

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 234**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 25/28</b>	(2006.01)
<b>A23J 3/18</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/51</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/11</b>	(2006.01)
<b>B82Y 30/00</b>	(2011.01)
<b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/14</b>	(2006.01)
<b>B01J 13/02</b>	(2006.01)
<b>A23K 40/30</b>	(2006.01)
<b>A23P 10/30</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.02.2013 PCT/EP2013/052795**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13120856**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2013 E 13703613 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2814332**

54 Título: **Nanopartículas que comprenden una proteína hidrófoba vegetal y un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**13.02.2012 EP 12382049**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.11.2017**

73 Titular/es:

**BIONANOPLUS, S.L. (100.0%)  
Polígono Mocholí Plaza Cein, 5 - nave B14  
31110 Noáin- Navarra, ES**

72 Inventor/es:

**SALMAN, HESHAM H.A.;  
GOÑI AZCÁRATE, IZASKUN y  
ESPARZA CATALÁN, IRENE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 644 234 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

Nanopartículas que comprenden una proteína hidrófoba vegetal y un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y usos de las mismas

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a un sistema de administración nanoparticulado biocompatible que comprende nanopartículas a base de proteínas hidrófobas vegetales, particularmente zeína, y disolventes orgánicos no volátiles miscibles en agua que tienen alta capacidad de bioadhesión a la mucosa. La invención también se refiere a un método de autoensamblaje *in situ* que permite la formación espontánea de dichas nanopartículas y a los usos y aplicaciones de las mismas.

**10 Antecedentes de la invención**

Se han usado frecuentemente sistemas nanoparticulados o microparticulados biodegradables (sistemas particulados poliméricos: PPS) construidos con polímeros biocompatibles, biodegradables y no tóxicos como vehículos de administración de liberación controlada en muchas industrias [1-6]. Existe una amplia variedad de polímeros que se han aplicado para obtener nanosistemas, microsistemas, películas o implantes, por ejemplo poliésteres, polianhidridos, proteínas y polisacáridos, etc. [7-14].

Uno de los aspectos más relevantes relacionados con la producción de sistemas particulados poliméricos (PPS) es la complejidad de los procedimientos de ampliación a escala industrial, que se ha considerado un factor importante y crítico para la comercialización de estos sistemas. Se han desarrollado muchas técnicas para preparar PPS para la administración de fármacos tales como técnicas de emulsificación o evaporación de disolvente que implican el uso de disolventes volátiles tóxicos orgánicos (por ejemplo, diclorometano, acetato de etilo, cloroformo, acetona, etanol etc.), y la aplicación de dispositivos complejos especiales tales como homogeneizadores de alta cizalladura, tecnología de fluido supercrítico o secadores por pulverización. La implementación de dichas técnicas en la producción a gran escala todavía constituye un reto, ya que requiere etapas definidas que incluyen la viabilidad del procedimiento, la optimización de la formulación, la optimización del procedimiento, la ampliación a escala y la validación con el fin de desarrollar productos de calidad y proporcionar un enfoque racional para las etapas de producción, incluyendo la concentración del fármaco y la concentración del polímero, las operaciones de procesamiento, el tamaño de partícula, la estabilidad del fármaco o la eficacia de atrapamiento. Además, para desarrollar sistemas de administración comestibles adecuados para aplicaciones alimentarias, las normas requieren que los disolventes y los componentes o bien se reconozcan en general como seguros o bien se enumeren por la Food and Drug Administration como coadyuvantes de elaboración.

La zeína es una proteína vegetal aislada del maíz que pertenece a una familia de prolaminas que están compuestas por altas cantidades de aminoácidos hidrófobos, tales como prolina, glutamina y asparagina. La zeína es una proteína vegetal transparente, inodora, no tóxica, biodegradable e insoluble en agua. La zeína se ha investigado y usado como polímero en las industrias farmacéutica, médica, alimentaria, cosmética, adhesiva y de empaquetado [15].

En las industrias alimentaria y farmacéutica, la zeína se ha usado, por ejemplo, para recubrir con película materiales [16-17] y para formar PPS para estrategias de administración de fármacos tales como administración de fármacos mediante implante de liberación sostenida a base de nanopartículas [18-20], micropartículas [21-26] o polímeros [27]. Se han propuesto diversos métodos para obtener partículas de zeína. La mayoría de los métodos aplicados para preparar los sistemas particulados se basan en el uso de mezclas de disolventes orgánicos volátiles-disoluciones acuosas tales como sistemas de etanol o acetona-agua para disolver la zeína. Entonces, se añade la disolución de zeína a otro disolvente miscible para precipitar la zeína (método de evaporación-desplazamiento de disolvente) que forma partículas coloidales. En este contexto, se prepararon nanopartículas mediante la adición de una disolución madre de zeína disuelta en etanol al 85% a agua desionizada [28]. De manera similar, se prepararon nanopartículas de zeína cargadas con 5-fluorouracilo para transporte dirigido al hígado, disolviendo tanto el 5-fluorouracilo como la zeína en etanol al 70% (p/p) con la ayuda de fuerza ultrasónica. La disolución resultante se añadió inmediatamente a agua destilada [29]. De manera similar, se prepararon nanocápsulas que contenían aceite volátil a partir de disolución de zeína en etanol al 85% dispersadas con mezclado a alta velocidad en 40 ml de agua que contenía un 0,01% de fluido de silicona [20]. Se aplicó un procedimiento de anti-disolvente supercrítico para sintetizar micro- y nanopartículas de zeína para sistemas de administración comestibles de compuestos bioactivos [30].

La patente estadounidense 5.324.351 da a conocer una mezcla de disolventes para disolver zeína que comprende agua y, desde aproximadamente el 60 hasta aproximadamente el 90 por ciento, de un disolvente orgánico volátil seleccionado del grupo que consiste en etanol, acetona y mezclas de los mismos. Entonces se precipita la zeína vertiendo dicha disolución de zeína como corriente en una fase acuosa con mezclado continuo, de manera que la zeína precipita como partículas finas en una dispersión coloidal y finalmente se elimina el disolvente orgánico para obtener una dispersión acuosa que comprende desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 10 por ciento p/v de zeína [31].

La patente estadounidense 8.669.225 da a conocer un método de producción de nanopartículas no inmunogénicas que comprenden una proteína hidrófoba insoluble en agua tal como zeína, disolviendo dicha proteína en un disolvente hidroalcohólico (una mezcla de etanol y agua) para proporcionar una primera disolución en fase acuosa. Entonces, se añade un agente de tamponamiento a la primera disolución en fase acuosa en presencia de un tensioactivo y un fosfolípido para producir una segunda disolución en fase acuosa que tiene un pH de entre aproximadamente pH 6,8 y aproximadamente pH 7,4. Tras esto, dicha segunda disolución en fase acuosa se procesa para efectuar una reducción en el tamaño de diámetro de las partículas dentro de la disolución mediante cizalladura ultrasónica, homogenización a alta presión o una combinación de los mismos, y finalmente se evapora el disolvente residual para producir nanopartículas que tienen un tamaño de diámetro menor que aproximadamente 400 nm. Dicho método también requiere la aplicación de energía ultrasónica constante y una técnica de evaporación para eliminar el disolvente volátil etanol.

En todos los casos, el principal inconveniente de los métodos mencionados anteriormente para obtener nanopartículas de zeína es la necesidad de aplicar algunas técnicas para eliminar el disolvente orgánico volátil, tales como evaporación a presión reducida, liofilización o secado por pulverización.

Por tanto, es necesario desarrollar un método de autoensamblaje *in situ* sencillo que permita la formación espontánea de nanopartículas construidas con proteínas hidrófobas vegetales biocompatibles y biodegradables, particularmente zeína, evitando dicho método el uso de disolventes orgánicos volátiles o técnicas complejas tales como homogenización a alta cizalladura, tecnología de fluido supercrítico o secadores por pulverización y permitiendo la encapsulación eficaz de las moléculas en nanopartículas catiónicas o aniónicas a gran escala.

## Sumario de la invención

Se ha encontrado sorprendentemente que mezclando un disolvente orgánico no volátil miscible en agua aceptado de calidad farmacéutica, cosmética o alimentaria, tal como un poliol (por ejemplo, propilenglicol) o una mezcla de disolventes de dicho disolvente orgánico no volátil miscible en agua y otro disolvente orgánico no volátil miscible en agua tal como glicerol o poliéster (Labrasol®: polioxiglicéridos o macroglicéridos) que contiene una proteína hidrófoba vegetal, particularmente zeína, con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal tal como una disolución acuosa que actúa como no disolvente de zeína, opcionalmente en presencia de excipientes, permite la formación espontánea de nanopartículas con un tamaño pequeño muy homogéneo (de aproximadamente 120-500 nm) y alto rendimiento de nanopartículas (de aproximadamente el 98%). Los ejemplos muestran nanoesferas de matriz vacía (ejemplos 1 y 2), nanoesferas de matriz cargada (ejemplos 3-8) y nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza cargadas (ejemplos 9-10) según la invención que muestran dichas características fisicoquímicas.

Este método permite obtener nanopartículas con alta eficacia de encapsulación tanto de moléculas hidrófilas grandes como pequeñas (BSA, rodamina B, clorhexidina, etc.) así como de moléculas hidrófobas (curcumina, sonda fluorescente lipófila, etc.) sin necesidad de disolventes orgánicos volátiles adicionales (por ejemplo, acetona, isopropanol, etanol) o codisolventes (por ejemplo, CD) que habitualmente se aplican para obtener nanosistemas de zeína. Específicamente, el ejemplo 3 muestra que las nanopartículas obtenidas mediante el método de autoensamblaje *in situ* de la invención tienen una eficacia de encapsulación de moléculas hidrófilas grandes tales como proteínas que es 1,5 veces superior que las nanopartículas obtenidas mediante un método tradicional usando disolventes volátiles. El ejemplo 4 también muestra que la eficacia de encapsulación para moléculas hidrófilas pequeñas tales como rodamina B es superior en las nanopartículas según la invención en comparación con las nanopartículas obtenidas mediante un método tradicional.

Pueden obtenerse nanopartículas similares a partir de sistemas de disolventes binarios para zeína (véase el ejemplo 2). El uso de mezclas binarias de disolventes orgánicos no volátiles miscibles en agua que son materiales enumerados de calidad alimentaria no tóxicos, las convierte en atractivas para la incorporación de diferentes tipos de moléculas para la encapsulación adicional en zeína para diferentes industrias y aplicaciones.

Además, el método de fabricación de esta invención también permite formar nanopartículas (ZSNP) y nanocápsulas (ZSNC) catiónicas autoensambladas *in situ* en un fluido corporal una vez que la disolución, suspensión o emulsión que contiene zeína en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y un producto de interés (POI) se mezcla con dicho fluido; por consiguiente, pueden formarse espontáneamente *in situ* nanopartículas cargadas con POI en contacto con el fluido corporal (un medio acuoso).

Por otra parte, esta invención permite obtener PPS aniónicos a base de zeína recubriendo satisfactoriamente las nanopartículas con polianiones. El ejemplo 1 muestra nanoesferas de matriz vacía recubiertas o acomplejadas con goma arábiga para producir nanopartículas aniónicas que tienen un alto rendimiento. Los ejemplos 9 y 10 muestran nanocápsulas de núcleo-corteza cargadas con un aceite esencial que están recubiertas o contienen goma arábiga y que tienen una eficacia de encapsulación del 75-84%.

Otra ventaja importante de este método se refiere a la simplicidad del procedimiento para la fabricación de nanopartículas, puesto que el método de esta invención facilita la producción a escala industrial sin el uso de ningún aparato especial, homogeneizadores de alta cizalladura, técnicas de sonicación o evaporación de disolventes orgánicos volátiles tales como etanol o acetona. Las nanopartículas obtenidas pueden incorporarse fácilmente en

muchas formas farmacéuticas tales como disoluciones, suspensiones, geles y formas semisólidas o sólidas que se usan ampliamente en la industria cosmética, farmacéutica, agrícola o alimentaria. En este contexto, se ha observado que el procedimiento de ampliación a escala del método de fabricación de esta invención, los ajustes desde 1 l hasta 50 l no afectaron a las propiedades fisicoquímicas de los nanosistemas de zeína obtenidos tal como se muestra en el ejemplo 1.

Además, debido a las diferentes características de matriz de las nanopartículas de la invención, dichas nanopartículas muestran un aumento en la liberación de las moléculas hidrófilas encapsuladas en comparación con las nanopartículas obtenidas mediante un método tradicional, tanto cuando se usa fluido intestinal simulado como fluido salivar simulado, tal como se muestra en los ejemplos 4 y 8, respectivamente. De manera específica, las nanopartículas de la invención aumentan la liberación de moléculas hidrófilas encapsuladas en aproximadamente 1,4 y 2 veces en comparación con las nanopartículas obtenidas mediante métodos tradicionales.

Además, las nanopartículas de la invención muestran una alta afinidad bioadhesiva por superficies en un modelo de mucosa bucal porcina superior a la observada para otras nanopartículas obtenidas mediante un método tradicional usando disolventes orgánicos volátiles. Dicha bioadhesión garantiza un aumento eficaz de la liberación controlada de un producto de interés. Específicamente, el ejemplo 8 muestra que la capacidad bioadhesiva de las diferentes formulaciones de nanopartículas de la invención es aproximadamente 2-4 veces superior que la capacidad bioadhesiva de las nanopartículas preparadas mediante métodos tradicionales usando etanol.

En resumen, las nanopartículas de zeína obtenidas mediante la técnica de autoensamblaje espontáneo *in situ* de la invención muestran, entre otras, las siguientes propiedades: (i) distribución de tamaño homogénea a pequeña y gran escala; (ii) el uso de disolventes orgánicos no volátiles tales como propilenglicol, permite la formación de nanoesferas de matriz y nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza que contienen aceite sin necesidad de evaporación de disolventes orgánicos volátiles; (iii) alta eficacia para encapsular moléculas hidrófilas, hidrófobas y aceites sin necesidad de codisolventes o agentes complejantes; (iv) este método de fabricación de nanopartículas también permite formar nanopartículas autoensambladas *in situ* (ZSNP) en un fluido corporal una vez que la disolución que contiene zeína en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y un producto de interés (POI) se mezcla con dicho fluido (es decir, mediante administración subcutánea, por inyección u oral); (v) afinidad bioadhesiva superior a superficies de la mucosa en comparación con las nanopartículas de zeína preparadas mediante un método tradicional, (vi) alta facilidad para incorporarse en muchas formas farmacéuticas, por ejemplo, líquidas, sólidas o semisólidas, tales como suspensiones, geles, etc., y (vii) liberación superior del producto encapsulado en fluidos biológicos en comparación con las nanopartículas de zeína preparadas mediante un método tradicional. Todas las propiedades mencionadas anteriormente favorecen el uso de dichas nanopartículas en diferentes campos, tales como en los campos agrícola, alimentario, etc., especialmente en los campos cosmético y farmacéutico, como sistemas de administración de liberación controlada a diferentes superficies incluyendo, entre otros, el cabello, la piel, etc., o su administración mediante las vías bucal, nasal, oral, rectal, vaginal, transdérmica o parenteral, entre otras.

Por tanto, un objeto de la presente invención es la producción y usos de nanopartículas a base de una proteína hidrófoba vegetal y un disolvente orgánico no volátil miscible en agua.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula seleccionada del grupo que consiste en:

a) una nanoesfera de matriz, comprendiendo dicha nanoesfera de matriz una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua; y

b) una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza, comprendiendo dicha nanocápsula vesicular de núcleo-corteza un núcleo y una corteza, comprendiendo dicha corteza una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanopartícula en el que dicha nanopartícula es una nanoesfera de matriz que comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una disolución de la proteína hidrófoba vegetal en al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal con el fin de formar dicha nanopartícula y en el que la disolución de la proteína hidrófoba vegetal no comprende un disolvente orgánico volátil, en el que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en el que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanopartícula seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una nanoesfera de matriz que comprende un producto de interés, comprendiendo dicha nanoesfera de matriz una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua; y

- (b) una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza que comprende un producto de interés, comprendiendo dicha nanocápsula vesicular de núcleo-corteza un núcleo y una corteza, comprendiendo dicha corteza una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua,

5 comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una disolución, suspensión o emulsión que comprende la proteína hidrófoba vegetal y el producto de interés en al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal tal como un medio acuoso con el fin de formar dicha nanopartícula y

10 en el que la disolución, suspensión o emulsión que comprende la proteína hidrófoba vegetal y el producto de interés no comprenden un disolvente orgánico volátil y en el que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en el que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

15 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a una disolución que contiene una proteína hidrófoba vegetal en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y, opcionalmente, un medio acuoso, en la que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas, en la que el medio que comprende al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua no comprende un disolvente orgánico volátil y en la que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v) con la condición de que cuando la proteína hidrófoba vegetal es gliadina, entonces la cantidad de proteína hidrófoba vegetal es mayor que 0,1%, en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

25 En un quinto aspecto, la invención se refiere a una disolución, suspensión o emulsión que contiene una proteína hidrófoba vegetal y un producto de interés disuelto, suspendido o emulsionado en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y, opcionalmente, un tensoactivo, y, opcionalmente, un medio acuoso, en la que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas, en la que el medio que comprende al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua no comprende un disolvente orgánico volátil y en la que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v), en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

30 En un sexto aspecto, la invención se refiere a una suspensión de nanopartículas según la invención en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal tal como un medio acuoso, y no comprendiendo un disolvente orgánico volátil, en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

35 En un séptimo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende dos elementos:

- a) un primer elemento seleccionado del grupo que consiste en (i) al menos una nanopartícula según el primer aspecto de la invención; (ii) una disolución según el cuarto aspecto de la invención; (iii) una disolución, suspensión o emulsión según el quinto aspecto de la invención; y (iv) una suspensión según el sexto aspecto de la invención, y
- 40 b) un segundo elemento que consiste en un vehículo.

En un octavo aspecto, la invención se refiere a un producto alimenticio que comprende una nanopartícula proporcionada por esta invención.

45 En un noveno aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula según la invención en la que el producto de interés es el fármaco antimicrobiano clorhexidina para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una infección corporal externa o bucal.

En un décimo aspecto, la invención se refiere al uso de una nanopartícula de la invención, en el que el producto de interés es un aceite seleccionado de aceite de hígado de bacalao y ácido linolénico, como complemento dietético.

### Breve descripción de los dibujos

50 Figura 1. Fotografía de nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP-10) obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

Figura 2. Solubilidad de zeína en mezclas binarias de diferentes disolventes con propilenglicol (PG) como disolvente primario. El intervalo de punto final (representado por el punto de partida del % de aumento de turbidez con respecto a un aumento del 100%) indica el porcentaje de disolvente (v/v) en PG al que comienza a precipitar la zeína hasta lograr una precipitación de zeína total que se representa por el 100% de cambio de turbidez (punto en el que no

puede producirse precipitación). Las flechas indican, como ejemplo, el porcentaje (v/v) de Tween® 80 en la disolución de PG que contiene zeína al que comenzó la precipitación de zeína hasta lograr la precipitación completa.

Figura 3. Porcentaje acumulativo de rodamina B (RB) liberada a partir de las formulaciones de nanopartícula, tras la incubación de nanopartículas de zeína autoensambladas con RB preparadas a partir de disolventes de zeína diferentes incluyendo propilenglicol (RB-ZSNP-PG), mezcla de propilenglicol:glicerol (RB-ZSNP-PG:G) y mezcla de propilenglicol:Lutrol® L 44 (RB-ZSNP-PG:Lut); y nanopartículas de zeína con RB preparadas mediante el método tradicional (RB-NP tradicionales) en fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF) durante diferentes intervalos de tiempo.

Figura 4. Porcentaje acumulativo de rodamina B (RB) liberada a partir de las formulaciones de nanopartículas tras la incubación de nanopartículas de zeína autoensambladas con RB preparadas a partir de disolventes de zeína diferentes incluyendo propilenglicol (RB-ZSNP-PG), mezcla de propilenglicol:glicerol (RB-ZSNP-PG:G) y mezcla de propilenglicol:Lutrol® L 44 (RB-ZSNP-PG:Lut); y nanopartículas de zeína con RB preparadas mediante el método tradicional (RB-NP tradicionales) en fluido salivar simulado.

Figura 5. Ensayo de la cantidad adherida ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) de formulaciones de nanopartículas en tejido de mucosa bucal porcino en diferentes tiempos. Las formulaciones de nanopartículas de zeína autoensambladas con RB marcadas de manera fluorescente se prepararon a partir de disolventes de zeína diferentes incluyendo propilenglicol solo (RB-ZSNP-PG), mezcla de propilenglicol:glicerol (RB-ZSNP-PG:G) y mezcla de propilenglicol:Lutrol® L 44 (RB-ZSNP-PG:Lut), y las nanopartículas de zeína marcadas de manera fluorescente convencionales (RB-ZNP-T) preparadas mediante el método de evaporación de disolvente tradicional. Cada valor se representó mediante la media ( $n=3$ ; en todos los casos, la DE fue inferior al 20% de la media).

Figura 6. Eficacias de encapsulación de diferentes aceites esenciales en nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNC) y en formulaciones control preparadas a partir de las mismas disoluciones de propilenglicol (PG) y aceites sin zeína. Los controles P, T, C y E son controles de aceite de *Mentha piperita*, tomillo, canela y eugenol, respectivamente.

Figura 7. Fotografías de las muestras 1, 4, 7 y 10 seleccionadas de la tabla 11 como ejemplos ilustrativos y obtenidas mediante microscopía óptica.

Figura 8. Fotografías de nanopartículas de zeína autoensambladas catiónicas (ZSNC-L1) y micropartículas de zeína autoensambladas catiónicas (ZSMC-L1) cargadas con aceite de limón obtenidas mediante microscopía óptica.

Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión (MET) para nanopartículas de zeína autoensambladas catiónicas cargadas con aceite de limón (ZSNC-L1).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nanopartículas catiónicas y aniónicas, específicamente nanoesferas de matriz y nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza, obtenidas mediante una tecnología de autoensamblaje a base de una proteína hidrófoba vegetal, particularmente zeína, y un disolvente orgánico no volátil miscible en agua. La presente invención también proporciona métodos para producir dichas nanopartículas, y aplicaciones de dichas nanopartículas.

#### Definiciones

Con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se explica el significado de algunos términos y expresiones tal como se usan en el contexto de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término “proteína hidrófoba vegetal” se refiere a una proteína encontrada habitualmente en vegetales que está compuesta por grandes cantidades de aminoácidos hidrófobos tales como, por ejemplo, prolina, glutamina y asparagina. Estos aminoácidos hidrófobos hacen que la proteína sea insoluble en agua en su estado no desnaturalizado. La proteína hidrófoba vegetal de la invención es una proteína considerada como prácticamente insoluble por la Farmacopea Británica (BP) (es decir, que requiere más de 10.000 parte de disolvente (ml) por una parte de soluto (g) a una temperatura que oscila entre 15°C y 25°C). Dicha proteína hidrófoba vegetal puede ser una proteína obtenida directamente de la fuente vegetal u obtenida mediante técnicas de ingeniería genética. Un tipo particular de proteína hidrófoba vegetal es la familia de prolaminas. Las prolaminas pueden encontrarse en diversos granos de cereal tales como maíz, trigo, cebada, mijo, arroz y sorgo. Algunos ejemplos de prolaminas adecuadas para usarse en esta invención son zeína, gliadina, hordeína y kafirina, aunque la aplicación del método de esta invención no se limita necesariamente a estos ejemplos. Particularmente, se usó zeína en esta invención como modelo de proteína hidrófoba vegetal derivada de harina de gluten de maíz, un producto secundario del maíz, y es una mezcla de al menos cuatro tipos de proteínas:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -zeína, cada uno con una secuencia de aminoácidos, un peso molecular y una solubilidad diferentes.

“Tamaño promedio” o “tamaño medio”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al diámetro promedio de una población de nanopartículas que se mueven juntas en un medio acuoso. El tamaño promedio de estos

sistemas puede medirse mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica y que se describen, a modo de ilustración, en la parte experimental adjunta a los ejemplos descritos más adelante. El tamaño promedio de las partículas puede resultar afectado principalmente por la cantidad de la proteína hidrófoba vegetal, y por la naturaleza y la cantidad del producto de interés (si lo hay) presente en las nanopartículas de la invención (generalmente, cuanto mayor es la cantidad de dichos componentes, mayor es el tamaño promedio de las nanopartículas), y por algunos parámetros tales como la viscosidad, la concentración de la proteína hidrófoba vegetal y la presencia de otros disolventes o tensioactivos, etc.

“Potencial zeta promedio” o “potencial zeta medio”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la carga superficial promedio de una población de nanopartículas que se mueven juntas en un medio acuoso. El potencial zeta promedio de estos sistemas puede medirse mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica y que se describen, a modo de ilustración, en la parte experimental adjunta a los ejemplos descritos más adelante. El potencial zeta promedio de las partículas puede resultar afectado principalmente por la naturaleza y la cantidad del producto de interés (si lo hay) presente en las nanopartículas de la invención. Generalmente, el potencial zeta promedio de las nanopartículas será más negativo mediante la adición de polímeros o moléculas aniónicas o con cambios de pH para dichos componentes, y por algunos parámetros o por la presencia de otros disolventes o tensioactivos, etc.

Tal como se usa en el presente documento, el término “nanopartícula” se refiere a un sistema coloidal de una partícula sólida con un tamaño promedio inferior a 1 micrómetro ( $\mu\text{m}$ ), normalmente de entre 1 y 999 nanómetros (nm), preferiblemente de entre 50 y 500 nm, más preferiblemente de entre 100 y 400 nm, todavía más preferiblemente de entre 120 y 200 nm, todavía más preferiblemente de entre 120 y 160 nm aproximadamente, formada por una proteína hidrófoba vegetal y que incluye un disolvente orgánico no volátil miscible en agua en su composición. Dependiendo, entre otros hechos, de su método de fabricación, las nanopartículas pueden subdividirse en nanoesferas de matriz y “nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza” [32-34]. Las “nanoesferas de matriz” son formas de matriz formadas por una red tridimensional; cuando se carga una nanoesfera con un producto de interés, por ejemplo, un fármaco, dicho producto de interés puede dispersarse física y uniformemente en dicha red tridimensional. La matriz o la red tridimensional de las nanoesferas de matriz de la invención contiene una proteína hidrófoba vegetal y uno o más disolventes orgánicos no volátiles miscibles en agua. Las “nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza” son sistemas vesiculares formados por una cavidad interna (conocida como el “núcleo”) que contiene el producto de interés rodeado por una pared o membrana (conocida como la “corteza”), es decir, las nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza de la invención son sistemas nanovesiculares que presentan una estructura de núcleo-corteza típica en la que el producto de interés está confinado en un depósito o dentro de una cavidad (“núcleo”) rodeado por una pared o membrana de proteína hidrófoba vegetal (“corteza”) que también contiene uno o más disolventes orgánicos no volátiles miscibles en agua. El experto en la técnica conoce que el núcleo de la nanocápsula vesicular de núcleo-corteza puede contener sólo excipientes, puede contener cualquier producto de interés tal como se define más adelante en el presente documento (por ejemplo un compuesto que tiene actividad agrícola, cosmética, alimentaria o farmacéutica o mezclas de las mismas con o sin excipientes), o puede contener tanto excipientes como dicho producto de interés tal como se define más adelante en el presente documento.

En ambos casos, debido a la gran superficie específica de estos sistemas, las moléculas del producto de interés pueden quedar atrapadas o adsorbidas en la superficie de las nanopartículas.

Tal como se usa en el presente documento, un “producto de interés” o “POI” se refiere a cualquier compuesto susceptible de usarse en cualquier tipo de industria, por ejemplo, en las industrias agrícola, cosmética, alimentaria o farmacéutica. Prácticamente cualquier compuesto susceptible de usarse en cualquier tipo de industria puede considerarse un POI según la presente invención. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de POI según la presente invención incluyen compuestos pequeños o grandes, solubles en agua o solubles en lípidos, hidrófilos, hidrófobos o anfifílicos, orgánicos o inorgánicos, tales como lípidos, nucleósidos, nucleótidos, aceites, ácidos grasos, oligonucleótidos, péptidos, polinucleótidos, proteínas, compuestos químicos orgánicos pequeños, etc. El POI puede estar en cualquier forma o estado, por ejemplo, en estado líquido, semisólido o sólido, es decir, el POI puede estar disuelto, disperso o inmisible (en caso de las emulsiones) en medios acuosos u orgánicos, formando así una disolución o suspensión acuosa u orgánica, incluyendo disoluciones o emulsiones aceitosas, o, alternativamente, el POI puede no estar disuelto o no estar disperso, como producto sólido. El POI puede contener otro POI o más que pueden estar disueltos, dispersos o emulsionados en el primer POI.

En una realización particular, el POI es un microorganismo completo o fraccionado tal como un virus, bacteria o levadura o una mezcla de los mismos dispersa en una disolución, suspensión o emulsión. En una realización más particular, el microorganismo es un agente probiótico, particularmente una bacteria probiótica. Ejemplos de bacterias probióticas son, sin limitación, lactobacilos y bifidobacterias.

En una realización particular, el POI es un compuesto que tiene actividad agrícola, es decir, susceptible de usarse en la industria agrícola, por ejemplo, un producto fitosanitario para controlar plagas y patógenos, un agente promotor del crecimiento de plantas, por ejemplo, un herbicida (por ejemplo, glifosato, etc.), un insecticida (por ejemplo, lambda-cihalotrina, etc.), un fungicida (por ejemplo, Mancozeb o aceites esenciales), o un antitranspirante, etc.

En otra realización particular, el POI es un compuesto que tiene actividad cosmética, es decir, una sustancia usada para potenciar el aspecto o el olor del cuerpo humano o animal. Los cosméticos incluyen cremas para el cuidado de la piel, lociones, polvos, perfumes, pintalabios, esmalte de uñas de manos y pies, y maquillaje facial y de ojos, toallitas húmedas, líquidos para ondulación permanente, lentes de contacto de color, tintes para el cabello, sprays y geles para el cabello, desodorantes, desinfectante para las manos, productos para bebés, aceites de baño, baños de burbujas, sales de baño, mantecas y muchos otros tipos de productos. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de POI usados en la industria cosmética incluyen productos anti-envejecimiento (por ejemplo, retinoides), productos anti-acné (por ejemplo, eritromicina, peróxido de benzoílo, etc.), productos para el cuidado facial (por ejemplo, GHK-cobre en limpiadores faciales, etc.), cosméticos pigmentados (por ejemplo, pigmentos de color usados en coloretes, bases de maquillaje, correctores, polvos, etc.), cosméticos (por ejemplo, Co-Q10, etc.), productos para el cuidado personal (por ejemplo, liberación controlada por humedad de la fragancia en desodorantes, etc.), productos para filtro solar/protección solar (por ejemplo, bloqueantes de UV), productos para sustancias de limpieza de dientes, dentífricos o enjuagues (por ejemplo, liberación sostenida de triclosán/bactericidas, aromas, fragancias, principios activos anti-boca seca en la boca, etc.), productos para champú (por ejemplo, principios activos anti-caspa/hidratantes, etc.), perfumes (por ejemplo, partículas de fragancia, etc.), productos para el cabello (por ejemplo, fijadores, productos de moldeado del cabello para dar volumen, etc.), etc.

En otra realización particular, el POI es un compuesto que tiene actividad nutricional, es decir, susceptible de usarse en la industria alimentaria, por ejemplo, ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina o vitamina B3, ácido pantoténico o vitamina B5, monofosfato de tiamina, pirofosfato de tiamina, trifosfato de tiamina, ácido ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos, ácido folínico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico, ácido cumárico, ácido cafeico, vitaminas de las familias A, D, E, K y derivados de las mismas, fosfolípidos, carotenoides (por ejemplo, carotenos, licopeno, luteína, capsantina, zeaxantina, etc.), ácidos grasos, ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, DHA, EPA, etc.), aminoácidos (por ejemplo, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, y valina), fitostanoles o fitosteroles (por ejemplo, sitosterol, campesterol, estigmasterol, etc.), polifenoles (ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides, antocianinas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, chalconas, isoflavonas, etc., lignanos, etc.; por ejemplo, quercetina, rutina, resveratrol, canferol, miricetina, isorhamnetina, luteolina, catequina, taninos condensados, malvidina, cianidina, delphinidina, peonidina, ácido gálico, ácido cumárico, ácido cafeico, etc.), derivados de productos alimentarios tales como levaduras y componentes de levaduras, componentes del vino, componentes del queso, microorganismos y componentes de microorganismos, aromas alimenticios, etc. Se dice que un producto es de "calidad alimentaria" cuando su uso en la alimentación para seres humanos o animales es segura según el código alimentario de un país o de una organización, por ejemplo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) o la Organización Mundial de la Salud (OMS); por consiguiente, un producto de "calidad alimentaria" es un producto no tóxico "adecuado para el uso del mismo en alimentos" y por tanto ambas expresiones son sinónimas y se usan indistintamente en esta descripción.

En otra realización particular, el POI es un compuesto que tiene actividad terapéutica (es decir, una sustancia que, cuando se administra a un sujeto, interacciona con su receptor en el sitio de acción y ejerce un determinado efecto); este tipo de productos son susceptibles de usarse en la industria farmacéutica. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de POI que tienen actividad terapéutica incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos, proteínas o antígenos bacterianos, fúngicos o virales, receptores celulares, factores de coagulación, citocinas, enzimas, eritropoyetinas, factores de crecimiento, hormonas, insulinas, interleucinas, interferones, ligandos, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos, oligonucleótidos, polinucleótidos, ADN, ARN, etc.), agentes de transducción de señales, compuestos químicos orgánicos pequeños, toxinas, etc. En una realización particular, el POI incluye agentes analgésicos (narcóticos) (por ejemplo, codeína, morfina, etc.), agentes analgésicos (no narcóticos) (por ejemplo, ácido acetilsalicílico, ácido flufenámico, etc.), agentes anti-alopecia (por ejemplo, finasterida, minoxidilo, etc.), agentes antianginosos (por ejemplo, atenolol, nicardipino, etc.), agentes antibacterianos (por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, azitromicina, cefaclor, ciprofloxacino, neomicina, tetraciclina, etc.), agentes antidepresivos (por ejemplo, fluoxetina, paroxetina, etc.), agentes antifúngicos (por ejemplo, isoconazol, ketoconazol, etc.), agentes antihipertensores (por ejemplo, benazepril, captopril, carvedilol, enalapril, losartán, minoxidilo, etc.), agentes antiinflamatorios (por ejemplo, ácido niflúmico, celecoxib, ibuprofeno, etc.), agentes antineoplásicos (por ejemplo, alemtuzumab, cisplatino, docetaxel, trastuzumab, etc.), agentes antipiréticos (por ejemplo, paracetamol, indometacina, etc.), agentes antipsicóticos (por ejemplo, risperidona, etc.), agentes ansiolíticos (por ejemplo, alprazolam, lorazepam, etc.), agentes broncodilatadores (por ejemplo, carbuterol, epinefina, etc.), glucocorticoides (por ejemplo, budesonida, prednisolona, etc.), agentes inmunosupresores (por ejemplo, alemtuzumab, tacrolimús, etc.), etc. En una realización particular adicional, dicho POI se selecciona del grupo que consiste en ácido acetilsalicílico, péptido natriurético auricular alfa, arginina vasopresina, atropina, augmerosen, atorvastatina, avastin, calcitoninas, gonadotropinas coriónicas, corticotropina, desmopresina, epibatidina, erbitux, exenatida, herceptina, humira, humulina, ketoconazol, lanreotida, lutropina alfa, metoprolol, minoxidilo, nesiritida, octreotida, paclitaxel, paracetamol, pegaptanib, hormona estimulante de folículo recombinante, factores de crecimiento recombinantes, remicade, rituxan, sermorelina, somatotropina, derivados de taxano, taxol, acetato de teriparatida, tirotropina, triclosán, urofollitropina, xolair, etc. En otra realización, el POI se selecciona del grupo que consiste en actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, glucorónido de estradiol,

erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipina, fenotiazinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidrocortisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, canferol, levofloxacina, lidocaína, loperamida, losartán, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradil, midazolam, nisoldipino, morfina, nelfinavir, nicardipino, nitrendipino, nifedipino, ondansetrón, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutina, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimús, sulfametizol, tacrolimús, tamoxifeno, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecán, triamcinolona, valsopodar, verapamilo, vinblastina, vincristina, vindesina, zopiclona, y mezclas de los mismos.

En otra realización particular, el POI es un excipiente, es decir, una sustancia inactiva insoluble o inmiscible en agua que puede ser líquida, sólida o semisólida, usada como medio o vehículo para los principios activos de una composición. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de POI que actúa como excipiente son parafina líquida o lípidos fundidos tales como cera, aceite de algodón, aceite de maíz, aceite vegetal hidrogenado, aceite de colza, aceite de coco, etc. Dichos POI son particularmente útiles en la producción de nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza y pueden encontrarse en el núcleo de dichas nanocápsulas.

En una realización preferida, el POI se selecciona del grupo que consiste en un herbicida, un insecticida, un fungicida, un producto anti-envejecimiento, un producto anti-acné, un producto para el cuidado facial, un cosmético pigmentado, un cosmético, un producto para el cuidado personal, un producto para filtro solar/protección solar, un producto para sustancias de limpieza de dientes, dentífricos o enjuagues, un producto para champús, un perfume, un producto para el cabello, un aditivo alimenticio, un aceite esencial, aceite de *Mentha piperita*, aceite de tomillo, aceite de canela, eugenol, aceite de limón, curcumina, ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina o vitamina B3, ácido pantoténico o vitamina B5, monofosfato de tiamina, pirofosfato de tiamina, trifosfato de tiamina, ácido ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, una vitamina de las familias A, D, E, K y derivados de las mismas, un fosfolípido, un carotenoide, un ácido graso, un ácido graso omega-3, aceite de hígado de bacalao, ácido linoléico, un aminoácido, un fitostanol, un fitosterol, un polifenol, clorhexidina, albúmina sérica bovina, un agente analgésico, un agente anti-alopecia, un agente antianginoso, un agente antibacteriano, un agente antidepresivo, un agente antifúngico, un agente antihipertensor, un agente antiinflamatorio, un agente antineoplásico, un agente antipirético, un agente antipsicótico, un agente ansiolítico, un agente broncodilatador, un glucocorticoide, un agente inmunosupresor, o cualquier combinación de los mismos.

Un “disolvente orgánico volátil”, tal como se usa en el presente documento, es un compuesto orgánico líquido que se vaporiza/evapora fácilmente a temperatura ambiente; un disolvente orgánico volátil habitualmente tiene una alta presión de vapor y un punto de ebullición inferior en comparación con el agua (es decir, un disolvente orgánico volátil tiene una presión de vapor superior a 23,3 hPa a 20°C y un punto de ebullición inferior a 100°C). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de disolventes orgánicos volátiles son etanol de calidad USP (punto de ebullición inicial e intervalo de ebullición 78,0-80,0°C y presión de vapor 59,5 hPa a 20°C), metanol (punto de ebullición 64,7°C y presión de vapor 130,3 hPa a 20°C) y acetona (punto de ebullición 56°C y presión de vapor 245,3 hPa a 20°C).

De manera similar, un “disolvente orgánico no volátil”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto orgánico líquido que no se evapora fácilmente o que se evapora muy lentamente a temperatura ambiente con presión de vapor inferior y punto de ebullición superior en comparación con el agua. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de disolventes orgánicos no volátiles son glicoles de calidad USP tales como propilenglicol (punto de ebullición 187°C y presión de vapor 0,11 hPa a 20°C), poliglicoles tales como poli(etilenglicol) líquido con peso molecular promedio 400 g/mol (punto de ebullición 250°C y presión de vapor <0,01 hPa a 20°C) o polioles tales como glicerol (punto de ebullición 290°C y presión de vapor <0,01 hPa a 20°C). Cuando sólo se usa un disolvente orgánico no volátil en el contexto de la presente invención, dicho disolvente debe ser un disolvente primario en el que se disuelve la proteína hidrófoba vegetal. Por tanto, dicho disolvente orgánico no volátil puede ser diferente dependiendo de la proteína hidrófoba vegetal usada. Cuando se usa una mezcla de disolventes orgánicos no volátiles diferentes, al menos uno de dichos disolventes debe ser un disolvente primario. Los otros disolventes que forman parte de una mezcla pueden ser disolventes primarios o disolventes secundarios diferentes. Dependiendo del número de disolventes usados, la mezcla puede ser binaria cuando se usan dos disolventes, o ternaria cuando se usa una mezcla de tres disolventes.

Un disolvente o líquido “miscible en agua” es un disolvente o líquido que se disuelve completamente en agua y que es difícil de separar del agua, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, etc.

Tal como se usa en el presente documento, el término “no disolvente de proteína hidrófoba vegetal” es un disolvente en estado líquido, semisólido o sólido, que disuelve o que es miscible con el disolvente orgánico no volátil usado, pero que produce la precipitación parcial o total de la proteína hidrófoba vegetal. En una realización preferida, el no disolvente de proteína hidrófoba vegetal es un medio acuoso. En otra realización, el no disolvente de proteína hidrófoba vegetal es glicerol. En otra realización, el no disolvente de proteína hidrófoba vegetal es Labrasol®. En otra realización, el no disolvente de proteína hidrófoba vegetal es Lutrol®.

Tal como se usa en el presente documento, el término “medio acuoso” es un medio que comprende agua o un medio que consiste en agua. Dicho medio acuoso puede comprender agua y un disolvente miscible en agua. En una realización particular, el medio acuoso es un fluido biológico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “biocompatible” significa que la nanopartícula producida mediante el método de la invención no produce o provoca efectos adversos significativos cuando se administra *in vivo* a un sujeto. Los ejemplos de posibles efectos adversos incluyen, pero sin limitarse a, inflamación excesiva y/o una respuesta inmunitaria excesiva o adversa, así como toxicidad.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término “poliol” o “polioles”, se refiere a compuestos con múltiples grupos funcionales hidroxilo para reacciones orgánicas. Una molécula con dos grupos hidroxilo es un diol, una con tres es un triol, una con cuatro es un tetrol y así sucesivamente. Ejemplos de polioles son, entre otros, glicerol (también denominado glicerina) que es un compuesto de poliol sencillo, y glicoles tales como propilenglicol (PG) (también denominado 1,2-propanodiol o propano-1,2-diol).
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “método tradicional”, se refiere a un método para la fabricación de nanopartículas que está relacionado con un grupo de métodos que tienen en común el uso de un disolvente orgánico volátil, especialmente mezclas de etanol-agua.

#### Nanopartículas de la invención

15 En un primer aspecto, la invención se refiere a una nanopartícula, denominada más adelante en el presente documento la “nanopartícula de la invención”, seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una nanoesfera de matriz, comprendiendo dicha nanoesfera de matriz una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua; y
- 20 b) una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza, comprendiendo dicha nanocápsula vesicular de núcleo-corteza un núcleo y una corteza, comprendiendo dicha corteza una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua,

en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

25 El término “nanopartícula” se ha definido anteriormente y se refiere a un sistema coloidal de una partícula sólida con un tamaño promedio inferior a 1  $\mu\text{m}$ , normalmente de entre 1 y 999 nm, preferiblemente de entre 100 y 400 nm, más preferiblemente de entre 120 y 160 nm, todavía más preferiblemente de aproximadamente 130-140 nm, formada en este caso particular por una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua de dicha proteína. El término “nanopartícula”, excepto que se indique otra cosa, incluye nanoesferas de matriz y nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza. En ambos casos, debido a la gran superficie específica de estos

30 sistemas, las moléculas del POI, si están presentes, pueden quedar atrapadas o adsorbidas en la superficie de las nanopartículas.

En una realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanoesfera de matriz que comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua de dicha proteína. En esta realización, la matriz de la nanosfera es una red tridimensional formada por una proteína hidrófoba vegetal y uno o más disolventes orgánicos no volátiles miscibles en agua de dicha proteína. En esta realización, el producto de interés puede quedar atrapado o encapsulado dentro de la nanosfera o, alternativamente, el producto de interés puede adsorberse sobre o conjugarse a la superficie de la nanosfera.

35

En otra realización particular, la nanopartícula de la invención es una estructura nanovesicular de núcleo-corteza (una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza) que comprende un núcleo y una corteza, comprendiendo dicha corteza una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua de dicha proteína. La cavidad (núcleo o depósito) contiene el POI en forma líquida, semisólida o sólida o como dispersión molecular; este depósito puede ser lipófilo o hidrófobo según el método de preparación y los materiales de partida usados. Esto es particularmente útil para llevar los POI en la forma de un estado líquido, semisólido o sólido, por ejemplo, aceites, líquidos inmiscibles en agua, disoluciones o suspensiones orgánicas, incluyendo disoluciones o suspensiones aceitosas, que comprenden un POI, disoluciones o suspensiones acuosas que comprenden el POI, etc. Según esta realización, el POI puede estar dentro del núcleo de la nanocápsula o, alternativamente, puede adsorberse sobre la superficie de la nanocápsula.

40

45

En otra realización particular, la invención proporciona una combinación de al menos una nanoesfera de matriz según la invención y al menos una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza según la invención.

50 El término “proteína hidrófoba vegetal” se ha definido anteriormente. La proteína hidrófoba vegetal es una proteína de una planta de cereal; preferiblemente una proteína de una planta seleccionada de maíz, trigo, cebada, arroz, mijo y sorgo; más preferiblemente de maíz. La proteína hidrófoba vegetal es una proteína encontrada en un grano.

Las prolaminas son una familia de proteínas hidrófobas vegetales encontradas en granos de cereal y asociadas con almidón que tienen nombres específicos e incluyen, sin limitación: trigo (gliadina), cebada (hordeína), centeno (secalina), maíz (zeína), sorgo (kafirina), mijo (panicina), arroz (orzenina) y avena (avenina). Dicha proteínas forman

55

parte del gluten. Por tanto, la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, preferiblemente una prolamina seleccionada de gliadina, hordeína, secalina, zeína, kafirina, panicina, orzenina y avenina; más preferiblemente la prolamina se selecciona de gliadina, hordeína, secalina, zeína, kafirina y avenina; incluso más preferiblemente se selecciona de zeína, gliadina, hordeína y kafirina; siendo lo más preferido zeína.

5 La proteína zeína puede obtenerse mediante extracción con disolvente de harina de gluten de maíz. El experto en la técnica conoce métodos para la extracción de zeína (véase [15]). La zeína también está disponible comercialmente. Biológicamente, la zeína es una mezcla de proteínas que varían en el tamaño molecular y la solubilidad. Estas proteínas pueden separarse por solubilidades diferenciales y por sus estructuras relacionadas en cuatro tipos distintos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  [15]. La  $\alpha$ -zeína es con mucho la más abundante, representando aproximadamente el 70% del total con un peso molecular de aproximadamente 22 kDa [35]. Estas clases de zeína:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  se expresan secuencialmente en el maíz y se encuentra que interactúan entre sí para proporcionar estabilidad. Se notificó que la zeína del maíz era aproximadamente un 35% de  $\alpha$ -zeína, que incluye 2 bandas destacadas de 22 y 24 kDa. La  $\beta$ -zeína no entra en un gel de SDS-PAGE sin reducción. El análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras muestra que la  $\beta$ -zeína tiene 3 bandas principales de 24, 22, y 14 kDa [36]. La zeína útil en la presente invención puede ser cualquiera de las cuatro clases de zeína ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) o una mezcla de las mismas. En una realización preferida, la zeína es una mezcla de las cuatro clases de zeína, más preferiblemente una mezcla de las cuatro clases de zeína compuesta principalmente de  $\alpha$ -zeína. En una realización más preferida, la zeína es una zeína disponible comercialmente.

20 La solubilidad de la zeína se notificó en una revisión [15]. La zeína es soluble en alcoholes acuosos, glicoles, etil éter, alcohol furfurílico, alcohol tetrahidrofurfurílico y disoluciones alcalinas acuosas de pH 11,5 o mayor. La zeína es insoluble en agua, acetona y alcoholes anhidros (excepto metanol). Es de interés que todos los disolventes primarios sean glicoles, éteres de glicol, aminoalcoholes, ácidos de nitro-alcohol, amidas y aminas. Los glicoles tienen considerablemente mayor poder disolvente que sus alcoholes monohidroxilados correspondientes. El propilenglicol es un buen disolvente para zeína pero el propanol absoluto no. La adición de grupos hidroxilo adicionales parece disminuir el poder disolvente. El propilenglicol puede disolver la zeína a temperatura ambiente, mientras que es necesario calentar el glicerol hasta 150°C, y los polipropilenglicoles con un peso molecular superior a (>) 3.000 no disuelven la zeína en absoluto [15].

30 La zeína, la prolamina en endospermo de maíz contiene más de un 50% de aminoácidos no polares dispuestos en una disposición espacial única que consiste en repeticiones en tándem de segmentos de alfa-hélice alienados en paralelo entre sí formando una cinta o prisma. Esta estructura da lugar a dominios hidrófobos e hidrófilos bien definidos en la superficie de la proteína. El objetivo es producir nanoestructuras de geometría controlada, útiles como materiales de microencapsulación para ácidos grasos, aromas, oleorresinas, vitaminas y péptidos [37].

35 Las nanopartículas de la invención también contienen al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua de la proteína hidrófoba usada. Al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua tiene que ser un disolvente primario de dicha proteína. Por tanto, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua puede ser un disolvente primario o una mezcla de disolventes primarios o una mezcla de al menos un disolvente primario y uno o más disolventes secundarios. Los términos "miscible en agua" y "disolvente orgánico no volátil" se han definido anteriormente. El disolvente orgánico no volátil miscible en agua de la presente invención puede ser propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios dependiendo de la proteína hidrófoba vegetal usada, puesto que es un requisito del disolvente primario que debe poder disolver dicha proteína. La "solubilidad" de una proteína se define como gramos de proteína totalmente disuelta en una cantidad dada de disolvente a una determinada temperatura. Una proteína se considera soluble en un disolvente según la Farmacopea Británica si es necesario usar aproximadamente 10-30 partes de disolvente (ml) por una parte de soluto (g) a una temperatura que oscila entre 15°C y 25°C para disolver la proteína.

45 En este contexto, el término "disolvente primario" se usa para aquellos disolventes en los que la proteína es totalmente soluble sin el uso de codisolventes. Los disolventes primarios de zeína son glicoles, éteres de glicol, aminoalcoholes, ácidos de nitro-alcohol, amidas y aminas [15]. En una realización particular, el disolvente primario se selecciona de, tartrato de butilo, 1,3-butilenglicol, dietanolamina, dietilenglicol, monometil éter de dietilenglicol, lactato de etilo, etilenglicol, monoetil éter de etilenglicol, monometil éter de etilenglicol, propilenglicol, dipropilenglicol, trietanolamina, trietilentetramina, trietilenglicol, hidroxietilendiamina, glicerol, glicerol- $\alpha$ -metil éter, 2-amino-2-etil-1,3-propanodiol, lactato de metilo, monoetanolamina, fenol y monoacetato de resorcinol; preferiblemente de propilenglicol, dipropilenglicol, trietanolamina, etilenglicol, 1,3-butilenglicol, trietilentetramina, trietilenglicol, lactato de metilo, monoetanolamina, monoetil éter de etilenglicol y lactato de etilo; más preferiblemente de propilenglicol, dipropilenglicol, trietanolamina, etilenglicol, 1,3-butilenglicol y lactato de metilo; incluso más preferiblemente de propilenglicol, 1,3-butilenglicol y lactato de etilo.

60 Por consiguiente, el término "disolvente secundario" se usa en la presente invención para aquellos disolventes que son miscibles con disolventes primarios y que no pueden disolver la proteína a una temperatura inferior a 40°C, pero que pueden mantener la proteína en disolución cuando se mezcla en proporciones apropiadas con un disolvente primario. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de disolventes secundarios adecuados son: agua, glicerol, etilenglicol, polietilenglicol, monoetil éter de dietilenglicol, caprilcaproíl macrogol-glicérido, copolímero de polioxietileno-

polioxipropileno, etc. Por tanto, dependiendo de la proporción del disolvente secundario usado, puede actuar como no disolvente de proteína hidrófoba vegetal (cuando se usa en la proporción requerida para precipitar proteínas hidrófobas vegetales), o como disolvente de proteína hidrófoba vegetal (cuando se mezcla con un disolvente primario en una proporción menor a la requerida para formar nanopartículas). El experto en la técnica puede determinar el volumen del disolvente secundario apropiado para precipitar o disolver la proteína hidrófoba vegetal realizando un estudio para determinar la solubilidad de la proteína en un disolvente tal como se muestra en el ejemplo 2.1.

Por tanto, el término mezclas binarias, ternarias o múltiples se usa para designar aquellas mezclas de uno, dos o múltiples disolventes secundarios con al menos un disolvente primario.

El disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios. En una realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es un disolvente adecuado para su uso cosmético o farmacéutico. En una realización, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es una mezcla binaria de propilenglicol y Lutrol®. En otra realización, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es una mezcla binaria de propilenglicol y glicerol. En otra realización, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es una mezcla binaria de propilenglicol y agua.

Las prolaminas se caracterizan por su insolubilidad en agua y su solubilidad en un alcohol acuoso. Las prolaminas son soluble en disoluciones sumamente ácidas o alcalinas y en mezclas acuosas de disolventes orgánicos, que pertenecen a las siguientes clases: compuestos de hidroxilo (por ejemplo, etanol, 2-propanol o glicerol), cetonas (por ejemplo, acetona, metil etil cetona) y amidas (por ejemplo, acetamida). Las prolaminas son solubles en mezclas acuosas de estos disolventes que contienen no más del 60% en peso de agua. Para los fines de esta invención, el "disolvente orgánico no volátil miscible en agua" no puede ser un disolvente volátil tal como etanol o acetona. En una realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua de la invención para prolaminas es propilenglicol.

Cuando la proteína es zeína, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua puede ser propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y uno de los disolventes primarios notificados en [15]. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de disolventes adecuados son tartrato de butilo, 1,3-butilenglicol, dietanolamina, dietilenglicol, monoetil éter de dietilenglicol, monometil éter de dietilenglicol, lactato de etilo, propilenglicol, etil éter de tripropilenglicol, etilenglicol, monoetil éter de etilenglicol, monometil éter de etilenglicol, glicerol, glicerol- $\alpha$ -metil éter, propilenglicol, dipropilenglicol, trietilenglicol, ácido láctico, trietanolamina, trietilentetramina, dietilentriamina 2-amino-2-etil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol, hidroxietilendiamina, lactato de metilo, monoetanolamina, fenol, monoacetato de resorcinol.

En una realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua para zeína es propilenglicol (PG).

Las nanopartículas de la invención pueden comprender uno, dos o tres disolventes orgánicos no volátiles miscibles en agua. En una realización preferida, las nanopartículas de la invención comprenden una mezcla binaria de disolventes, preferiblemente una mezcla de propilenglicol y otro disolvente primario o secundario orgánico no volátil miscible en agua.

Debido a la gran superficie específica de las nanopartículas de la invención, las moléculas de un producto de interés pueden quedar atrapadas o adsorbidas en o conjugadas a la superficie de las nanopartículas. Por tanto, las nanopartículas de la invención pueden incorporar de manera eficaz productos de interés, tales como compuestos grandes o pequeños, hidrófobos o hidrófilos, que tienen estados físicos, usos y aplicaciones diferentes, y, por tanto, pueden aplicarse potencialmente en industrias diferentes (por ejemplo, en composiciones farmacéuticas, cosméticas o agrícolas, en productos alimenticios, etc.).

Por tanto, en una realización particular, la nanopartícula de la invención comprende además un producto de interés (POI); en este caso, la nanopartícula de la invención se identifica ocasionalmente en esta descripción como "nanopartícula cargada de la invención". Puede encontrarse información relacionada con dicho POI en la sección anterior ("Definiciones"). El experto en la técnica entenderá que una nanopartícula cargada de la invención puede incorporar uno o más productos de interés (POI) en la misma nanopartícula siempre que dichos POI no sean incompatibles entre sí.

En una realización particular, dicho POI es el antioxidante curcumina, o el fármaco antimicrobiano clorhexidina y la nanopartícula de la invención es una nanoesfera de matriz en la que el POI queda atrapado o encapsulado dentro de la nanosfera o, alternativamente, se adsorbe sobre o se conjuga a la superficie de la nanosfera.

En otra realización particular, dicho POI es un aceite esencial, independientemente de su estado físico, tal como un aceite volátil incluyendo, entre otros, aceites aromáticos que son miscibles con disolución de PG:zeína incluyendo aceite de *Mentha piperita* (menta), eugenol, aceite de canela, aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*), o aceites aromáticos que son inmiscibles con disolución de PG:zeína tales como aceite esencial de limón; aceites no volátiles, tales como aceite de hígado de bacalao; o ácidos grasos tales como ácido oleico o ácido linolénico, etc., asociados o encapsulados dentro de la nanopartícula de la invención que es una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza en la que el POI queda atrapado o encapsulado dentro de la nanocápsula o, alternativamente, se adsorbe en o se conjuga

5 a la superficie de estas nanocápsulas. En una realización preferida, el aceite esencial es un aceite volátil miscible con la disolución de PG:zeína, seleccionado preferiblemente de aceite de *Mentha piperita*, eugenol, aceite de canela y aceite de *Thymus vulgaris*. En otra realización preferida, el aceite esencial es un aceite volátil inmiscible con disolución de PG:zeína, preferiblemente aceite esencial de limón. En otra realización preferida, el aceite esencial es un aceite no volátil, seleccionado preferiblemente de aceite de hígado de bacalao, ácido oleico y ácido linolénico.

En otra realización particular, dicho POI es un aceite en forma de disolución, suspensión o emulsión, asociado o encapsulado dentro de la nanopartícula de la invención que es una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza en la que el POI queda atrapado o encapsulado dentro de la nanocápsula o, alternativamente, se adsorbe sobre o se une a la superficie de la nanocápsula.

10 La razón en peso de la proteína hidrófoba vegetal:POI, preferiblemente la razón en peso de "zeína":POI, en la nanopartícula cargada de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la razón en peso/peso de proteína hidrófoba vegetal (preferiblemente zeína):POI en la nanopartícula cargada de la invención puede estar comprendida entre  $1:10^6$  y  $1:10^6$ , preferiblemente entre  $1:10^4$  y  $1:10^3$ , y más preferiblemente entre 1:0.001 y 1:100.

15 Las nanopartículas de matriz y las nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza de la invención son principalmente catiónicas o aniónicas con carga superficial promedio positiva o negativa, respectivamente.

Las nanopartículas aniónicas pueden obtenerse mediante recubrimiento de las nanopartículas con polímeros aniónicos tales como goma arábica o mediante complejación del polímero aniónico en la matriz o corteza de las nanopartículas. En una realización preferida, el polímero aniónico o polianiónico usado es la goma arábica.

#### 20 Procedimiento para producir sistemas particulados poliméricos

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanoesfera de matriz que comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, más adelante en el presente documento denominado "procedimiento [1] de la invención", que comprende poner en contacto una disolución de la proteína hidrófoba vegetal en al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso, con el fin de formar dicha nanoesfera de matriz y en el que la disolución de la proteína hidrófoba vegetal no comprende un disolvente orgánico volátil, en el que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en el que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios. Este procedimiento [1] de la invención produce nanopartículas "vacías" de la invención, es decir, nanopartículas sin producto de interés (POI), particularmente nanoesferas de matriz, en las que la matriz comprende una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua de la proteína hidrófoba vegetal.

Los detalles del disolvente orgánico no volátil miscible en agua se han definido en la sección de "Definiciones". Las realizaciones relacionadas con el disolvente orgánico no volátil miscible en agua dado a conocer en el contexto de las nanopartículas de la invención también pueden aplicarse al procedimiento [1] de la invención.

El disolvente orgánico es cualquier disolvente orgánico no volátil miscible en agua adecuado en el que la proteína hidrófoba vegetal puede solubilizarse, preferiblemente un disolvente orgánico no volátil aceptable desde el punto de vista farmacéutico, alimentario o cosmético e incluye un disolvente primario o una mezcla apropiada de al menos un disolvente primario y uno o más more disolventes secundarios. Adicionalmente, el disolvente orgánico puede ser una mezcla más de un disolvente primario. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de disolventes orgánicos incluyen glicoles y éteres de glicol entre otros.

El término "glicol", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto orgánico no volátil que contiene dos grupos funcionales hidroxilo (-OH). Los glicoles también se denominan dioles e incluyen alcoholes tales como propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etilenglicol, dietilenglicol, etc. PG y PEG son alcoholes no volátiles que pueden estar presentes como líquido (PG) o como sólido dependiendo del peso molecular (PM) del PEG (por ejemplo, PEG6000, PEG10000). Pueden usarse disolventes sólidos (por ejemplo, PEG6000, PEG10000, etc.), por ejemplo, para producir formas farmacéuticas sólidas para la administración de fármacos, tales como supositorios, por ejemplo, supositorios rectales que comprenden, por ejemplo, fármacos antipiréticos, o supositorios vaginales (óvulos) que comprenden, por ejemplo, agente antifúngicos, entre otros, y se formarán nanopartículas cuando la disolución que comprende la proteína hidrófoba vegetal y el disolvente orgánico no volátil miscible en agua entra en contacto con un fluido corporal, por ejemplo, el fluido vaginal o los fluidos del tubo digestivo. Los glicoles útiles en la presente invención como disolventes primarios son aquellos en los que puede disolverse la proteína hidrófoba vegetal. Por tanto, los glicoles en los que no puede disolverse la proteína hidrófoba vegetal son útiles como disolventes secundarios (cuando se mezclan con un disolvente primario en proporción inferior a la requerida para formar nanopartículas) o como no disolvente de proteína hidrófoba vegetal. Por tanto, el glicol usado dependerá de la proteína hidrófoba vegetal específica que va a disolverse. Los disolventes de zeína se dan a conocer en [15]. Disolventes de zeína adecuados son, sin limitación, 1,3-butilenglicol, dietilenglicol, dipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, trietilenglicol, etc. En una realización particular, el disolvente orgánico es un glicol,

preferiblemente propilenglicol.

5 El término “glicerol”, también denominado glicerina, se refiere a un poliol que tiene tres grupos hidroxilo que son responsables de su solubilidad en agua y su naturaleza higroscópica. En una realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es una mezcla de propilenglicol con un poliol, preferiblemente glicerol como disolvente primario a temperaturas superiores a 139°C, y como disolvente secundario a temperaturas inferiores a 139°C.

El término “éter de glicol”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de disolventes a base de alquil éteres de etilenglicol. Los éteres de glicol adecuados para la presente invención son, sin limitación, monoetil éter de dietilenglicol, monometil éter de dietilenglicol, monoetil éter de etilenglicol, monometil éter de etilenglicol, etc.

10 En una realización particular, el disolvente orgánico comprende una mezcla de dos o más poliglicoles no volátiles miscibles en agua como disolventes primarios o secundarios. Ejemplos de poliglicoles son, sin limitación, polietilenglicoles (PEG), metoxipolietilenglicoles (MPEG), polipropilenglicoles (PPG) y polibutilenglicoles (PBG).

15 Los disolventes orgánicos no volátiles miscibles en agua útiles en la invención pueden enumerarse en más de una categoría, por ejemplo propilenglicol (PG) que es un poliol y también un glicol. El término “poliol” se ha definido en la sección “Definiciones”.

20 En otra realización, el disolvente orgánico no volátil, miscible en agua, comprende al menos propilenglicol (PG) o una mezcla de disolventes apropiada de propilenglicol y al menos un disolvente primario y uno o más disolventes secundarios, incluyendo mezclas binarias y ternarias de disolventes para la proteína hidrófoba vegetal, particularmente zeína. Ejemplos ilustrativos no limitativos son mezcla de PG:glicerol, mezcla de PG:agua en un porcentaje de agua que mantiene la zeína soluble o mezcla de PG:PEG:glicerol. Alternativamente, el disolvente orgánico comprende PG y un disolvente no volátil miscible en PG distinto de un alcohol. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de disolventes no volátiles miscibles en agua distintos de alcoholes que pueden formar parte de una mezcla binaria con PG incluyen polioxiglicéridos, por ejemplo, caprilcaproíl polioxiglicéridos, derivados de ácidos grasos, por ejemplo, sus derivados de PG o PEG, etc. El término “caprilcaproíl polioxiglicéridos” se refiere a un agente tensioactivo a base de lípidos. Un caprilcaproíl polioxiglicérido a modo de ejemplo es glicérido caprílico/cáprico PEG-8, comercializado como Labrasol® por Gattefosse. Los caprilcaproíl polioxiglicéridos también se conocen como “caprilcaproíl macroglicéridos”. En una realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es una mezcla binaria de PG:glicerol. En otra realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es una mezcla binaria de PG:Labrasol®. En otra realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es una mezcla binaria de PG:Tween® 80. En otra realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es una mezcla binaria de PG:Lutrol®. En otra realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es una mezcla binaria de PG:agua.

En una realización preferida, el disolvente primario orgánico no volátil miscible en agua de la disolución de la proteína hidrófoba vegetal es el disolvente mayoritario en dicha disolución.

35 Los detalles de la proteína hidrófoba vegetal se han definido en la sección “Definiciones” y en el contexto de las nanopartículas de la invención. Las realizaciones relacionadas con la proteína hidrófoba vegetal dada a conocer en el contexto de las nanopartículas de la invención también pueden aplicarse al procedimiento [1] de la invención.

40 Se da a conocer que la proteína hidrófoba vegetal es una proteína de una planta de cereal; preferiblemente una proteína de una planta seleccionada de maíz, trigo, cebada, arroz, mijo y sorgo; más preferiblemente de maíz. La proteína hidrófoba vegetal es una proteína encontrada en un grano.

La proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, preferiblemente una prolamina seleccionada de gliadina, hordeína, secalina, zeína, kafirina, panicina, orzenina y avenina; más preferiblemente, la prolamina se selecciona de gliadina, hordeína, secalina, zeína, kafirina y avenina; incluso más preferiblemente, se selecciona de zeína, gliadina, hordeína y kafirina; siendo lo más preferido zeína.

45 La concentración de dicha proteína hidrófoba vegetal, en el disolvente orgánico no volátil miscible en agua para formar una disolución puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración de la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, en dicha disolución orgánica está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,1% y el 30% (p/v), más preferiblemente entre el 1% y el 15% (p/v), todavía más preferiblemente entre el 1% y el 10% (p/v); en una realización específica, la concentración de la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, en la disolución orgánica es de entre el 2,5 y el 5% (p/v).

55 La disolución orgánica que contiene una proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, puede prepararse disolviendo dicho producto en el disolvente orgánico. En una realización particular, el disolvente orgánico es un poliol no volátil miscible en agua, por ejemplo, PG. En otra realización particular, el disolvente orgánico es una mezcla de disolventes binaria o ternaria no volátil miscible en agua que contiene al menos uno o dos polioles y opcionalmente un disolvente distinto de un alcohol tal como un polioxiglicérido, por ejemplo, un caprilcaproíl macrogol-glicérido, copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (Lutrol® L 44, Poloxamer USP-NF) o un derivado de ácido graso.

Según el procedimiento [1] de la invención, se pone en contacto una disolución orgánica que contiene una proteína hidrófoba vegetal en al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso, que actúa como no disolvente de proteína hidrófoba que puede mezclarse con el disolvente usado en la disolución orgánica. Esta produce la precipitación de la proteína hidrófoba con el fin de formar las nanopartículas. En una realización preferida, se pone en contacto una disolución orgánica que contiene zeína en PG con un medio acuoso, que actúa como no disolvente de proteína hidrófoba miscible en PG, produciendo así la precipitación de la zeína y la formación de nanopartículas.

En una realización particular, el medio acuoso comprende agua, preferiblemente, agua destilada o bidestilada. Esta etapa se realiza a una temperatura adecuada, normalmente comprendida entre 1°C y 150°C, preferiblemente de entre 10°C y 40°C, más preferiblemente de entre 15°C y 25°C. Posteriormente, si se desea, la suspensión de nanopartículas obtenida se somete a un tratamiento adecuado para eliminar el disolvente orgánico. La eliminación del disolvente orgánico puede realizarse mediante cualquier método convencional, dependiendo de la naturaleza del disolvente que va a eliminarse, conocido por el experto en la técnica incluyendo, por ejemplo, centrifugación, diálisis, etc. En una realización particular, cuando el disolvente orgánico es PG, la suspensión de nanopartículas se centrifuga con el fin de eliminar dicho poliol. Alternativamente, la suspensión de nanopartículas puede secarse mediante técnicas diferentes, por ejemplo, liofilización con algunos excipientes tales como azúcares, sales, polisacáridos o tensioactivos.

En una realización preferida, el medio comprende además un tensioactivo y/o un polímero polianiónico.

Alternativamente, dichas nanopartículas pueden producirse *in situ* mediante el mezclado de la proteína hidrófoba vegetal disuelta en una disolución orgánica no volátil miscible en agua con cualquier fluido corporal, en las que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en las que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios. Para ese fin, la disolución orgánica en la que el disolvente de proteína es un disolvente no volátil miscible en agua (tal como un alcohol no volátil miscible en agua, por ejemplo, PG, o un disolvente no volátil miscible en agua distinto de un alcohol, por ejemplo, ácido láctico, trietanolamina) que contiene la proteína hidrófoba vegetal se prepara mezclando dicha proteína hidrófoba vegetal con dicho disolvente orgánico, y luego mezclando dicha disolución orgánica que contiene la proteína hidrófoba vegetal con un medio acuoso, tal como un fluido corporal, por ejemplo, fluido gastrointestinal, sangre, fluido intravítreo, fluido subcutáneo, fluido vaginal, etc., y, por consiguiente, se forman directamente nanopartículas autoensambladas *in situ* de la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína (ZSNP).

Según esta realización, si la disolución orgánica que contiene la proteína hidrófoba vegetal es una disolución en la que el disolvente es un poliol no volátil miscible en agua, por ejemplo, PG, y dicha disolución de poliol no volátil que contiene la proteína hidrófoba vegetal se administra como tal mediante una vía adecuada que permita el contacto de dicha disolución o suspensión con un fluido corporal, por ejemplo, vía oral, parenteral, rectal, vaginal, o similar, a un sujeto (por ejemplo, un animal incluyendo un ser humano), entonces se forman las nanopartículas *in situ* mediante el autoensamblaje de las cadenas de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente cadenas de zeína, en contacto con dicho fluido corporal adecuado que comprende un medio acuoso.

Por tanto, la disolución que contiene una proteína hidrófoba vegetal en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y, opcionalmente, un medio acuoso, en la que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas, en la que el medio que comprende al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua no comprende un disolvente orgánico volátil, en la que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,01% y el 40% (p/v), más preferiblemente entre el 0,01% y el 30% (p/v), todavía más preferiblemente entre el 0,01% y el 20% (p/v), todavía más preferiblemente entre el 0,01% y el 15% (p/v), incluso más preferiblemente entre el 0,01% y el 10% (p/v), incluso más preferiblemente entre el 0,01% y el 5% (p/v), lo más preferido entre el 0,01% y el 2,5% (p/v), con la condición de que cuando la proteína hidrófoba vegetal es gliadina, entonces la cantidad de proteína hidrófoba vegetal es mayor del 0,1%, en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios, constituye un aspecto adicional de la presente invención. En una realización preferida la proteína hidrófoba vegetal de dicha disolución se selecciona de hordeína, secalina, zeína, kafirina, panicina, orzenina y avenina; más preferiblemente se selecciona de hordeína, secalina, zeína, kafirina y avenina; aún más preferiblemente se selecciona de zeína, hordeína y kafirina; lo más preferiblemente es zeína. En otra realización, la cantidad de proteína hidrófoba vegetal en dicha disolución es mayor de 0,1% (p/v), al menos 0,2% (p/v), al menos 0,5% (p/v), al menos 1% (p/v), al menos 5% (p/v), al menos 10% (p/v), al menos 15% (p/v), al menos 20% (p/v), al menos 25% (p/v), al menos 30% (p/v), al menos 35% (p/v), al menos 40% (p/v) y no más del 50% (p/v).

Dicha disolución debe poder formar nanopartículas de proteína hidrófoba vegetal cuando se mezcla con una cantidad apropiada de no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso. Dicha disolución orgánica puede usarse para producir nanopartículas, principalmente nanoesferas de matriz, en las que dicha matriz comprende una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, tras entrar en contacto con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente con un medio acuoso, preferiblemente con un fluido biológico. En una realización particular, el disolvente orgánico no volátil

miscible en agua es propilenglicol, y el medio acuoso comprende agua, preferiblemente es un fluido biológico. En una realización preferida, el medio comprende una mezcla binaria o ternaria de un disolvente orgánico no volátil miscible en agua. La proteína hidrófoba vegetal de la invención es una prolamina, preferiblemente zeína. En una realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua de la invención es propilenglicol. En una realización preferida, la disolución o suspensión comprende además un tensioactivo y/o un polímero polianiónico.

La cantidad de no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso, que es necesaria para formar las nanopartículas depende, entre otros factores, de la concentración de dicha proteína hidrófoba vegetal en la disolución o suspensión hidro-orgánica que contiene dicha proteína hidrófoba, y del no disolvente de proteína hidrófoba vegetal seleccionado; no obstante, en una realización particular, la razón de no disolvente de proteína hidrófoba vegetal:disolvente orgánico no volátil miscible en agua está comprendida entre 0,01:1 (v/v) y 1000:1 (v/v), preferiblemente entre 0,5:1 (v/v) y 10:1 (v/v), más preferiblemente es de aproximadamente 4:1 (v/v).

La concentración de la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, en la disolución de disolvente orgánico no volátil miscible en agua que contiene dicha proteína puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, la concentración de la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, en dicha disolución orgánica está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,1% y el 30% (p/v), más preferiblemente entre el 1% y el 15% (p/v), todavía más preferiblemente entre el 2% y el 10% (p/v) con la condición de que cuando la proteína hidrófoba vegetal es gliadina, entonces la cantidad de proteína hidrófoba vegetal es mayor del 0,1%; en una realización específica, la concentración de la proteína hidrófoba, preferiblemente zeína, en la disolución orgánica es de aproximadamente el 2-5% (p/v).

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir una nanoesfera de matriz que comprende un producto de interés (POI), en donde dicha nanoesfera de matriz comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, denominado más adelante en el presente documento "procedimiento [2] de la invención", que comprende: poner en contacto una disolución o suspensión que comprende dicho POI y dicha proteína hidrófoba vegetal, disueltos en al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso, con el fin de formar dicha nanoesfera de matriz y en el que la disolución o suspensión que comprende la proteína hidrófoba vegetal y el producto de interés no comprende un disolvente orgánico volátil, en el que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en el que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios. El procedimiento [2] de la invención produce nanopartículas "cargadas" de la invención, concretamente, nanoesferas de matriz cargadas con al menos un producto de interés (POI). Según el procedimiento [2] de la invención, se pone en contacto la disolución o suspensión orgánica no volátil miscible en agua que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso. El POI puede ser un compuesto hidrófobo, hidrófilo o anfílico. En el caso de los compuestos hidrófilos, puede añadirse opcionalmente un pequeño porcentaje de agua al disolvente orgánico no volátil miscible en agua que contiene zeína en un porcentaje que no debe producir la precipitación de zeína.

En resumen, una disolución o suspensión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua puede obtenerse mediante medios convencionales conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, mezclando una disolución o suspensión de disolvente orgánico no volátil miscible en agua que comprende un POI y una proteína hidrófoba (que puede obtenerse disolviendo o suspendiendo el POI en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua adecuado que contiene una proteína hidrófoba), o alternativamente, una disolución o suspensión acuosa de dicho POI (que puede obtenerse disolviendo o suspendiendo el POI en un medio acuoso, en el que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas, por ejemplo, un medio que comprende agua, preferiblemente, agua que actúa como no disolvente de proteína miscible en agua), con una disolución orgánica de la proteína hidrófoba vegetal, en condiciones adecuadas para obtener dicha disolución o suspensión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas condiciones de operación incluyen agitar, a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo, desde 1 hasta 30 minutos, normalmente, inferior a 15 minutos, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos.

Los detalles del POI se han mencionado anteriormente en la sección "Definiciones".

Los detalles de la proteína hidrófoba vegetal se han mencionado anteriormente en relación con el procedimiento [1] de la invención, así como con los detalles de la disolución de la proteína hidrófoba vegetal, por ejemplo, alcoholes, concentración, etc. La proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, preferiblemente zeína. Los detalles del disolvente orgánico no volátil miscible en agua se han mencionado anteriormente en relación con el procedimiento [1] de la invención. El alcohol presente en la disolución alcohólica es un poliol, preferiblemente un glicol, más preferiblemente es propilenglicol (PG).

Todas las realizaciones dadas a conocer en relación con el procedimiento [1] de la invención también pueden aplicarse al procedimiento [2] de la invención.

Según el procedimiento [2] de la invención, se pone en contacto una disolución o suspensión de una proteína

hidrófoba vegetal en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua que comprende un POI con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso, es decir, un medio que comprende agua, que actúa como no disolvente de polímero miscible en agua, con el fin de formar las nanopartículas cargadas con dicho POI ("nanopartículas cargadas con POI"). En una realización particular, el no disolvente de proteína hidrófoba vegetal comprende agua, preferiblemente, agua destilada o bidestilada. La razón de volumen entre el disolvente de proteína (alcohol, por ejemplo, PG) y el no disolvente de proteína (por ejemplo, agua) [disolvente:no disolvente] puede variar dentro de un amplio intervalo, normalmente entre 1:0,001 (v/v) y 1:5000 (v/v), preferiblemente entre 1:4 (v/v) y 1:5 (v/v).

La etapa de poner en contacto la disolución o suspensión de proteína hidrófoba vegetal en el disolvente orgánico no volátil miscible en agua que comprende POI con el medio no disolvente de proteína se realiza a una temperatura adecuada, comprendida normalmente entre 1°C y 150°C, preferiblemente, entre 10°C y 40°C, y más preferiblemente entre 15°C y 25°C.

Posteriormente, si es necesario, la suspensión de nanopartículas cargadas con POI así obtenida se somete a un tratamiento adecuado para eliminar el disolvente orgánico no volátil miscible en agua con el fin de obtener una suspensión no disolvente de proteína, preferiblemente una suspensión acuosa, de nanopartículas cargadas con POI libre de polioles. La eliminación del disolvente orgánico no volátil miscible en agua (preferiblemente poliol) puede realizarse mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica incluyendo, por ejemplo, centrifugación o diálisis, etc.; en una realización particular, se centrifuga la suspensión de nanopartículas cargadas con POI para eliminar el PG. Sin embargo, cuando el disolvente es PG no es necesario eliminarlo puesto que puede usarse en seres humanos mediante las vías oral o parenteral.

En una realización preferida, el medio comprende además un tensioactivo y/o un polímero polianiónico.

Según el procedimiento [2] de la invención, con el fin de obtener ("nanopartículas cargadas con POI"), se pone en contacto una disolución o suspensión de zeína en disolvente orgánico no volátil que comprende un POI en forma de suspensión o disolución con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente con un medio acuoso, es decir, un medio que comprende agua, que actúa como no disolvente de zeína miscible en agua, espontáneamente o con agitación magnética. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas condiciones de operación incluyen agitar, a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo, desde 1 hasta 30 minutos.

Alternativamente, debido a la posibilidad de que la proteína hidrófoba vegetal forme nanopartículas autoensambladas *in situ* (ZSNP), la invención proporciona un procedimiento adicional para producir una nanoesfera de matriz que comprende una matriz y un producto de interés (POI), comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, que comprende poner en contacto una disolución o suspensión orgánica que comprende dicho POI y dicha proteína hidrófoba vegetal, en el que dicha disolución o suspensión orgánica comprende un disolvente no volátil miscible en agua, con un fluido corporal, por ejemplo, fluido gastrointestinal, sangre, fluido intravítreo, fluido vaginal etc., y, por consiguiente, se forman directamente nanopartículas autoensambladas *in situ* de la proteína hidrófoba vegetal cargadas con POI (ZSNP cargadas). Este procedimiento produce nanopartículas "cargadas" de la invención, concretamente nanoesferas de matriz autoensambladas *in situ* cargadas con al menos un POI. Según este procedimiento, se pone en contacto una disolución o suspensión orgánica que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal, en al menos un disolvente no volátil miscible en agua con un fluido corporal acuoso, en el que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en el que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

Este procedimiento es útil cuando el POI es un compuesto hidrófobo, hidrófilo o anfifílico. En resumen una disolución o suspensión orgánica que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal en un disolvente no volátil miscible en agua se obtiene mezclando una disolución o suspensión de dicho POI (que puede obtenerse disolviendo o dispersando el POI en un disolvente no volátil miscible en agua o en un medio acuoso en el que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas) con una disolución de dicha proteína hidrófoba vegetal en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, en condiciones adecuadas para obtener dicha disolución o suspensión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal, particularmente zeína, en un disolvente no volátil miscible en agua.

Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas condiciones de operación para obtener la disolución o suspensión de POI:proteína en un disolvente orgánico no volátil incluyen agitar a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo, desde 1 hasta 30 minutos, preferiblemente de aproximadamente 20 minutos, normalmente, inferior a 15 minutos, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos. Aunque los disolventes de dichas disoluciones o suspensiones (la disolución o suspensión del POI y la disolución de la proteína hidrófoba vegetal) pueden ser diferentes, en la práctica se prefiere que el disolvente de ambas disoluciones o suspensiones sea el mismo; en una realización particular, dicho disolvente es un poliol tal como PG.

Los detalles del POI se han mencionado anteriormente en la sección "Definiciones". Los detalles de la proteína hidrófoba vegetal, una prolamina, más preferiblemente zeína, se han mencionado anteriormente en relación con el

procedimiento [1] de la invención. Los detalles del disolvente orgánico no volátil soluble en agua se han mencionado anteriormente en relación con el procedimiento [1] de la invención.

Tal como se mencionó anteriormente, el disolvente es un disolvente no volátil miscible en agua (propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios), en el que puede solubilizarse la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un disolvente no volátil miscible en agua farmacéutica o cosméticamente aceptable. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de disolventes primarios no volátiles miscibles en agua, incluyen alcoholes no volátiles miscibles en agua, por ejemplo, PG, etc. El/los disolvente(s) primario(s) no volátil(es) miscible(s) en agua puede(n) mezclarse en proporciones apropiadas con un disolvente secundario, por ejemplo disolventes no volátiles miscibles en agua distintos de alcoholes, tales como polioxiglicéridos, por ejemplo, caprilcaproíl polioxi-glicéridos (Labrasol®), derivados de ácidos grasos, por ejemplo, sus derivados de PG o PEG, etc., y cualquier mezcla de los mismos, por ejemplo, una mezcla de dos o más alcoholes no volátiles miscibles en agua, una mezcla de dos o más disolventes no volátiles miscibles en agua distintos de alcoholes, o una mezcla de al menos un alcohol no volátil miscible en agua y al menos un disolvente no volátil miscible en agua distinto de un alcohol. En una realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol.

La concentración de dicha proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, en la disolución o suspensión que comprende dicho POI y dicho disolvente no volátil miscible en agua puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración de la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, en dicha disolución o suspensión está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,1% y el 30% (p/v), más preferiblemente entre el 1% y el 15% (p/v), todavía más preferiblemente entre el 1% y el 10% (p/v); en una realización específica, la concentración de la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, en la disolución orgánica o suspensión es de aproximadamente el 2,5% (p/v).

Según el procedimiento [2] de la invención, se pone en contacto una disolución o suspensión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal en un disolvente no volátil miscible en agua con un fluido corporal acuoso, por ejemplo, fluidos gastrointestinales, para formar las nanopartículas cargadas con dicho POI ("nanopartículas cargadas con POI") mediante el autoensamblaje *in situ* de las cadenas de proteína. En una realización particular, el fluido corporal acuoso comprende fluido intestinal simulado. Esta etapa se realiza a una temperatura adecuada, de entre 10°C y 50°C, y más preferiblemente de entre 35°C y 37°C.

La disolución o suspensión que contiene una proteína hidrófoba vegetal y un producto de interés disuelto o suspendido en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y, opcionalmente, un tensioactivo y, opcionalmente, un medio acuoso, en la que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas, en la que el medio que comprende al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua no comprende un disolvente orgánico volátil y en la que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,01% y el 40% (p/v), más preferiblemente entre el 0,01% y el 30% (p/v), todavía más preferiblemente entre el 0,01% y el 20% (p/v), todavía más preferiblemente entre el 0,01% y el 15% (p/v), incluso más preferiblemente entre el 0,01% y el 10% (p/v), incluso más preferiblemente entre el 0,01% y el 5% (p/v), lo más preferido entre el 0,01% y el 2,5% (p/v), en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios, constituye un aspecto adicional de la presente invención. En una realización preferida la proteína hidrófoba vegetal de dicha disolución o suspensión se selecciona de hordeína, secalina, zeína, kafirina, panicina, orzenina y avenina; más preferiblemente se selecciona de hordeína, secalina, zeína, kafirina y avenina; aún más preferiblemente se selecciona de zeína, hordeína y kafirina; lo más preferiblemente es zeína. En otra realización, la cantidad de proteína hidrófoba vegetal en dicha disolución o suspensión es mayor de 0,1% (p/v), al menos 0,2% (p/v), al menos 0,5% (p/v), al menos 1% (p/v), al menos 5% (p/v), al menos 10% (p/v), al menos 15% (p/v), al menos 20% (p/v), al menos 25% (p/v), al menos 30% (p/v), al menos 35% (p/v), al menos 40% (p/v) y no más del 50% (p/v). En otra realización la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre 0,01% y 50% con la condición de que cuando la proteína hidrófoba vegetal es gliadina, entonces la cantidad de proteína hidrófoba vegetal es mayor de 0,1%. Dicha disolución o suspensión debe poder formar nanopartículas de proteína hidrófoba vegetal cuando se mezcla con una cantidad apropiada de no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso. Dicha disolución o suspensión orgánica puede usarse para producir nanopartículas cargadas con POI, principalmente nanoesferas de matriz en las que dicha matriz comprende una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, tras entrar en contacto con un medio no disolvente de proteína, preferiblemente con un medio acuoso, más preferiblemente con un fluido biológico. En una realización particular, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol, y el no disolvente de proteína hidrófoba vegetal es un medio acuoso que comprende agua, y preferiblemente es un fluido biológico. En una realización preferida, el medio comprende una mezcla binaria o ternaria de un disolvente orgánico no volátil miscible en agua. La proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, preferiblemente zeína. En una realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol. En una realización preferida, la disolución o suspensión comprende además un tensioactivo y/o un polímero polianiónico.

En el tercer aspecto, la invención también se refiere a un procedimiento para producir una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza que comprende un producto de interés (POI) asociado con núcleo-corteza, comprendiendo dicha nanocápsula vesicular de núcleo-corteza un núcleo y una corteza, comprendiendo dicha corteza una proteína

hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, denominado más adelante en el presente documento “procedimiento [3] de la invención”, que comprende poner en contacto una disolución, suspensión o emulsión que comprende dicho POI y dicha proteína hidrófoba vegetal en al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso, con el fin de formar dicha nanocápsula vesicular de núcleo-corteza y en el que la disolución, suspensión o emulsión que comprende la proteína hidrófoba vegetal y el producto de interés no comprende un disolvente orgánico volátil, en el que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en el que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios. La disolución, suspensión o emulsión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal, se pone en contacto con el no disolvente de proteína, preferiblemente un medio acuoso, en ausencia o en presencia de un tensioactivo u otros excipientes. En una realización particular, la disolución, suspensión o emulsión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, se pone en contacto con un medio acuoso en presencia de un tensioactivo.

El procedimiento [3] de la invención produce nanopartículas “cargadas” de la invención, concretamente, “nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza” cargadas con al menos un POI. El POI puede estar dentro de la nanocápsula o adsorberse sobre la superficie de la nanocápsula de corteza.

Los detalles del POI se han definido en la sección “Definiciones”.

El POI puede estar en estado líquido, semisólido o sólido. En una realización particular, dicho POI es un aceite. Las nanocápsulas de núcleo-corteza, preferiblemente las nanocápsulas de zeína (ZSNC) pueden obtenerse mediante o bien una técnica de nanoprecipitación *in situ*-deposición en superficie o una técnica de emulsificación-deposición en superficie *in situ*. La técnica de nanoprecipitación *in situ*-deposición en superficie se usa cuando el aceite es miscible con PG, y la técnica de emulsificación-deposición en superficie *in situ* cuando el material aceitoso es inmiscible con PG.

En otra realización particular, dicho POI se disuelve, emulsiona o dispersa en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua en el que se disolvió la proteína hidrófoba vegetal. En otra realización particular, dicho POI es un fármaco, un cosmético o un producto alimenticio en forma de una disolución o suspensión aceitosa o en forma de una disolución o dispersión en un disolvente inmiscible en agua.

En otra realización particular, dicho POI es un excipiente, por ejemplo parafina líquida o un lípido fundido tal como cera. Dicho excipiente está contenido en el núcleo de la nanocápsula vesicular de núcleo-corteza.

Según el procedimiento [3] de la invención, dicho POI puede ser, como ejemplo, (i) un aceite volátil tal como aceite de menta esencial, eugenol, aceite de canela, aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*) o sus componentes químicos (es decir, mentol, mentona, etc.) que son miscibles con disolventes orgánicos no volátiles que comprenden una proteína hidrófoba vegetal, lo que conduce a la formación de una disolución orgánica que contiene aceite y proteína; (ii) aceites volátiles tales como aceite esencial de limón o sus componentes químicos (es decir, limoneno) que son inmiscibles con disolventes orgánicos no volátiles que comprenden una proteína hidrófoba vegetal, lo que conduce a la formación de una emulsión que contiene gotitas de aceite y disolución de proteína (iii) aceites no volátiles o ácidos grasos, en estado líquido, semisólido o sólido, por ejemplo ácido oleico o ácido linoleico, que son miscibles o inmiscibles con disolventes orgánicos no volátiles que comprenden una proteína hidrófoba vegetal, lo que conduce a la formación de una disolución o emulsión orgánica de dicho aceite en la disolución de proteína.

Los detalles del disolvente orgánico no volátil miscible en agua se han mencionado anteriormente en relación con el procedimiento [1] de la invención. En una realización particular, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol (PG).

Los detalles de la proteína hidrófoba vegetal se han mencionado anteriormente en relación con el procedimiento [1] de la invención. La proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, preferiblemente zeína.

Todas las realizaciones dadas a conocer en relación con el procedimiento [1] de la invención también pueden aplicarse al procedimiento [3] de la invención.

Según el procedimiento [3] de la invención, se pone en contacto una disolución, suspensión o emulsión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente con un medio acuoso, en ausencia o presencia de un tensioactivo o en presencia de otros excipientes. Este procedimiento es particularmente útil cuando el POI es un compuesto hidrófobo, hidrófilo o anfifílico.

En resumen, una disolución, suspensión o emulsión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal se obtiene mezclando, disolviendo o emulsionando un POI en una disolución orgánica de una proteína hidrófoba vegetal en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua en condiciones adecuadas para obtener dicha disolución, suspensión o emulsión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal.

El disolvente orgánico no volátil miscible en agua que va a mezclarse tanto con el POI como con la disolución de la

proteína hidrófoba vegetal, en una realización particular, puede ser el mismo o diferente del disolvente que forma la disolución de la proteína hidrófoba vegetal.

5 La disolución, suspensión o emulsión orgánica que contiene tanto el POI como la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, puede ser un poliol no volátil miscible en agua, preferiblemente PG. Ejemplos de dichas disoluciones orgánicas incluyen prácticamente cualquier disolvente no volátil miscible en agua, preferiblemente un alcohol farmacéutica, alimentaria o cosméticamente aceptable, por ejemplo, un poliol, por ejemplo, PG, etc., o cualquier mezcla de polioles, o al menos un poliol, por ejemplo, PG y al menos un disolvente no volátil miscible en agua distinto de poliol, tal como polioxiglicéridos, por ejemplo, caprilcaproíl polioxi-glicéridos (Labrasol®), derivados de ácidos grasos, por ejemplo, sus derivados de PG o PEG, etc. En una realización particular, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua que va a mezclarse con tanto el POI como con la disolución de dicha proteína hidrófoba vegetal es PG (cuando la fase líquida que comprende el POI es altamente soluble en PG).

Dependiendo, entre otras características, de la solubilidad o miscibilidad del POI en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua que contiene la proteína hidrófoba vegetal, puede obtenerse una disolución, suspensión o emulsión (“el tamaño de gotita de aceite en el intervalo de 10-999 nm”) en presencia o ausencia de tensioactivos.

15 En una realización particular, se pone en contacto una disolución, suspensión o emulsión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal, en ausencia o presencia de un tensioactivo, con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso, en ausencia o presencia de un tensioactivo o de otros excipientes para formar una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza.

20 Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de las condiciones de operación para obtener la disolución, suspensión o emulsión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, particularmente PG, incluyen sonicación, homogeneización a alta cizalladura o agitación, a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo, desde 1 hasta 30 minutos, normalmente, inferior a 15 minutos, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos si es necesario usar agitación.

25 Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de las condiciones de operación para obtener nanocápsulas de núcleo-corteza incluyen mezclar la disolución, suspensión o emulsión que comprende un POI y una proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, particularmente PG, con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso, con agitación suave durante un periodo de tiempo adecuado, a temperatura ambiente, por ejemplo, desde 1 hasta 30 minutos, normalmente, inferior a 15 minutos, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos si es necesario usar agitación.

30 La razón de POI:disolvente no volátil miscible en agua en peso en volumen (mg/ml) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicha razón de POI:disolvente no volátil miscible en agua está comprendida entre 0,001:1 y 10<sup>4</sup>:1, preferiblemente entre 0,01:1 y 50:1.

35 Los detalles del POI se han mencionado anteriormente en la sección “Definiciones”; no obstante, es este caso, el POI debe ser de características inmiscibles en agua y capaz de formar una disolución, suspensión o emulsión en un disolvente no volátil miscible en agua que contiene una proteína hidrófoba vegetal. Por tanto, en una realización particular, el POI es un aceite o grasas sólidas, por ejemplo, un aceite esencial, aceite mineral, grasas sólidas (es decir, cera). En otra realización particular, el POI se disuelve, suspende o emulsiona en un disolvente miscible en agua, por ejemplo, un poliol, tal como PG y por tanto forma una disolución de una fase o una emulsión de dos fases, etc. Por tanto, prácticamente cualquier POI que pueda disolverse, dispersarse o emulsionarse en un disolvente no volátil miscible en agua, que comprenda una proteína hidrófoba vegetal, puede usarse dentro del contexto del procedimiento [3] de la invención.

En una realización específica, dicho POI es un fármaco o un producto cosmético o alimenticio que se disuelve, dispersa o emulsiona en un disolvente no volátil miscible en agua que comprende tanto POI como una proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína.

45 En una realización específica, dicho POI puede incluir un fármaco o un producto cosmético o alimenticio que se disuelve, dispersa o emulsiona en otro POI.

Según el procedimiento [3] de la invención, se pone en contacto un disolvente orgánico no volátil miscible en agua que comprende un POI en forma de disolución o suspensión o emulsión y una proteína hidrófoba vegetal, por ejemplo, una disolución, suspensión o emulsión aceitosa, con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso, es decir, un medio que comprende agua, no disolvente, opcionalmente en presencia de un tensioactivo, con el fin de formar las nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza cargadas con dicho POI (“nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza cargadas con POI”). En una realización particular, el no disolvente de proteína comprende agua, preferiblemente, agua destilada o bidestilada. La razón en volumen de la fase de (disolución o suspensión o emulsión que comprende el POI y la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína):no disolvente de proteína puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre 1:0,5 y 1:10<sup>6</sup> (v/v), preferiblemente entre 1:0,5 y 1:1000 (v/v), más preferiblemente entre 1:50 y 1:100, e incluso más preferiblemente entre 1:2 y 1:10.

En una realización preferida, el medio comprende además un tensioactivo y o un polímero polianiónico.

Aunque no es necesario usar tensioactivos para producir las nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza proporcionadas por la presente invención, en la práctica puede ser de interés usar un tensioactivo, por ejemplo, uno hidrófilo, hidrófobo o mezclas de los mismos, con el fin de obtener el HLB adecuado. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de tensioactivos que pueden usarse dentro del contexto de la presente invención incluyen tensioactivos no iónicos, por ejemplo, polisorbatos (es decir, líquidos aceitosos derivados de sorbitano pegilado esterificado con ácidos grasos, por ejemplo, ácido láurico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, etc.; se hace referencia a ésteres de sorbitano sencillo (no pegilado) con ácidos grasos mediante el nombre "Span"), derivado de polioxietileno de monolaurato de sorbitano (Tween® 20), derivado de polioxietileno de oleato de sorbitano (Tween® 80), etc., tensioactivos aniónicos, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), etc., copolímeros de bloque a base de óxido de etileno y óxido de propileno comercializados como Pluronic® por BASF, poli(alcohol vinílico) (PVA), etc. En una realización particular, el tensioactivo es TPGS (succinato de alfa-tocoferilo esterificado con PEG1000). La cantidad del tensioactivo puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la concentración de tensioactivo está comprendida entre el 0,001% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,01% y el 10% (p/v), más preferiblemente entre el 0,05% y el 5% (p/v).

Esta etapa se realiza a una temperatura adecuada, normalmente comprendida entre 1°C y 100°C, preferiblemente, entre 15°C y 50°C.

La disolución, suspensión o emulsión que contiene una proteína hidrófoba vegetal y un producto de interés disuelto, suspendido o emulsionado en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y, opcionalmente, un tensioactivo y, opcionalmente, un medio acuoso, en la que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas, en la que el medio que comprende al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua no comprende un disolvente orgánico volátil y en la que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v), preferiblemente entre el 0,01% y el 40% (p/v), más preferiblemente entre el 0,01% y el 30% (p/v), todavía más preferiblemente entre el 0,01% y el 20% (p/v), todavía más preferiblemente entre el 0,01% y el 15% (p/v), incluso más preferiblemente entre el 0,01% y el 10% (p/v), incluso más preferiblemente entre el 0,01% y el 5% (p/v), lo más preferido entre el 0,01% y el 2,5% (p/v), en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios, constituye un aspecto adicional de la presente invención. En una realización preferida la proteína hidrófoba vegetal de dicha disolución, suspensión o emulsión se selecciona de hordeína, secalina, zeína, kafirina, panicina, orzenina y avenina; más preferiblemente se selecciona de hordeína, secalina, zeína, kafirina y avenina; aún más preferiblemente se selecciona de zeína, hordeína y kafirina; lo más preferiblemente es zeína. En otra realización, la cantidad de proteína hidrófoba vegetal en dicha disolución, suspensión o emulsión es mayor de 0,1% (p/v), al menos 0,2% (p/v), al menos 0,5% (p/v), al menos 1% (p/v), al menos 5% (p/v), al menos 10% (p/v), al menos 15% (p/v), al menos 20% (p/v), al menos 25% (p/v), al menos 30% (p/v), al menos 35% (p/v), al menos 40% (p/v) y no más del 50% (p/v). En otra realización la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre 0,01% y 50% con la condición de que cuando la proteína hidrófoba vegetal es gliadina, entonces la cantidad de proteína hidrófoba vegetal es mayor de 0,1%. Dicha disolución, suspensión o emulsión debe poder formar nanopartículas de proteína hidrófoba vegetal cuando se mezcla con una cantidad apropiada de no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente agua. Dicha disolución, suspensión o emulsión orgánica puede usarse para producir nanopartículas cargadas con POI, principalmente nanocápsulas de núcleo-corteza en las que dicha corteza comprende una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, tras entrar en contacto con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente un medio acuoso, preferiblemente con un fluido biológico. En una realización particular, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol, y el no disolvente de proteína comprende agua, y preferiblemente es un fluido biológico. En una realización preferida, el medio comprende una mezcla binaria o terciaria de un disolvente orgánico no volátil miscible en agua. En una realización preferida, la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, preferiblemente zeína. En una realización preferida, el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es un poliol, preferiblemente es un glicol, más preferiblemente propilenglicol. En una realización preferida, la disolución o suspensión comprende además un tensioactivo y/o un polímero polianiónico.

Si se desea, las nanopartículas de la invención, tanto las que están cargadas con un POI (nanopartículas cargadas con POI) como las que no están cargadas (nanopartículas "vacías"), pueden incorporar un antioxidante, por ejemplo, ácido ascórbico (vitamina C), etc., en su formulación para el fin de aumentar su estabilidad con respecto a la temperatura y oxidación. En este caso, dicho antioxidante podría encapsularse conjuntamente con el POI (cuando sea apropiado) o en el recubrimiento de las nanopartículas de la invención; con ese fin, dichos procedimientos [1] a [3] de la invención se adaptarán adecuadamente para incorporar el antioxidante en la formulación de las nanopartículas, por ejemplo, añadiendo el antioxidante al medio no disolvente de proteína, preferiblemente medio acuoso, usado para producir las nanopartículas.

Adicionalmente, si se desea, dichos procedimientos [1], [2] y [3] de la invención pueden incluir un polímero o molécula aniónica, por ejemplo, polisacáridos aniónicos (por ejemplo, pectina, goma arábiga) o sales polianiónicas que pueden asociarse con las nanopartículas de la invención para obtener nanopartículas aniónicas. Dichas nanopartículas aniónicas pueden obtenerse recubriendo nanopartículas con dichos polímeros o moléculas aniónicas

o mediante complejación de los polímeros o moléculas aniónicas en la matriz o corteza de las nanopartículas.

Adicionalmente, si se desea, dichos procedimientos [1], [2] y [3] de la invención pueden incluir una etapa de secado para secar la suspensión que contiene las nanopartículas así formadas, con el fin de obtener las nanopartículas de la invención, es decir, tanto las nanopartículas cargadas con POI como las nanopartículas “vacías”, en forma de un polvo. En una realización particular, dicha etapa de secado se realiza mediante liofilización. Esta forma de presentación de dichas nanopartículas contribuye a su estabilidad y es además particularmente útil para su aplicación final en alimentos sólidos, tales como harina, pan, productos de masa, cereales, leche en polvo, etc., así como en productos y composiciones farmacéuticas y/o cosméticas.

Prácticamente puede usarse cualquier método o técnica convencional para secar suspensiones que contienen nanopartículas para realizar esta etapa de secado; sin embargo, en una realización particular, el secado de la suspensión que contiene nanopartículas se lleva a cabo por medio de secado por pulverización o por medio de liofilización. Este tratamiento se lleva a cabo generalmente añadiendo un agente protector adecuado de dichas nanopartículas, tal como un sacárido, por ejemplo, lactosa, trehalosa, manitol, sacarosa, maltodextrina, glucosa, sorbitol, maltosa, etc., y mezclas de los mismos con la suspensión de las nanopartículas. Dicho agente protector protege las nanopartículas de la invención frente a la degradación térmica así como la oxidación durante el proceso de secado.

La razón de “proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína:sacárido” en peso puede variar dentro de un amplio intervalo; sin embargo, en una realización particular, la razón de “proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína:sacárido” en peso está comprendida entre 1:1 y 1:1000, preferiblemente es de aproximadamente 1:1-5.

Asimismo, en una realización particular, la disolución que contiene el sacárido podría contener además un agente antioxidante, tal como ácido ascórbico (vitamina C), etc.; en este caso, la razón de “proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína:sacárido:agente antioxidante” en peso podría ser de 1:0,01-1000:0.001-100, preferiblemente de aproximadamente 1:1-5:0,2.

Tal como se mencionó anteriormente, el experto en la técnica entenderá que una nanopartícula cargada de la invención puede incorporar uno o más POI en la misma nanopartícula siempre que dichos POI no sean incompatibles entre sí. Con ese fin, los procedimientos [1], [2] y [3] se modificarán apropiadamente para incorporar los POI en la misma disolución de disolvente orgánico no volátil miscible en agua que comprende la proteína hidrófoba vegetal, o en la misma disolución, suspensión o emulsión que comprende la proteína hidrófoba vegetal y otro POI, o, alternativamente, en diferentes preparaciones.

Las nanopartículas obtenidas según el procedimiento [1], [2] ó [3] de la invención se dan a conocer por el presente documento.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a una disolución que contiene una proteína hidrófoba vegetal en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y, opcionalmente, un medio acuoso, en la que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas; en la que el medio que comprende al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua no comprende un disolvente orgánico volátil y en la que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v) con la condición de que cuando la proteína hidrófoba vegetal es gliadina, entonces la cantidad de proteína hidrófoba vegetal es mayor del 0,1%, en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a una disolución, suspensión o emulsión que contiene una proteína hidrófoba vegetal y un producto de interés disuelto, suspendido o emulsionado en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y, opcionalmente, un tensioactivo y, opcionalmente, un medio acuoso, en la que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas, en la que el medio que comprende al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua no comprende un disolvente orgánico volátil y en la que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre el 0,01 y el 50% (p/v), en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a una suspensión de nanopartículas según la invención en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, tal como un medio acuoso, y que no comprende un disolvente orgánico volátil, en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.

## Aplicaciones

Las nanopartículas de la invención tienen muchas propiedades que las hacen potencialmente útiles en una amplia variedad y diversidad de industrias, por ejemplo, en las industrias farmacéutica, cosmética, agrícola o alimentaria,

como sistema para la administración de productos de interés a diferentes superficies, por ejemplo, bucal, tubo digestivo, cabello, nasal, oral, rectal, cutánea, vaginal, etc.

5 Se ha considerado una ventaja importante la formación espontánea de las nanopartículas a base de una proteína hidrófoba vegetal mediante una técnica de autoensamblaje *in situ*. Esto permitiría la fabricación de grandes lotes industriales de nanopartículas para la administración de productos de interés para diferentes aplicaciones.

10 Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas propiedades de las nanopartículas de la invención incluyen la facilidad para obtener las nanopartículas sin el uso de disolventes orgánicos volátiles y sonicación para disolver proteínas hidrófobas o una técnica de evaporación aplicada para eliminar estos disolventes. Esto permitiría la adición directa de los nanosistemas recién preparados a cualquier producto final. Además, las nanopartículas de zeína autoensambladas tienen una alta capacidad para incorporar diferentes tipos de moléculas con diferentes propiedades fisicoquímicas incluyendo alta eficacia de encapsulación de productos de interés, tales como compuestos hidrófilos, hidrófobos o anfífilos pequeños o grandes. El uso de un disolvente orgánico no volátil miscible en agua o una mezcla de los mismos, que tienen un alto poder de solubilidad para zeína y otras proteínas hidrófobas vegetales, pueden actuar como plastificantes para potenciar la capacidad bioadhesiva a las superficies de la mucosa y por tanto permitir la administración de fármacos eficaz a la mucosa. Además, una aplicación interesante se refiere a la posibilidad de la administración directa de una disolución, suspensión o emulsión de proteína hidrófoba vegetal que contiene POI a los fluidos corporales, lo que permitiría la formación *in situ* de las nanopartículas y el posterior atrapamiento de la molécula, por ejemplo una inyección subcutánea de un disolvente orgánico no volátil miscible en agua biocompatible que contiene una proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, y moléculas terapéuticas para la administración permitirían la formación *in situ* de nanoimplantes.

15 En una realización particular, las nanopartículas de la invención permiten la incorporación directa de un POI en composiciones agrícolas, cosméticas, alimentarias o farmacéuticas.

20 Las nanopartículas de la invención pueden presentarse en forma de una suspensión, preferiblemente en un medio acuoso, o, alternativamente, pueden presentarse en forma de un polvo seco, manteniendo el POI en un estado estable y permitiendo su almacenamiento durante largos periodos de tiempo (particularmente, para su incorporación en preparaciones alimenticias sólidas).

25 Por tanto, en un séptimo aspecto, la invención se refiere a una composición, en lo sucesivo en el presente documento "composición de la invención", que comprende dos elementos:

- 30 a) un primer elemento seleccionado del grupo que consiste en (i) al menos una nanopartícula según el primer aspecto de la invención; (ii) una disolución según el cuarto aspecto de la invención; (iii) una disolución, suspensión o emulsión según el quinto aspecto de la invención; y (iv) una suspensión según el sexto aspecto de la invención, y
- 35 b) un segundo elemento que consiste en un vehículo, particularmente un vehículo agrícola, cosmética o farmacéuticamente aceptable o un vehículo adecuado para alimentos. En una realización preferida, la composición se selecciona de una composición farmacéutica, una composición cosmética, una composición agrícola y una composición alimenticia.

40 En una realización particular, la partícula de la invención es una nanopartícula "vacía" de la invención, es decir, una nanopartícula de la invención sin un POI, tal como i) una nanoesfera de matriz que comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua. En otra realización particular, la partícula de la invención es una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza, comprendiendo dicha nanocápsula vesicular de núcleo-corteza un núcleo y una corteza, comprendiendo dicha corteza una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, y comprendiendo dicha nanocápsula vesicular de núcleo-corteza un núcleo, comprendiendo dicho núcleo un excipiente en estado sólido, semisólido o líquido.

45 En otra realización particular, la nanopartícula de la invención es una nanopartícula "cargada" de la invención, es decir, una nanopartícula de la invención cargada con un POI, tal como (i) una nanoesfera de matriz que comprende un POI y una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, (ii) una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza que comprende un POI en el núcleo y una corteza, comprendiendo dicha corteza una proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua, o (iii) una combinación de (i) y (ii). En una realización particular, dicho POI es un POI que tiene actividad agrícola, cosmética, nutricional y/o terapéutica. Los detalles de dicho POI se han mencionado en la sección "Definiciones".

50 En otra realización particular, la composición de la invención es una composición agrícola; con ese fin, dicha composición comprende una nanopartícula "cargada" de la invención que comprende un POI susceptible de usarse en el campo agrícola, en el sentido más amplio, por ejemplo, un producto fitosanitario para controlar plagas y patógenos, un agente de potenciación del crecimiento de plantas, etc., por ejemplo, un herbicida (glifosato, etc.), un insecticida (por ejemplo, lambda-cihalotrina, etc.), un fungicida (por ejemplo, Mancozeb), etc., o un antitranspirante en el caso de nanopartículas "vacías", etc., y un vehículo aceptable en agricultura que comprende uno o más

excipientes adecuados para su aplicación; la composición agrícola puede formularse en forma de un gel, suspensión, etc., usando los vehículos conocidos por el experto en la técnica.

5 En otra realización particular, la composición de la invención es una composición cosmética; con ese fin, dicha composición comprende nanopartículas “vacías” de la invención, por ejemplo, nanopartículas vacías para su uso en productos para el moldeado del cabello tales como fijadores, moldeadores del cabello, etc., o nanopartículas “cargadas” de la invención que comprenden un POI que tiene actividad cosmética o susceptibles de usarse con fines cosméticos, o mezclas de los mismos, y un vehículo cosméticamente aceptable que comprende uno o más excipientes adecuados para su administración mediante una vía adecuada, tal como, por ejemplo, mediante la vía tópica; la composición cosmética puede formularse en forma de cremas para el cuidado de la piel, lociones, polvos, perfumes, pintalabios, esmalte de uñas de manos y pies, maquillaje facial y de ojos, toallitas húmedas, líquidos para ondulación permanente, lentes de contacto de color, tintes para el cabello, sprays y geles para el cabello, desodorantes, desinfectante para las manos, productos para bebés, aceites de baño, baños de burbujas, sales de baño, suspensiones, mantecas y muchos otros tipos de productos. Puede encontrarse información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones cosméticas así como sobre la producción de dichas composiciones cosméticas en el libro “Manual de Cosmetología”, por Octavio Díez Sales, 1ª edición, 1998, Editorial Videocinco, S.A. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de POI usados en la industria cosmética incluyen los productos ya mencionados en la sección “Definiciones”.

20 En otra realización particular, la composición de la invención es una composición alimenticia, tal como una preparación alimenticia sólida, líquida o semisólida; con ese fin, dicha composición comprende una nanopartícula “cargada” de la invención que comprende un POI que tiene actividad nutricional y un vehículo para su uso en alimentos. Alternativamente, la composición de la invención puede incorporarse en un producto alimenticio; por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un producto alimenticio que comprende una composición de la invención, concretamente, una composición que comprende una nanopartícula “cargada” de la invención, comprendiendo dicha nanopartícula un POI que tiene actividad nutricional y un vehículo para su uso en alimentos. El producto alimenticio puede encontrarse en forma líquida, semisólida o sólida. Los ejemplos ilustrativos de productos alimenticios que pueden enriquecerse o fortalecerse con la composición de la invención incluyen leche y derivados de la misma (yogures, quesos, cuajadas, etc.), zumos, mermeladas, productos de panadería y masa, pan, carne fermentada, salsas, etc. De manera similar, la composición de la invención puede incorporarse en un producto alimenticio para animales, por ejemplo, en piensos. En una realización particular, el producto alimenticio es un nutracéutico (es decir, un producto derivado de fuentes alimenticias que proporciona beneficios para la salud extras además del valor nutricional básico encontrado en los alimentos), particularmente un alimento funcional, es decir, un alimento en el que se ha añadido un nuevo ingrediente o un ingrediente existente para dar como resultado un nuevo producto que tiene una nueva función a menudo relacionada con la mejora de la salud o la prevención de enfermedades.

35 En otra realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica; con ese fin, dicha composición comprende una nanopartícula “cargada” de la invención que comprende un POI que tiene actividad terapéutica o susceptible de usarse con fines terapéuticos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más excipientes o vehículos. El POI que está presente en la nanopartícula “cargada” de la invención puede quedar atrapado o encapsulado dentro de la nanopartícula (es decir, nanoesfera o nanocápsula) o, alternativamente, el producto de interés puede adsorberse sobre o conjugarse a la superficie de la nanopartícula.

Los ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen composiciones líquidas, sólidas o semisólidas.

45 Las composiciones farmacéuticas comprenderán excipientes adecuados para cada formulación y se prepararán convencionalmente mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los excipientes se elegirán según la forma de dosificación farmacéutica seleccionada. Puede encontrarse una revisión de las diferentes formas de dosificación farmacéutica de fármacos y de su preparación en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, por C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

50 La dosis de nanopartículas “cargadas” de la invención que va a administrarse a un sujeto que necesita tratamiento con el POI puede variar dentro de un amplio intervalo y dependerá, entre otras características, de la naturaleza del POI, de su actividad o potencia, de la cantidad de POI por nanopartícula, etc.; sólo para fines ilustrativos, la dosis de nanopartículas “cargadas” que va a administrarse a un sujeto puede estar comprendida, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal al día, preferiblemente, entre 0,1 y 2 mg por kg de peso corporal al día.

55 En una realización particular, dicha composición farmacéutica se formula como forma de dosificación farmacéutica adecuada para su administración mediante cualquier vía, por ejemplo, mediante la vía bucal, dental, nasal, ocular, oral, parenteral, rectal, tópica o vaginal. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de dichas formas de dosificación farmacéutica incluyen sólidos (por ejemplo, cápsulas de no gelatina y de gelatina dura y blanda, películas adhesivas, parches dentales adhesivos, supositorios, comprimidos, gránulos, micropartículas, etc.), semisólidos (por ejemplo, cremas, geles, lociones, pomadas, etc.), líquidos (por ejemplo, disoluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). En una realización preferida, debido a las propiedades bioadhesivas de las nanopartículas de la invención, la composición farmacéutica se formula en forma de una composición para su administración a través de una vía de

acceso a las mucosas.

5 En una realización específica, la composición farmacéutica se formula como forma farmacéutica adecuada para su administración mediante la vía rectal (supositorios), mediante la vía vaginal (óvulos) o mediante las vías oral o parenteral (por ejemplo, s.c., o intravítrea); si se desea, en esta realización, las nanopartículas pueden formarse cuando la disolución, suspensión o emulsión que comprende el POI, la proteína hidrófoba vegetal, preferiblemente zeína, y el disolvente orgánico no volátil miscible en agua, entra en contacto con un fluido corporal, por ejemplo, el fluido vaginal, los fluidos del intestino y otros. Por tanto, en una realización preferida, el vehículo de la composición comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable para la administración del mismo mediante las vías bucal, dental, nasal, ocular, intravítrea, oral, parenteral, rectal, tópica o vaginal, o un excipiente cosméticamente aceptable para la administración del mismo mediante la vía tópica.

En una realización particular, la composición es una composición cosmética o una composición farmacéutica adecuada para su administración mediante la vía bucal, dental, nasal, ocular, oral, parenteral, rectal, tópica o vaginal.

15 En otra realización particular, la composición de la invención se prepara en forma de un polvo seco, por ejemplo como liofilizado, junto con un agente crioprotector, que va a reconstituirse antes de su uso mediante mezclado con el agente de reconstitución.

En una realización específica, la invención proporciona una composición farmacéutica en forma de disolución, suspensión o emulsión que comprende:

<u>Componente</u>	<u>% en peso con respecto al volumen total</u>
Proteína hidrófoba vegetal (zeína)	0,01 – 50
POI*	0,001 – 99,988
disolvente(s) orgánico(s) no volátil(es) miscible(s) en agua	0,001 - 99,98
no disolvente de proteína hidrófoba vegetal (agua)	0,00 - 15%

\* El POI puede ser cualquier POI tal como se define en la sección “Definiciones” incluyendo excipientes.

20 Dicha composición farmacéutica es adecuada para la formación *in situ* de las nanopartículas tras el contacto con fluidos corporales.

En otra realización específica, la invención proporciona una composición farmacéutica en forma de una suspensión de nanopartículas que comprende:

<u>Componente</u>	<u>% en peso con respecto al volumen total</u>
Proteína hidrófoba vegetal (zeína)	0,01 – 50
POI*	0,001 – 99,988
disolvente(s) orgánico(s) no volátil(es) miscible(s) en agua	0,001 - 75
polímero aniónico	0,00 - 10
no disolvente de proteína hidrófoba vegetal (agua)	15,00 - 99,98%

\* El POI puede ser cualquier POI tal como se define en la sección “Definiciones” incluyendo excipientes.

25 Las nanopartículas “cargadas” de la invención, en particular, las nanopartículas cargadas con un POI en las que dicho POI es un fármaco, pueden usarse en el tratamiento de enfermedades. El fármaco se seleccionará en función de la enfermedad que va a tratarse. Por tanto, también se da a conocer una nanopartícula de la invención cargada con un POI, en la que dicho POI es un fármaco, para su uso en medicina.

30 En un aspecto, se da a conocer una disolución, suspensión o emulsión de una proteína hidrófoba vegetal en una cantidad comprendida entre el 0,01% y el 50% (p/v) y un POI en un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y, opcionalmente, un tensioactivo o/y un polímero polianiónico, y, opcionalmente, un medio acuoso, en la que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas; en la que el POI es un fármaco y en la que dicha disolución, suspensión o emulsión no comprende un disolvente orgánico volátil para su uso en medicina o en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad. También se da a conocer  
35 que dicha disolución, suspensión o emulsión contiene una cantidad de una proteína hidrófoba vegetal comprendida entre el 0,01% y el 40% (p/v), preferiblemente entre el 0,01% y el 30% (p/v), más preferiblemente entre el 0,01% y el

20% (p/v), todavía más preferiblemente entre el 0,01% y el 15% (p/v), incluso más preferiblemente entre el 0,01% y el 10% (p/v), incluso más preferiblemente entre el 0,01% y el 5% (p/v), lo más preferido entre el 0,01% y el 2,5% (p/v). También se da a conocer que la proteína hidrófoba vegetal de dicha disolución, suspensión o emulsión se selecciona de hordeína, secalina, zeína, kafirina, panicina, orzenina y avenina; más preferiblemente se selecciona de hordeína, secalina, zeína, kafirina y avenina; aún más preferiblemente se selecciona de zeína, hordeína y kafirina; lo más preferiblemente es zeína. También se da a conocer que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal en dicha disolución, suspensión o emulsión es mayor de 0,1% (p/v), al menos 0,2% (p/v), al menos 0,5% (p/v), al menos 1% (p/v), al menos 5% (p/v), al menos 10% (p/v), al menos 15% (p/v), al menos 20% (p/v), al menos 25% (p/v), al menos 30% (p/v), al menos 35% (p/v), al menos 40% (p/v) y no más del 50% (p/v). También se da a conocer que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre 0,01% y 50% con la condición de que cuando la proteína hidrófoba vegetal es gliadina, entonces la cantidad de proteína hidrófoba vegetal es mayor de 0,1%.

Por tanto, en un noveno aspecto, el fármaco es clorhexidina antimicrobiana y, por tanto, la invención se refiere a una nanopartícula de la invención cargada con clorhexidina para su uso en el tratamiento y la prevención de infecciones corporales externas o bucales.

En una divulgación particular, la molécula es útil en un alimento funcional, específicamente es el antioxidante curcumina y, por tanto, se da a conocer el uso de una nanopartícula cargada con curcumina como antioxidante y aditivo alimenticio para mejorar la salud de animales y seres humanos.

En otra divulgación particular, la molécula es un aceite esencial (aroma) y, por tanto, se da a conocer el uso de una nanopartícula de la invención cargada con aceites esenciales (aromas) en los campos alimentario, cosmético, agrícola y farmacéutico.

En otra divulgación particular, la molécula es un aceite o ácido graso omega y, por tanto, se da a conocer el uso de una nanopartícula de la invención cargada con aceites o ácidos grasos omega como complemento dietético. En un décimo aspecto, la invención se refiere al uso de una nanopartícula de la invención, en la que el producto de interés es un aceite seleccionado de aceite de hígado de bacalao y ácido linolénico, como complemento dietético.

En un aspecto, se da a conocer el uso de una nanopartícula cargada y vacía catiónica en la aglutinación, captura o unión a la superficie de moléculas solubles aniónicas, microorganismos aniónicos (es decir, levaduras, bacterias, virus, hongos, etc.), o cualquier partícula aniónica.

La invención se describe a continuación por medio de varios ejemplos que no limitan, sino que más bien ilustran la invención.

### 30 Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen la producción de nanopartículas (nanoesferas de matriz y nanocápsulas vesiculares de núcleo-corteza), a base de la proteína hidrófoba vegetal zeína, que pueden incorporar un producto de interés, por ejemplo, un aceite o aroma (por ejemplo, aceite esencial de limón o menta, aceites de hígado de bacalao, ácido oleico, ácido linolénico), una proteína (por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA)), un fármaco (por ejemplo, clorhexidina) o un antioxidante alimentario (por ejemplo, curcumina). Dichos ejemplos muestran que dichas nanopartículas tienen alta bioadhesión a la mucosa, facilidad del proceso a escala industrial, alta eficacia de encapsulación de productos de interés, tales como compuestos hidrófilos, hidrófobos o anfifílicos pequeños o grandes, alta eficacia de encapsulación de aceites, y que las nanopartículas potencian la solubilidad en agua de compuestos hidrófobos.

40 Los materiales usados para la producción de dichas nanopartículas se describen a continuación.

#### Materiales

La zeína, el ácido linolénico, la curcumina, la albúmina sérica bovina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA) y la sonda fluorescente lipófila perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina se suministraron por Sigma (España).

45 Los triglicéridos de cadena media (Labrafac™ CC) fueron una muestra de donación proporcionada por Gattefosse (Gennevilliers, Francia).

Labrasol® se suministró por Gattefosse.

La goma arábiga, la clorhexidina, el aceite de *Mentha piperita* (menta), el aceite de canela, el aceite de tomillo, el eugenol, Tween® 20, Tween® 80, el glicerol y el propilenglicol se suministraron por Fagron.

50 Lutrol® L 44 fue una amable donación de BASF.

El resto de los reactivos químicos incluyendo los excipientes eran de calidad analítica y se suministraron por Sigma (España).

## EJEMPLO 1

Preparación y caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas vacías (ZSNP) a pequeña y gran escala

## 1.1 Preparación de nanopartículas de zeína autoensambladas vacías catiónicas y aniónicas

Para obtener ZSNP catiónicas vacías, a pequeña escala, se disolvió zeína en propilenglicol (PG) a diferentes concentraciones de zeína (0,5, 1, 2,5, 5 y 10% (p/v)). Entonces, se formaron las nanopartículas mezclando 1 ml de dicha disolución de zeína-propilenglicol con 5 ml de agua bidestilada como no disolvente de zeína miscible en propilenglicol. Por tanto, la zeína precipitó en forma de nanopartículas de matriz.

Para la producción a gran escala, se vertieron 5 l de disolución de zeína-propilenglicol, a una concentración del 5% (p/v), a un flujo constante de 250 ml/min. en 25 l de agua bidestilada en un reactor a temperatura ambiente con agitación suave.

Se obtuvieron nanopartículas preparadas mediante un método tradicional según el protocolo descrito anteriormente con ligeras modificaciones [29]. Para este fin, se disolvieron 100 mg de zeína en 5 ml de etanol al 70% (p/p) de manera ultrasónica. Se añadió inmediatamente la disolución resultante en 7,5 ml de agua destilada. Entonces, se evaporó la suspensión de nanopartículas resultante a presión reducida usando un rotavapor (Büchi R-144, Suiza) para eliminar el etanol.

Con el fin obtener nanopartículas de zeína aniónicas, se mezcló 1 ml de la disolución de zeína en propilenglicol (al 5% p/v) con 5 ml de agua bidestilada como no disolvente de zeína miscible en PG. Entonces, se añadió 1 ml de polímero aniónico (goma arábica al 0,25% p/v) a la suspensión de nanopartículas de zeína con agitación magnética. Tras esto, se dejó la mezcla con agitación magnética durante 5 min. a temperatura ambiente. De un modo similar, se aplicó un procedimiento de complejación directa para obtener nanopartículas de zeína. Para este fin, se añadió 1 ml de la disolución de zeína en propilenglicol (al 5% p/v) a 5 ml de una disolución acuosa de polímero aniónico (goma arábica al 0,04% p/v) como no disolvente de zeína miscible en PG.

En ambos tipos de nanopartículas, se centrifugaron las suspensiones de nanopartículas resultantes dos veces a 27.000 x g durante 20 min. y entonces se recogieron para su caracterización adicional.

## 1.2 Caracterización de nanopartículas de zeína vacías

1.2.1 Tamaño, potencial zeta, rendimiento y morfología de las nanopartículas

Se determinaron el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas mediante espectroscopía de correlación fotónica y anemometría Doppler láser electroforética, respectivamente, usando un sistema analizador Zetamaster (Malvern Instruments, RU). Se diluyeron las muestras con agua bidestilada y se midieron a 25°C con un ángulo de dispersión de 90°.

El rendimiento del procedimiento de preparación de nanopartículas, que es el porcentaje de zeína transformada en nanopartículas, se determinó mediante gravimetría a partir de muestras secadas por congelación tal como se describió anteriormente [38]. Para este fin, se centrifugaron las suspensiones acuosas de las nanopartículas obtenidas dos veces a 27.000 x g durante 20 min. (centrífuga de laboratorio de Sigma, Rotor 3336, Biofuge Heraeus, Alemania), se recogieron y se liofilizaron en un aparato Genesis 12EL (Virtis, EE.UU.). Se calculó el porcentaje de rendimiento de las nanopartículas (la cantidad de zeína transformada en nanopartículas) como la razón entre las muestras de nanopartículas liofilizadas secas y la cantidad inicial de la zeína usada para preparar las formulaciones.

Se visualizaron las características morfológicas de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) en un microscopio electrónico Zeiss Libra® 120 (Oberkochen, Alemania).

## 1.3 Resultados

1.3.1 Caracterización de nanopartículas de zeína vacías

La tabla 1 muestra las principales características fisicoquímicas de tanto ZSNP de la invención preparadas a pequeña (ZSNP-0,5, ZSNP-1, ZSNP-2,5, ZSNP-5, ZSNP-10) y gran escala (ZSNP-5 a gran escala) como nanopartículas de zeína preparadas mediante un método de evaporación de disolvente tradicional (Z-NP-1 TRAD) [29]. Generalmente, las nanopartículas de zeína autoensambladas vacías catiónicas presentaban un tamaño homogéneo y una carga superficial positiva. La microscopía electrónica de transmisión corroboró el tamaño de las nanopartículas y se encontró que las nanopartículas eran esféricas (figura 1). La carga superficial positiva aumentó al aumentar la concentración de zeína. No hubo ninguna diferencia significativa entre el tamaño y el potencial zeta para ZSNP preparadas a pequeña o gran escala. El porcentaje de rendimiento de las nanopartículas era muy alto para todas las formulaciones (aproximadamente el 98%). Se ha observado que en el caso de ZSNP a altas concentraciones de zeína (ZSNP-5 y ZSNP-10), se formaba un pequeño porcentaje de agregados. Por otro lado, el recubrimiento de las nanopartículas de zeína con polímeros aniónicos (ZSNP-5 AG) o la complejación del polímero aniónico (goma arábica) en la matriz de nanopartículas de zeína (complejo ZSNP-5 AG) aumentó significativamente el tamaño de las partículas hasta aproximadamente de 200 a 250 nm en comparación con las no recubiertas o las

no complejadas. Las nanopartículas recubiertas con goma arábica (ZSNP-5 AG y complejo ZSNP-5 AG) tienen cargas de superficie negativas homogéneas.

Tabla 1

Características fisicoquímicas de ZSNP.

5 Datos expresados como media  $\pm$  DE (n=6)

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), ( $\pm$ DE)				<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), ( $\pm$ DE)	<sup>d</sup> % de rendimiento, ( $\pm$ DE)
	Pico y porcentaje						
	<i>Pico 1 (nm)</i>	%	<i>Pico 2 (nm)</i>	%			
ZSNP-0,5	111,08 (0,21)	100%			0,115	+ 6,67 (0,11)	97,12 (2,21)
ZSNP-1	125,03 (1,22)	100%			0,103	+ 24,21 (0,06)	97,83 (1,35)
ZSNP-2,5	143,86 (2,11)	100%			0,123	+ 34,90 (0,20)	99,10 (2,29)
ZSNP-5	173,65 (4,22)	95%	3073,65 (22,31)	5%	0,230	+ 32,84 (1,79)	96,12 (3,90)
ZSNP-10	211,81 (2,12)	83%	7314,65 (11,21)	17%	0,378	+ 38,85 (1,12)	97,70 (2,10)
ZSNP-5 AG	198,97 (5,37)	95%	1823,12 (27,77)	5%	0,211	-6,23 (0,32)	96,10 (1,13)
complejo ZSNP-5 AG	250,11 (3,12)	94%	3453,33 (23,01)	6%	0,291	-8,14 (0,66)	97,35 (2,55)
Z-NP-1 TRAD	188,44 (5,62)	94%	2923,12 (13,33)	6%	0,178	+ 33,28 (0,42)	96,00 (0,77)
ZSNP-5 gran escala	173,97 (5,32)	96%	2132,10 (25,69)	4%	0,238	+ 32,76 (0,52)	95,13 (2,15)

ZSNP-0,5 a ZSNP-10: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas a partir de diferentes concentraciones de disolución de zeína en propilenglicol (al 0,5, 1, 2,5, 5 y 10% p/v) preparadas a pequeña escala

ZSNP-5 AG: nanopartículas de zeína autoensambladas recubiertas con goma arábica

10 Complejo ZSNP-5 AG: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas mediante complejación entre zeína y goma arábica

Z-NP-1 TRAD: nanopartículas de zeína obtenidas mediante un método de sustitución de disolvente tradicional [29]

ZSNP-5 gran escala: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas a gran escala

<sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

<sup>b</sup> Índice de Polidispersidad.

15 <sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

<sup>d</sup> Porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial de la proteína zeína usada.

## EJEMPLO 2

### Preparación y caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas obtenidas a partir de diferentes mezclas de disolventes

20 También se usaron mezclas de disolventes no tóxicos biocompatibles y biodegradables para obtener nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP). Como ejemplo, se usaron una mezcla binaria de propilenglicol y disolventes no volátiles miscibles en PG (es decir, agua o glicerol) u otros tensoactivos líquidos que son miscibles con propilenglicol, tales como Labrasol® (caprilcaproíl polioxil-8 glicéridos NF), copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno no iónicos (Lutrol® L 44 líquido (Poloxamer USP-NF)) o Tween® 80, a una concentración que

mantuvo la zeína soluble en PG.

## 2.1 Determinación de la solubilidad de la zeína en mezclas binarias de disolventes no volátiles miscibles en agua

Se estudió la solubilidad de la zeína en diferentes mezclas binarias de PG y otros disolventes orgánicos no volátiles miscibles en agua que son miscibles con PG. Este ejemplo estudia la incorporación de diferentes tensioactivos o disolventes para potenciar la solubilidad de una molécula en PG, si es necesario. Para este fin, se monitorizó el cambio de turbidez de la disolución de zeína-PG a 405 nm tras la adición de diferentes cantidades de agua, glicerol, Labrasol®, Tween® 80 o Lutrol® L 44 a 5 ml de disolución de zeína en PG (2,5% p/v), a temperatura ambiente. La zona de punto final, a la que la zeína precipitó en la disolución de PG, se calculó monitorizando el cambio de turbidez a 405 nm, es decir, el aumento de absorbancia (en porcentaje) tras cada adición de disolvente/tensioactivo con respecto al valor de absorbancia inicial en un espectrofotómetro (Labsystems iEMS Reader MF, Finlandia).

## 2.2 Preparación y caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas obtenidas a partir de mezclas binarias de disolventes no volátiles miscibles

Con el fin de obtener ZSNP a partir de mezclas de disolventes binarias de PG, se prepararon 5 ml de zeína en disolución de propilenglicol (zeína-PG) a diferentes concentraciones. Entonces, se añadieron diferentes cantidades de disolventes secundarios que son miscibles con PG tales como glicerol (2 ml), agua (0,8 ml), Labrasol® (3 ml), Tween® 80 (3 ml) y Lutrol® L 44 (1,2 ml) a la disolución de zeína-PG. Se mantuvo habitualmente la concentración de zeína final al 2,5% p/v en la mezcla de disolventes. Se seleccionó el volumen de los disolventes secundarios según el estudio previo realizado para determinar la zona de miscibilidad entre disolventes no volátiles miscibles en PG y zeína-PG en la que la zeína no era soluble. Entonces, se formaron las nanopartículas mezclando 1 ml de la disolución de mezcla binaria de disolventes de zeína con 5 ml de agua bidestilada como no disolvente miscible en zeína. Se caracterizaron las nanopartículas resultantes tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1.

Por otro lado, con el fin de formar ZSNP a partir de mezclas de disolventes binarias de PG añadiendo un no disolvente de proteína zeína distinto de agua, se prepararon 5 ml de zeína en disolución de propilenglicol (zeína-PG) a diferentes concentraciones. Entonces, se añadieron diferentes cantidades de disolventes secundarios que son miscibles con PG, tal como glicerol (2 ml), Labrasol® (3 ml) y Lutrol® L 44 (1,2 ml) a la disolución de zeína-PG. Se mantuvo habitualmente la concentración de zeína final al 2,5% p/v en la mezcla de disolventes. Se seleccionó el volumen de los disolventes secundarios según el estudio previo realizado para determinar la zona de miscibilidad entre disolventes no volátiles miscibles en PG y zeína-PG en la que la zeína era soluble. Entonces, se formaron las nanopartículas añadiendo la cantidad apropiada de cada disolvente secundario para lograr el volumen final de 25 ml. Se caracterizaron las nanopartículas resultantes tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Solubilidad de zeína en mezclas de disolventes de PG

La figura 2 muestra el porcentaje de cambios de turbidez monitorizados mediante UV a 405 nm tras la adición de diferentes porcentajes (v/v) de tensioactivos o disolventes no volátiles, miscibles en PG en los que la zeína no era soluble. El intervalo de punto final mostrado en la figura 2 se ha considerado como zona en la que el porcentaje de no disolvente de zeína inicia la precipitación de zeína a partir de la disolución de PG para lograr la precipitación completa. A partir de esta figura, se ha observado que el intervalo de punto final (representado por el intervalo amplio de cada curva en el eje X) para tanto agua como Lutrol® L 44 era de desde 15 hasta 22,5 y del 22 al 28% v/v respectivamente. Esto indicó el bajo poder de solubilización de ambos disolventes para la zeína. Por otro lado, el porcentaje de disolución de zeína en glicerol:PG (v/v) demostró un intervalo de punto final superior (45-55% v/v). La capacidad de solubilización de tanto Labrasol® como Tween® 80 para la zeína en PG eran las más altas, aproximadamente del 65-75% (v/v) en el caso de Tween® 80 y de desde el 75 hasta el 85% (v/v) en el caso de Labrasol®.

### 2.3.2 Caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas obtenidas a partir de mezclas binarias de disolventes no volátiles miscibles

La tabla 2 muestra las principales características fisicoquímicas de ZSNP preparadas a partir de mezclas de disolventes para zeína que comprenden una disolución de zeína-PG mezclada con otros disolventes tales como agua (ZSNP-PG:W), glicerol (ZSNP-PG:G), Labrasol® (ZSNP-PG:Lab), Lutrol® L 44 (ZSNP-PG:Lut) y Tween® 80 (ZSNP-PG:T80) formadas tras la adición de una cantidad apropiada de agua como no disolvente de proteína. Se obtuvieron ZSNP formadas tras la adición de un no disolvente de proteína distinto de agua (Lutrol®, glicerol y Labrasol®) a la disolución de mezcla binaria de disolventes de zeína-PG tras la adición de glicerol a la disolución de mezcla binaria de zeína\_PG-glicerol (ZSNP-PG:G/G), de Lutrol® a la disolución de mezcla binaria de zeína PG-Lutrol® (ZSNP-PG:Lut/Lut) y de Labrasol® a la disolución de mezcla binaria de zeína PG-Labrasol® (ZNSP-PG:Lab/Lab).

Todas las formulaciones de nanopartículas obtenidas usando agua como no disolvente de proteína presentaban un tamaño inferior a 200 nm y una carga superficial positiva homogénea. En el caso de ZSNP preparadas a partir de

una mezcla de PG:glicerol (ZSNP-PG:G), el tamaño de las nanopartículas aumentó en comparación con ZSNP-PG:W y se observó un pequeño porcentaje de aglomerados (9%). Este fenómeno se refiere a la alta viscosidad de la disolución de PG:glicerol. El porcentaje de rendimiento de las nanopartículas era muy alto para todas las formulaciones (aproximadamente el 95-98%).

- 5 En el caso de nanopartículas obtenidas tras la adición de un no disolvente de proteína distinto de agua, los tamaños y los índices de polidispersidad eran superiores a los obtenidos para ZSNP obtenidas con agua. Por tanto, las nanopartículas formadas tras la adición de un no disolvente de proteína distinto de agua eran menos homogéneas en tamaño y mostraban mayor porcentaje de aglomerados que ZSNP obtenidas con agua.

Tabla 2

- 10 Características fisicoquímica de ZSNP preparadas a partir de mezclas binarias de PG y otros disolventes.

Datos expresados como media  $\pm$  DE (n=6)

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), ( $\pm$ DE)				<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), ( $\pm$ DE)	<sup>d</sup> % de rendimiento, ( $\pm$ DE)
	Pico y porcentaje						
	<i>Pico 1 (nm)</i>	%	<i>Pico 2 (nm)</i>	%			
ZSNP-PG:W	117,11 (0,120)	100%			0,189	+ 32,12 (0,41)	96,22 (1,16)
ZSNP-PG:G	125,03 (1,22)	91%	2320,11 (34,21)	9%	0,273	+ 30,20 (1,36)	98,13 (0,56)
ZSNP-PG:Lab	151,16 (3,71)	100%			0,143	+ 31,43 (0,60)	98,10 (3,25)
ZSNP-PG:Lut	143,05 (1,42)	100%			0,220	+ 32,73 (1,99)	95,12 (2,10)
ZSNP-PG:T80	161,21 (4,60)	100%			0,178	+ 34,33 (1,62)	96,55 (3,87)
ZSNP-PG:G/G	557,21	Nd	1393,6	nd	0,462	nd	nd
ZSNP-PG:Lut/Lut	331,82	100%		nd	0,339	nd	nd
ZSNP-PG:Lab/Lab	429,22	Nd	343,75	nd	0,333	nd	nd

ZSNP-PG:W: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas a partir de disolución de zeína-PG mezclada con agua mediante la adición de la cantidad de agua adicional requerida.

- 15 ZSNP-PG:G: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas a partir de disolución de zeína-PG mezclada con glicerol mediante la adición de la cantidad de agua requerida.

ZSNP-PG:Lab: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas a partir de disolución de zeína-PG mezclada con Labrasol® mediante la adición de la cantidad de agua requerida.

ZSNP-PG:Lut: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas a partir de disolución de zeína-PG mezclada con Lutrol® L 44 mediante la adición de la cantidad de agua requerida.

- 20 ZSNP-PG:T80: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas a partir de disolución de zeína-PG mezclada con Tween® 80 mediante la adición de la cantidad de agua requerida.

ZSNP-PG:G/G: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas a partir de disolución de zeína-PG mezclada con glicerol mediante la adición de la cantidad de glicerol adicional requerida.

- 25 ZSNP-PG:Lut/Lut: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas a partir de disolución de zeína-PG mezclada con Lutrol® mediante la adición de la cantidad de Lutrol® adicional requerida.

ZSNP-PG:Lab/Lab: nanopartículas de zeína autoensambladas preparadas a partir de disolución de zeína-PG mezclada con Labrasol® mediante la adición de la cantidad de Labrasol® adicional requerida.

<sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

<sup>b</sup> Índice de Polidispersidad.

<sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

<sup>d</sup> Porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial de proteína zeína usada.

EJEMPLO 3

5 Encapsulación de albúmina sérica bovina (BSA) como modelo de molécula hidrófila grande en nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP)

3.1 Encapsulación de BSA en nanopartículas de zeína autoensambladas

Se utilizó una proteína marcada fluorescentemente como modelo de fármaco de molécula grande que va a incorporarse en nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP). Para ese fin, se incorporaron 200 µl de disolución acuosa de albúmina sérica bovina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA) a una concentración de 1 mg/ml en 2 ml de disolución de zeína-PG (zeína al 2,5% p/v). Para obtener nanopartículas de zeína tradicionales, se incorporaron 200 µl de FITC-BSA (1 mg/ml) en disolución hidroalcohólica al 70% que tenía una concentración de zeína similar. Con el fin de obtener ZSNP, se añadió un ml de disolución de zeína-PG que contenía FITC-BSA a 5 ml de agua bidestilada. Se obtuvieron nanopartículas cargadas con FITC-BSA preparadas mediante un método tradicional según lo descrito anteriormente en el ejemplo 1 con las mismas cantidades de zeína y FITC-BSA. Se purificó la suspensión acuosa final de nanopartículas cargadas con FITC-BSA mediante centrifugación y se recogieron para su caracterización adicional tal como se describió en el ejemplo 1.

3.2 Caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP) cargadas con FITC-BSA

Se determinaron el tamaño, el potencial zeta y el rendimiento del procedimiento de preparación de nanopartículas tal como se describió en el ejemplo 1. Con el fin de calcular la eficacia de encapsulación de FITC-BSA en ZSNP y nanopartículas obtenidas mediante un método tradicional usando etanol, se centrifugaron las suspensiones de nanopartículas a 27.000 x g durante 20 min. Entonces, se estimó la cantidad de FITC-BSA cargada como la diferencia entre su concentración inicial añadida y la concentración medida en los sobrenadantes tras la etapa de centrifugación. Para ese fin, se prepararon curvas de calibración con disoluciones patrón de FITC-BSA a un intervalo de concentración de desde 1 hasta 20 µg/ml (r = 0,996). Se realizó el ensayo mediante espectrofluorimetría a 480 nm (longitud de onda de excitación) y 520 nm (longitud de onda de emisión) (GENios, TECAN, Austria).

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP) cargadas con FITC-BSA

La tabla 3 describe las principales características fisicoquímicas de ZSNP cargadas con FITC-BSA (ZSNP-BSA) y nanopartículas de zeína preparadas mediante el método de desplazamiento de disolvente (Z-NP-BSA-T). Se observó que ambos tipos de nanopartículas presentaban un tamaño homogéneo y carga superficial positiva. La eficacia de encapsulación de FITC-BSA en nanopartículas de zeína preparadas mediante el método de autoensamblaje (ZSNP-BSA) era 1,5 veces superior que la obtenida mediante el método tradicional (Z-NP-BSA-T). Esto puede deberse a la precipitación de BSA que se asoció en la fase de etanol. La eficacia de encapsulación indicó la alta capacidad del método de autoensamblaje para incorporar moléculas grandes tales como proteínas.

Tabla 3

Características fisicoquímicas de nanopartículas de zeína cargadas con FITC-BSA

Datos expresados como media ± DE (n=6)

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), (±DE)	<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), (±DE)	<sup>d</sup> %de rendimiento, (±DE)	<sup>e</sup> %de eficacia de encapsulación de FITC-BSA, (±DE)
ZSNP-BSA	116,41 (1,34)	0,271	+23,8 (0,77)	96,39 (3,11)	92,22 (1,59)
Z-NP-BSA-T	121,83 (0,51)	0,222	+28,7 (1,10)	98,37 (2,11)	61,11 (2,12)

ZSNP-BSA: nanopartículas de zeína autoensambladas cargadas con FITC-BSA

40 Z-NP-BSA-T: nanopartículas de zeína preparadas mediante un método de desplazamiento de disolvente tradicional cargadas con FITC-BSA

<sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

<sup>b</sup> Índice de Polidispersidad.

<sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

<sup>d</sup> El porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial de la proteína zeína usada.

<sup>e</sup> % de eficacia de encapsulación: porcentaje de la cantidad de proteína FITC-BSA encapsulada en nanopartículas de zeína en relación con la cantidad inicial usada.

## 5 EJEMPLO 4

### Encapsulación de rodamina B como modelo de molécula hidrófila pequeña en nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP)

#### 4.1 Encapsulación de rodamina B en nanopartículas de zeína autoensambladas

Se usó isotiocianato de rodamina B (RB), una molécula pequeña fluorescente, como modelo de molécula hidrófila pequeña que va a incorporarse en ZSNP para el estudio de bioadhesión. Para ese fin, se incorporaron 500  $\mu$ l de disolución acuosa de RB (1 mg/ml) en 4 ml de disolución de zeína-PG o mezcla binaria de PG con glicerol o Lutrol® L 44 tal como se describió en el ejemplo 2. Se mantuvo habitualmente la concentración de zeína final al 2,5% p/v. Con el fin de obtener nanopartículas ZSNP cargadas con RB, se añadió un ml de disolución de zeína que contenía RB a 5 ml de agua bidestilada. Se recogió la suspensión acuosa final de nanopartículas de zeína cargadas con RB para su caracterización adicional. Se prepararon las formulaciones a partir de un disolvente primario de propilenglicol (RB-ZSNP-PG), o una mezcla binaria de PG y otros disolventes secundarios incluyendo Lutrol® L 44 (RB-ZSNP-PG:Lut) o glicerol (RB-ZSNP-PG:G). Se seleccionó el volumen de los disolventes secundarios según el estudio previo realizado para determinar la zona de miscibilidad entre disolventes no volátiles miscibles en PG y zeína-PG en los que la zeína no era soluble.

Con el fin de comparar la eficacia de encapsulación de ZSNP con nanopartículas de zeína tradicionales preparadas mediante un método de desplazamiento de disolvente, se obtuvieron nanopartículas de zeína cargadas con RB preparadas mediante un método tradicional según el protocolo descrito anteriormente con ligeras modificaciones tal como se describió en el ejemplo 1 con las mismas cantidades de zeína y RB. Se recogió la suspensión acuosa final de nanopartículas de zeína cargadas con RB para su caracterización adicional tal como se describió en el ejemplo 1.

#### 4.2 Caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas cargadas con RB (RB-ZSNP)

Se determinaron el tamaño, el potencial zeta y el rendimiento del procedimiento de preparación de nanopartículas tal como se describió en el ejemplo 1. Con el fin de calcular la eficacia de encapsulación de RB en ZSNP, se centrifugaron las suspensiones de nanopartículas a 27.000 x g durante 20 min. Entonces, se determinó la cantidad de la RB cargada en las nanopartículas mediante colorimetría a 540 nm (Labsystems iEMS Reader MF, Finlandia). Se estimó la cantidad de RB cargada como la diferencia entre su concentración inicial añadida y la concentración medida en los sobrenadantes tras la etapa de centrifugación. Para ese fin, se prepararon curvas de calibración con disoluciones patrón de RBITC (isotiocianato de rodamina B) a un intervalo de concentración de desde 10 hasta 100  $\mu$ g/ml ( $r = 0,996$ ).

#### 4.3 Liberación de RB a partir de ZSNP en fluidos del tubo digestivo simulados

Se estudió la liberación *in vitro* de RB a partir de las nanopartículas según un protocolo modificado descrito en otra parte [39]. Para ese fin, se centrifugaron 5 ml de ZSNP cargadas con RB, preparadas a partir de un disolvente primario de propilenglicol (RB-ZSNP-PG), o una mezcla binaria de PG y otros disolventes secundarios incluyendo Lutrol® L 44 (RB-ZSNP-PG:Lut) o glicerol (RB-ZSNP-PG:G), y nanopartículas tradicionales con RB (RB-NP tradicionales) a 27.000 x g durante 20 min. para eliminar la RB no encapsulada. Entonces, se dispersaron las nanopartículas cargadas con RB en 20 ml de fluido gástrico simulado (SGF; USP XXIII, pH 1,2; pepsina al 0,32% p/v) a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Entonces, se incubó 1 ml de la suspensión durante 2 horas. Tras esto, se centrifugaron las nanopartículas a 27.000 x g durante 20 min. y se recogieron los sobrenadantes para calcular la cantidad de RB liberada a partir de las nanopartículas en condiciones ácidas. Entonces, se resuspendieron los sedimentos en 1 ml de fluido intestinal simulado (SIF; USP XXIII, pH 7,5; pancreatina al 1% p/v) a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . A diferentes tiempos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 h), se centrifugaron las nanopartículas a 27.000 x g durante 20 min. y se recogieron los sobrenadantes para calcular la cantidad de RB liberada a partir de las nanopartículas tras la incubación en condiciones de SIF tal como se describió anteriormente y los sedimentos resultantes se dispersaron siempre en el SIF tras cada tiempo correspondiente. En todos los casos, se sometió a ensayo la cantidad de RB liberada a partir de ambos fluidos mediante espectrofluorimetría a 540 nm (longitud de onda de excitación) y 580 nm (longitud de onda de emisión) (GENios, TECAN, Austria).

## 4.4 Resultados

### 4.4.1 Caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas cargadas con RB (RB-ZSNP)

La tabla 4 describe las principales características fisicoquímicas de nanopartículas autoensambladas cargadas con RB (RBZSNP). Se prepararon las formulaciones a partir de un disolvente primario de propilenglicol (RB-ZSNP-PG), o

- 5 una mezcla binaria de PG y otros disolventes secundarios incluyendo Lutrol® L 44 (RB-ZSNP-PG:Lut) o glicerol (RB-ZSNP-PG:G). Se prepararon nanopartículas de zeína tradicionales mediante un método de desplazamiento de disolvente (RB-NP tradicionales). La eficacia de encapsulación indicó la capacidad ligeramente superior de las nanopartículas preparadas mediante el método de autoensamblaje para incorporar moléculas hidrófilas pequeñas en comparación con nanopartículas preparadas mediante un método tradicional. En ambos casos, el tamaño de las nanopartículas era homogéneo. En ambos casos, la asociación de RB no afectó a la carga superficial de las nanopartículas.

Tabla 4

Características fisicoquímicas de nanopartículas de zeína cargadas con rodamina B.

- 10 Datos expresados como media  $\pm$  DE (n=6).

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), ( $\pm$ DE)	<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), ( $\pm$ DE)	<sup>d</sup> % de rendimiento, ( $\pm$ DE)	<sup>e</sup> % de eficacia de encapsulación de rodamina B ( $\pm$ DE)
RB-ZSNP-PG	123,44 (1,73)	0,122	+36,03 (3,66)	95,32 (1,73)	81,44 (1,18)
RB-ZSNP-PG:Lut	164,10 (0,31)	0,187	+32,46 (3,23)	95,26 (1,74)	83,16 (2,77)
RB-ZSNP-PG:G	155,64 (3,81)	0,146	+31,03 (2,00)	95,59 (1,01)	84,35 (3,54)
RB-NP tradicionales	133,50 (1,81)	0,129	+35,51 (1,63)	96,52 (2,54)	75,31 (1,33)

RB-ZSNP-PG: nanopartículas de zeína autoensambladas cargadas con RB obtenidas a partir de un disolvente primario de propilenglicol

RB-ZSNP-PG:Lutrol RB-ZSNP-PG:G: nanopartículas de zeína autoensambladas cargadas con RB obtenidas a partir de una mezcla binaria de PG con Lutrol® L 44 o glicerol, respectivamente

- 15 RB-NP tradicionales: nanopartículas de zeína preparadas mediante un método de desplazamiento de disolvente cargadas con RB

<sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

<sup>b</sup> Índice de polidispersidad.

<sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

- 20 <sup>d</sup> El porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial de la proteína zeína usada.

<sup>e</sup> % de eficacia de encapsulación: porcentaje de la cantidad de rodamina B encapsulada en nanopartículas de zeína en relación con la cantidad inicial usada.

#### 4.4.2 Liberación de RB a partir de ZSNP en fluidos del tubo digestivo simulados

- 25 La figura 3 muestra que todos los tipos de formulaciones de nanopartículas tienen una alta estabilidad en fluido gástrico simulado ácido (SGF). En este caso, la cantidad total de RB liberada a partir de todos los tipos de formulaciones de nanopartículas era inferior al 5%. Por otro lado, tras la incubación en SIF, el perfil de liberación de nanopartículas de zeína autoensambladas con RB (RB-ZSNP) era diferente del perfil descrito para nanopartículas de zeína obtenidas mediante un método tradicional (RB-NP tradicionales). Se ha observado que la asociación de PG en la matriz de nanopartículas potenciaba la liberación de RB en RB-ZSNP en comparación con las tradicionales. De hecho, la cantidad total de RB liberada en SIF al final del estudio era entre 1,4 y 1,5 veces superior para RB-ZSNP que para RB-NP tradicionales.

#### EJEMPLO 5

##### Encapsulación de una sonda fluorescente como modelo de molécula lipófila pequeña en ZSNP

##### 5.1 Producción de ZSNP cargadas con una molécula lipófila pequeña

- 35 Con el fin de investigar la capacidad de ZSNP para atrapar moléculas hidrófobas, se seleccionó la sonda fluorescente lipófila perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (TP) como molécula hidrófoba insoluble en agua. Para ese fin, se disolvió 1 mg de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina en diferentes volúmenes de disolución de PG-zeína (al 1% p/v) con agitación magnética durante la noche. La razón

de zeína:perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina era de 2,5:1, 5:1 y 10:1 p/p. Entonces, se añadió un ml de disolución de zeína-PG que contenía perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina a 5 ml de agua bidestilada. Se recogió la suspensión acuosa final de nanopartículas de zeína cargadas con perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina para su caracterización adicional.

## 5.2 Caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP) cargadas con perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina

Se determinaron el tamaño, el potencial zeta y el rendimiento del procedimiento de preparación de nanopartículas tal como se describió en el ejemplo 1. Con el fin de calcular la eficacia de encapsulación del perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina en ZSNP, se centrifugaron en primer lugar las suspensiones de nanopartículas a 3.000 x g para investigar la presencia de cristales de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina no atrapado. Entonces, se centrifugaron los sobrenadantes de nuevo a 27.000 x g durante 20 min. Los cristales de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina que precipitaron tras la primera centrifugación se resuspendieron en etanol absoluto. Se sometió a ensayo la cantidad de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina mediante espectrofluorimetría a 540 nm (longitud de onda de excitación) y 580 nm (longitud de onda de emisión) (GENios, TECAN, Groedig, Austria). Por otro lado, se sometió a ensayo la cantidad de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina libre en el sobrenadante tras la segunda etapa de centrifugación mediante espectrofluorimetría a 540 nm (longitud de onda de excitación) y 580 nm (longitud de onda de emisión) (GENios, TECAN, Groedig, Austria). Se prepararon las curvas de calibración con etanol absoluto que contenía disoluciones patrón de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina a un intervalo de concentración de desde 1 hasta 10 µg/ml (r = 0,996). Se estimó la cantidad de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina cargado como la diferencia entre su concentración inicial añadida y la cantidad libre medida en el precipitado tras la primera etapa de centrifugación y el sobrenadante tras la segunda etapa de centrifugación.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP) cargadas con perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina

A partir de los resultados mostrados en la tabla 5, puede concluirse que la eficacia de encapsulación de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina era alta (más del 80%) para todas las formulaciones. Sin embargo, la eficacia de encapsulación disminuyó significativamente al aumentar el porcentaje de la cantidad inicial de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina en relación con zeína. En este contexto, se encontró que la eficacia de encapsulación era del 80% para ZSNP preparadas a partir de una razón en peso de zeína:perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina de 2,5:1 (ZSNP-TP-2,5:1) y de aproximadamente el 90% para ZSNP preparadas a partir de una razón p/p de zeína:perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina de 5:1 (ZSNP-TP-5:1). Sin embargo, con una cantidad inicial creciente de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina en la formulación (es decir, disminuyendo la razón de zeína:perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina), la cantidad de la sonda fluorescente encapsulada por mg de nanopartícula aumenta en la misma proporción. De un modo similar, el tamaño de partícula aumentó significativamente al aumentar la cantidad de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina cargado en relación con la zeína. En todas las formulaciones, el rendimiento de la proteína zeína era alto para lograr el 98% de la zeína inicial usada para obtener nanopartículas. Por otro lado, el aumento del porcentaje de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina en relación con la proteína zeína provocó una disminución significativa en el potencial zeta.

Tabla 5

Características fisicoquímicas de ZSNP cargadas con perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina.

Datos expresados como media ± DE (n=6)

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), (±DE)	<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), (±DE)	<sup>d</sup> % de rendimiento, (±DE)	<sup>e</sup> % de eficacia de encapsulación (±DE)	<sup>f</sup> TP cargado (µg/mg de np) (±DE)
ZSNP-TP-2,5:1	206,23 (2,07)	0,109	-12,03 (3,66)	98,19 (1,81)	81,13 (1,67)	330,50 (6,80)
ZSNP-TP-5:1	178,98 (4,00)	0,211	+6,51 (1,63)	99,32 (2,13)	90,14 (2,61)	183,60 (5,31)
ZSNP-	133,12 (3,11)	0,223	+13,51 (1,63)	99,32 (2,13)	97,66 (2,99)	99,46 (3,04)

TP-10:1						
---------	--	--	--	--	--	--

ZSNP-TP-2,5:1, ZSNP-TP-5:1 y ZSNP-TP-10:1: nanopartículas de zeína autoensambladas cargadas con perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (zeína:perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina era de 2,5:1, 5:1 y 10:1 p/p, respectivamente)

<sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

5 <sup>b</sup> Índice de Polidispersidad.

<sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

<sup>d</sup> El porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial de la proteína zeína usada.

<sup>e</sup> % de eficacia de encapsulación: porcentaje de la cantidad de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina encapsulado en ZSNP en relación con la cantidad inicial usada.

10 <sup>f</sup> Cantidad de perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina cargado (µg) por mg de nanopartícula (np).

EJEMPLO 6

Encapsulación del antioxidante lipófilo curcumina en ZSNP

6.1 Producción de nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP) cargadas con curcumina

15 Con el fin de investigar la capacidad de ZSNP para atrapar moléculas hidrófobas de antioxidantes alimentarios, se seleccionó la curcumina como molécula hidrófoba insoluble en agua. La curcumina (diferuloilmetano) es un polifenol natural obtenido del rizoma de la cúrcuma (*Curcuma longa*). Para ese fin, se disolvieron 10 mg de curcumina en 10 ml de disolución de zeína en PG con diferentes concentraciones de zeína (al 2,5 y al 5% p/v) o concentraciones similares de zeína en 10 ml de PG que contenía Labrasol® al 10% v/v. Entonces, se añadió un ml de disolución de zeína-PG que contenía curcumina a 4 ml de agua bidestilada. Se purificaron la suspensión acuosa final de nanopartículas de zeína cargadas con curcumina (ZSNP-C-2,5 y ZSNP-C-5) o formulaciones preparadas con Labrasol® (ZSNP-C-2,5L y ZSNP-C-5L) mediante centrifugación y se recogieron para su caracterización adicional.

6.2 Caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas cargadas con curcumina (ZSNP-C)

25 Se determinaron el tamaño, el potencial zeta y el rendimiento del procedimiento de preparación de nanopartículas tal como se describió en el ejemplo 1. Con el fin de calcular la eficacia de encapsulación de curcumina, se centrifugaron 1,5 ml de ZSNP cargadas con curcumina recién preparadas a 27.000 x g durante 20 min. y se recogieron los sobrenadantes, se diluyeron con etanol y se sometieron a ensayo para calcular la cantidad libre de curcumina mediante espectrofotometría UV a 425 nm [40] (Shimadzu 1203 UV-VIS). Se estimó la cantidad de curcumina cargada en las nanopartículas como la diferencia entre su concentración inicial añadida y la concentración medida en los sobrenadantes tras la etapa de centrifugación.

6.3 Resultados

6.3.1 Caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP) cargadas con curcumina

35 La tabla 6 describe las principales características fisicoquímicas de ZSNP cargadas con curcumina. Se ha observado que la presencia de Labrasol® disminuía significativamente el tamaño de las nanopartículas si se comparaba el tamaño de tanto ZSNP-C-2,5 como ZSNP-C-5 con las mismas formulaciones que contenían Labrasol® (ZSNP-C-2,5L y ZSNP-C-5L). Sin embargo, la presencia de curcumina no afectó significativamente a la carga superficial positiva de las formulaciones. En todos los casos, se obtuvo un rendimiento de nanopartículas alto que era aproximadamente el 95% de la cantidad inicial de zeína que se transformó en estructura nanoparticulada. Generalmente, la eficacia de encapsulación indicó la alta capacidad del método de autoensamblaje para incorporar moléculas hidrófobas pequeñas (curcumina) que oscilaba entre el 65 y el 75%. En este caso, se ha observado que la presencia de Labrasol® disminuyó significativamente la eficacia de encapsulación en comparación con formulaciones de nanopartículas obtenidas a partir de disolución de zeína-PG.

Tabla 6

Características fisicoquímicas de ZSNP cargadas con curcumina

45 Datos expresados como media ± DE (n=6)

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), (±DE)	<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), (±DE)	<sup>d</sup> % de rendimiento,	<sup>e</sup> % de eficacia de encapsulación de
--	---------------------------------	------------------	---	--------------------------------	--

				(±DE)	curcumina (±DE)
ZSNP-C-2,5	366,13 (2,07)	0,209	+36,11 (3,66)	95,22 (1,00)	70,13 (1,39)
ZSNP-C-5	358,33 (4,00)	0,181	+35,54 (2,63)	94,11 (2,66)	75,15 (2,67)
ZSNP-C-2,5L	218,98 (2,00)	0,241	+36,51 (0,63)	96,75 (2,22)	65,23 (5,61)
ZSNP-C-5L	213,12 (3,98)	0,273	+33,41 (2,65)	95,62 (2,33)	63,66 (2,12)

ZSNP-C-2,5 y ZSNP-C-5: nanopartículas de zeína autoensambladas cargadas con curcumina usando disolución de PG-zeína a concentraciones de zeína iniciales del 2,5 y el 5% p/v en PG, respectivamente.

ZSNP-C-2,5L y ZSNP-C-5L: nanopartículas de zeína autoensambladas cargadas con curcumina usando disolución de PG-zeína que contenía Labrasol® (al 10% v/v) a concentraciones de zeína iniciales del 2,5 y el 5% p/v en disolución de PG:Labrasol®, respectivamente.

<sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

<sup>b</sup> Índice de Polidispersidad.

<sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

<sup>d</sup> El porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial de la proteína zeína usada.

10 <sup>e</sup> % de eficacia de encapsulación: porcentaje de la cantidad de curcumina encapsulada en las formulaciones de nanopartículas en relación con la cantidad inicial de curcumina usada.

#### EJEMPLO 7

#### Encapsulación de clorhexidina en ZSNP como agente antimicrobiano para administración bucal

##### 7.1 Producción de ZSNP cargadas con clorhexidina

15 Con el fin de investigar la capacidad de ZSNP para atrapar agentes antimicrobianos, tales como clorhexidina (CHX), se mezclaron 0,6 ml de disolución de CHX-gluconato (al 20% p/v Farmacopea Europea) con 5 ml de disolución de PG que contenía zeína (al 2,5% p/v) con agitación magnética. Entonces, se vertió la disolución de CHX-PG en 94,4 ml o 44,4 ml de agua bidestilada para lograr la formación de ZSNP cargadas con CHX con una concentración de CHX final del 0,12% y el 0,24% p/v, respectivamente.

##### 20 7.2 Caracterización de ZSNP cargadas con clorhexidina

Se determinaron el tamaño, el potencial zeta y del rendimiento del procedimiento de preparación de nanopartículas tal como se describió en el ejemplo 1. Con el fin de calcular la eficacia de encapsulación de CHX, se centrifugó un ml de ZSNP cargadas con CHX recién preparadas a 27.000 x g durante 20 min y se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para calcular la cantidad libre de CHX mediante espectrofotometría UV a 260 nm (Shimadzu 25 1203 UV-VIS) [41]. Se estimó la cantidad de CHX cargada en las nanopartículas como la diferencia entre su concentración inicial añadida y la concentración medida en los sobrenadantes tras la etapa de centrifugación.

##### 7.3 Resultados

##### 7.3.1 Caracterización de nanopartículas de zeína autoensambladas (ZSNP) cargadas con CHX

30 La tabla 7 describe las principales características fisicoquímicas de ZSNP cargadas con CHX. En ambos tipos de nanopartículas cargadas con CHX (CHX-ZSNP-0,12 y CHX-ZSNP-0,24), el tamaño de las nanopartículas era homogéneo (aproximadamente 135 nm). Además, las nanopartículas presentaban una carga positiva. La eficacia de encapsulación de CHX era muy alta, logrando aproximadamente el 90% de la cantidad inicial de CHX usada.

Tabla 7

Características fisicoquímicas de ZSNP cargadas con CHX

35 Datos expresados como media ± DE (n=6)

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), (±DE)	<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), (±DE)	<sup>d</sup> % de rendimiento, (±DE)	<sup>e</sup> % de eficacia de encapsulación de CHX (±DE)
CHX-ZSNP-0,12	134,56 (3,04)	0,121	+30,50 (4,79)	96,55 (2,90)	90,18 (2,82)

CHX-ZSNP-0,24	132,11 (1,83)	0,100	+24,54 (1,23)	97,21 (2,71)	92,24 (1,37)
---------------	---------------	-------	---------------	--------------	--------------

CHX-ZSNP-0,12 y CHX-ZSNP-0,24: nanopartículas de zeína autoensambladas cargadas con CHX para lograr una concentración de CHX final del 0,12 y el 0,24% p/v en la suspensión acuosa de ZSNP

<sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

<sup>b</sup> Índice de Polidispersidad.

5 <sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

<sup>d</sup> El porcentaje de las nanopartículas formadas a partir de la cantidad inicial de la proteína zeína usada.

<sup>e</sup> % de eficacia de encapsulación: porcentaje de la cantidad de CHX encapsulada en las formulaciones de nanopartículas en relación con la cantidad inicial de CHX usada.

## EJEMPLO 8

### 10 Estudio de afinidad por la mucosa ex vivo de nanopartículas de zeína en mucosa bucal porcina

8.1 Liberación de rodamina B (RB) a partir de formulaciones de nanopartículas formulaciones en fluido de saliva simulado

15 Con el fin de garantizar que la intensidad de fluorescencia medida en el tejido de la mucosa bucal no se origine a partir de RB libre que se libera a partir de la matriz de nanopartículas, se realizó un estudio de liberación *in vitro* de RB a partir de nanopartículas en fluido de saliva simulado. Para este fin, se diluyeron 500 µl de formulaciones de nanopartículas preparadas a partir de un disolvente primario de propilenglicol (RB-ZSNP-PG), o una mezcla binaria de PG y otros disolventes secundarios incluyendo Lutrol® L 44 (RB-ZSNP-PG:Lut) o glicerol (RB-ZSNP-PG:G) y nanopartículas de zeína preparadas mediante un método tradicional (RB-NP tradicionales) (ejemplo 4) con 75 ml de fluido de saliva simulado (SSF) [42]. A diferentes intervalos de tiempo (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 y 3 horas), se centrifugó 1 ml de cada muestra a 3.000 x g usando tubos de diálisis Vivaspin® 5.000 MWCO (VIVASPIN, Alemania). Se sometió a ensayo la cantidad de RB libre en el dializado mediante espectrofluorimetría a 540 nm (longitud de onda de excitación) y 580 nm (longitud de onda de emisión) (GENios, TECAN, Austria).

8.2 Ensayo de bioadhesión cuantitativo en mucosa bucal

25 Se realizó el estudio de bioadhesión *ex vivo* con formulaciones de nanopartículas marcadas fluorescentemente con RB obtenidas en el ejemplo 4.

30 Para este fin, se obtuvieron cabezas de cerdos de un matadero local y se aisló quirúrgicamente la mucosa bucal. Se limpió el epitelio de los tejidos conjuntivos subyacentes usando tijeras quirúrgicas y se cortó en áreas circulares de 2 cm<sup>2</sup>. Entonces, se almacenaron las muestras de tejido en PBS a 4°C y se usaron en el plazo de 1 hora. Se sujetaron las muestras de tejido entre pestañas planas de estopa de compartimentos de células de Franz y se depositaron las formulaciones de nanopartículas en el compartimento donador. En este caso, las formulaciones de nanopartículas eran de 500 µl de: (i) tres suspensiones acuosas de nanopartículas de zeína marcadas fluorescentemente con rodamina B obtenidas mediante tecnología de autoensamblaje a una concentración de 4,2 mg/ml de nanopartículas de zeína p/v preparadas a partir de diferentes disolventes (RB-ZSNP-PG, RB-ZSNP-PG:Lut y RB-ZSNP-PG:G) y (ii) nanopartículas de zeína marcadas fluorescentemente con rodamina B preparadas mediante una técnica de evaporación de disolvente tradicional a la misma concentración.

35 Para la aplicación de la muestra a las superficies mucosas, se expuso un lado del compartimento donador (1 cm<sup>2</sup> del tejido) a 500 µl de suspensión acuosa de nanopartículas sólo durante 30 segundos con agitación de turbulencia para simular condiciones de lavado de la cavidad bucal. Entonces, se retiraron las muestras del compartimento y se expusieron las formulaciones a 75 ml de fluidos salivares simulados [19] [20] a 37°C durante 6 horas. Se retiraron las muestras de tejido a diferentes intervalos de tiempo (0,5, 30, 60, 120 y 180 minutos) y se cortó y se aisló un área de 1 cm<sup>2</sup>, que se expuso a la muestra durante el experimento. Se sometió a ensayo la cantidad de nanopartículas adheridas tal como se describió anteriormente [38]. En resumen, se digirió cada segmento de mucosa con 2 ml de NaOH 3 M durante 24 h. Se diluyeron las muestras hasta 3 ml añadiendo NaOH 3 M, se agitaron con vórtex durante 10 min. y se centrifugaron a 2.000 x g durante 30 min. Finalmente, se sometió a ensayo la cantidad de rodamina B mediante espectrofluorimetría a 540 nm (longitud de onda de excitación) y 580 nm (longitud de onda de emisión) (GENios, TECAN, Groedig, Austria) con el fin de estimar la fracción de nanopartículas adheridas a la mucosa. Se prepararon las curvas patrón del estudio de bioadhesión mediante adición de disoluciones de rodamina B en NaOH 3 M (0,05-1 µg/ml) con tejido control (r>0,996).

8.3 Resultados

50 8.3.1 Liberación de RB a partir de formulaciones de nanopartículas en fluido de saliva simulado

A partir de la figura 4 puede observarse que la cantidad total acumulativa de RB liberada a partir de las formulaciones de nanopartículas tras 3 horas de incubación en SSF era inferior al 5% de la cantidad encapsulada total de RB en las formulaciones de nanopartículas. Por tanto, puede suponerse que la intensidad de fluorescencia obtenida en el siguiente ensayo de bioadhesión cuantitativo en mucosa bucal se origina a partir de las nanopartículas adheridas a la superficie de la mucosa, y por tanto es posible determinar la cantidad total de nanopartículas adheridas a la mucosa.

### 8.3.2 Ensayo de bioadhesión cuantitativo en mucosa bucal

A partir de la figura 5, puede observarse que la capacidad bioadhesiva de nanopartículas de zeína cargadas con RB obtenidas mediante el método de autoensamblaje y propilenglicol como disolvente primario (RB-ZSNP-PG) era mucho mayor que la capacidad bioadhesiva de las nanopartículas obtenidas mediante un método tradicional (RB-ZNP-T). En este contexto, la capacidad bioadhesiva inicial de RB-ZSNP-PG era aproximadamente 4 veces superior que RB-ZNP-T tras 0,5 min. de contacto entre la formulación de nanopartículas y la mucosa bucal. Se observó este fenómeno durante 180 min. Además, la cantidad adherida total de RB-ZSNP-PG se mantuvo a niveles superiores sobre la superficie de la mucosa en comparación con RB-ZNP-T. De hecho, la fracción adherida de RB-ZSNP encontrada al final del estudio (180 min.) era 2 veces superior a la fracción adherida inicial de RB-ZNP-T. En este contexto, la tasa de eliminación de RB-ZNP-T era más rápida que la de RB-ZSNP. Además, nanopartículas de zeína cargadas con RB obtenidas mediante el método de autoensamblaje usando mezclas binarias de propilenglicol y glicerol (RB-ZSNP-PG:G) y propilenglicol y Lutrol® L 44 (RB-ZSNP-PG:Lut) mostraron, durante los primeros 60 minutos del estudio, capacidad bioadhesiva superior a la capacidad bioadhesiva de las nanopartículas obtenidas mediante un método tradicional (RB-ZNP-T).

#### EJEMPLO 9

### Nanocápsulas de núcleo-corteza de zeína autoensambladas (ZSNC) catiónicas y aniónicas que contienen aceites esenciales miscibles en PG

#### 9.1 Preparación de ZSNC catiónicas y aniónicas que contienen aceites esenciales miscibles en PG (aromas)

Un aceite esencial es un líquido hidrófobo concentrado que contiene compuestos de aroma volátiles procedentes de plantas. Los aceites esenciales también se conocen como aceites volátiles, aceites etéreos o *aetherolea*, o simplemente como "aceite de" la planta de la que se extrajeron.

En este caso, se han seleccionado algunos aceites esenciales que son miscibles con la disolución de zeína-PG, por ejemplo, aceite de *Mentha piperita* (menta), eugenol, aceite de canela y aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*).

Con el fin de obtener ZSNC cargadas con estos aceites mediante la técnica de nanoprecipitación *in situ*-deposición en superficie, se disolvió 1 ml de cada aceite en 20 ml de disolución de zeína-PG (al 2,5% p/v) con agitación magnética a temperatura ambiente. Entonces, se obtuvieron las ZSNC catiónicas *in situ* mediante la simple adición de un mililitro de la disolución de aceite/zeína/PG a 4 ml de agua bidestilada.

Por otro lado, se prepararon ZSNC aniónicas cargadas con aceite de *Mentha piperita* (menta) mediante la adición de polímero aniónicos, tales como goma arábiga a la suspensión acuosa recién preparada de las nanocápsulas. En este caso, se obtuvieron ZSNC aniónicas mediante la adición de 1 ml de disolución acuosa de goma arábiga (al 0,25% p/v) a 5 ml de suspensión acuosa de ZSNC catiónicas cargadas con aceite de *Mentha piperita* (menta) (ZSNC-PA1).

De un modo similar, se aplicó un procedimiento de complejación directa para obtener ZSNC aniónicas cargadas con aceite de *Mentha piperita* (menta). Para este fin, se añadió 1 ml de la disolución de aceite de *Mentha piperita* (menta)/zeína/PG a 4 ml de una disolución acuosa de goma arábiga (al 0,05% p/v) dando ZSNC-PA2. Se prepararon muestras control con todos los tipos de aceites tal como se describió anteriormente mediante el mismo método pero sin usar proteína zeína.

#### 9.2 Caracterización de ZSNC catiónicas y aniónicas que contienen aceites esenciales miscibles en PG (aromas)

Se determinaron el tamaño, el potencial zeta y el rendimiento del procedimiento de preparación de nanopartículas tal como se describió en el ejemplo 1. Se observó el aspecto físico de formulaciones control y de ZSNC.

Con el fin de calcular la eficacia de encapsulación de diferentes tipos de aceites esenciales atrapados en ZSNC, se prepararon las nanocápsulas usando diferentes aceites esenciales marcados fluorescentemente con la sonda fluorescente lipófila perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina a una concentración de 25 µg/ml de aceite. Entonces, se obtuvieron las nanocápsulas tal como se describió anteriormente. Tras esto, se extrajeron los aceites libres que no estaban cargados en ZSNC mediante un aceite inmiscible en agua, tal como triglicéridos de cadena media (Labrafac™ CC). Se realizó el procedimiento de extracción mediante extracción triple con agitación vigorosa de 1 ml de Labrafac™ CC con 1 ml de ZSNC fluorescentes recién preparadas. Finalmente, se sometieron a ensayo los aceites libres que se extrajeron mediante Labrafac™ CC mediante espectrofluorimetría a 540 nm (longitud de onda de excitación) y 580 nm (longitud de onda de emisión) (GENios, TECAN, Austria). Se

prepararon muestras control (PG sólo sin zeína) con todos los tipos de aceites tal como se describió anteriormente y se sometieron a ensayo mediante el mismo método.

9.3 Resultados

9.3.1 Caracterización de ZSNC que contienen aceites esenciales miscibles en PG

5 La figura 6 muestra la eficacia de encapsulación de ZSNC catiónicas cargadas con diferentes aceites esenciales. Se ha observado la encapsulación eficaz de los 4 tipos de aceites esenciales cargados en nanocápsulas de zeína obtenidas mediante la técnica de autoensamblaje *in situ*. Para todos los tipos de aceites, las eficacias de encapsulación oscilaban entre el 85 y el 95%. Estos valores de eficacia de encapsulación son significativamente superiores a los valores encontrados en la bibliografía para aceites esenciales encapsulados en nanopartículas obtenidas mediante un método tradicional [20]. Las muestras control, preparadas en ausencia de zeína, mostraron una eficacia de encapsulación muy baja que indicaba la formación de emulsiones inestables que mostraban una separación de fases y se extraían fácilmente mediante Labrafac™ CC (tabla 8).

15 La tabla 8 describe las principales características fisicoquímicas de ZSNC catiónicas cargadas con diferentes aceites esenciales. Se observó que todas las ZSNC que contenían aceites esenciales presentaban un tamaño homogéneo (que oscilaba entre 150-180 nm) y carga superficial positiva. El aspecto final de la suspensión de nanocápsulas es lechoso y homogéneo en el plazo de los primeros 60 min tras su preparación. Por otro lado, muestras control preparadas con PG sólo y sin zeína presentaban un tamaño de gotita muy grande y mostraban separación del aceite en todos los casos. El tamaño de gotita grande constituía aproximadamente el 80-90% de las muestras control que era de 6 a 7 µm en el plazo de los primeros 5 min tras su preparación.

20 Tabla 8

Características fisicoquímicas de ZSNC catiónicas y formulaciones control cargadas con aceites esenciales.

Datos expresados como media ± DE (n=6)

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), (±DE) Pico y porcentaje				<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), (±DE)	<sup>d</sup> Aspecto en el plazo de 60 min tras la preparación de la formulación
	<i>Pico 1 (nm)</i>	%	<i>Pico 2 (nm)</i>	%			
ZSNC-P	145,11 (0,61)	100%			0,223	+ 19,22 ± 0,11	-Lechoso y homogéneo
ZSNC-E	179,03 (4,12)	100%			0,276	+ 2,38 ± 0,06	-Lechoso y homogéneo
ZSNC-C	188,16 (1,80)	100%			0,239	+ 21,56 ± 0,20	-Lechoso y homogéneo
ZSNC-T	163,69 (2,02)	100%			0,230	+ 24,14 ± 1,09	-Lechoso y homogéneo
Control P	411,81 (2,12)	11%	6614,65 (11,21)	89%	0,578	-18,8 ± 3,12	-Aspecto casi transparente -Separación del aceite como capa flotante
Control E	533,97 (32,37)	13%	6723,13 (22,77)	87%	0,567	-30,2 ± 0,38	-Aspecto casi transparente -Separación del aceite como capa inferior
Control C	220,43 (31,12)	8%	3453,33 (23,01)	92%	0,591	-15,1 ± 2,41	-Aspecto casi transparente -Separación

							del aceite como capa inferior
Control T	240,44 (71,62)	5,5 %	7923,12 (66,33)	94,5 %	0,578	-14,2 ± 2,19	-Aspecto casi transparente -Separación del aceite como capa flotante

ZSNC-P, ZSNC-E, ZSNC-C y ZSNC-T: nanocápsulas de zeína autoensambladas preparadas a partir de diferentes aceites esenciales incluyendo aceite de *Mentha piperita* (menta), eugenol, aceite de canela y aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*), respectivamente.

5 Control P, E, C y T: Formulaciones preparadas con los mismos aceites a partir de disolución de PG sin proteína zeína.

<sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

<sup>b</sup> Índice de Polidispersidad.

<sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

10 <sup>d</sup> Descripción de las formulaciones control y ZSNC tal como separación de fases, sedimentación, aglomeraciones o flotación.

15 La tabla 9 muestra las características fisicoquímicas de nanocápsulas aniónicas cargadas con aceite de *Mentha piperita* (menta) (ZSNC-PA1 y ZSNC-PA2). La carga superficial para ambos tipos de nanocápsulas era negativa. En este caso, se ha observado que el recubrimiento de ZSNC-P con goma arábiga (ZSNC-PA1) o la inclusión de la misma goma en la corteza de ZSNC (ZSNC-PA2) aumentaba significativamente el tamaño de las nanocápsulas en comparación con ZSNC-P catiónicas (tabla 8). Además, se formaban partículas grandes debido a la aglomeración provocada por interacciones de carga opuesta entre la zeína y la goma arábiga. Además, se ha mostrado que las nanocápsulas aniónicas cargadas con aceite de *Mentha piperita* (menta) (ZSNC-PA1 y ZSNC-PA2) presentaban una alta eficacia de encapsulación que era del 84 y el 75%, respectivamente.

Tabla 9

20 Características fisicoquímicas de ZSNC aniónicas cargadas con aceite de *Mentha piperita*.

Datos expresados como media ± DE (n=6)

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), (±DE) Pico y porcentaje				<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), (±DE)	<sup>d</sup> Aspecto en el plazo de 60 min tras la preparación de la formulación
	<i>Pico 1 (nm)</i>	%	<i>Pico 2 (nm)</i>	%			
ZSNC-PA1	265,32 (0,41)	91%	4342,11 (33,09)	9%	0,273	-9,22 ± 0,11	-Lechoso y homogéneo
ZSNC-PA2	471,03 (4,32)	80%	5054,33 (22,08)	20%	0,276	-3,38 ± 0,06	-Lechoso y homogéneo

ZSNC-PA1: nanocápsulas de zeína autoensambladas cargadas con aceite de *Mentha piperita* (menta) y recubiertas con el polímero polianiónico goma arábiga.

25 ZSNC-PA2: nanocápsulas de zeína cargadas con aceite de *Mentha piperita* (menta) que contienen el polímero polianiónico goma arábiga en la corteza de zeína.

<sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

<sup>b</sup> Índice de Polidispersidad.

<sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

<sup>d</sup> Descripción de las ZSNC tal como separación de fases, sedimentación, aglomeraciones o flotación.

## EJEMPLO 10

Nanocápsulas (ZSNC) y microcápsulas (ZSMC) de núcleo-corteza de zeína autoensambladas catiónicas y aniónicas que contienen aceites esenciales inmiscibles con PG

5 El aceite de limón es un aceite esencial inmiscible con la disolución de PG/zeína. Por tanto, se optimizó en primer lugar la emulsión de aceite en agua con diferentes tensioactivos y diferentes razones de aceite:disolución de PG-zeína (v/v) para obtener un tamaño de gotita en el intervalo de nm o  $\mu\text{m}$ .

## 10.1 Preparación y caracterización de emulsiones que contienen aceite de limón en disolución de PG-zeína

10 Con el fin de obtener emulsiones estables de aceite de limón en disolución de PG-zeína (o/w), se emulsionaron diferentes cantidades de aceite de limón en disolución de PG-zeína (aceite de limón al 5, 10 y 15% v/v en disolución de PG-zeína) en presencia de tensioactivos con sonicación durante 1 min. Los tensioactivos usados fueron Tween® 20 o Tween® 80 a una concentración final del 2 o el 4% según la siguiente tabla (tabla 10).

Tabla 10

Composición de diferentes tipos de emulsiones de aceite de limón en disoluciones de PG-zeína

Número de muestra de O/W	% de aceite de limón (v/v) en disolución de PG-zeína	% de Tween® 20 (v/v) en disolución de PG-zeína	% de Tween® 80 (v/v) en disolución de PG-zeína	% de disolución de PG-zeína	% de concentración de zeína (p/v)
1	5	2	0	93	2,5
2	10	2	0	88	2,5
3	15	2	0	83	2,5
4	5	4	0	91	2,5
5	10	4	0	86	2,5
6	15	4	0	81	2,5
7	5	0	2	93	2,5
8	10	0	2	88	2,5
9	15	0	2	83	2,5
10	5	0	4	91	2,5
11	10	0	4	86	2,5
12	15	0	4	81	2,5

15 Entonces, se dejaron las emulsiones de o/w a temperatura ambiente durante 3 días. Tras esto, se monitorizaron el aspecto y los tamaños de partículas para todas las muestras y se visualizaron bajo microscopía óptica.

## 10.2 Resultados

20 La siguiente tabla (tabla 11) muestra las características macro y microscópicas de las emulsiones de aceite de limón indicadas en la tabla 10 (muestras desde 1 hasta 12). Generalmente, todas las muestras de emulsiones preparadas con Tween® 80 mostraban mayor tamaño de gotita en comparación con las muestras preparadas con Tween® 20, que oscilaba entre 30 y 50  $\mu\text{m}$ . Además, las muestras 1 y 4, que contenían Tween® 20, presentaban un tamaño de gotita más pequeño que era inferior a 2  $\mu\text{m}$ . Se analizó el tamaño de las muestras 1 y 4 tal como se describió en el ejemplo 1. Los resultados demostraron que el tamaño de la emulsión primaria, en la muestra 1, era homogéneo (400  $\pm$  4,6 nm) incluso tras un mes de incubación a temperatura ambiente. Sin embargo, el tamaño de gotita de la muestra 4 era de 2,1  $\pm$  0,9  $\mu\text{m}$  en el mismo periodo de tiempo. La figura 7 mostró algunos ejemplos de imágenes de microscopía óptica que representan el tamaño de gotita de las partículas para las muestras de emulsiones 1, 4, 7 y 10.

Tabla 11

Caracterización macro y microscópica de emulsiones de aceite de limón

Número de muestra de O/W	Intervalo de tamaño estimado bajo microscopía óptica ( $\mu\text{m}$ )	Observación macroscópica tras 3 días a temperatura ambiente (presencia de separación de fases)
1	Inferior a 1	NO
2	5-10	SÍ
3	10-30	SÍ
4	1-2	NO
5	50-60	SÍ
6	10-30	SÍ
7	5-10	SÍ
8	15-25	SÍ
9	20-30	SÍ
10	30-50	SÍ
11	30-50	SÍ
12	30-50	SÍ

### 10.3 Preparación y caracterización de microcápsulas y nanocápsulas de núcleo-corteza de zeína autoensambladas catiónicas y aniónicas que contienen aceite de limón

En este caso, se prepararon las nano y microcápsulas mediante la técnica de emulsificación-deposición en superficie *in situ*. Según los resultados obtenidos a partir de experimentos de optimización de emulsiones de o/w de aceite de limón en disoluciones de zeína, se seleccionaron las muestras 1 y 4 para preparar tanto nanocápsulas (ZSNC-L1) como microcápsulas (ZSMC-L1) de zeína autoensambladas catiónicas de núcleo-corteza, respectivamente. Para ese fin, se prepararon emulsiones (muestras 1 y 4) de aceite de limón en disolución de zeína-PG tal como se describió en la sección 10.1. Entonces, se añadió 1 ml de dicha emulsión a 4 ml de agua bidestilada. Con el fin de obtener nanocápsulas (ZSNC-L2) y microcápsulas (ZSMC-L2) de zeína autoensambladas aniónicas de núcleo-corteza, se añadió 1 ml de disolución acuosa de goma arábiga (al 0,25% p/v) a la suspensión tanto de nanocápsulas como de microcápsulas que estaban recién preparadas, con agitación magnética, durante 5 min. a temperatura ambiente.

Se determinaron el tamaño y el potencial zeta tal como se describió en el ejemplo 1. Por otro lado, con el fin de calcular la eficacia de encapsulación, se prepararon todas las formulaciones mediante el mismo método con aceite de limón marcado fluorescentemente con la sonda fluorescente lipófila perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina a una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$  de aceite. Entonces, se calculó la eficacia de encapsulación tal como se describió en el ejemplo 9. Se visualizaron las formulaciones finales de nanocápsulas catiónicas mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.

### 10.4 Resultados

La tabla 12 describe las principales características fisicoquímicas de nanocápsulas y microcápsulas de zeína autoensambladas, catiónicas y aniónicas, de núcleo-corteza, recién preparadas (catiónicas: ZSNC-L1 y ZSMC-L1; aniónicas: ZSNC-L2 y ZSMC-L2). Tanto las nanocápsulas (ZSNC-L1) como las microcápsulas (ZSMC-L1) catiónicas presentaron un tamaño homogéneo con un índice de polidispersidad pequeño y estaban cargadas positivamente. Por otro lado, la presencia del polímero aniónico goma arábiga aumentó significativamente el tamaño de las partículas. Sin embargo, se observó que la eficacia de encapsulación de aceite de limón era más alta en el caso de las microcápsulas tanto catiónicas como aniónicas (ZSMC-L1 y ZSMC-L2) en comparación con las nanocápsulas. La figura 8 muestra imágenes de microscopía óptica para ZSNC-L1 y ZSMC-L1 y la figura 9 muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión para ZSNC-L1 catiónicas.

Tabla 12

Características fisicoquímicas de nanocápsulas y microcápsulas de zeína autoensambladas catiónicas y aniónicas de núcleo-corteza

Datos expresados como media  $\pm$  DE (n=6)

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), (±DE)	<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), (±DE)	<sup>d</sup> % de eficacia de encapsulación de aceite de limón (±DE)
ZSNC-L1	398,53 (4,66)	0,180	+7,50 (4,79)	86,28 (3,82)
ZSMC-L1	2321,11 (10,83)	0,133	+10,54 (1,23)	96,24 (1,37)
ZSNC-L2	660,51 (5,022)	0,221	-5,54 (2,44)	85,22 (2,45)
ZSMC-L2	4177,33 (19,09)	0,100	-4,80 (1,77)	94,77 (3,11)

ZSNC-L1: nanocápsulas de zeína autoensambladas catiónicas cargadas con aceite de limón.

ZSMC-L1: microcápsulas de zeína autoensambladas catiónicas cargadas con aceite de limón.

ZSNC-L2: nanocápsulas de zeína autoensambladas aniónicas cargadas con aceite de limón.

ZSMC-L2: microcápsulas de zeína autoensambladas aniónicas cargadas con aceite de limón.

5 <sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

<sup>b</sup> Índice de Polidispersidad.

<sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

<sup>d</sup> % de eficacia de encapsulación: Porcentaje de la cantidad de aceite de limón encapsulado en las formulaciones en relación con la cantidad inicial de aceite de limón usada.

10 EJEMPLO 11

Nanocápsulas (ZSNC) y microcápsulas (ZSMC) de núcleo-corteza de zeína autoensambladas catiónicas que contienen ácidos grasos y aceites no volátiles

11.1 Preparación y caracterización de ZSNC y ZSMC catiónicas que contienen aceite de hígado de bacalao y ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) como aceites no volátiles

15 En este caso, se seleccionaron aceite de hígado de bacalao y ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) como ácidos grasos omega-3 como modelos para obtener nanocápsulas y microcápsulas como complementos dietéticos con algunos beneficios en la salud cardiovascular.

20 El aceite de hígado de bacalao es un complemento nutricional derivado del hígado del bacalao. Tiene altos niveles de los ácidos grasos omega-3, ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA), y muy altos niveles de vitamina A y vitamina D. El ácido  $\alpha$ -linolénico es un ácido graso *n*-3 que se encuentra en muchos aceites vegetales comunes y es un miembro del grupo de ácidos grasos esenciales (EFA), así denominados debido a que no pueden producirse dentro del cuerpo y deben adquirirse a través de la dieta. Los ácidos grasos N-3 (denominados ácidos grasos  $\omega$ -3 o ácidos grasos omega-3) son ácidos grasos insaturados esenciales con un doble enlace (C=C) comenzando tras el tercer átomo de carbono desde el final de la cadena de carbonos.

25 Se obtuvieron nanocápsulas que contenían ALA (ZSNC-ALA) mediante la técnica de nanoprecipitación *in situ*-deposición en superficie descrita en el ejemplo 9 y se prepararon microcápsulas que contenían aceite de hígado de bacalao (ZSMC-CLO) mediante la técnica de emulsificación-deposición en superficie *in situ* tal como se describe en el ejemplo 10, pero en este caso el tensioactivo era Lutrol® L 44. Se caracterizaron ambas formulaciones tal como se describió anteriormente en los ejemplos 9 y 10.

30 11.2 Resultados

La tabla 13 muestra las características fisicoquímicas de ZSNC y ZSMC catiónicas de núcleo-corteza que contienen ALA y aceite de hígado de bacalao, respectivamente.

Tabla 13

35 Características fisicoquímicas de nanocápsulas y microcápsulas de zeína autoensambladas catiónicas de núcleo-corteza que contienen aceite de hígado de bacalao y ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA)

Datos expresados como media  $\pm$  DE (n=6)

	<sup>a</sup> Tamaño (nm), (±DE)	<sup>b</sup> PDI	<sup>c</sup> Potencial zeta (mV), (±DE)	<sup>d</sup> % de eficacia de encapsulación de aceites no volátiles
--	---------------------------------	------------------	---	---

				(±DE)
ZSNC-ALA	730,11 (2,66)	0,140	+3,50 (4,79)	56,63 (3,82)
ZSMC-CLO	6321,11 (13,45)	0,263	+10,54 (1,23)	63,11 (5,22)

ZSNC-ALA: nanocápsulas de zeína autoensambladas cargadas con ácido linolénico

ZSMC-CLO: microcápsulas de zeína autoensambladas cargadas con aceite de hígado de bacalao

<sup>a</sup> Determinación del tamaño de las nanopartículas (nm) mediante espectroscopía de correlación fotónica.

<sup>b</sup> Índice de Polidispersidad.

5 <sup>c</sup> Determinación del potencial zeta mediante anemometría Doppler láser electroforética.

<sup>d</sup> % de eficacia de encapsulación: Porcentaje de la cantidad de aceite no volátil encapsulado en las formulaciones de nanopartículas en relación con la cantidad inicial de los aceites no volátiles usada.

### Bibliografía

- 10 1. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 1-18.
2. Lai, T., *et al.*, *Clinical application of a novel silver nanoparticles biosensor based on localized surface plasmon resonance for detecting the microalbuminuria*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010. **42**(11): p. 787-92.
- 15 3. Santipanichwong, R., *et al.*, *Core-shell biopolymer nanoparticles produced by electrostatic deposition of beet pectin onto heat-denatured beta-lactoglobulin aggregates*. J Food Sci, 2008. **73**(6): p. N23-30.
4. Sanoj Rejinold, N., *et al.*, *Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery*. J Colloid Interface Sci, 2011. **360**(1): p. 39-51.
5. Bourquin, C., *et al.*, *Delivery of immunostimulatory RNA oligonucleotides by gelatin nanoparticles triggers an efficient antitumoral response*. J Immunother, 2010. **33**(9): p. 935-44.
- 20 6. Tseng, C.L., *et al.*, *Development of gelatin nanoparticles with biotinylated EGF conjugation for lung cancer targeting*. Biomaterials, 2007. **28**(27): p. 3996-4005.
7. Tan, S.T., *et al.*, *Biocompatible and biodegradable polymer nanofibers displaying superparamagnetic properties*. Chemphyschem, 2005. **6**(8): p. 1461-5.
- 25 8. Sanoj Rejinold, N., *et al.*, *Biocompatible, biodegradable and thermo-sensitive chitosan-g-poly (N-isopropylacrylamide) nanocarrier for curcumin drug delivery*. Int J Biol Macromol, 2011. **49**(2): p. 161-72.
9. Cho, H.S., *et al.*, *Biodegradability and biodegradation rate of poly(caprolactone)-starch blend and poly(butylene succinate) biodegradable polymer under aerobic and anaerobic environment*. Waste Manag, 2011. **31**(3): p. 475-80.
- 30 10. Hu, X. and X. Jing, *Biodegradable amphiphilic polymer-drug conjugate micelles*. Expert Opin Drug Deliv, 2009. **6**(10): p. 1079-90.
11. Tang, Y. and J. Singh, *Biodegradable and biocompatible thermosensitive polymer based injectable implant for controlled release of protein*. Int J Pharm, 2009. **365**(1-2): p. 34-43.
12. Yu, N.Y., *et al.*, *Biodegradable poly(alpha-hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2010. **93**(1): p. 285-95.
- 35 13. Kim, H.I., *et al.*, *Biodegradable polymer films for releasing nanovehicles containing sirolimus*. Drug Deliv, 2009. **16**(4): p. 183-8.
14. Markvicheva, E.A., *et al.*, *[Biodegradable polymer microparticles with entrapped herbal extracts: preparation with supercritical carbon dioxide and use for tissue repair]*. Biomed Khim, 2009. **55**(4): p. 479-88.
15. Lawton, J.W., *Zein: A History of Processing and Use*. Cereal Chem., 2002. **79**(1): p. 1-18.
- 40 16. Guo, H.X., J. Heinamaki, and J. Yliruusi, *Stable aqueous film coating dispersion of zein*. J Colloid Interface Sci, 2008. **322**(2): p. 478-84.

17. Li, X.N., H.X. Guo, and J. Heinamaki, *Aqueous coating dispersion (pseudolatex) of zein improves formulation of sustained-release tablets containing very water-soluble drug*. J Colloid Interface Sci, 2010. **345**(1): p. 46-53.
- 5 18. Podaralla, S. and O. Perumal, *Preparation of zein nanoparticles by pH controlled nanoprecipitation*. J Biomed Nanotechnol, 2010. **6**(4): p. 312-7.
19. Luo, Y., *et al.*, *Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of alpha-tocopherol, and its in vitro controlled release study*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011. **85**(2): p. 145-52.
20. Parris, N., P.H. Cooke, and K.B. Hicks, *Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles*. J Agric Food Chem, 2005. **53**(12): p. 4788-92.
- 10 21. de Sousa, F.O., *et al.*, *Effect of zein on biodegradable inserts for the delivery of tetracycline within periodontal pockets*. J Biomater Appl, 2011.
22. Salerno, A., *et al.*, *Design of novel three-phase PCL/TZ-HA biomaterials for use in bone regeneration applications*. J Mater Sci Mater Med, 2010. **21**(9): p. 2569-81.
- 15 23. Chen, L., *et al.*, *In vitro study of the release properties of soy-zein protein microspheres with a dynamic artificial digestive system*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(17): p. 9861-7.
24. Wang, Y. and G.W. Padua, *Formation of zein microphases in ethanol-water*. Langmuir, 2010. **26**(15): p. 12897-901.
25. Liu, L., *et al.*, *Pectin/zein beads for potential colon-specific drug delivery: synthesis and in vitro evaluation*. Drug Deliv, 2006. **13**(6): p. 417-23.
- 20 26. Muthuselvi, L. and A. Dhathathreyan, *Simple coacervates of zein to encapsulate Gitoxin*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2006. **51**(1): p. 39-43.
27. Lin, T., *et al.*, *The biodegradation of zein in vitro and in vivo and its application in implants*. AAPS PharmSciTech, 2011. **12**(1): p. 172-6.
- 25 28. Jin, Q.Z.a.M., *zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion*. Food Hydrocolloids, 2009. **23**: p. 2380-2387.
29. Lai, L.F. and H.X. Guo, *Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting*. Int J Pharm, 2011. **404**(1-2): p. 317-23.
30. Zhang, Q.Z.M.J.D.X.H.T.W., *Application of Supercritical Anti-Solvent Technologies for the Synthesis of Delivery Systems of Bioactive Food Components*. Food Biophysics 2008(3): p. 186-190.
- 30 31. Patent, U.S., *Aqueous dispersions of zein and preparation thereof* Patent Number: 5324351
32. Schaffazick, S.R., A.R. Pohlmann, and S.S. Guterres, *Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability evaluation*. Pharmazie, 2007. **62**(5): p. 354-60.
33. Rodriguez-Emmenegger, C., *et al.*, *Polymeric nanocapsules ultra stable in complex biological media*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011. **83**(2): p. 376-81.
- 35 34. Fukui, Y. and K. Fujimoto, *The preparation of sugar polymer-coated nanocapsules by the layer-by-layer deposition on the liposome*. Langmuir, 2009. **25**(17): p. 10020-5.
35. Song, R., *et al.*, *Sequence, regulation, and evolution of the maize 22-kD alpha zein gene family*. Genome Res, 2001. **11**(11): p. 1817-25.
- 40 36. Esen, A., *Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility*. Plant Physiol, 1986. **80**(3): p. 623-7.
37. Graciela W. Padua and , Q.W., *Controlled Self-Organization of Zein Nanostructures for Encapsulation of Food Ingredients*. BOOK: Micro/Nanoencapsulation of Active Food Ingredients, 2009. **Chapter 9** p. 143-156.
38. Arbos, P., *et al.*, *Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles*. Int J Pharm, 2002. **242**(1-2): p. 129-36.
- 45 39. Salman, H.H., *et al.*, *Bioadhesive mannosylated nanoparticles for oral drug delivery*. J Nanosci Nanotechnol, 2006. **6**(9-10): p. 3203-9.
40. Kakkar, V., *et al.*, *Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin*. Mol Nutr

Food Res, 2011. **55**(3): p. 495-503.

41. Meng, N., *et al.*, *Controlled release and antibacterial activity chlorhexidine acetate (CA) intercalated in montmorillonite*. Int J Pharm, 2009. **382**(1-2): p. 45-9.

5 42. Peh, K.K. and C.F. Wong, *Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties*. J Pharm Pharm Sci, 1999. **2**(2): p. 53-61.

## REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula seleccionada del grupo que consiste en:
  - a) una nanoesfera de matriz, en donde dicha nanoesfera de matriz comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua; y
  - b) una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza, en donde dicha nanocápsula vesicular de núcleo-corteza comprende un núcleo y una corteza, comprendiendo dicha corteza una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua,

en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y

en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.
2. Nanopartícula según la reivindicación 1, que comprende además un producto de interés.
3. Un procedimiento para producir una nanopartícula, siendo dicha nanopartícula una nanoesfera de matriz, en donde dicha nanoesfera de matriz comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua,
 

comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una disolución de la proteína hidrófoba vegetal en al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal con el fin de formar dicha nanopartícula y

en el que la disolución de la proteína hidrófoba vegetal no comprende un disolvente orgánico volátil,

en el que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y

en el que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.
4. Un procedimiento para producir una nanopartícula seleccionada del grupo que consiste en:
  - (a) una nanoesfera de matriz que comprende un producto de interés, en donde dicha nanoesfera de matriz comprende una matriz, comprendiendo dicha matriz una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua; y
  - (b) una nanocápsula vesicular de núcleo-corteza que comprende un producto de interés, en donde dicha nanocápsula vesicular de núcleo-corteza comprende un núcleo y una corteza, comprendiendo dicha corteza una proteína hidrófoba vegetal y al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua,

comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una disolución, suspensión o emulsión que comprende la proteína hidrófoba vegetal y el producto de interés en al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua con un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal con el fin de formar dicha nanopartícula y

en el que la disolución, suspensión o emulsión que comprende la proteína hidrófoba vegetal y el producto de interés no comprende un disolvente orgánico volátil,

en el que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y

en el que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en el que la prolamina es zeína.
6. Una disolución que contiene una proteína hidrófoba vegetal en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y, opcionalmente, un medio acuoso, en la que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas, en la que el medio que comprende al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua no comprende un disolvente orgánico volátil y en la que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre el 0,01 y el 50% (p/v) con la condición de que cuando la proteína hidrófoba vegetal es gliadina, entonces la cantidad de proteína hidrófoba vegetal es mayor de 0,1%, en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.
7. Una disolución, suspensión o emulsión que contiene una proteína hidrófoba vegetal y un producto de

- interés disuelto, suspendido o emulsionado en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y, opcionalmente, un tensioactivo y, opcionalmente, un medio acuoso, en la que la cantidad de medio acuoso es inferior a la cantidad necesaria de medio acuoso para formar nanopartículas, en la que el medio que comprende al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua no comprende un disolvente orgánico volátil y en la que la cantidad de proteína hidrófoba vegetal está comprendida entre el 0,01 y el 50% (p/v), en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.
- 5
8. Una suspensión de nanopartículas, en la que las nanopartículas son según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en un medio, comprendiendo dicho medio al menos un disolvente orgánico no volátil miscible en agua y un no disolvente de proteína hidrófoba vegetal, y no comprendiendo un disolvente orgánico volátil, en la que la proteína hidrófoba vegetal es una prolamina, y en la que el disolvente orgánico no volátil miscible en agua es propilenglicol o una mezcla de propilenglicol y otros disolventes primarios y/o secundarios.
- 10
9. Una composición que comprende dos elementos:
- 15
- a) un primer elemento seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) al menos una nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2;
- (ii) una disolución según la reivindicación 6;
- (iii) una disolución, suspensión o emulsión según la reivindicación 7; y
- 20
- (iv) una suspensión según la reivindicación 8, y
- b) un segundo elemento que consiste en un vehículo.
10. Composición según la reivindicación 9, que comprende además un producto de interés seleccionado de un herbicida, un insecticida, un fungicida, un producto anti-envejecimiento, un producto anti-acné, un producto para el cuidado facial, un cosmético pigmentado, un cosmético, un producto para el cuidado personal, un producto para filtro solar/protección solar, un producto para limpiadores dentales, dentífricos o enjuagues, un producto para champús, un perfume, un producto para el cabello, un aditivo alimenticio, un aceite esencial, aceite de *Mentha piperita*, aceite de tomillo, aceite de canela, eugenol, aceite de limón, curcumina, ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina o vitamina B3, ácido pantoténico o vitamina B5, monofosfato de tiamina, pirofosfato de tiamina, trifosfato de tiamina, ácido ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos, ácido folínico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, una vitamina de las familias A, D, E, K y derivados de las mismas, un fosfolípido, un carotenoide, un ácido graso, un ácido graso omega-3, aceite de hígado de bacalao, ácido linolénico, un aminoácido, un fitostanol, un fitosterol, un polifenol, clorhexidina, albúmina sérica bovina, un agente analgésico, un agente anti-alopecia, un agente antianginoso, un agente antibacteriano, un agente antidepresivo, un agente antifúngico, un agente antihipertensor, un agente antiinflamatorio, un agente antineoplásico, un agente antipirético, un agente antipsicótico, un agente ansiolítico, un agente broncodilatador, un glucocorticoide, un agente inmunosupresor, ácido acetilsalicílico, péptido natriurético auricular alfa, arginina vasopresina, atropina, augmerosen, atorvastatina, Avastin, calcitoninas, clorhexidina, gonadotropinas coriónicas, corticotropina, desmopresina, epibatidina, erbitux, exenatida, herceptina, humira, humulina, ketoconazol, lanreotida, lutropina alfa, metoprolol, minoxidilo, nesiritida, octreotida, paclitaxel, paracetamol, pegaptanib, hormona estimulante de folículo recombinante, un factor de crecimiento recombinante, remicade, rituxan, sermorelina, somatotropina, un derivado de taxano, taxol, acetato de teriparatida, tirotropina, triclosán, urofolitropina, Xolair, actinomicina D, albendazol, aldosterona, alprazolam, amiodarona, amitriptilina, amprenavir, asimadolina, atorvastatina, bunitrolol, buspirona, camptotecina, carbamazepina, carvedilol, celiprolol, ciclosporina A, cimetidina, clotrimazol, colchicina, cortisona, daunorubicina, debrisoquina, dexametasona, diazepam, digitoxina, digoxina, diltiazem, docetaxel, domperidona, doxorubicina, efavirenz, epirubicina, eritromicina, ergotamina, estradiol, glucorónido de estradiol, erlotinib, etopósido, fenitoína, fentanilo, felodipina, fenotiazinas, fexofenadina, fluoroquinolonas, fluorouracilo, FK-506, gentamicina, griseofulvina, hidrocortisona, imatinib, indinavir, itraconazol, ivermectina, ketoconazol, canferol, levofloxacina, lidocaína, loperamida, losartán, lovastatina, mebendazol, metilprednisolona, metotrexato, mibefradil, midazolam, nisoldipino, morfina, nelfinavir, nocardipino, nitrendipino, nifedipino, ondansetrón, paclitaxel, pentazocina, praziquantel, prednisolona, prednisona, quercetina, quinidina, ranitidina, rapamicina, rifabutina, rifampicina, ritonavir, saquinavir, sirolimús, sulfametizol, tacrolimús, tamoxifeno, talinolol, tenipósido, terfenadina, tetraciclina, topotecán, triamcinolona, valspodar, verapamilo, vinblastina, vincristina, vindesina, zopiclona y mezclas de los mismos.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
11. Composición según la reivindicación 9, que comprende además un producto de interés seleccionado de anticuerpos o fragmentos de los mismos, proteínas o antígenos bacterianos, fúngicos o virales, receptores celulares, factores de coagulación, citocinas, enzimas, eritropoyetinas, factores de crecimiento, hormonas,

insulinas, interleucinas, interferones, ligandos, ácidos nucleicos, agentes de transducción de señales, compuestos químicos orgánicos pequeños, toxinas.

12. Un producto alimenticio que comprende una nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 5 13. Una nanopartícula según la reivindicación 2, en la que el producto de interés es el fármaco antimicrobiano clorhexidina para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una infección corporal externa o bucal.
14. Uso de una nanopartícula según la reivindicación 2, en la que el producto de interés es un aceite seleccionado de aceite de hígado de bacalao y ácido linolénico, como complemento dietético.
- 10 15. Nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o disolución según la reivindicación 6, o disolución, suspensión o emulsión según la reivindicación 7, o suspensión según la reivindicación 8, o composición según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la proteína hidrófoba vegetal es zeína.

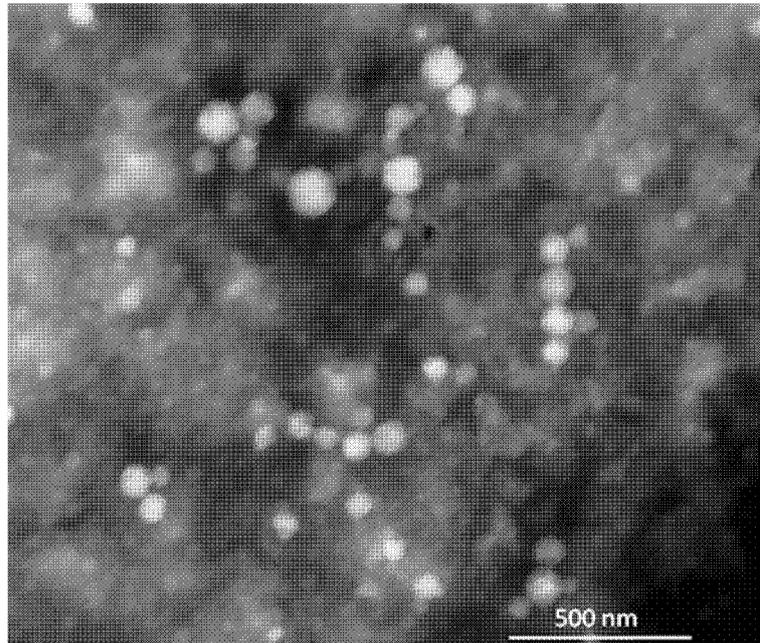
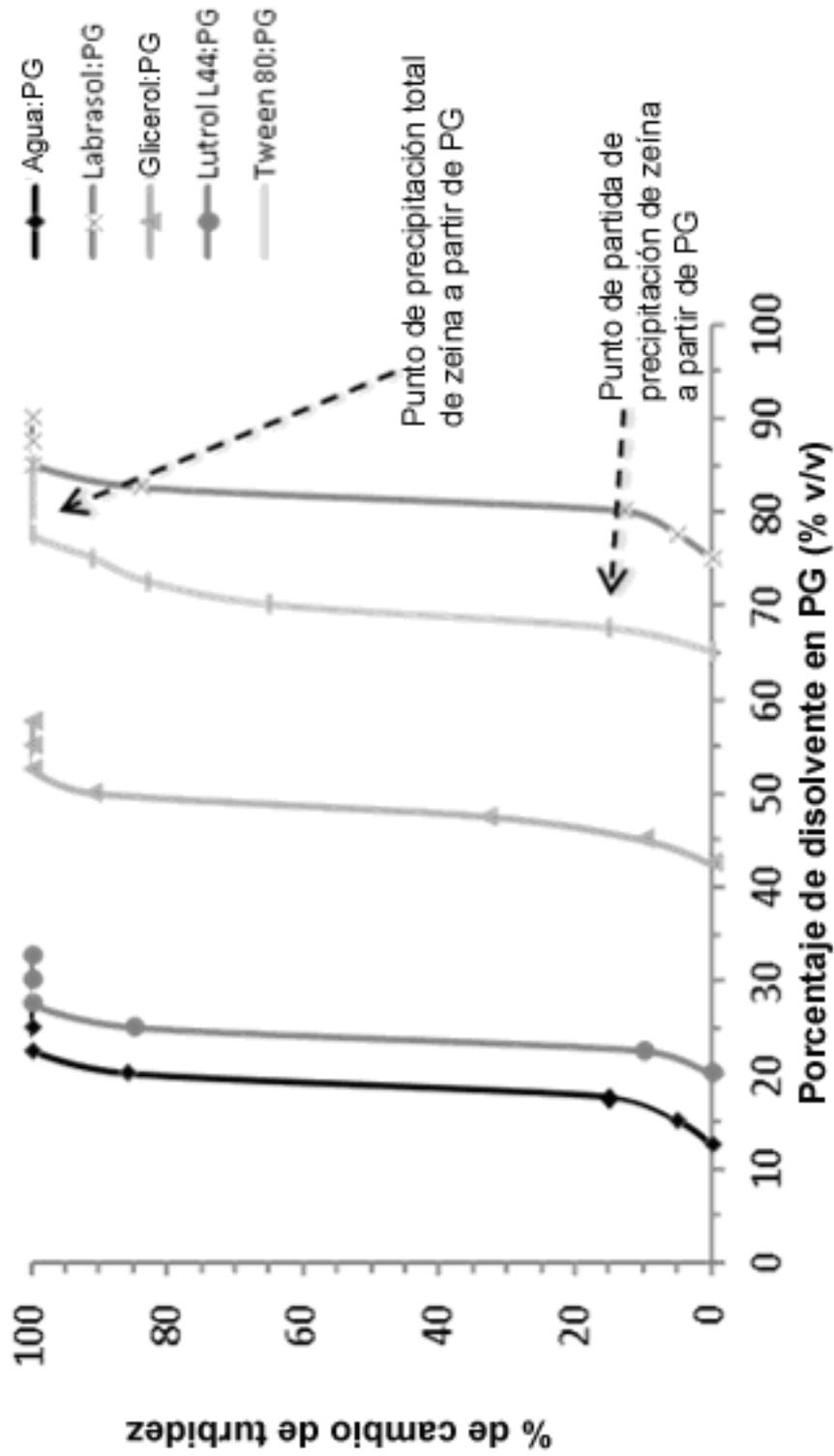


Figura 1

**Cambio de turbidez de disolución de zeína en PG con disolventes miscibles en PG**



**Figura 2**

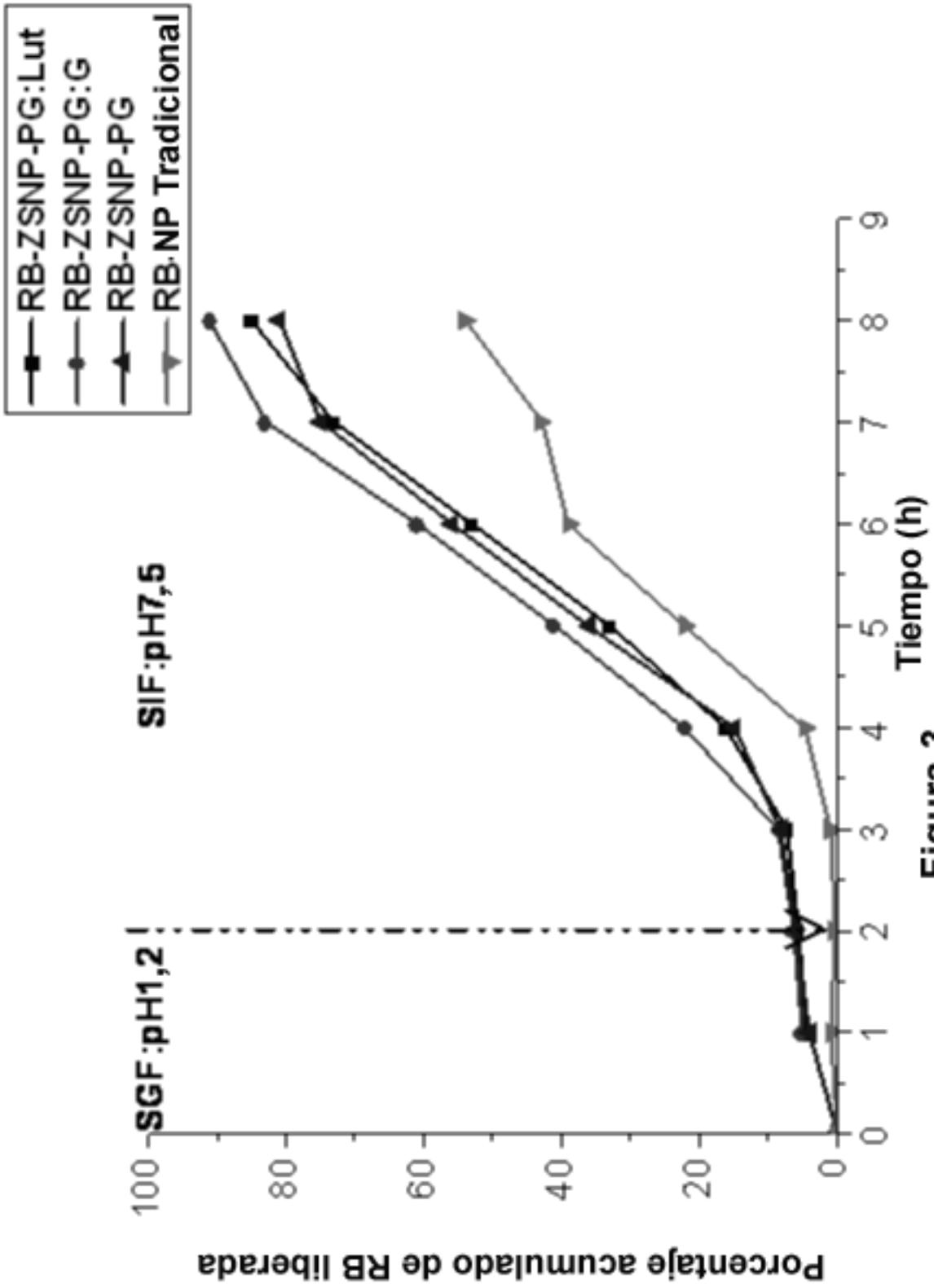


Figura 3

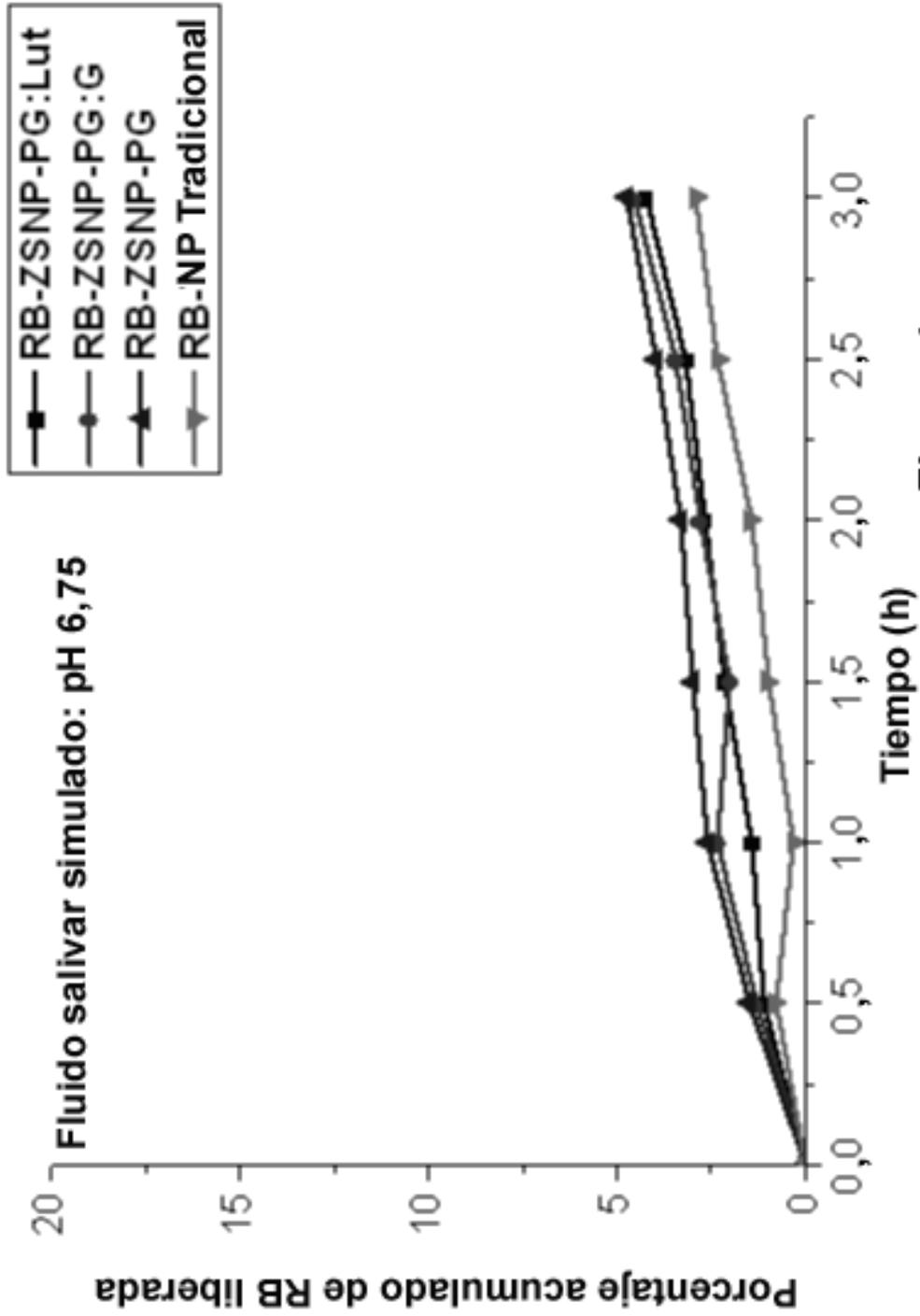


Figura 4

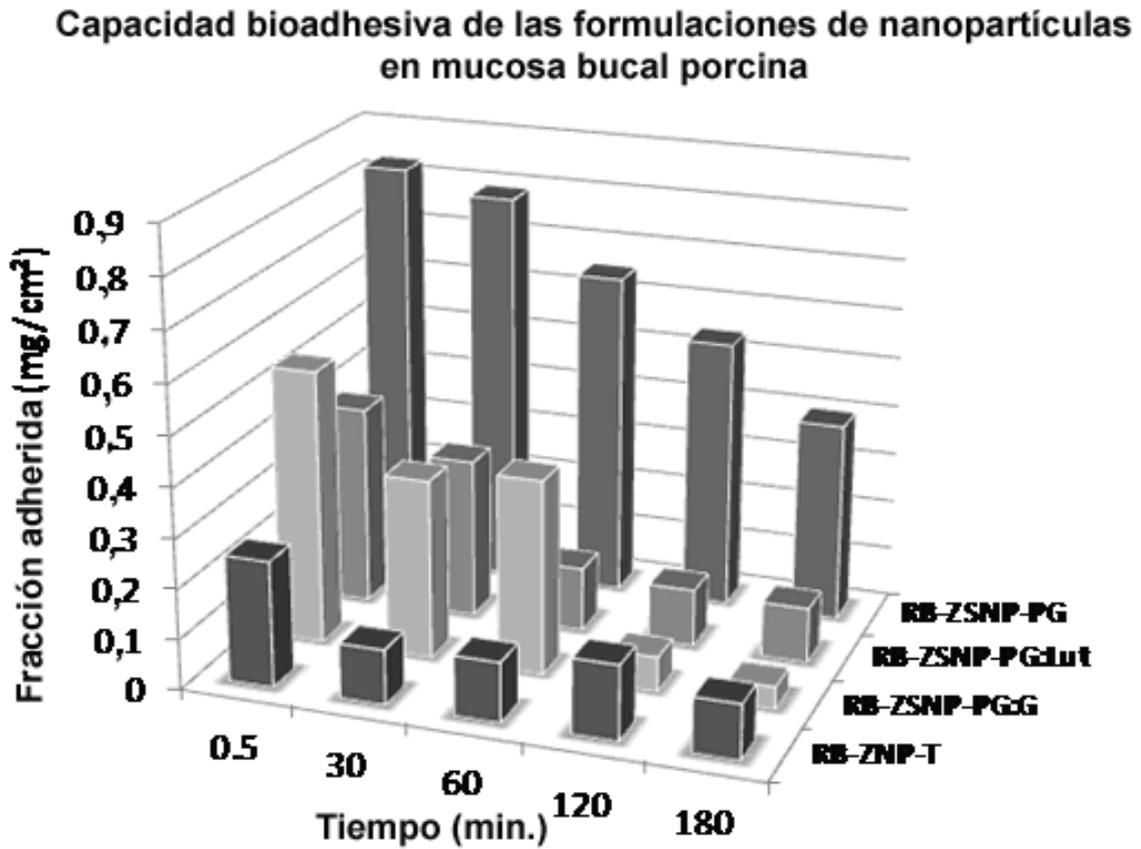
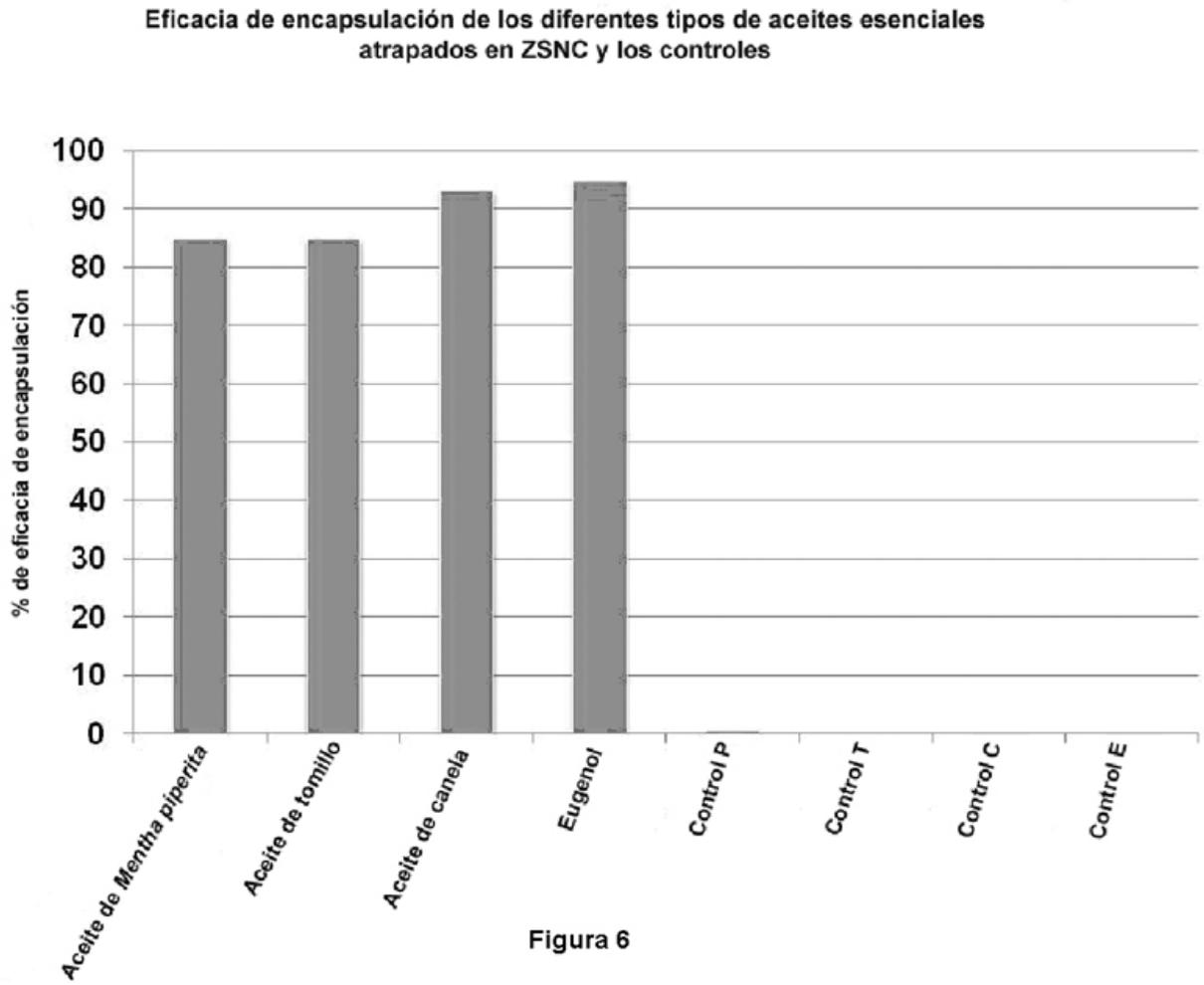


Figura 5



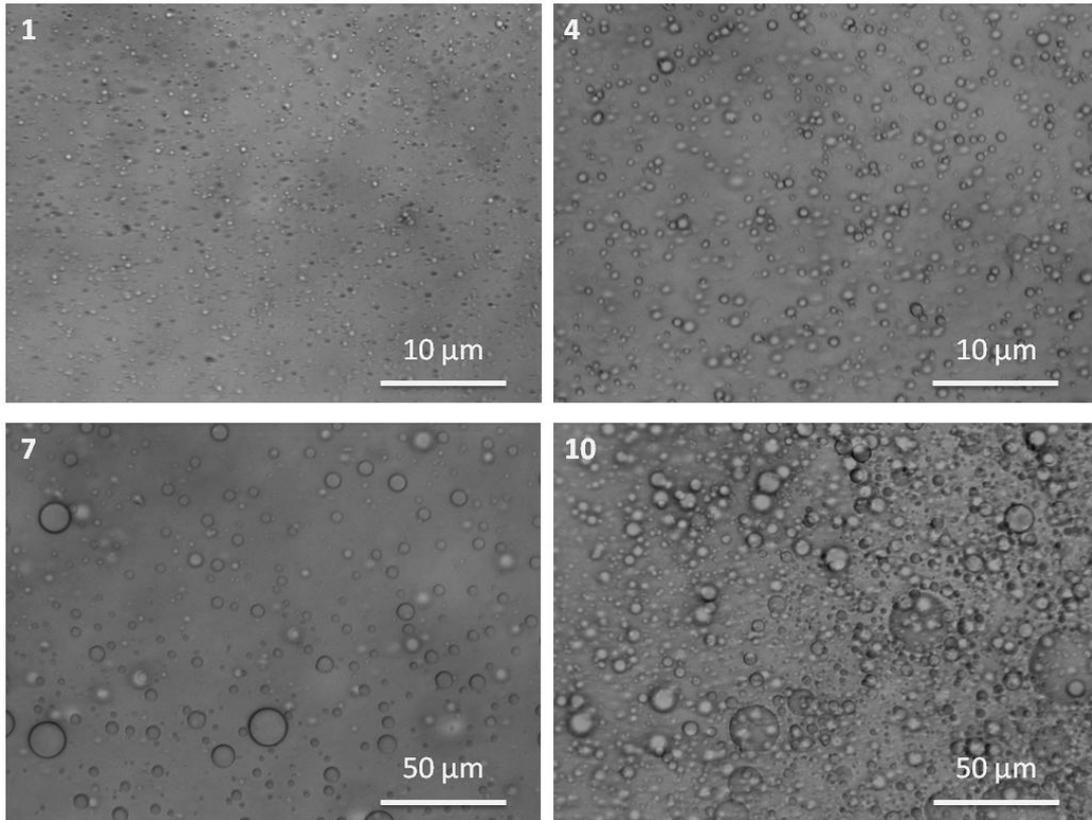


Figura 7

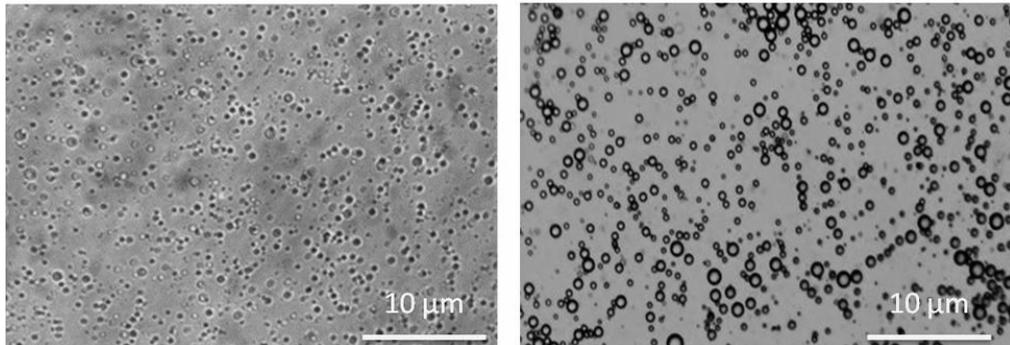
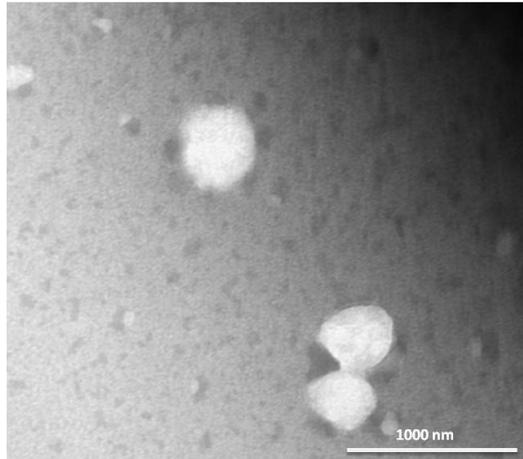


Figura 8



**Figura 9**