEDIMIENTO

- 20 1. Se mezcla la Fase 1 durante 10 min a 300-500 rpm.
2. Se añade la Fase 2 a la Fase A en incrementos mientras se mezcla a 300-500 rpm durante 10 min.
3. Se añade la Fase 3 y se mezcla a 700 rpm durante otros 5 minutos.
- 25 4. Se añade la Fase 4, y se agita durante 2 minutos a 700 rpm.
5. Se ajusta el pH a 5,0-5,5 con NaOH.
- 30 6. Viscosidad de aproximadamente 40.000 mPa.s (40.000 cps).

Ejemplo 10. Preparación de una crema hidratante natural que comprende un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado a un pH de aproximadamente 5,7 en presencia de un alcohol multihídrico

| <u>INGREDIENTE</u> | <u>PORCENTAJE</u> |
|---|-------------------|
| <u>Fase 1</u> | |
| Oleosomas estabilizados con glicerina (que consisten en oleosomas al 59,33 %, agua al 19,33 %, glicerina al 19,33 %, Geogard Ultra al 1 %) | 10 % |
| TiO ₂ (modificado hidrófobamente) | 1 % |
| <u>Fase 2</u> | |
| Glicerina | 10 % |
| Agua | 76,75 % |
| <u>Fase 3</u> | |
| Carragenano (Genuvisco) | 1,1 % |
| <u>Fase 4</u> | |
| Conservante de tipo glucosa oxidasa/lacto peroxidasa | 1,15 % |
| HCl | cs |

5 PROCEDIMIENTO

1. Se mezcla la Fase 1 durante 10 min a 300-500 rpm.
2. Se añade la Fase 2 a la Fase 1 en incrementos mientras se mezcla a 300-500 rpm durante 10 min.
3. Se añade la Fase 3 y se mezcla a 700 rpm durante otros 5 minutos.
4. Se añade la Fase 4, y se agita durante 2 minutos a 500 rpm.
5. Se ajusta el pH a 5,5-6,0 con HCl.
6. Viscosidad de aproximadamente 42.000 mPa.s (42.000 cps).

20 Ejemplo 11. Preparación de una crema hidratante que comprende un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado a un pH de aproximadamente 5,3 en presencia de un alcohol multihídrico (decaglicerina)

| <u>INGREDIENTE</u> | <u>PORCENTAJE</u> |
|---|-------------------|
| <u>Fase 1</u> | |
| Oleosomas convencionales (oleosomas al 75 %, agua al 25 %) | 10,0 |
| Natrulon H-10 (Decaglicerina/Agua) | 2,50 |
| <u>Fase 2</u> | |
| Polyaldo DGDO (10-10-0) (Poliglicerol-10 Decaoleato) | 5,00 |
| Uvinul MC 80 (Etilhexil-metoxicinnamato) | 2,00 |
| Perfume | 0,50 |
| <u>Fase 3</u> | |
| Agua DI | 77,90 |
| <u>Fase 4</u> | |
| Geogard Ultra (Gluconolactona/Benzoato de sodio) | 1,00 |
| Aristoflex AVC (Copolímero de acriloidimetiltaurato de amonio/VP) | 1,10 |

PROCEDIMIENTO

- 25 1. Se prepara el preparado de oleosomas estabilizado con decaglicerina mediante la combinación de la Fase 1 bajo un propulsor y el mezclado durante 10 minutos a 400 rpm.
2. Se añade la Fase 2 en el orden que aparece y se mezcla durante otros 10 minutos.

3. Se añade la Fase 3 en incrementos y se mezcla bajo un propulsor durante 20 minutos; se aumenta lentamente la velocidad de 400 a 650 rpm.
4. Se añade la Fase 4 en el orden que aparece y se mezcla a 650 rpm hasta que el lote es uniforme y espeso. Se ajusta el pH a 5,2-5,5.

5 Ejemplo 12. Preparación de un desinfectante para las manos que comprende un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado en presencia de un alcohol multihídrico

(no de acuerdo con la invención).

10

| <u>INGREDIENTE</u> | <u>PORCENTAJE</u> |
|---|-------------------|
| <u>Fase 1</u> | |
| Oleosomas estabilizados con glicerina (que consisten en oleosomas al 59,33 %, agua al 19,33 %, glicerina al 19,33 %, Geogard Ultra al 1 %) | 12,5 |
| Perfume | 0,3 |
| <u>Fase 2</u> | |
| Agua desionizada | 30,0 |
| <u>Fase 3</u> | |
| Alcohol etílico | 55,0 |
| <u>Fase 4</u> | |
| Methocel J75M (Hidroxipropilmetilcelulosa) Amercol | 1,0 |
| <u>Fase 5</u> | |
| Solución de hidróxido sódico | cs |
| Solución de ácido cítrico | cs |

PROCEDIMIENTO

1. Bajo un propulsor, se combinan los ingredientes de la Fase 1 y se mezclan durante 10 minutos a 400 rpm.
2. Se añade la Fase 2 lentamente en incrementos. Se aumenta la velocidad hasta 600 rpm y se mezcla durante 10 minutos.
3. Una vez introducida toda el agua, se inicia lentamente la adición de la Fase 3 y se mezcla durante 10 minutos.
4. Se añade lentamente la Fase 4 y se mezcla durante 20 minutos para dispersar adecuadamente la goma.
5. Se añade hidróxido sódico hasta aumentar el pH hasta 8,5-9,0 para espesar la goma. Se mezcla hasta que se vuelve uniforme.
6. Se añade ácido cítrico para ajustar el pH hasta 6,5-7,0.

25 Ejemplo 13. Preparación de una margarina que comprende un preparado de oleosomas de cártamo estabilizado en presencia de un alcohol multihídrico

| <u>INGREDIENTE</u> | <u>GRAMOS</u> |
|---|---------------|
| Aceite de palma | 1.500 |
| Aceite de soja | 1.653 |
| Agua | 751,2 |
| Sal | 72 |
| Oleosomas estabilizados con glicerina (que consisten en oleosomas al 59,33 %, agua al 19,33 %, glicerina al 19,33 %, Geogard Ultra al 1 %) | 10,8 |
| Lecitina | 8 |
| Ácido láctico | 1,8 |
| Betacaroteno | 0,28 |
| Sorbato de potasio | 3 |

PROCEDIMIENTO

1. Se añade el aceite de soja a una caldera. Con agitación, se calienta hasta 54,4 °C (130 °F).
2. Se añade el aceite de palma y se mantiene la temperatura.
- 5 3. Con agitación, se añade la lecitina. Se mezcla durante 5 minutos.
4. En una caldera separada, se añade el agua y se calienta hasta 60 °C (140 °F).
5. Con agitación, se añade la sal, el ácido láctico y el sorbato de potasio. Se mezcla durante 5 minutos.
6. Se añaden los oleosomas estabilizados con glicerina. Se mezcla durante 5 minutos.
7. Con agitación, se añade el betacaroteno a la mezcla de aceite.
- 10 8. Se combinan las mezclas de aceite y de agua, y se mantiene la temperatura a 54,4 °C (130 °F). Se mezcla durante 10 minutos.
9. Se realiza la homogenización y el procesamiento a temperatura ultra-alta.

15 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a lo que actualmente se considera que son los ejemplos preferidos, se ha de entender que la invención no se limita a los ejemplos desvelados. Por el contrario, la invención pretende cubrir diversas modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas dentro del espíritu y del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes se incorporan por referencia en su totalidad en la misma medida que si cada una de dichas publicaciones, patentes o solicitudes de patente se indicara de forma específica e individualizada como incorporada por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de un preparado de oleosomas estabilizado que comprende:
 - 5 (a) proporcionar un preparado de oleosomas; y
 - (b) mezclar el preparado de oleosomas en presencia de (i) un alcohol multihídrico y (ii) un ácido capaz de reducir el pH de dicho preparado de oleosomas hasta un pH inferior a 6,0.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el preparado de oleosomas estabilizado comprende menos del 5 % en volumen de aceite libre cuando se almacena a 45 °C durante un período de dos meses.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el preparado de oleosomas comprende oleosomas a al menos 1 %.
- 15 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que el alcohol multihídrico es un diol, triol o poliol no aromático.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el diol, triol o poliol no aromático tiene una masa molecular de 200.000 Da o inferior.
- 20 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que el alcohol multihídrico es un péptido o polipéptido compuesto de dos o más aminoácidos que contienen alcohol.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el aminoácido que contiene alcohol se selecciona del grupo que consiste en treonina y serina.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el péptido o polipéptido está presente en el preparado en una cantidad del 0,5 % al 3,5 %.