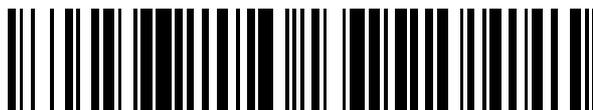


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 710**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

**A23D 7/04** (2006.01)

**A61K 36/899** (2006.01)

**A23D 7/005** (2006.01)

**A61K 47/44** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2011 PCT/SE2011/050646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11149416**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2011 E 11786992 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2575768**

54 Título: **Dispersión acuosa que comprende galactolípidos y método de producción de la misma**

30 Prioridad:

**24.05.2010 SE 1050515**  
**24.05.2010 US 347643 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.04.2018**

73 Titular/es:

**SWEDISH OAT FIBER AB (100.0%)**  
**Båtafjordsvägen 12**  
**432 63 Bua, SE**

72 Inventor/es:

**LARSSON, KÅRE y**  
**HÄRRÖD, MAGNUS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones:**

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

ES 2 662 710 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

Dispersión acuosa que comprende galactolípidos y método de producción de la misma

5 **1. Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para preparar una dispersión de lípidos polares en una mezcla de etanol-agua, comprendiendo dichos lípidos polares los galactolípidos. La invención también se refiere a un aceite obtenido al evaporar etanol y agua de la dispersión. La invención se refiere además a dispersiones acuosas coloidales de lípidos polares que comprenden galactolípidos, a un aceite que contiene lípidos polares que comprenden galactolípidos, y a composiciones farmacéuticas, cosméticas y alimentarias que comprenden dichas dispersiones y/o aceite.

15 **2. Antecedentes de la invención**2.1. *Comportamiento de fase lipídica y dispersiones acuosas de partículas lipídicas*

Los lípidos de origen vegetal consisten en componentes polares y no polares. Los lípidos no polares tienen gran importancia en alimentos, proporcionando materias primas para grasas o aceites. Los lípidos polares se utilizan principalmente para conseguir propiedades funcionales especiales, tales como emulsificación. En este contexto, el término lípido polar se utiliza basándose en la interacción con agua; así, los lípidos que forman fases acuosas se denominan polares, mientras que una muestra lipídica que no forma fases acuosas se denomina no polar. Los lípidos polares de origen vegetal se obtienen mediante la denominada etapa de desgomada durante el proceso de refinado de cultivos de oleaginosas, tal como el aceite de soja. Estos lípidos son predominantemente fosfolípidos. Otra fuente de lípidos polares son los cereales, que contienen una mezcla de fosfolípidos y galactolípidos. En la presente invención, los inventores han partido de soluciones de etanol-agua de mezclas de galactolípidos y fosfolípidos, centrándose en los extractos etanólicos de avena, en el que los lípidos polares se han enriquecido mediante fraccionamiento. A determinadas concentraciones de lípidos en las mezclas etanol-agua de una composición particular, se forma un fluido que contiene agregados de un estado líquido cristalino que, en la medida de lo sabido, nunca antes se había notificado en lípidos. En la invención de los inventores, se utiliza la organización molecular de este fluido y las transformaciones en la dilución con agua/evaporación con etanol.

Las dispersiones de la fase laminar cristalina líquida en un entorno acuoso, que se denominan liposomas, se describieron por primera vez en la década de los sesenta del siglo pasado. Estas partículas consisten en bicapas lipídicas esféricamente concéntricas que alternan con capas de agua. Están formadas a partir de la fase laminar cristalina líquida, la fase L-alfa, por dispersión mecánica en un exceso de agua. Así, un requisito previo es que la fase L-alfa pueda coexistir en equilibrio con una fase acuosa. Los liposomas preparados a partir de la fase L-alfa consisten en varias bicapas concéntricas, y también se denominan vesículas multilaminares. Existen también métodos muy específicos descritos en la bibliografía para preparaciones que dan como resultado vesículas unilaminares, que se han aplicado especialmente para la administración de fármacos. La presente invención describe un nuevo método para preparar dispersiones acuosas monodispersas de vesículas de galactolípidos y fosfolípidos de tamaño muy pequeño, y el uso de dichas partículas.

Existe una amplia bibliografía sobre la fabricación y el uso de liposomas. Los principales lípidos utilizados son los fosfolípidos, y las aplicaciones más habituales implican la administración de componentes biológicamente activos para uso farmacéutico y alimentario.

Habitualmente, los liposomas se forman mediante homogeneización mecánica de la fase laminar cristalina líquida en un exceso de agua, incluida la ultrasonificación y el uso de homogeneizadores de válvula. Los métodos habitualmente notificados en la bibliografía implican el método de película seca y el método de inyección de etanol. Para obtener liposomas o vesículas de tamaño uniforme, se han utilizado métodos de tamices moleculares.

También existen otras fases cristalinas líquidas en sistemas lípido-agua. Los más importantes son, además de la fase L-alfa anteriormente mencionada, la fase hexagonal cristalina líquida invertida, también denominada fase HII, y las fases cúbicas. Estas también pueden formar dispersiones acuosas. La introducción del método crio-TEM ha permitido una detallada descripción estructural de las partículas en fase tanto hexagonal como cúbica inversa en agua (Langmuir 12 (1996) 4611 - 4613 and 13 (1997) 6964 - 6971. J. Gustavsson, H. Ljusberg-Wahren, M. Almgren, K. Larsson respectivamente). En el texto siguiente, las fases laminares cristalinas líquidas se denominan la fase L-alfa, y la fase hexagonal cristalina líquida invertida se denomina la fase HII.

Durante el desarrollo de un proceso de preparación de dispersiones de vesícula de lípidos polares preparados a partir de avena, los inventores observaron que el mismo proceso se podría aplicar para preparar dispersiones de partículas uniformes de aceite en agua y, adicionalmente, mediante la introducción de monoglicéridos en mezclas de fosfolípidos y galactolípidos, de forma que se pudieran preparar de forma eficaz dispersiones de partículas uniformes de fases cúbicas.

Los inventores han desarrollado un proceso de dilución en etanol/agua por etapas para preparar dispersiones coloidales de lípidos polares, y esto se describe detalladamente en el presente documento para el caso de fracciones lipídicas de avena. Este proceso fue introducido principalmente para evitar la formación de la fase HII tras la exposición directa al agua. Se ha descubierto que este método produce vesículas unilaminares de un intervalo de

5 tamaños más pequeño al anteriormente descrito. Los procesos de la técnica anterior necesitaban fracciones lipídicas polares muy puras como material de partida. El nuevo proceso de los inventores permite el uso de un material de partida menos puro y, al mismo tiempo, admite mayor carga de principio activo en sistemas de administración, manteniendo o mejorando a la vez las propiedades funcionales de la dispersión.

#### 10 2.1.1 Técnica anterior y su relación con la invención de los inventores

Puesto que los inventores utilizan soluciones etanólicas, se considerará en el presente documento como técnica anterior la preparación de partículas lipídicas que implica etanol. Hace tiempo se presentó un método basado en gotículas de solución de etanol expuestas a una fase acuosa que se ha convertido en importante para la preparación

15 de liposomas (S. Batzri y E. Korn: Biochim. Biophys. Acta 298 (1973) 1015-1019). Estos autores inyectaron una solución etanólica de fosfolípidos en la fase acuosa. También se ha notificado la producción a gran escala usando este método, véase (R. Naeff: Adv. Drug Delivery Rev. 18 (1996) 343-347), incluida la preparación de distribuciones del tamaño de partícula adaptables controladas por el diámetro de la aguja junto con la presión hidrodinámica (P. Prahari, J. Guan, P.G. Wang, L.J. Lee, R.J. Lee: Anticancer Res. 28 (2008) 943-947).

20 El uso de etanol para la preparación de partículas cúbicas fue introducido por Spicer y colaboradores, y se analiza a continuación en lo que respecta a dichas partículas.

Estas aplicaciones de soluciones de etanol con dilución directa en agua de los lípidos se diferencia

25 fundamentalmente del proceso de dilución en etanol-agua de los presentes inventores para producir dispersiones de partículas. Los métodos de la técnica anterior previamente descritos no se pueden aplicar a los sistemas de galactolípidos y fosfolípidos de los presentes inventores por que se formará la fase HII hexagonal.

En el caso de los presente inventores, la dilución en etanol-agua de la mezcla etanol-lípido se puede controlar cuidadosamente para evitar la formación de la fase HII hexagonal. A concentraciones de etanol superiores a una

30 concentración de etanol crítica, la fase HII no se puede formar. Por dilución de un aceite que contiene lípidos polares, usando una solución de etanol con una concentración cercana a la concentración crítica, es posible separar directamente la fase laminar sin la formación de ninguna fase HII.

Los procesos de la técnica anterior necesitan fracciones lipídicas polares muy puras como material de partida. El nuevo proceso de los inventores permite el uso de un material de partida menos puro y, al mismo tiempo, las partículas pueden transportar una mayor carga de principio activo en aplicaciones de administración, mientras que las propiedades funcionales de la dispersión se mantienen o mejoran.

35

La interacción de los lípidos de cereales con el agua se ha analizado en detalle en el caso de los lípidos del trigo, que dio como resultado el diagrama de fases ternario que se muestra en la Figura 1. Un equilibrio de fases similar también se produce para los lípidos de la avena, como se muestra a continuación. El diagrama de fases muestra el

40 equilibrio de fases de los lípidos del trigo y agua a temperatura ambiente. Los componentes de los lípidos del trigo, polares y no polares, se separaron en primer lugar y posteriormente se reconstituyeron en diferentes proporciones antes del equilibrio con agua. Se producen dos fases cristalinas líquidas -la fase laminar (LC-L) y la fase hexagonal invertida (LC-H) y una fase líquida (L) tal como se identifica mediante difracción de rayos X. La línea discontinua muestra la composición de lípidos polares/no polares en el endospermo del trigo (según Larsson et al. 2006 Lipids: Structure, Physical properties and Functionality, The Oily Press)

45

El equilibrio de fases y las estructuras físicas de los extractos lipídicos de la avena concuerdan de forma general con el sistema lipídico del trigo (G. Jayasingha, K. Larsson, Y. Miezis y B. Sivik. J. Dispersion Sci. Techn. 12 (1991) 443).

50

A partir de la Figura 1, puede observarse que, a una concentración de lípidos polares superior al 65 % de lípidos y adición de agua, se forma la fase HII hexagonal. La fase hexagonal crea un gel y este gel es muy viscoso e

55 imposible de dispersar en partículas pequeñas.

Sin embargo, el material de partida de la presente invención contiene etanol. De esta forma se introduce una cuarta dimensión. En los lípidos de la avena con etanol, la formación del HII-gel se produce cuando los lípidos se diluyen en agua, véase el Ejemplo 1. Una vez formado, se tarda mucho tiempo en disolver el HII-gel. A temperatura ambiente, la escala temporal es años.

60

En la dilución directa de las fracciones lipídicas de la avena de la presente invención, la fase HII siempre se forma antes de la fase L-alfa, véase el Ejemplo 1 y, por tanto, los métodos de la técnica anterior para producir liposomas en sistemas de fosfolípidos no se pueden aplicar. Cuando la fase HII se forma en los diagramas de fase de fosfolípidos, parece existir una región de fase L-alfa a temperatura más baja, cuando puede tener lugar la dilución de agua respecto de los liposomas.

65

Al diluir los lípidos con una solución etanol-agua de acuerdo con un protocolo cuidadosamente diseñado, definido en la presente invención, se puede evitar la formación de las partículas HII. Este procedimiento es un requisito previo para la formación de las partículas muy pequeñas presentado en la presente invención. De esta forma, los inventores pueden producir partículas muy pequeñas usando mezclas de lípidos con una amplia variación en su composición y con concentraciones más altas, y esto permite a los inventores cargar más principios activos en comparación con la técnica anterior. Los lípidos usados en el presente documento forman la fase cristalina líquida a temperatura ambiente, y superior, de forma que el procesamiento se puede llevar a cabo a temperatura ambiente. El protocolo de dilución con etanol-agua cuidadosamente diseñado también permite la producción de fracciones lipídicas muy polares exentas de etanol de una forma reproducible sin partículas HII. Estas fracciones lipídicas polares tienen una capacidad muy alta y estable para preparar emulsiones de aceite en agua.

Biochimica et Biophysica Acta 1768 (2007), 1526-1540, divulga que las interacciones entre los grupos de cabeza de galactosilo controla el empaquetamiento molecular de los lípidos del trigo en películas de Langmuir y en mesofases cristalinas líquidas hidratadas.

Se han notificado muy pocas aplicaciones de lípidos de cereales y galactolípidos que se analizan detalladamente a continuación:

1. El documento WO9520944 (US 6.022.561) describe "preparaciones bicapa" que se preparan a partir de extractos de cereales purificados mediante cromatografía dando como resultado una concentración de lípidos polares del 100 % y una concentración de DGDG mayor del 67 % (véase su Tabla 1) para la producción de partículas transportadoras de principios activos, en forma bien de gel o de los liposomas que muestran ser multilaminares. Estos lípidos polares muy puros se podrían mezclar con agua sin formación de HII. Tras ultrasonificación, el tamaño de partícula promedio de las vesículas fue 144 nm.

Las pequeñas vesículas unilaminares obtenidas por los inventores tienen un tamaño de partículas promedio menor de 100 nm. Además, los cubosomas que describen los inventores no se pueden formar según la tecnología anterior. A destacar también que los inventores consiguen partículas mucho más pequeñas usando lípidos polares de pureza muy inferior.

2. El documento US 5 688 528 divulga una emulsión de aceite en agua que comprende 0,01-50 % en peso de la preparación total, preferentemente 0,1-10 %, de un material de galactolípido como emulsionante. El material de galactolípido consiste en al menos un 50 % de digalactosil-diacilgliceroles, siendo el resto otros lípidos polares. La citada emulsión es adecuada como vehículo para uno o más sustancias activas en una composición farmacéutica, pero también en productos nutritivos, cosméticos, alimenticios y agrícolas. Los lípidos polares utilizados fueron extractos de cereales purificados mediante cromatografía que dan como resultado una concentración de lípidos polares del 100 % y una concentración de DGDG mayor del 67 % (como se muestra en la Tabla 1) para producir emulsiones de aceite en agua. No se menciona la evitación de la formación de los cristales líquidos hexagonales de tipo HII.

3. El documento WO 2009/131436A1 describe un producto de yogur con una emulsión de aceite en agua para mejorar la sensación de saciedad, y en la formulación de la mezcla compleja se utilizan galactolípidos como emulsionantes (reivindicación 3) y también se mencionan los lípidos de la avena (reivindicación 4). El tamaño de partícula de la emulsión de aceite en agua (O/W) estabilizada con un estabilizante adicional, fue tal que al menos el 75 % de las partículas deberían ser menores de 1000 nm. Por tanto, su procesamiento nunca obtendría las emulsiones O/W que describen los inventores.

4. El documento WO 2009/068651 A1 describe una emulsión O/W para bajar el colesterol mediante fitoesteroles como componente en todas las reivindicaciones. Los galactolípidos se utilizan como emulsionante. No se proporcionan los tamaños de partícula.

5. Li X. et al, Preparation and stability of DGDG as emulsifier for sug-microemulsions, Zhongguo zhongyao zazhi 2009, 34(17) 1272-1276 (AN2009:1571859) describen que los digalactosil diglicéridos se utilizan para fabricar una submicroemulsión de "aceite de laurel" como un modelo de fármaco. El tamaño de partícula después de homogeneización a alta presión fue 168 nm. Así, las partículas son significativamente más grandes que las partículas del proceso de los inventores.

6. El documento WO 2007/026151 divulga una composición farmacéutica homogénea que comprende una antihistamina, un corticoesteroide, un liposoma lípido polar y un vehículo farmacéuticamente aceptable acuoso. Los liposomas lípidos polares se dispersan en la totalidad del vehículo acuoso. Los lípidos polares preferidos son fosfolípidos y, en todos los ejemplos, se usó una composición de fosfolípidos puros.

### 2.1.2 Conclusión sobre las partículas lipídicas

Dentro de una amplia gama de proporciones entre galactolípidos y otros componentes de la avena o de otros lípidos de cereales, la formación de una fase HII es una complicación importante para la formación de dispersiones de vesículas uniformes. La presente invención proporciona una solución a este problema.

Durante el desarrollo del proceso de preparación centrado en las dispersiones de vesícula de lípidos de la avena en agua, se observó que este proceso también se puede aplicar a la preparación de fracciones lipídicas polares exentas de etanol y de cristales III, emulsiones de aceite en agua, y además se pueden preparar partículas de cristal líquido cúbicas en agua cuando se introducen monoglicéridos en la mezclas de lípidos de cereales.

5

## 2.2 Regulación del apetito

La obesidad es un problema importante y creciente en la sociedad occidental. Se ha estimado que 45.000 millones de dólares estadounidenses en atención sanitaria, o el 8 % anual del gasto sanitario total, es resultado directo de la obesidad. Los enfoques tradicionales de gestión de peso a largo plazo, tales como la dieta y el ejercicio físico, han mostrados ser ineficaces en solitario para controlar la propagación de la obesidad. En la actualidad, más que nunca, hay un considerable interés para desarrollar métodos eficaces y seguros para el tratamiento de la obesidad.

10

Los enfoques farmacológicos para el tratamiento de la obesidad se han centrado bien en el desarrollo de fármacos que aumentan el gasto energético o en fármacos que reducen la ingesta de energía. Un enfoque dirigido a la reducción del ingesta de energía es reducir la capacidad del organismo para digerir y adsorber alimentos, especialmente grasa. La enzima clave implicada en la digestión de la grasa es la lipasa pancreática, que se secreta por el páncreas en la luz intestinal.

15

El inhibidor de la lipasa lipstatina ha constituido la base del fármaco contra la obesidad, orlistat. Orlistat y su uso en la inhibición de la lipasa pancreática y el tratamiento de la hiperlipidemia y la obesidad se divulga en el documento EP129748 (Hoffmann-la Roche, 1984). El uso de orlistat (Xenical) como fármaco contra la obesidad está bien establecido (Sjöström L. et al., Lancet 352: 167-172, 1998). El mecanismo propuesto es que se absorberá menos grasa y, por tanto, se reducirá la ingesta energética y, en consecuencia, se reducirá el peso del paciente. El inconveniente de este inhibidor de la lipasa es que inhibe todos los tipos de lipasa y produce esteatorrea debido a una digestión de las grasas fuertemente alterada. Es, por tanto, de la mayor importancia desarrollar un compuesto natural que retarde la digestión de la grasa de manera más suave sin producir esteatorrea como efecto secundario.

20

25

Cetilistat es otro inhibidor de lipasa divulgado en el documento WO00/40247, (Alizyme Therapeutics, 2000) con un mecanismo de acción similar, pero con menos efectos secundarios que orlistat (Kopelman P. et al., Int J Obes 2006; 31: 465-71).

30

El balance de energía es un sistema homeostático. Aunque un funcionamiento incorrecto de este sistema puede producir obesidad, el aumento relativamente reciente de la incidencia de la obesidad no se considera el resultado de defectos específicos, sino un sistema regulador incapaces de hacer frente al actual contexto de alimentos baratos de alto contenido energético, transporte mecanizado y trabajo no manual. El control de los elementos de este sistema regulador nos proporcionarían la mejor oportunidad para combatir la obesidad (Murphy K. Bloom S., Nature 2006; 444: 854-859).

35

El "freno ilíaco" es un mecanismo de retroalimentación activado por los nutrientes en el intestino, especialmente la grasa, con efectos importantes sobre la sensación de saciedad. Pequeñas cantidades de grasa pueden inducir la sensación de saciedad y alterar la ingesta de alimento (Welch I., et al. Gastroenterology 1985; 89: 1293-1297; Welch I., et al. Gut 1988; 29: 306-311; Greenberg D. y Smith, G.P., Psychosomatic medicine 1996; 58: 559-569; Maljaars PWJ., et al, Int. J. Obesity 2008; 32: 1633-1639).

45

El documento WO 87/03198 se refiere a una preparación entérica en forma de una cápsula o comprimido que contiene una grasa como principio activo que deberá liberarse en el intestino. Esta preparación utiliza el mecanismo del freno ilíaco.

50

Los documentos WO 99/02041 y WO 2007/075142 divulgan el uso de emulsiones basadas en aceite de palma fraccionado y aceite de avena fraccionado para proporcionar grasa a la parte inferior del intestino. Este producto (Olibra, DSM) se investiga en varios estudios (Burns A.A. et al., Int. J Obesity 2000; 24:1419-1425; Burns A.A. et al., Int. J Obesity 2001; 25:1487-1496; Burns A.A. et al., Eur J Clin Nutr 2002; 56:368-377; Logan C:M: et al., Eur J Clin Nutr 2006; 60:1081-1091; Diepvens K. et al., Int. J Obesity 2007; 31:942-949; Diepvens K. et al., Physiol Behav 2008; 95:114-117). Se ha demostrado en algunos casos un efecto estadísticamente significativo. Sin embargo, es cuestionable si el efecto se puede considerar como clínico.

55

Las emulsiones basadas en aceite de palma y proteínas procedentes de clara de huevo parcialmente desnaturalizadas, como se divulga en el documento WO 2006/053647, Unilever, y aceite de colza o aceite de colza hidrogenado junto con proteínas lácteas y monoglicéridos, como se divulga en el documento WO 2006/117069, Unilever, también se utilizan para proporcionar grasa a la parte inferior del intestino.

60

En el documento WO 2006/132586 (Albertsson), membranas biológicas completas o los péptidos hidrófobos de membranas biológicas se utilizar para la reducción de la actividad lipolítica y/o retardar la digestión de las grasas, suprimir el apetito, reducir el peso corporal y/o los lípidos de la sangre.

65

El documento WO 97/13500 se refiere a formulaciones de liposomas que tienen incorporada en las mismas una cantidad de esteroide 5-β eficaz para tratar la obesidad, diabetes o hidrocortocoidismo.

5 El documento WO 03/018529 se refiere a monoésteres de ácido graso de un estrógeno y un ácido graso para su uso en el tratamiento de la obesidad y el sobrepeso. En una composición farmacéutica o cosméticos preferida para inyección intravenosa, el monoéster se incorpora a una suspensión lipídica preparada a partir de liposomas.

10 El documento J 2007204368 se refiere a un péptido de la seda como principio activo de utilidad en el tratamiento de la obesidad, en el que el péptido de la seda se incorpora al interior de un liposoma.

Incluso aunque estos productos proporcionan métodos eficaces para tratar la obesidad, sigue existiendo la necesidad de proporcionar mejores métodos para su uso en el control y el tratamiento de la obesidad y de las enfermedades relacionadas con la obesidad.

15 *2.2.1 Mecanismo propuesto y resultados iniciales de la presente invención*

20 El proceso de los inventores permite la producción de partículas uniformes de tamaño muy pequeño (menor de 100 nm) de tipo vesícula unilaminar. El mecanismo para mejorar la sensación de saciedad se supone que es el siguiente: Estas partículas lipídicas, con una superficie específica extremadamente grande y muy ricas en galactolípidos, interactúan con las lipasas el intestino y, la reducida actividad enzimática aumenta la concentración de lípidos en la parte final del intestino. Esto activa el "mecanismo de freno ilíaco" de la sensación de saciedad. Los inventores pueden controlar la actividad enzimática y conseguir suficiente sensación de saciedad sin ningún efecto secundario negativo. Una ventaja particular es que los lípidos que utilizan los inventores son componentes de un material alimenticio habitual, los que elimina los posibles riesgos para la seguridad.

25 Como primera etapa para demostrar esta invención sobre la sensación de saciedad, se realizó una evaluación clínica en condiciones controladas. Una comida matutina que contenía una dispersión de partículas de vesículas de lípidos de avena proporcionó efectos significativos sobre GLP-1, que es una hormona de la sangre y que se utiliza como indicador de la sensación de saciedad. Este esto se describe en el Ejemplo 7, más adelante. En la actualidad está en curso un estudio clínico ampliado.

30 *2.3. Encapsulación o solubilización para aumentar la biodisponibilidad de nutrientes valiosos en alimentos y piensos*

35 En el campo de la tecnología de formulación, se han desarrollado diversos métodos para solubilizar materiales encapsulados, y administrar materiales biológicamente activos. La invención de los inventores proporciona nuevas posibilidades de aplicación de nutrientes u otros componentes importantes de alimentos, tales como antioxidantes y sustancias aromáticas. Estos procesos implican la solubilización o encapsulación del componente actual en los sistemas transportadores de partículas de los inventores. De esta forma se puede obtener un aumento en la biodisponibilidad.

40 Las aplicaciones más avanzadas en este campo se encuentran en la administración de fármacos, que implica la administración controlada de una sustancia farmacéuticamente activa para conseguir un efecto terapéutico. Una autoridad de este campo, Robert S, Lang, declaró que las necesidades actuales en este campo son reducirla toxicidad, aumentar la absorción y mejorar el perfil de liberación (C.M. Henry, Chem. & Engineering News 80 (2002) 39-47). Los lípidos se aplican con frecuencia, y la introducción de liposomas ha demostrado reducir la toxicidad en una aplicación que implica doxorubicina (el producto Doxil se utiliza en el tratamiento contra el cáncer). Un fármaco incorporado a un liposoma se libera mediante difusión o se libera al interior de las células diana mediante endocitosis. Algunos estudios recientes avanzados se han centrado en el direccionamiento de fármacos mediante ligandos unidos sobre la superficie de los liposomas que se unen a receptores específicos de la superficie celular.

50 Las propiedades generales de las partículas lipídicas descritos en la presente invención ofrecen posibilidades de aplicación similares a los liposomas. Puede esperarse que sean superiores con respecto a la carga de fármaco y las propiedades mecánicas de las partículas.

55 Evidentemente, hay muchas características comunes entre la administración de fármacos gastrointestinales y la administración de componentes alimentarios especiales. El presente conocimiento de la administración en sistemas alimentarios se ha descrito recientemente en una excelente revisión de Sagalowicz y Leser (Delivery systems for liquid food products, Current Opinion in Colloid & Interface Science (2009), doi: 10.1016/j.cocis.2009.12.003). Las moléculas sensibles se pueden proteger contra la degradación (tal como oxidación durante el almacenamiento del producto alimenticio real) y el aspecto más importante es que se pueda mejorar la biodisponibilidad de los nutrientes importantes.

60 *2.3.1 Conclusión sobre encapsulación y solubilización*

65 La presente invención proporciona nuevas posibilidades en este campo. Una aplicación permite la producción de partículas uniformes muy pequeñas (menores de 100 nm) de tipo autoensamblado. Solamente se necesita una energía de mezcla limitada en el proceso. También, la preparación de partículas de fases líquidas cristalinas lipídicas

cúbicas puede ser útil en este campo. Se puede añadir a las partículas una amplia gama de moléculas, tanto hidrófilas como lipófilas. Una ventaja particular es que los lípidos que utilizan los inventores son componentes de un material alimenticio habitual, lo que elimina los riesgos de seguridad.

#### 5 2.4 Método para utilizar toda la capacidad emulsionante de aceites que contienen galactolípidos en emulsiones

Ya en la década de los 60 del siglo pasado, Stig Friberg demostró el importante papel de la fase cristalina líquida laminar en la formación y estabilidad de las emulsiones. Ahora se acepta de manera general que las emulsiones de alimentos estabilizadas mediante lípidos polares deben proporcionar la fase cristalina líquida laminar durante el proceso de emulsificación (cf. K. Larsson y Stig Friberg: Food Emulsion segunda ed. Marcel Dekker Inc., Nueva York 1960).

El mecanismo subyacente a la emulsificación es que el aceite no polar formado se separa simultáneamente como la fase cristalina líquida laminar, y la fase laminar tenderá a continuación a recubrir las gotículas de aceite simultáneamente para reducir la energía superficial de la dispersión. Dichas emulsiones son cinéticamente estables y tienen un contenido de sólidos superior a aproximadamente el 40 % en volumen.

Esto también significa que la fase HII se forma antes de la fase laminar, existe una importante complicación que impide la aplicación de los procesos de emulsificación mecánica convencionales. El material lipídico de partida que utilizan los inventores comprende galactolípidos como componente lipídico polar. Los galactolípidos pueden formar partículas HII. El uso de los métodos de emulsificación tradicionales con aceites que contienen galactolípidos puede fracasar o ser difícil de reproducir debido a la formación de partículas HII. Se necesitan grandes cantidades de energía para emulsionar aceite en agua. Es difícil conseguir partículas suficientemente pequeñas, conseguir una distribución del tamaño de partícula suficientemente estrecha, y la variación entre lotes es muy alta.

Mediante el uso de los métodos presentados en la presente invención, los inventores pueden evitar los intervalos donde se forman partículas HII y el consumo de energía se reduce, el tamaño de partículas se reduce, la distribución del tamaño de partícula es más estrecha, y la variación entre lotes se reduce.

#### 30 2.5 Eliminación de etanol de aceites que contienen galactolípidos sin formar partículas HII

Cuando el etanol se elimina de las fracciones oleosas que contienen galactolípidos y etanol existe el riesgo de que se formen partículas HII. Una vez formadas, pueden pasar años antes de que las partículas HII se disuelvan. Esto significa que los aceites que contienen partículas HII pierden sus propiedades emulsionantes.

Por tanto, hay una importante necesidad de encontrar métodos para eliminar el etanol de aceites que contienen galactolípidos sin formar partículas HII.

Mediante el uso de los métodos presentados en la presente invención, los inventores pueden; evitar los intervalos donde se forman las partículas HII durante la eliminación del etanol a partir de aceites que contienen galactolípidos; reducen el consumo de energía, el tamaño de partícula, la distribución del tamaño de partícula, y reducen la variación en la calidad del producto entre lotes en procesos posteriores.

### 3 Sumario de la invención

45 Los objetivos anteriormente mencionados se consiguen en todo o en parte con un método de acuerdo con la reivindicación independiente 1, una dispersión acuosa coloidal de líquidos polares de acuerdo con la reivindicación independiente 12, una dispersión acuosa coloidal de lípidos polares y lípidos no polares de acuerdo con la reivindicación 14, una dispersión acuosa de acuerdo con la reivindicación independiente 18, un aceite de acuerdo con la reivindicación independiente 19, una dispersión acuosa coloidal y/o aceite para su uso en el tratamiento de obesidad de acuerdo con la reivindicación independiente 21, una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación independiente 23, y un artículo de acuerdo con la reivindicación independiente 24. Las realizaciones se especifican en las reivindicaciones dependientes y en la siguiente descripción y ejemplos.

La invención se refiere a un método para preparar una dispersión de lípidos polares en una mezcla de etanol-agua, comprendiendo dichos lípidos polares los galactolípidos, caracterizada por diluir un aceite que contiene lípidos polares que comprenden galactolípidos usando una primera mezcla de etanol-agua que tiene una concentración de etanol, calculada como % en volumen basado en la cantidad total de etanol y agua, que está en el intervalo de 15 % en unidades de volumen por debajo de la polaridad crítica de la mezcla de etanol-agua, con respecto a dicho aceite, a 15 % en unidades de volumen por encima de dicha polaridad crítica, en el que la polaridad crítica de dicha primera mezcla de etanol-agua está en el intervalo de 25-75 % de volumen de etanol en la mezcla de etanol-agua y en la que tras la dilución, dichos lípidos polares forman una fase cristalina líquida laminar, sin formar primero una fase HII hexagonal. En una realización, dicha primera mezcla de etanol-agua tiene una concentración de etanol calculada como % en volumen basado en la cantidad total de etanol y agua, que está en el intervalo de 10 % en unidades de volumen y preferiblemente de 5 % en unidades de volumen, por debajo de la polaridad crítica de la mezcla de etanol-agua, con respecto a dicho aceite, a 10 % en unidades de volumen y preferiblemente a 5 % en volumen, por encima de dicha polaridad crítica.

## ES 2 662 710 T3

La polaridad crítica de dicha primera mezcla de etanol-agua puede estar en el intervalo de 30-70, preferiblemente 35-65, más preferiblemente 40-60 y los más preferido en el intervalo de 45-55 % en volumen de etanol en la fase disolvente.

5 La dilución de dicha dispersión se puede llevar a cabo con dicha primera mezcla de etanol-agua y/o una segunda mezcla de etanol-agua y/o con agua hasta que se obtiene una dispersión coloidal de dichos lípidos polares, en la que dichos lípidos polares forman partículas coloidales en la forma de liposomas, partículas cúbicas y/o gotículas de aceite revestidas de fase cristalina líquida laminar.

10 La relación como % en volumen entre el etanol y el agua en la segunda mezcla de etanol-agua usada para diluir los lípidos polares que conforman la fase cristalina líquida laminar en dicha primera mezcla de etanol-agua puede ser diferente a la de dicha primera mezcla de etanol-agua, de tal forma que la segunda mezcla de etanol-agua puede contener una proporción mayor de agua que la primera mezcla de disolvente polar.

15 Tras realizar la dilución de dicha dispersión que comprende dichos lípidos polares en una fase cristalina líquida laminar, se puede obtener una dispersión coloidal de liposomas.

Dichos liposomas pueden tener un diámetro promedio que es menor de 100 nm.

20 Al menos el 80 % de los liposomas pueden tener un diámetro de menos de 200 nm.

Dichos liposomas pueden estar en la forma de vesículas unilaminares que tienen una bicapa de lípidos polares.

25 Dicho aceite puede contener al menos un 25 % en peso de monoglicéridos de ácido oleico y/o linoleico, calculado sobre la cantidad total de lípidos en dicho aceite, en la que, después de realizar la dilución de dicha dispersión que comprende dichos lípidos polares, se puede formar una dispersión coloidal de cubosomas.

30 El etanol se puede evaporar de la dispersión para proporcionar una dispersión acuosa que contiene menos del 10 % en peso, preferiblemente menos del 5 % en peso y más preferiblemente menos del 1 % en peso de etanol.

Los lípidos polares se pueden derivar de especies vegetales, animales o microbiológicas.

Los lípidos polares se pueden derivar de los granos de cereal o de hojas.

35 Los lípidos polares se pueden derivar de la avena.

Dichos lípidos polares también pueden comprender fosfolípidos.

40 Dicho aceite puede contener entre 30-95, preferiblemente entre 30-90 % de lípidos no polares y dicha dispersión contiene al menos un 30 % en peso, preferiblemente al menos un 40 % en peso y más preferiblemente al menos un 50 % en peso de lípidos totales, dando como resultado una emulsión de aceite en agua en la que los lípidos no polares forman gotículas que están revestidas por una fase cristalina líquida laminar de dichos lípidos polares.

45 El etanol y el agua se pueden evaporar de dicha dispersión para proporcionar un aceite que contiene menos del 1 % en peso de etanol.

Dicho aceite se puede derivar de la avena.

50 La invención se refiere además a una dispersión acuosa coloidal de lípidos polares, comprendiendo dichos lípidos polares los galactolípidos, en la que dichos lípidos polares que comprenden galactolípidos comprenden al menos un 50 % en lípidos de lípidos polares y al menos un 2 % de lípidos en lípidos no polares, en la que % en lípidos se refiere al % en peso de lípidos polares calculado sobre la cantidad total de lípidos.

55 Dichos liposomas pueden tener un diámetro promedio que es menor de 100 nm. Al menos el 80 % de los liposomas pueden tener un diámetro de menos de 200 nm.

Los liposomas pueden tener un diámetro promedio que es no es menor de 80 nm, preferiblemente no superior a 60 nm.

60 Al menos el 80 %, preferiblemente al menos un 90 % y más preferiblemente al menos un 99 % de los liposomas de tamaño nanométrico pueden tener un diámetro de menos de 100 nm.

Los liposomas pueden tener un diámetro promedio en el intervalo de 30-60 nm, preferiblemente en el intervalo de 40-50 nm.

65

Los liposomas pueden ser vesículas unilaminares que tienen una bicapa de lípidos polares.

Al menos un 25 % en peso pueden ser monoglicéridos de ácido oleico y/o linoleico, tal como se calcula sobre la cantidad total de lípidos, comprendiendo dichos lípidos polares los galactolípidos, en la que los lípidos polares que comprenden galactolípidos y los monoglicéridos forman cubosomas coloidales.

5 Los lípidos polares se pueden derivar de especies vegetales, animales o microbiológicas.

Los lípidos polares se pueden derivar de los granos de cereal o de hojas.

Los lípidos polares se pueden derivar de la avena.

10

Los lípidos polares también pueden también comprender fosfolípidos.

Los liposomas y/o cubosomas pueden contener al menos un 60 % en lípidos y preferiblemente al menos un 75 % en lípidos de lípidos polares, siendo el resto lípidos no polares, en la que % en lípidos se refiere al % en peso de lípidos polares calculado sobre la cantidad total de lípidos.

15

Los liposomas pueden contener al menos un 5 % en lípidos y preferiblemente al menos un 10 % en lípidos de lípidos no polares, siendo el resto de los lípidos, lípidos polares, en la que % en lípidos se refiere al % en peso de lípidos no polares calculado sobre la cantidad total de lípidos.

20

La dispersión puede tener un contenido de sólidos secos menor del 20 % en peso.

La divulgación se refiere además a una dispersión acuosa coloidal en forma de una emulsión de aceite en agua de lípidos polares que comprenden galactolípidos y lípidos no polares, en la que los lípidos no polares forman gotículas que están revestidas por una fase cristalina líquida laminar de dichos lípidos polares.

25

La invención también se refiere a una dispersión coloidal acuosa que se puede obtener por un método definido anteriormente.

La invención también se refiere a un aceite que contiene lípidos polares que comprenden galactolípidos, en la que dicho aceite se puede obtener por el método anterior, seguido de la evaporación del etanol y el agua para proporcionar un aceite que contiene menos del 1 % en peso de etanol y menos del 3 % en peso de azúcar, preferentemente menos del 2 % en peso de azúcar y más del 25 % en peso de lípidos polares, preferiblemente, más del 30 % en peso de lípidos polares y dicho aceite también se caracteriza por formar menos fase hexagonal que de fase cristalina líquida laminar durante un proceso posterior de hinchamiento en agua que da como resultado una emulsificación espontánea.

35

Dicho aceite se puede derivar de la avena.

40

La invención se refiere además a una dispersión acuosa coloidal como se ha definido anteriormente o que se puede obtener de acuerdo con el método que se ha definido anteriormente para su uso como medicamento.

La invención se refiere además a una dispersión acuosa coloidal y/o un aceite tal como se ha definido anteriormente o que se puede obtener de acuerdo con el método que se ha definido anteriormente para el tratamiento de la obesidad.

45

La invención se refiere además a una formulación farmacéutica que comprende una dispersión acuosa coloidal y/o un aceite tal como se ha definido anteriormente o que se puede obtener de acuerdo con el método que se ha definido anteriormente en premezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable.

50

La dispersión y/o el aceite puede actuar como un principio activo o puede actuar como un vehículo para liberar un principio activo.

La invención se refiere además a una composición cosmética que comprende una dispersión acuosa coloidal y/o un aceite tal como se ha definido anteriormente o que se puede obtener de acuerdo con el método que se ha definido anteriormente.

55

La invención se refiere además a una composición alimentaria o composición de suplemento alimentario que comprende una dispersión acuosa coloidal y/o un aceite tal como se ha definido anteriormente o que se puede obtener de acuerdo con el método que se ha definido anteriormente.

60

La composición alimentaria o composición de suplemento alimentario puede ser margarina, aceite, nata, leche, yogur, queso, harina, zumo, batido o refresco.

65

La invención se refiere además a una composición de pienso para animales que comprende una dispersión acuosa coloidal y/o un aceite tal como se ha definido anteriormente o que se puede obtener de acuerdo con el método que

se ha definido anteriormente.

La invención también se refiere a un artículo que comprende una dispersión acuosa coloidal y/o un aceite tal como se ha definido anteriormente o que se puede obtener de acuerdo con el método que se ha definido anteriormente.

5

#### 4 Definiciones

##### *Soluciones madre*

- 10 T2, T7, HL17 y SFO10 son soluciones madre, véase la Tabla 1.  
 PL0126 es un aceite de avena de tipo T2 con lípidos polares = 65 % en lípidos.  
 PL13 es un aceite de avena de tipo T7 con lípidos polares = 85 % en lípidos  
 HL17 es un aceite de avena de tipo T2 con lípidos polares = 40 % en lípidos  
 SFO10 es aceite de girasol y T2 mezclado con lípidos polares = 10 % en lípidos

15

##### *Dispersión de vesículas con fracción lipídica de la avena*

T3 y T4, dispersiones de vesículas producidas a partir de T2 y T7, respectivamente

20

##### *Dispersiones coloidales*

Las dispersiones coloidales son fases acuosas homogéneas que contienen partículas en el intervalo de tamaños 1 - 1000 nm.

25

##### *Fases lípido-agua cristalinas líquidas*

L-alfa - laminar  
 HII - hexagonal invertida  
 Cubosoma

30

##### *Fase cristalina líquida termotrópica*

Baronet

35

##### *Liposomas*

dispersión de una fase L-alfa

##### *Liposomas unilaminares = vesículas*

40

dispersión de una fase L-alfa que consiste en una sola bicapa

##### *Fases de disolvente líquido*

45

Lw = fase líquida que comienza en la esquina del agua de un diagrama de fases etanol/lípido/agua  
 Le = fase líquida que comienza en la esquina del etanol de un diagrama de fases etanol/lípido/agua

##### *Polaridad crítica*

50

La polaridad crítica define la concentración de etanol y agua del sistema disolvente cuando una emulsión de disolvente en aceite se transforma en una emulsión de aceite en disolvente, y esta polaridad crítica se puede detectar por la viscosidad o al microscopio. Cuando se detecta por la viscosidad, la viscosidad comienza a aumentar rápidamente al aumentar la polaridad desde la polaridad crítica. Cuando se detecta usando un microscopio de luz polarizada, los liposomas resultan mucho más pequeños cuando la polaridad aumenta desde la polaridad crítica.

55

Cuando se detecta mediante un microscopio óptico con contraste de fases, el tamaño de las partículas comienza a disminuir muy rápidamente cuando la polaridad aumenta desde la polaridad crítica. La polaridad crítica está en el intervalo de 25-75 % en volumen, preferiblemente 30-70 % en volumen, más preferiblemente 35-65 % en volumen, incluso más preferiblemente 40-60 % en volumen y lo más preferido 45-55 % en volumen de etanol en la fase disolvente, en el que la fase disolvente es como se define más adelante.

60

Para medir la polaridad crítica; el sólido seco del sistema debería estar en el intervalo de 10-80 % en peso, más preferentemente 15 -70 % en peso, lo más preferido 20-65 % en peso; y la concentración de etanol en la fase disolvente deberá cubrir la polaridad crítica.

65

El Ejemplo 2 describe un método para determinar la polaridad crítica.

*Cerca de polaridad crítica*

5 Cerca de la polaridad crítica significa que la concentración de etanol en la primera mezcla de etanol-agua deberá estar en el intervalo de  $\pm 15\%$  en volumen desde la polaridad crítica, más preferiblemente en el intervalo de  $\pm 10\%$  en volumen desde la polaridad crítica y con máxima preferencia en el intervalo de  $\pm 5\%$  en volumen desde la polaridad crítica.

*Aceite*

10 Un aceite es una fase lipídica líquida que contiene lípidos no polares, lípidos polares y etanol, y también puede contener pequeñas cantidades de agua y azúcar.

*Fase disolvente*

15 La fase disolvente es una fase calculada simplificada que contiene todo el etanol y el agua del sistema, sin tener en cuenta la diferente concentración en las distintas fases verdaderas

*%EtOH en volumen en fase disolvente*

20 %EtOH en volumen es la concentración calculada de etanol en la fase disolvente de la mezcla utilizada sin tener en cuenta la diferente concentración en diferentes fases.

*E40, E42, E45, E50, E55, E60, Exx* significa soluciones de agua y etanol, con una concentración de etanol a 40, 42, 45, 50, 55, 60 y xx % en volumen de etanol, respectivamente.

25

**5 Breve descripción de los dibujos**

30 Figura 1. La interacción entre los lípidos del trigo y el agua como se describe mediante este diagrama de fases ternario determinado a temperatura ambiente mediante el equilibrado de mezclas de componentes lipídicos polares y no polares del trigo con agua. Las fases se describen en el texto.

Figura 2. La solución madre T2 vista al microscopio de polarización. Partículas birrefringentes con las características formas denominadas de bastoncillo se observan en equilibrio con el fluido isotrópico.

35 Figura 3. La fotografía se toma tras la adición de una pequeña cantidad de agua, pero por debajo del límite de hinchamiento, al mismo fluido que se muestra en la Figura 1. El agua añadida induce una transformación a la fase HII tanto en el interior del bastoncillo que se muestra como en el fluido circundante exterior. El hinchamiento de agua dentro del bastoncillo original da como resultado una transición a la fase HII, con sus característicos colores intensos de interferencia por birrefringencia.

40

Figura 4. Una dispersión liposomal de la solución madre T7 se diluyó hasta una composición de etanol-agua 55:45 (v/v) y un contenido de lípidos del 10 % (p/p). Solamente se observan las texturas características de la fase L-alfa, mostrando los liposomas las texturas de cruz de Malta.

45 Figura 5. El contenido de sólidos secos en % en peso vs %EtOH en volumen en la fase disolvente para PL0126 cuando se diluyó con agua. Se proporcionan los límites del intervalo de "formación de la fase HII". Destacar que la composición del aceite atraviesa el intervalo HII durante la dilución con agua y que la línea de proceso no es una línea recta con estas unidades.

50 Figura 6. El contenido de sólidos secos en % en peso vs %EtOH en volumen en la fase disolvente para PL0126 cuando se diluyó con diferentes soluciones de etanol y agua donde la concentración de etanol está en un intervalo del 40 al 60 % en volumen. Destacar que las líneas de proceso no son una línea recta con estas unidades.

55 Figura 7. Igual que para la Figura 6, pero con las fronteras del intervalo de la "Fase oleosa", se incluyen el intervalo de "Dispersión" y el intervalo "Muy viscoso" y la "Polaridad crítica" de PL0126.

Figura 8. El contenido de sólidos secos en % en peso vs %EtOH en volumen en la fase disolvente para PL0126 cuando se diluyó por primera vez con 9, 19 y 39 partes de E55 y después se añadió agua a dichas mezclas.

60

Figura 9. Igual que para la Figura 8, pero con las fronteras del intervalo de la "Fase oleosa", se incluyen el intervalo de "Dispersión" y el intervalo "Muy viscoso".

65 Figura 10. El contenido de sólidos secos en % en peso vs %EtOH en volumen en la fase disolvente para PL0126 cuando se diluyó por primera vez con 27 partes de E50 y a continuación se eliminó el etanol por evaporación mediante un proceso discontinuo.

Los límites del intervalo "Muy viscoso", el intervalo de "Dispersión", el intervalo de "Formación de fase HII" y la "Polaridad crítica" para PL0126 se han incluido.

5 Figura 11. El contenido de sólidos secos en % en peso vs %EtOH en volumen en la fase disolvente para PL0126 cuando se diluyó por primera vez con 9 partes de E45 y a continuación se diluyó con agua y a continuación se eliminó el etanol por evaporación mediante un proceso discontinuo. Los límites del intervalo "Muy viscoso", el intervalo de "Formación de fase HII" y la "Polaridad crítica" para PL0126 se han incluido.

10 Figura 12. El contenido de sólidos secos en % en peso vs %EtOH en volumen en la fase disolvente para PL0126 cuando se diluyó por primera vez con 4 partes de E45 y a continuación se diluyó con agua y a continuación se eliminó el etanol por evaporación mediante un proceso discontinuo. Los límites del intervalo "Muy viscoso", el intervalo de "Formación de fase HII" y la "Polaridad crítica" para PL0126 se han incluido.

15 Figura 13. El contenido de sólidos secos en % en peso vs %EtOH en volumen en la fase disolvente para PL13 cuando se diluyó por primera vez con 3,5 partes de E42 y a continuación se diluyó con agua y a continuación se eliminó el etanol por evaporación mediante un proceso discontinuo. Los límites del intervalo "Muy viscoso", el intervalo de "Formación de fase HII" y la "Polaridad crítica" para PL13 se han incluido.

20 Figura 14. El contenido de sólidos secos en % en peso vs %EtOH en volumen en la fase disolvente para dos procesos. La primera línea de proceso describe cuando el etanol de HL17 se elimina directamente por evaporación mediante procesos discontinuos. La segunda línea de proceso describe cuando HL17 se diluye por primera vez con 2 partes de E50 y a continuación el etanol se elimina por evaporación mediante procesos discontinuos.

25 Los límites del intervalo "Muy viscoso", el intervalo de "Formación de fase HII" y la "Polaridad crítica" para HL17 se han incluido.

30 Figura 15. El contenido de sólidos secos en % en peso vs %EtOH en volumen en la fase disolvente para SPO10 cuando se diluyó por primera vez con 2 partes de E45 y a continuación se diluyó con agua y a continuación se eliminó el etanol por evaporación mediante un proceso discontinuo. La "Polaridad crítica" para SFO10 se ha incluido.

## 6. Divulgación detallada de la invención

### 6.1 Resumen

35 Se han dedicado amplios estudios a las fracciones lipídicas de la avena y la posibilidad de producir dispersiones acuosas de dichas fracciones para aplicaciones de alimentos y farmacéuticas. Durante esta primera fase del trabajo de los inventores se observó que el método de preparación, la cuidadosa dilución del aceite usando mezclas disolventes de etanol y agua, también se podrían usar para producir dispersiones, vesículas, liposomas, emulsiones y aceites, de otras mezclas de galactolípidos y fosfolípidos. Además, el proceso se puede aplicar a mezclas de estos lípidos con monoglicéridos para preparar dispersiones de fases cristalinas líquidas cúbicas en agua.

40 Principios activos tanto lipófilos como hidrófilos se pueden incorporar a los diferentes tipos de partículas lipídicas, y utilizarse para aumentar la biodisponibilidad de nutrientes importantes.

45 Las dispersiones de partículas se pueden mezclar con alimentos o usarse tal cual en los denominados golpes. Las dispersiones de partículas también pueden utilizarse en sustancias farmacéuticas, cosméticos, agroquímicos y alimento mezclado con otros componentes o usado en solitario.

50 Se realizó un estudio anterior del efecto sobre la sensación de saciedad de las partículas lipídicas basadas en fracciones ricas en galactolípidos. El resultado de dos estudios con el desayuno puede resumirse de esta manera: un día los lípidos proceden de vesículas fabricadas a partir de aceites de la avena y el segundo día los lípidos procedían de la leche. Se obtuvieron indicaciones claras del efecto positivo sobre la sensación de saciedad a partir de los niveles de GLP-1 en muestras de sangre.

### 55 6.2. Introducción

60 Las soluciones de etanol-agua de lípidos con las que trata la presente invención tienen ventajas evidentes en comparación con otros sistemas que implican disolventes orgánicos cuando se trata de alimentos o productos farmacéuticos, y las aplicaciones importantes implican procesos para formar dispersiones acuosas de lípidos. Un ejemplo es la preparación de liposomas por el método de inyección de etanol.

65 El proceso presentado en el presente documento permite un mejor control de la etapa inicial de dichos procesos de separación de fases y, de esta forma, mediante la presente invención se crean condiciones reproducibles para la formación de dispersiones de partículas uniformes.

### 6.3. Parte I Proceso por etapas de dilución en etanol/agua-*evaporación aplicado a un sistema lipídico de la avena.*

Para describir la aplicación de la invención en la preparación de dispersiones de vesículas de avenas, es necesario volver al diagrama de fases mostrado en la Figura 1. Como se puede observar en las regiones monofásicas de la Figura 1, la adición de agua a una composición de lípidos donde la concentración de lípidos polares supera el 65 % en lípidos produce en primer lugar la fase HII hexagonal, y por encima de aproximadamente el 18 % (p/p) de agua, se forma la fase L-alfa laminar. Análogamente, cuando se fraccionan aceites de avena de acuerdo con la presente invención, con una concentración de lípidos polares superior al 50 %, se mezclan con agua, se forma una fase HII y la fase HII resultante crea un gel muy fuerte. Una vez formado, este es muy estable e imposible de dispersar en partículas pequeñas, véase el Ejemplo 1.

Los inventores han desarrollado un proceso de dilución en etanol-agua/evaporación con el objetivo principal de evitar la formación de la fase cristalina líquida HII si los lípidos se exponen en primer lugar al agua. Si la concentración de etanol en la mezcla de etanol-agua usada para diluir el aceite supera aproximadamente 30 % (v/v), no se forma fase HII (como se observa en la Fig. 4, que se revisará más adelante). Por tanto, en primer lugar, se añade una mezcla de agua-etanol con aproximadamente un 45 % en volumen de etanol a la solución madre. A continuación, una vez que se ha añadido disolvente suficiente a la fase cristalina líquida L-alfa mediante esta solución de etanol-agua, los inventores han descubierto que es posible añadir agua pura a la mezcla. De esta forma, los inventores pueden evitar la fase HII y diluir la fase L-alfa sin formar el estado de gel irreversible y la fase L-alfa-inicialmente formada durante la adición de agua en etanol persiste todo el tiempo hacia la transición con un exceso de agua a una dispersión de vesículas unilaminares. El etanol añadido puede eliminarse por evaporación y las partículas son muy pequeñas y la dispersión se vuelve muy estable.

Además de esto, fue interesante observar que este proceso crea espontáneamente partículas muy pequeñas y uniformes. Estas características de tamaño de la dispersión se consiguieron cuando la dilución del aceite se lleva a cabo usando una mezcla de agua-etanol con una concentración de etanol cercana a la concentración crítica, según las definiciones. Cuando la concentración de etanol es mayor que este punto de transición, la fase disolvente se llena con liposomas grandes. Estas partículas de no son estables. Cuando se añade agua a esta mezcla, la tasa de adición y la tasa de mezclado de agua resultan muy difíciles de controlar, y la distribución del tamaño de partícula será amplia. Si la concentración de etanol es notablemente inferior a este punto de transición, la formación de partículas es más lenta, y se forman partículas más grandes. Si la concentración de etanol es muy inferior al punto de transición, se forman partículas de gel granes. Una vez formadas, estas partículas son muy estables y es muy difícil reducir el tamaño de estas partículas usando energía mecánica. Por tanto, a una concentración de etanol adecuada, las partículas se forman espontáneamente muy rápido y las partículas resultan ser muy pequeñas.

Otra forma de ilustrar estos cambios de fase durante la dilución con agua y evaporación del etanol que se produce es que partir de nuevo del diagrama de fases de la Figura 1. Se puede imaginar una cuarta dimensión en la dirección verticalmente ascendente correspondiente al componente de etanol, formando un vértice en un tetraedro que describe las regiones de fase en un sistema tetracomponente. Así, los inventores han descubierto que hay un "corredor" al aumentar la adición de etanol entre el intervalo de existencia de la fase HII y la solución de etanol-agua de estos lípidos (T2 o T7) que los inventores utilizan en el proceso de preparación, que posibilita formar la fase L-alfa directamente (y a continuación, las vesículas se forman muy rápidamente) sin pasar por la fase cristalina líquida HII.

### 6.3.1 Materiales de partida de los lípidos de la avena

Los autores describen en detalle dos materiales de partida diferentes adecuados para las dispersiones, que representan proporciones extremas de lípidos no polares:polares. Se trata de fracciones de aceite de avena, fraccionado usando etanol, agua y azúcar de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO 2010104444. En dicho documento, las fracciones se denominan "Lípidos polares pesados" y "Bajo en estóolidos". En el presente documento se denominan soluciones madre T2 y T7, respectivamente. Las composiciones de estas fracciones se describen en la Tabla 1.

Los aceites de avena en bruto contienen aproximadamente un 15 % en peso de lípidos polares. Estos lípidos polares son ricos en galactolípidos y, especialmente, en di-galactosil-di-acil-glicérido (DGDG). La expresión "rico en galactolípidos" se refiere a que al menos un 30 % en peso de los lípidos polares los galactolípidos. El DGDG de la avena es único porque parte del DGDG contiene uno o más ácidos hidroxilgrasos, que se esterifican mediante otros ácidos grasos. Las moléculas que contienen ácidos grasos con ácidos hidroxilgrasos se denominan estóolidos. Los estóolidos naturales solamente se encuentran en avenas (WO 88/08253, Jee M.H. 1995, "A new emulsifier from oat", Proc. 21st World Congress ISF, The Hague, artículo 135). Los estóolidos sintéticos no son habituales, por ejemplo, los productos basados en aceite de ricino, u otros emulsionantes sintéticos como PGPR.

### 6.3.2 Proceso de preparación de las dispersiones de vesículas unilaminares de lípidos de la avena

Cuando las soluciones madre T2 o T7 se mezclan con agua, se forma un gel muy viscoso. Una vez formado, este gel no se puede disolver, bien mediante calentamiento hasta 100°C o agitación. En la Figura 5 se muestra un diagrama esquemático basado en esta formación de gel. El gel se forma cuando la concentración de etanol en la fase disolvente es menor de aproximadamente el 40 % en volumen.

Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, se ha descubierto que es posible evitar la formación de este gel, mediante la dilución cuidadosa de aceite en un disolvente que contiene etanol, véase la Figura 6-7 y la Figura 10-13. Una concentración de etanol en el intervalo de 40-55 % en volumen es adecuada en la mayoría de los casos. Si la concentración de etanol es demasiado alta, el aceite no se dispersará. Si la concentración de etanol es algo  
 5 demasiado baja, la velocidad de formación de partículas es más lenta, y la distribución del tamaño de partícula será más amplia y se formarán algunas partículas mayores de 1  $\mu\text{m}$ . Si la concentración de etanol es demasiado baja, se formarán partículas de gel (que son fase HII) como se ha mencionado anteriormente. Una vez formada, permanecerán como partículas grandes ( $>1 \mu\text{m}$ ). Las dispersiones de partículas se forman mediante los lípidos polares y el agua. El etanol se puede eliminar mediante evaporación. Cuando el etanol se elimina, las partículas se  
 10 vuelven muy estables y el sólido seco puede aumentar. Sin embargo, cuando el contenido de sólidos secos supera el 10 % en peso, la viscosidad aumenta rápidamente.

El gel descrito en el presente documento se identificó fenomenológicamente en el microscopio de polarización por su textura birrefringencia como una fase HIII, como se describe adicionalmente a continuación.

La composición de la fracción T2 se describe en la Tabla 1. La solución madre T2 parece una fase oleosa homogénea con alta viscosidad. Sin embargo, en un microscopio de polarización, se observan bonitas partículas en forma de varilla que son fuertemente birrefringentes, tal como se muestra en la Figura 2. Su presencia y orientación en el flujo explican las propiedades viscosas del fluido. Dichas partículas fueron descritas por primera vez en 1910 por Friedel y Grandjean, y se denominaron bastoncillos (del francés, batonnets, y posteriormente también en inglés) debido a la forma alargada regular y su simetría de espejo a lo largo de un eje central. Se ha demostrado que dichas partículas cristalinas líquidas consisten en pilas de láminas blandas de espesor uniforme. Las limitaciones del empaquetamiento geométrico de dichas láminas curvas induce la denominada textura focal-cónica, que explica la forma externa de la partícula, tal como se observa en el microscopio de polarización. Esta estructura laminar también  
 25 se ha denominado como esmectita en la bibliografía. Las moléculas ordenadas en la superficie de la partícula se encuentran en equilibrio dinámico con las moléculas desordenadas en el fluido isotrópico exterior.

Hasta donde alcanza el conocimiento de los presentes inventores, esta es la primera observación de los bastoncillos en lípidos naturales.

Las fases cristalinas líquidas que aparecen en los sistemas acuosos lípidos polares se han caracterizado bien desde su primera descripción en la década de los sesenta del siglo pasado. Consisten en interfases formadas por las cabezas polares dispuestas en diferentes patrones geométricos, separando las regiones de la cadena de hidrocarburo de las regiones acuosas. Sus estructuras son laminar, hexagonal y cúbica, siendo las fases L-alfa y HII utilizadas en la presente invención las dos fases más comunes. Como estas fases cristalinas líquidas contienen agua (o un disolvente) se denominan cristales líquidos *liotrópicos*. Cuando el etanol está presente en el medio acuoso, se podría esperar que hubiera una concentración determinada de etanol para este tipo de comportamiento de fase y, por encima de esta concentración, no se forman regiones acuosas. Esto se considera que representa la estructura de la fase fluida a un 65 % de etanol, que son las soluciones madre que utilizan los inventores. En dicho fluido, un tipo diferente de fase cristalina líquida puede cristalizar a continuación. Se trata de una fase cristalina líquida *termotrópica* que consiste en moléculas lipídicas, solamente sin ninguna región interna de moléculas disolventes. Esta fase está en equilibrio con la solución isotrópica exterior, con su estructura laminar, formando la organización de bastoncillos mostrada en la Figura 2.

Cuando se añade agua a T2, se obtiene en primer lugar la fase HIII de tipo gel. Es muy viscoso y no es posible dispersarlo en agua. Además, el calentamiento hasta aproximadamente 90 °C no muestra efectos sobre su estabilidad o hinchamiento con agua. Al microscopio puede observarse que esta fase es muy homogénea y fuertemente birrefringente, mostrando intensos colores de interferencia cubriendo el espectro visible. Todos estos rasgos son consistentes con las características bien conocidas de la fase HIII.

Si el proceso de dilución con agua de la solución madre T2 implica una cantidad limitada de agua, puede observarse al microscopio cómo las partes de la fase oleosa isotrópica, así como el interior de los bastoncillos, se transforman en la fase HIII, como se indica por los intensos colores de interferencia dentro de las regiones birrefringentes, tal como se muestra en la Figura 3.

Cuando la fase L-alfa se forma directamente durante el hinchamiento con agua-etanol de la solución madre T2, para determinada concentración de etanol (superior a aproximadamente el 50 % (v/v)), muestra baja viscosidad y una birrefringencia uniforme y débil sin colores de interferencia. A una dilución superior de la solución de etanol-agua, se obtiene una dispersión liposomal, tal como se muestra en la Figura 4.

Cuando la solución madre T2 se expone a un exceso de fase disolvente rica en agua, mediante el proceso de dilución en agua-etanol/evaporación descrito, se obtiene el tipo T3 de partículas lipídicas dispersas como se describe en el Ejemplo 3, más adelante.

Estas partículas son notablemente estables sin ningún signo de separación (sedimentación o formación de nata) durante el almacenamiento. Los estudios realizados mediante el microscopio electrónico de criotransmisión (crio-

TEM) y difracción de sincrotrón de rayos X de estas dispersiones cinéticamente estables que contienen 1 y 10 % (p/p) de lípidos en agua (y menos del 1 % de etanol) mostraron una estructura de las vesículas bastante uniforme. Hay una dominancia de vesículas dentro de la película de agua vitrificada en el intervalo de tamaños de 40 - 50 nm de diámetro). Esta distribución del tamaño dominante muestra una estructura de bicapa uniforme, parte de las vesículas muestran una forma pseudohexagonal, que parecía ser un efecto de las interacciones partícula-partícula en la película crio-TEM. Un análisis de dispersión de sincrotrón de rayos X de ángulo pequeño confirmó el tamaño pequeño de la distribución y no mostró indicaciones de formas, más allá de las esféricas. Había un máximo a 5,2 nm, que se interpretó como debido al espesor de la bicapa lipídica. También apareció otra joroba muy pequeña a aproximadamente 2,2 nm, que se suponía reflejaba el espesor de la capa de agua en una pequeña fracción de partículas con dos o más bicapas (también observadas en el crio-TEM).

La composición de T7 se describe en la Tabla 1. Análogamente a la solución madre T2, también la solución madre T7 aparece homogénea cuando se observa a simple vista, pero muestra partículas birrefringentes en forma de bastoncillo en el fluido isotrópico bajo el microscopio de polarización. Cuando esta fracción, que contiene una mayor proporción de lípidos polares, se diluye de acuerdo con el mismo proceso que se ha usado para la fracción T2, sin embargo, una mayor proporción de liposomas participan en la formación de la dispersión final. A una dilución hasta una concentración de lípidos del 10 % en peso y una concentración de etanol del 55 % en volumen, existe una marcada dominancia de los liposomas, tal como se muestra en la Figura 4.

De esta forma, las vesículas unilaminares que se forman espontáneamente mediante el presente proceso de preparación tienen un tamaño notablemente uniforme y bastante pequeño, en comparaciones con las distribuciones de tamaño de vesículas notificadas en la bibliografía. Mediante ultrasonificación, sin embargo, se pueden producir pequeñas vesículas unilaminares, como se ha demostrado anteriormente, por ejemplo, en el caso de dimiristoilfosfatidil-colina (B Lentz, T J Carpenter, D R Alford: *Biochemistry* 26 (1987) 5389 - 5397). El pequeño tamaño puede proporcionar una importante ventaja en las aplicaciones que consideran los inventores.

### 6.3.3 Mecanismos durante la formación de las partículas muy pequeñas

¿Por qué se forman las vesículas espontáneamente tan rápidamente y son tan pequeñas? Los inventores piensan que el tamaño refleja una segregación de las moléculas lipídicas disponibles según su forma molecular. De esta forma, la monocapa interna de la bicapa de la vesícula se podrían enriquecer en moléculas lipídicas con un área de la sección transversal más grande en la región del grupo metilo final, con moléculas como los estóridos DGDG. Por el contrario, la monocapa exterior podría estar enriquecida en moléculas con una forma molecular opuesta, con un área de sección transversal más grande en la región del grupo de cabeza polar en comparación con la región del grupo metilo final, por ejemplo digalactosil-monoglicéridos. Otro rasgo inusual es que estas vesículas en el caso de la solución madre T2 contienen una proporción bastante alta de moléculas de triglicéridos, aproximadamente un 30 % en lípidos, que parecen estar solubilizados dentro de la bicapa.

Los inventores proponen que es la diferente composición de los lípidos que crean los liposomas y las condiciones favorables cercanas a la polaridad crítica son los motivos para el cambio súbito casi espontáneo en el tamaño de partícula entre los liposomas que se produce durante la dilución en condiciones cercanas a la polaridad crítica. A una polaridad por debajo de la polaridad crítica, muy poca cantidad de estóridos y triglicéridos, o ninguna, se disuelve en la fase disolvente y, por tanto, no se incluye en los liposomas. Esto conduce a un diámetro de los liposomas en el intervalo de 1 a 40  $\mu\text{m}$ .

Los inventores proponen que la disgregación rápida de las partículas en el intervalo 1 - 100  $\mu\text{m}$  a una polaridad ligeramente por debajo de la polaridad crítica hasta menos de 100 nm ligeramente por encima de la crítica se debe a la composición de los lípidos que crean la fuerza impulsora junto con una concentración de etanol adecuada en todo el sistema, esto es, proporcionando una fase disolvente de baja viscosidad que facilitan el transporte de materia y una polaridad adecuada, de forma que esta transición puede suceder muy fácilmente.

Las conclusiones de los Ejemplos 2, 3 y 4 son que:

- La polaridad crítica se puede determinar usando los principios descritos en el Ejemplo 2.
- La mejor distribución de tamaño de partículas se consigue cuando el aceite se diluye con un primer disolvente de etanol-agua con una polaridad ligeramente superior a la polaridad crítica, véase la Figura 10 y 12. De esta forma, se consigue un producto muy viscoso debido a la formación rápida de partículas muy pequeñas. La dilución con esta primera mezcla disolvente de etanol-agua debería continuar hasta que la viscosidad alcanza un máximo. A continuación, la distribución de tamaño de partículas conseguida se puede mantener, y el etanol se puede eliminar, mediante la adición de agua seguido por evaporación. La cantidad de agua añadida debería ser suficiente para permitir la siguiente evaporación para dejar que el producto alcance una concentración de etanol aceptable inferior y una viscosidad aceptable del producto final.
- El producto final tuvo un contenido de sólidos secos del 10 % en peso; el contenido de etanol estaba por debajo del 0,1 % en peso y, para el mejor proceso, las vesículas unilaminares resultantes estaban comprendidas en el intervalo de 40-50 nm.

Las partículas muy pequeñas y la distribución del tamaño de partículas, muy estrecha, también se debe, por tanto, a que los lípidos solamente entran en contacto con una fase disolvente que tiene una concentración de etanol muy específica, cercana a la concentración crítica.

5 Indicar que la pequeña diferencia entre E50 y E45 dio lugar a una importante diferencia en la distribución de tamaño de partículas, véase el Ejemplo 6. Esta diferencia es decisiva porque las vesículas se pueden mezclar con otros productos sin problemas, o no, y si la estructura de las partículas permanecerá inalterada cuando hayan pasado por el estómago y alcanzado el intestino.

10 *6.3.4 Formación de aceite con alto contenido de lípidos polares sin HII y etanol utilizando el proceso de dilución con etanol-agua / evaporación.*

15 Cuando el disolvente del aceite de avena con una concentración de lípidos polares de aproximadamente un 70 % en lípidos, como T2, se evapora, el aceite se vuelve muy viscoso e imposible de manipular. Cuando la concentración de lípidos polares se reduce hasta aproximadamente un 40 % en lípidos, la viscosidad se reduce y el aceite se puede manipular. Sin embargo, en algunos casos, la capacidad emulsionante se ve notablemente reducida. Cuando los inventores investigaron el aceite al microscopio, observaron cristales HII. Estas partículas HII son responsables de la muy alta viscosidad observada y la capacidad emulsionante reducida observada.

20 En la presente invención, los inventores demuestran que, mediante el uso del proceso de dilución con etanol-agua/evaporación, los aceites que contienen galactolípidos pueden estar exentos de cristales HII y los aceites siguen siendo fáciles de manipular y los aceites mantienen su capacidad emulsionante, también después de la eliminación del etanol, véase el Ejemplo 8.

25 El producto del ejemplo contenía menos del 1 % en peso de etanol y menos del 3 % en peso de azúcar. Cuando este aceite se expone al agua, forma menos fase hexagonal que fase cristalina líquida laminar durante el siguiente proceso de hinchamiento con agua, que da como resultado una emulsificación espontánea. Los inventores esperan que una reducción en la concentración de azúcar en el aceite a menos del 2 % de azúcar puede mejorar las propiedades de emulsión todavía más. Los inventores también esperan que la concentración de lípidos polares debería ser más del 25 % en peso de lípidos polares, preferiblemente más del 30 % en peso de lípidos polares, y que los lípidos polares derivados de avena son especialmente adecuados.

30 Esto significa que el procesamiento posterior con lípidos que contienen galactolípidos resulta más fácil de realizar. Esto dará como resultado productos con partículas más pequeñas, una distribución del tamaño de partícula más uniforme, y una calidad más reproducible del producto en comparación con los métodos de evaporación tradicionales.

#### *6.4 Parte II Proceso por etapas de dilución en etanol/agua- evaporación aplicado a sistemas lipídicos más complejos*

40 El proceso por etapas de dilución en etanol/agua- evaporación de la solución de etanol-agua de las fracciones lipídicas de la avena, descrito anteriormente, también se puede aplicar para preparar partículas de fases cúbicas bicontinuas. Este proceso posibilita un mejor control de la distribución del tamaño de partículas mediante la coprecipitación secuencial de una fase L-alfa, junto con una fase cúbica. El tamaño de partícula se controla mediante la cinética de la acumulación de las zonas superficiales de partículas.

45 Para explicar la forma en que el proceso de los inventores se puede aplicar en tales casos, los inventores considerarán la preparación de partículas cúbicas a partir de lípidos de la avena -mezclas de monooleína y comenzarán a partir de monooleína disuelta en el sistema etanol-agua, donde la preparación de las partículas cúbicas se basa en el diagrama de fases ternario de monooleína-agua-etanol publicado por Spicer y colaboradores (Spicer et al. 2001, Langmuir, 17, 5748-5756). El primer diagrama de fases ternario de este sistema se cartografió por Engström et al. (S.Engström, K. Alfons, M. Rasmusson, H. Ljusberg-Wahren: Progr. Colloid & Polymer Sci. 108 (1998) The Colloid Science of Lipids Kåre Larsson Festschrift pp 93 - 98).

50 Existe una pequeña región trifásica en el diagrama de fases donde la fase cúbica existe simultáneamente con la L-alfa. Parte de la monooleína disuelto en etanol puro y mediante dilución hacia la esquina del agua usando agua pura, las partículas cúbicas cristalizarán a partir de la fase líquida etanol-agua al pasar a la región trifásica. Este es un breve resumen del proceso de preparación descrito por Spicer et al (Spicer et al. 2001, Langmuir, 17, 5748-5756; WO02068561, WO02068562, WO0202716).

60 Si, en su lugar, se utiliza el proceso de acuerdo con la presente invención, los inventores consiguen una mezcla de etanol-agua-monooleína de aproximadamente 20:20:60 % en peso mezclando monooleína con una mezcla de etanol/agua del 50 %. A continuación, esta mezcla se mezcla con la mezcla de etanol-agua de aproximadamente un 30 % en peso de etanol. La concentración exacta de etanol en esta etapa se determina de una forma análoga al procedimiento descrito en el Ejemplo 2. La cantidad de mezcla de etanol y agua añadida se determina análogamente a la manera proporcionada en el Ejemplo 3. Finalmente, se añade agua y, si se requiere, el etanol se evapora de forma análoga a la descripción del Ejemplo 4. Estas condiciones se predeterminan y se ajustan mediante ensayo y

error, y a continuación se pueden aplicar de una forma reproducible en procesos a gran escala.

Un concepto útil del proceso de preparación de los inventores es la polaridad crítica, que define la concentración de etanol y agua cuando una emulsión de agua en aceite se transforma en una emulsión de aceite en agua, cuando  
5 aumenta la polaridad, véanse las definiciones. A una concentración de agua en el medio disolvente añadido ligeramente por encima de la polaridad crítica se ha observado que proporciona las condiciones ideales para iniciar la precipitación de las partículas cúbicas.

A la polaridad crítica para la formación de una película de monooleína con interfase aceite-agua, se debería esperar  
10 inducir la nucleación de las fases cristalinas líquidas. Esto debería ser una razón de las posibilidades mejoradas de producir partículas uniformes mediante este proceso, ya que el paso a través de los límites de la fase de cristal líquido puede tener lugar lentamente de una forma controlable. La adición de agua dirigida hacia la esquina del agua dará como resultado una precipitación más rápida y menos controlable. Esta diferencia será especialmente importante en el proceso a gran escala.

Los inventores también considerarán en la presente memoria los sistemas mixtos de fosfatidilcolina y monooleína,  
15 que fue el sistema en el que se demostró por primera vez la formación de partículas cúbicas (K. Larsson: J. Phys. Chem. 93 (1989) 7304 - 7314). Aproximadamente un 10 % (p/p) de una fosfatidilcolina pura procedente de soja en monooleína es suficiente para la formación de una distribución del tamaño de partícula más uniforme de las partículas cúbicas y, más importante, para aumentar su estabilidad contra la agregación.

En la presente invención, los inventores proponen la dilución cuidadosa hasta cerca de la polaridad crítica. A  
20 continuación, se ha iniciado la separación para dar una fase L-alfa. En la siguiente dilución con la segunda mezcla de etanol-agua hasta la separación de fases para obtener también la fase cúbica se ha obtenido completamente en la forma dispersa. A continuación, el etanol se evapora.

#### 6.5 Parte III Formación de emulsiones usando el proceso de dilución con etanol-agua/evaporación

El material lipídico de partida que utilizan los inventores comprende galactolípidos como componente lipídico polar.  
30 Los galactolípidos se utilizan como emulsionantes muy eficaces. Están naturalmente presentes en el extracto etanólico original del aceite de avena y pueden producir una emulsión de aceite en agua cuando la concentración de lípidos no polares es de aproximadamente 50 a aproximadamente 95 % en lípidos aplicando el proceso de dilución con etanol-agua/evaporación con etanol. A una concentración de lípidos no polares menor, los liposomas se forman aplicando el proceso de dilución con etanol-agua/evaporación con etanol de los inventores. Sin embargo, los  
35 galactolípidos pueden formar partículas HIII, que se pueden conformar usando métodos tradicionales para producir emulsiones. Una vez formado, el aceite que contiene partículas HIII ha perdido la mayoría de sus propiedades emulsionantes.

Con los principios de la presente invención, el proceso de dilución con etanol-agua/evaporación con etanol, los  
40 inventores pueden evitar la formación de partículas de HIII en aceites que contienen galactolípidos. Con estos métodos se utiliza todo el potencial de los lípidos, véase el Ejemplo 9. También se pueden añadir lípidos no polares de otro origen al aceite antes de comenzar los procesos de dilución y evaporación.

Esto dará como resultado emulsiones con partículas más pequeñas, una distribución del tamaño de partícula más  
45 uniforme, y una calidad más reproducible del producto en comparación con los métodos de emulsión tradicionales.

### 7. APLICACIONES DE LA INVENCION

Los inventores se centrarán aquí en determinadas aplicaciones de las dispersiones de vesículas unilaminares. En  
50 aplicaciones de liberación de aditivos lipófilos para uso en alimentos, fármacos o cosméticos, el componente real o mezcla de componente en el caso más simple se añade a la solución madre T2 o T7 antes de que se formen las vesículas mediante el proceso de dilución, de tal manera que los componentes reales queden integrados en la bicapa. No se permite que las diferentes sustancias que se incorporan a las vesículas alteren el comportamiento de la fase lipídica, y esto se puede analizar mediante un estudio de equilibrio de fases. Un método más rápido es usar  
55 la estrategia detalla en los Ejemplos 2-4. Se pueden añadir también aditivos a la dispersión final si se solubilizan espontáneamente en la bicapa lipídica de las vesículas.

Los aditivos hidrófilos pueden solubilizarse, algunas veces, en el núcleo acuoso de las partículas si se añaden como  
60 una solución en la fase acuosa que se usa en dilución de la solución madre T2 o T7 en una dispersión de tipo T3. Las moléculas solubilizadas penetrarán a continuación en los compartimentos acuosos de las partículas, siempre que las moléculas sean suficientemente pequeñas. El exceso de aditivo que permanece en la fase acuosa continua externa puede a continuación eliminarse mediante diálisis.

Los diferentes modos de incorporar, encapsular o solubilizar aditivos para aplicaciones, principalmente en alimentos  
65 y productos farmacéuticos se ilustrarán mediante los ejemplos siguientes que se seleccionan con el fin de ilustrar esto.

Las aplicaciones de la presente invención se pueden usar en los siguientes campos:

#### 7.1. Regulación del apetito

5 Como se ha mencionado en la introducción, un método para la regulación del apetito se ha basado en sustancias farmacéuticamente activas y documentado en ensayos clínicos, implicando la inhibición de la actividad lipasa en el tracto gastrointestinal mediante partículas liposómicas. Este es ahora un tratamiento generalmente aceptado frente a la obesidad en la atención sanitaria. Las dispersiones de vesículas de acuerdo con la presente invención se asocian a la lipasa presente en el intestino. El tamaño pequeño de las vesículas y su larga vida en el sistema intestinal son características importantes. Esto abre una posibilidad de productos alimenticios con función mejorada en la regulación del apetito.

#### 7.2. Formulación de fármacos para la administración tópica o gastrointestinal

15 La incorporación del fármaco a las vesículas se describió en la introducción al párrafo 4 anterior. Las moléculas que son hidrófilas pueden añadirse a una dispersión preparada previamente y quedan integradas de forma espontánea. Las vesículas pueden incorporar moléculas hidrófilas mediante procesos de apertura/cierre transitorios, por ejemplo, mediante ultrasonificación y a continuación, el fármaco se distribuirá en el interior de las vesículas y en el exterior. Mediante diálisis pueden eliminarse a continuación las moléculas de fármaco externas.

20 Las moléculas activas hidrófobas se disuelven preferentemente junto con el material de partida de lípidos en el etanol utilizado en el proceso de precipitación con agua/evaporación con etanol. Se pueden añadir moléculas hidrófobas que son solubles en agua directamente a la formulación final donde las moléculas se repartirán entre las regiones acuosas y lipídicas.

25

#### 7.3. Un producto inmunomodulador gastrointestinal

Los galactolípidos de rosa mosqueta han mostrado proporcionar un efecto inmunomodulador y se usan para aliviar el dolor en las dolencias con inflamación de las articulaciones (R. Christensen, E. Bartels, R. Altman, A. Astrup, Bliddal, H. Osteoarthritis and Cartilage 16 (2008) 965 - 972.) Parece probable que los galactolípidos de los lípidos de la avena tendrán efectos similares y tienen aplicación en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como artritis reumatoide y esclerosis múltiple. Una ventaja concreta debería ser el tamaño y la forma de las partículas, ya que son un factor significativo en el reconocimiento por el sistema inmunitario. Aproximadamente la mitad del sistema inmunitario de los seres humanos se localiza en la región gastrointestinal. Los inventores consideran el tamaño pequeño de sus vesículas unilaminares (en T3) como particularmente interesante para contribuir a la protección inmunológica conseguida por las partículas y las bacterias en el ambiente del colon.

Los efectos en la inflamación de las articulaciones en la artritis reumatoide se han vinculado a la presencia de digalactodiglicéridos en las formulaciones de rosa mosqueta anteriores (Christensen ref rad 12). Dado que las partículas de los inventores tienen un alto contenido del mismo lípido, debería esperarse que las dispersiones de los inventores ricas en DGDG tengan efectos similares. Además, ha habido informes anecdóticos de pacientes indicando efectos de las dispersiones de lípidos de avena de los inventores sobre la esclerosis múltiple.

#### 7.4 Encapsulación de componentes alimenticios en las partículas lipídicas para una biodisponibilidad aumentada

45 Como se ha mencionado anteriormente, se espera que nutrientes con baja biodisponibilidad que se incorporan en las partículas dispersas de acuerdo con esta invención tengan mejor biodisponibilidad debido a una partición en los agregados lipídicos que se absorben en el tracto GI.

50 Además, determinados componentes alimenticios lipófilos con tendencia a oxidarse durante el almacenamiento en productos alimenticios se protegen cuando se incorporan en la región lipídica de las fases cristalinas líquidas. Licopeno, luteína y coenzima Q10 (ubiquinona) son ejemplos donde una incorporación en vesículas unilaminares o vesículas de la presente invención pueden proporcionar posibilidades para fabricar producto con biodisponibilidad aumentada. El compuesto hidrófilo puede incorporarse a los compartimentos acuosos de las partículas lipídicas de la misma forma que se describe en el caso de los fármacos anteriores. Otro ejemplo de un compuesto donde la biodisponibilidad es muy baja es la curcumina.

## 8 Ejemplos

### 60 Preparación de un gel

El Ejemplo 1 ilustra cómo la técnica anterior se aplica a lípidos que contienen galactolípidos.

#### **Ejemplo 1. Preparación de un gel acuoso de tipo HII.**

65 Cuando la franquicia T2 se diluye directamente con un exceso de agua hasta que la concentración de etanol y la

concentración de lípidos solo es un pequeño % en peso, véase la Figura 5, la fase cristalina líquida HII se forma mediante lo que se puede identificar sin duda alguna como su textura birrefringente. Finalmente, la fase HII deberá transformarse en una fase L-alfa pero esta transición es extremadamente lenta, como se ha mencionado anteriormente. Una vez formada, es imposible dispersar este gel de fase HII. El gel flota en la parte superior del disolvente. En algunos casos, el gel puede ser tan duro que es posible coger el gel con unas pinzas como una sola pieza separándolo del disolvente.

#### Preparación de las dispersiones de lípidos

10 Para obtener una dispersión coloidal de vesículas unilaminares, se desarrolló y se utilizó el siguiente proceso de dilución, véanse los Ejemplos 2, 3 y 4 siguientes.

#### **Ejemplo 2. Método para encontrar la polaridad crítica**

15 Los inventores partieron de 5 tubos de vidrio de 5 ml, lleno cada uno con 1 ml de PL0126, un aceite de avena fraccionado de tipo T2. La composición de PL0126 era: 65 % en lípidos de lípidos polares; 25 % en peso de disolvente y la concentración de etanol en esta fase disolvente era un 55 % en volumen. Esto se ilustra como PL0126 en la Figura 6.

20 Pequeñas cantidades de cinco mezclas de etanol/agua diferentes se añadieron en porciones hasta totalizar 4 ml en cada tubo. Después de la adición de cada disolvente, los tubos se sacudieron a mano durante cinco segundos y a continuación se mezclaron durante diez segundos usando un mezclador de vortización para tubos, y se extrajo una gotícula para su observación al microscopio, y se observó su viscosidad y su comportamiento de fases.

25 La concentración de etanol en las mezclas disolventes fue 60, 55, 50, 45 y 40 % en volumen, respectivamente. Estas soluciones de etanol se denotan como E60, E55, E50, E45 y E40, respectivamente, en el resto del presente documento. Las composiciones de estos cinco tubos se calcularon, y los resultados se ilustran como PL0126+E60, PL0126+E55, PL0126+E50, PL0126+E45 y PL+E40, respectivamente, en la Figura 6. Como se ha mencionado en el texto para estas figuras, todos los datos de agua y todos los datos de etanol se consideran como la composición promedio de la mezcla total. Cuando, a determinadas composiciones, existe un hueco de inmiscibilidad entre el agua y el etanol, o no, esto no se tiene en cuenta. Los inventores han considerado esto como una simplificación útil y práctica para describir el sistema. Después de la dilución, el contenido de sólidos secos se convirtió en aproximadamente un 15 % en peso.

35 Todos los experimentos de este ejemplo se realizaron a temperatura ambiente.

Tras evaluación de la viscosidad y del comportamiento de fase en estos experimentos, los inventores pudieron construir las líneas "Muy viscoso", "Dispersión" y "Aceite" en la Figura 7.

40 Al evaluar estos experimentos, es importante observar que la velocidad de formación de partículas es mucho más alta que la velocidad de mezclado del aceite y el disolvente. Esto significa que localmente, en la interfase entre el aceite y el disolvente, la concentración del líquido está cercana al disolvente añadido. Esta situación es muy importante cuando la viscosidad es elevada en el sistema.

45 Cuando la concentración de etanol en la fase disolvente era un 55 % en volumen o superior, se produjo una fase oleosa y una fase disolvente. Si se deja que la muestra repose durante diez minutos o más, la fase oleosa se observó en el fondo del tubo. Al cabo de una hora o más, se pudo observar una precipitación de color blanco de una emulsión de aceite por encima de esta fase oleosa. La fase disolvente por encima de esta precipitación era, entonces, opaca. Después de largo tiempo, esta fase disolvente se volvió transparente y cristalina en la mayoría de los casos. El intervalo en el que se produjo este comportamiento de fase estaba bajo "Aceite" y hacia la derecha de la línea "Dispersión" de la Figura 7.

50 Cuando la concentración de etanol en la fase disolvente estaba en el intervalo comprendido entre 50 y 55 % en volumen, se produjo una dispersión de disolvente en aceite. La dispersión era de baja viscosidad. La fase oleosa era la fase continua. Se produjeron muchos liposomas en las gotículas de disolvente. En algunos casos, los liposomas eran muy grandes, hasta 40  $\mu\text{m}$ , véase la Figura 4. Basándose en otros experimentos, los inventores saben que la composición del aceite en esta parte de "aceite en disolvente" de la dispersión es diferente en comparación con T2. La composición de este aceite está cercana a la de T7, es decir, menos cantidad de estóridos y menos cantidad de triglicéridos comparado con T2, véase la Tabla 1 y el documento WO 2010104444

60 Tras dilución con E45, el aceite era una fase continua en E55, pero parcialmente disgregada en E50 con gotículas en el intervalo de 1 a 100  $\mu\text{m}$ , véase la Figura 6, 7 y 3. El intervalo en el que se produjo este comportamiento de fase estaba a la izquierda de la línea "Dispersión" y a la derecha de la línea "Muy viscoso" de la Figura 7.

65 A una dilución adicional con E45 y concentración de etanol en la fase disolvente por debajo de E50, la fase disolvente se convirtió en la fase continua y se produjo una dispersión de aceite en disolvente. Muy rápidamente,

esta dispersión se volvió muy viscosa. Muy rápidamente, la fase disolvente quedó llena con partículas muy pequeñas, la mayoría menores de 1  $\mu\text{m}$ , el límite de resolución del microscopio óptico. El máximo de la viscosidad y velocidad de formación de partículas pequeñas se produjo cuando se añadieron 4 partes de E45. En este caso, la dispersión se convirtió en tan espesa después de cinco sacudidas del tubo con la mano, que los inventores pudieron poner el tubo del revés sin que el contenido saliera del tubo, véase la Figura 7.

Con 4 partes de E50, la mezcla siguió siendo de baja viscosidad. Con 4 partes de E40, la mezcla se volvió espesa, pero tardó 10 minutos en convertirse en lo suficientemente viscosa como para poder poner el tubo del revés. En este caso, los inventores pudieron detectar al microscopio algunas partículas mayores de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Por tanto, a concentraciones de etanol en la fase disolvente por debajo del 50 % en volumen, se forma una dispersión muy viscosa. Este intervalo está hacia la izquierda de la línea denominada "Muy viscoso" en la Figura 7.

Basándose en estos experimentos, los inventores puede determinar la polaridad crítica para este aceite como comprendida entre E50 y E45. Los motivos para esto son:

- a E50, la mezcla era poco viscosa y a E45 la mezcla se volvió muy viscosa. Por tanto, la viscosidad comienza a aumentar rápidamente a una polaridad mayor de E50 pero a menor polaridad de E45.
- Muchos liposomas de gran tamaño, 1-100  $\mu\text{m}$ , aparecieron en las mezclas entre E55 y E50, a E45, todas las partículas eran menores de 1  $\mu\text{m}$ . Por tanto, el tamaño del liposoma comienza a disminuir rápidamente a una polaridad mayor de E50 pero a una polaridad menor de E45.
- Muchas partículas de gran tamaño, 1-100  $\mu\text{m}$ , aparecieron en las mezclas entre E55 y E50, a E45, todas las partículas eran menores de 1  $\mu\text{m}$ . Por tanto, el tamaño de partícula comienza a disminuir rápidamente a una polaridad mayor de E50 pero a una polaridad menor de E45.

La polaridad crítica se representa gráficamente en la Figura 7.

Usando los principios descritos en este ejemplo, se puede determinar la polaridad crítica de cualquier aceite.

### **Ejemplo 3. Ilustración del comportamiento de fases a una concentración de sólidos secos por debajo del 12 % en peso y a una concentración de etanol en el intervalo de 40-55 % en volumen**

Una solución madre de tipo T2, PL0126, se diluyó con 9, 19 y 39 partes de E55, respectivamente. A su vez, estas muestras se diluyeron con agua pura, véase la Figura 8. Las concentraciones se calcularon como en el Ejemplo 2. La viscosidad y del comportamiento de fases se observaron visualmente y al microscopio óptico.

Cuando la concentración de etanol en el disolvente es superior al 50 % en volumen y el sólido seco estaba por debajo del 8 % en peso, el "Disolvente libre", "Aceite" y "Dispersión" se pudieron observar de la misma forma que anteriormente.

La diferencia era que la frontera de "Dispersión" se había desplazado ligeramente hacia concentraciones más bajas de etanol cuando el contenido de sólidos secos se redujo, véase la Figura 9.

### **Ejemplo 4. Producción de T3 - Un método para encontrar las condiciones adecuadas para añadir agua a la dispersión y un método para eliminar el etanol de la dispersión**

Las soluciones madre se habían diluido con soluciones de etanol-agua diferentes, seguido por la adición de agua y la evaporación del etanol de un evaporador rotatorio de laboratorio. Las composiciones de las mezclas se calcularon de la misma forma que en el Ejemplo 2. El tamaño de partícula se investigó mediante el microscopio de luz polarizada y dichas muestras se tomaron en diferentes etapas del proceso.

Cuando la evaporación se lleva a cabo en un evaporador rotatorio de laboratorio, el sólido seco se puede aumentar hasta aproximadamente un 10 % en peso y la dispersión sigue teniendo baja viscosidad en todo el tiempo. Cuando el contenido de sólidos secos superan aproximadamente un 10 % en peso, la dispersión se vuelve muy viscosa. Las líneas de proceso para los tres ejemplos se ilustran en las Figuras 10-12. La frontera entre la región muy viscosa y la región poco viscosa se puede extender hasta cero en etanol, véanse las Figuras 10-12.

#### *Figura 10 T2+ 27E50*

Una parte, 10 ml, de una solución madre de tipo T2, PL0126, Se diluyó por etapas con 27 partes de E50. La dispersión se agitó con la mano en un frasco de evaporación de 1 l de capacidad. La composición siguió la región de baja viscosidad y alcanzó la región de "Aceite" y "Disolvente". La muestra se evaporó de un evaporador rotatorio de laboratorio, véase la Figura 10.

Tras completar la dilución con E50, el producto contenía muchas partículas muy pequeñas, menores de 1000 nm, pero también algunas partículas más grandes, Aproximadamente un 5 % de las partículas eran mayores de 1000 nm. En esta etapa no fue posible observar ninguna cruz de Malta en el producto. Con los métodos utilizados, no fue

posible detectar que se hubiera producido algún cambio en la distribución de tamaño de partículas durante el proceso de evaporación.

5 La dilución se llevó a cabo a una polaridad de la primera mezcla de etanol-agua ligeramente inferior a la polaridad crítica. En este caso no se usó segundo disolvente o bien, los inventores pueden decir que el segundo solvente era el mismo que el primer disolvente. El producto final después de este procedimiento se denomina T3.

10 Las muestras producidas de acuerdo con esta línea de proceso se analizaron usando análisis de dispersión de sincrotrón de rayos X de ángulo pequeño. El tamaño de partículas promedio fue mayor de 100 nm.

Figura 11 T2+ 9E45

15 Una parte, 10 ml, de una solución madre de tipo T2, PL0126, Se diluyó por etapas con 9 partes de E45. La dispersión se agitó con la mano en un frasco de evaporación de 1 l de capacidad. La composición entró y pasó por la región de alta viscosidad y alcanzó la región de dispersión de baja viscosidad al final de la dilución. A continuación, se añadieron 4 partes de agua, y comenzó la evaporación. Cuando se evaporó 1 parte de disolvente, la dispersión se volvió bastante viscosa, y la evaporación se interrumpió. Se añadió una parte más de agua, y la evaporación se inició de nuevo. Cuando se evaporó otra parte del disolvente, la dispersión se volvió bastante viscosa, y la evaporación se interrumpió. Se añadió una parte más de agua, y la evaporación se inició de nuevo. Esta vez, la evaporación pudo continuar hasta que el etanol estuvo por debajo del 1 % en peso y la cantidad de sólido seco era aproximadamente un 10 % en peso, véase la Figura 11.

20 Tras completar la dilución con E45, el producto contenía muchas partículas muy pequeñas, menores de 1000 nm, pero también algunas partículas más grandes, Aproximadamente un 1 % de las partículas eran mayores de 1000 nm. En esta etapa no fue posible observar ninguna cruz de Malta en el producto. Con los métodos utilizados, no fue posible detectar que se hubiera producido algún cambio en la distribución de tamaño de partículas durante la dilución del producto con agua o durante el proceso de evaporación.

30 La dilución se llevó a cabo a una polaridad de la primera mezcla de etanol-agua ligeramente superior a la polaridad crítica. La cantidad de este disolvente fue tan alta que la viscosidad se redujo al final del procedimiento de dilución, véase la Figura 11. El segundo disolvente era agua. El producto final después de este procedimiento se denomina T3.

Figura 12 T2+ 4E45

35 Una parte, 10 ml, de una solución madre de tipo T2, PL0126, Se diluyó por etapas con 4 partes de E45. La dispersión se agitó con la mano en un frasco de evaporación de 1 l de capacidad. La composición entró y permaneció en la región de alta viscosidad. A continuación se añadieron 7 partes de agua y la viscosidad se redujo al final del procedimiento de dilución. A continuación se inició la evaporación. La evaporación continuó hasta que el etanol estuvo por debajo del 1 % en peso y la cantidad de sólido seco era aproximadamente un 10 % en peso, véase la Figura 12.

45 Tras completar la dilución con E45, el producto contenía muchas partículas muy pequeñas, menores de 100 nm. No se observaron partículas mayores de 1000 nm. En esta etapa no fue posible observar ninguna cruz de Malta en el producto. Con los métodos utilizados, no fue posible detectar que se hubiera producido algún cambio en la distribución de tamaño de partículas durante la dilución del producto con agua o durante el proceso de evaporación.

50 La dilución se llevó a cabo a una polaridad de la primera mezcla de etanol-agua ligeramente superior a la polaridad crítica. El segundo disolvente era agua. Véase la Figura 12. El producto final después de este procedimiento se denomina T3.

Las muestras producidas de acuerdo con esta línea de proceso se analizaron usando análisis de dispersión de sincrotrón de rayos X de ángulo pequeño. El tamaño de partícula promedio de las vesículas fue de 40-50 nm.

55 Los métodos del Ejemplo 2-4 se aplicaron a otros aceites

**Ejemplo 5. Producción de T4 - Preparación de una dispersión acuosa de vesículas unilaminares usando un aceite de tipo T7 como material de partida.**

60 Después de explorar la región de alta viscosidad de la dispersión, de forma análoga a la descripción de los Ejemplos 2, 3 y 4, los inventores utilizaron el siguiente procedimiento para un aceite de tipo T7 para producir una dispersión acuosa de vesículas muy pequeñas.

65 Una parte, 100 ml, de un aceite de tipo T7, PL13, se mezcló con 3,5 partes de E42. La dispersión se agitó con la mano en un frasco de evaporación durante aproximadamente 30 segundos. Se añadieron siete partes de agua. La dispersión se agitó con la mano durante aproximadamente 30 segundos más. El etanol se retiró de la dispersión por

evaporación en un evaporador de vacío. Este proceso se ilustra mediante la línea de proceso "PL13+3.5E42" de la Figura 13.

La dilución se llevó a cabo a una polaridad de la primera mezcla de etanol-agua superior a la polaridad crítica. El segundo disolvente era agua. Véase la Figura 13. El producto final después de este procedimiento se denomina T4.

El producto final tuvo un contenido de sólidos secos del 10 % en peso; el contenido de etanol estaba por debajo del 0,1 % en peso y todas las partículas resultantes estaban por debajo del límite de detección del microscopio óptico, aproximadamente 1000 nm,

El efecto del tamaño de partícula reducido y de la distribución de tamaño de partículas mejorada

**Ejemplo 6. Ensayos de estabilidad sobre las diferentes vesículas, tipo T3.**

Para simular in vitro las condiciones del estómago; los inventores mezclaron 2 ml de una muestra de T3 con 2 ml de ácido cítrico 1M en un tubo de vidrio. Esto proporciona un pH de aproximadamente 3. A continuación, los inventores observaron cómo se comportaba esta mezcla durante un periodo de tiempo prolongado a temperatura ambiente.

El tamaño de partícula promedio inicial se determinó mediante análisis de dispersión de sincrotrón de rayos X de ángulo pequeño.

Los inventores presentan los resultados de dos líneas de proceso. La primera muestra, T3-1, siguió la línea de proceso de la Figura 10 y la segunda muestra, T3-2, siguió la línea de proceso de la Figura 12. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

El tamaño de partícula resultó mucho más pequeño usando la línea de proceso de la Figura 12, 50 nm, comparada con el uso de la línea de proceso de la Figura 10, >100 nm. La muestra con las vesículas más grandes, T3-1, no era estable a pH 3. Por tanto, los inventores no esperan que estas vesículas sigan siendo estables cuando pasen por el estómago. La muestra con las vesículas más pequeñas, T3-2, fue estable durante 10 días a pH 3. Por tanto, los inventores esperan que estas pequeñas vesículas sigan siendo estables cuando pasen por el estómago.

Por tanto, al diluir un aceite que contiene lípidos polares usando una solución de etanol-agua con una polaridad cercana a la polaridad crítica, se pueden producir dispersiones con partículas muy pequeñas. Al entrar y permanecer en la región de alta viscosidad durante la dilución con la primera mezcla de etanol-agua, los inventores pueden reducir el tamaño de las vesículas, desde más de 100 nm a 50 nm. Esta diferencia mejora las propiedades funcionales de la dispersión en gran medida.

**Ejemplo 7 Efectos de las vesículas de aceite de avena sobre la sensación de saciedad**

Se llevó a cabo un estudio aleatorizado enmascarado de diseño cruzado sobre individuos sanos en el hospital de la universidad de Lund y supervisado por médicos y especialistas con experiencia clínica. En el estudio, 19 sujetos consumieron 35 g de lípidos durante el desayuno en la forma de una dispersión de lípidos de la avena, T3-2 como se describe en la presente invención, o en la forma de un yogur de control. Las muestras de sangre se analizaron para determinar el contenido de triacilglicéridos, colesterol HDL, LDL y total, glucosa y las hormonas gástricas PYY y GLP-1 antes y cuatro veces después de la comida. Generalmente, estas hormonas están aceptadas como marcadores de la sensación de saciedad. El análisis subjetivo de la sensación de saciedad se midió con un cuestionario VAS. Los participantes registraron su ingesta de alimentos antes y después del ensayo clínico.

La hormona de sensación de saciedad PYY estuvo significativamente elevada 5 y 7 horas después, y la glucosa era menor después de 5 horas con la dispersión de lípidos de la avena, en comparación con el control. Esto coincidió con una prolongada elevación de la concentración de TG en plasma. La sensación de saciedad subjetiva y la ingesta de alimento durante el resto del tiempo del día de la prueba no fueron significativamente diferentes entre los grupos.

De este estudio se puede concluir que la ingesta de la dispersión de lípidos de la avena induce una digestión intestinal prolongada, una salida de quilomicrones prolongada, acompañada de un aumento de PYY en individuos sanos. En conjunto, el perfil de lípidos y hormonas postprandiales tras la ingesta de esta dispersión de lípidos de la avena podría inducir la sensación de saciedad y reducir la sobrealimentación.

Otros productos conseguidos mediante dilución cercana a la polaridad crítica

**Ejemplo 8 Preparación de un aceite de avena exento de etanol y partículas HII.**

Un aceite de avena con una concentración de lípidos polares del 40 % en lípidos (HL17) se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio de laboratorio. El contenido de etanol era inferior al 0,1 % en peso en el producto final. La línea de proceso puede observarse en la Figura 14. El producto contenía muchas las partículas HII. Este producto tiene malas propiedades emulsionantes.

Cinco tubos de vidrio de 5 ml se llenaron cada uno con 1 ml de HL17. 2 ml de soluciones etanólicas de E40, E45, E50, E55 y E60 se añadieron a los diferentes tubos de vidrio. Los tubos se mezclaron a mano y durante un corto periodo de tiempo en un mezclador por vortización. E40, E45 y E50 se volvieron muy viscosos. El polaridad crítica resultó ser E51.

5 161 g de HL17 se mezclaron con 320 ml de E50 en un matraz de evaporación. El matraz se agitó a mano durante 1 min y se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio. El contenido de etanol era inferior al 0,1 % en el producto final. La línea de proceso puede observarse en la Figura 14. El producto no contenía ninguna partícula HII.

10 Mediante el uso del método de dilución con etanol-agua/evaporación, los inventores consiguieron evitar el intervalo donde se forman las partículas HII.  
El aceite producido de esta forma se denominó T9.  
Este aceite tiene muy buenas propiedades emulsionantes.

15 A un tubo de ensayo lleno hasta la mitad con agua destilada, se añadió cuidadosamente T9 sobre la superficie en una cantidad del 10 % (p/p) calculado respecto de la cantidad de agua. La película de aceite en flotación se dejó hinchar durante una hora en la zona de contacto con el agua hacia una forma de gota descendente en el agua, pero siguió siendo homogénea y transparente. A continuación, durante las siguientes 15 - 25 horas (relacionada la cinética con las cantidades y la geometría de la interfase) sin agitación ni aplicación de ninguna fuerza mecánica, se obtuvo una dispersión homogénea. Esto se puede considerar como un proceso de emulsificación espontánea impulsada por la reducción de la tensión interfacial.

**Ejemplo 9 Emulsión de aceite en agua preparada usando el proceso de dilución con etanol-agua/evaporación.**

25 Aceite de girasol y aceite de avena de tipo T2, PL090219, se mezclaron a dos concentraciones diferentes de lípidos polares, 10 y 2 % en lípidos. La polaridad crítica se determinó mezclando 1 ml de aceite y 1 ml de diferentes mezclas de etanol (E0, E35, E40, E45, E50, E55, E60), en tubos de vidrio de 5 ml y agitando los tubos a mano y en un mezclador de vortización. La viscosidad de las muestras se observó visualmente y mediante agitación. El tamaño de partícula se observó al microscopio con luz polarizada y contraste de fase.

30 El aceite con un 2 % en lípidos de lípidos polares proporcionó una emulsión de baja viscosidad. Las muestras mezcladas con E45 y E50 proporcionaron las partículas más pequeñas, 0,5-5 µm. Esto indica una polaridad crítica de E52. Sin embargo, la cantidad de lípidos polares parece ser insuficiente para dar una buena emulsión.

35 El aceite con 10 % en lípidos de lípidos polares, SFO10, proporcionó una emulsión muy viscosa a E35, E40 y E45. La muestras con E45 proporcionó las partículas más pequeñas, todas las partículas menores de 1 µm. Esto proporcionó una polaridad crítica de E47.

40 26 g de SFO10 se mezclaron con 52 ml de E45. Esta mezcla se agitó con la mano en un matraz de evaporación durante 1 min. Se añadieron 52 ml de agua y el matraz se agitó a mano durante 1 min. El etanol se evaporó hasta un contenido de sólidos secos del 42 % y la concentración de etanol a menos del 0,1 % en peso, véase la Figura 15. La emulsión parecía una mayonesa y todas las partículas tenían un diámetro inferior a 1 µm.

45 **Tabla 1. Composición de algunos aceites utilizados como soluciones madre**

Fracción		Composición							
		disolvente		Lípidos					
nombre	método de preparación	Disolvente etanol-agua, %		Sólidos secos, % en peso	NL <sup>1)</sup> % en lípidos	PL <sup>2)</sup> % en lípidos	Azúcar <sup>3)</sup> % en lípidos	Relación GL/PhL <sup>4)</sup>	Relación estóolidos/DGDG <sup>5)</sup>
T2 <sup>6)</sup>	Lípidos polares pesados <sup>6)</sup>	60	40	75	35	65	4	1,0	1,0
T7 <sup>6)</sup>	Bajo en estóolidos <sup>6)</sup>	60	40	75	15	85	9	1,0	0,3
HL17 <sup>7)</sup>	T16) + T26)	61	39	80	60	40	5	1,0	1,0
SFO10	SFO <sup>8)</sup> + T2 <sup>6)</sup>	55	45	96	90	10	0	1,0	1,0

- 1) NL Lípidos con funcionalidad no polar más del 90 % de triglicéridos  
 2) PL Lípidos con funcionalidad polar Galactolípidos y fosfolípidos  
 3) Azúcar más del 90 % de sacarosa  
 4) GL Galactolípidos DGDG más del 70 % de GL PhL Fosfolípidos PC + PE aproximadamente 50 % de PhL Esta relación es 1,0 en el aceite de avena en bruto  
 5) Estóridos DGDG con al menos un ácido graso que contiene un grupo OH esterificado DGDG di-galactosil-di-acil-glicérido Esta relación es 1,0 en el aceite de avena en bruto  
 6) Fracción de aceite de avena obtenida en procedimientos de fraccionamiento con etanol, agua y azúcar, descrita en el documento WO 2010104444  
 7) HL17 Fracción de aceite de avena de tipo T2  
 8) SFO Aceite de girasol

**Tabla 2. Propiedades de las vesículas de diferentes proceso**

Muestra		Propiedades			
nombre	proceso	tamaño de partículas <sup>1)</sup>	sólidos secos	estabilidad <sup>2)</sup>	
		promedio nm	% en peso	pH=3 veces	pH=7 veces
T3-1	27E50 + agua <sup>3)</sup>	>100	10	<1 min	>12 meses
T3-2	4E45 + agua <sup>4)</sup>	50	10	10 días	>12 meses

- 1) Determinado con análisis de dispersión de sincrotrón de rayos X de ángulo pequeño  
 2) tiempo antes de producirse cambios visibles  
 3) véase el proceso de la Figura 10  
 4) véase el proceso de la Figura 12

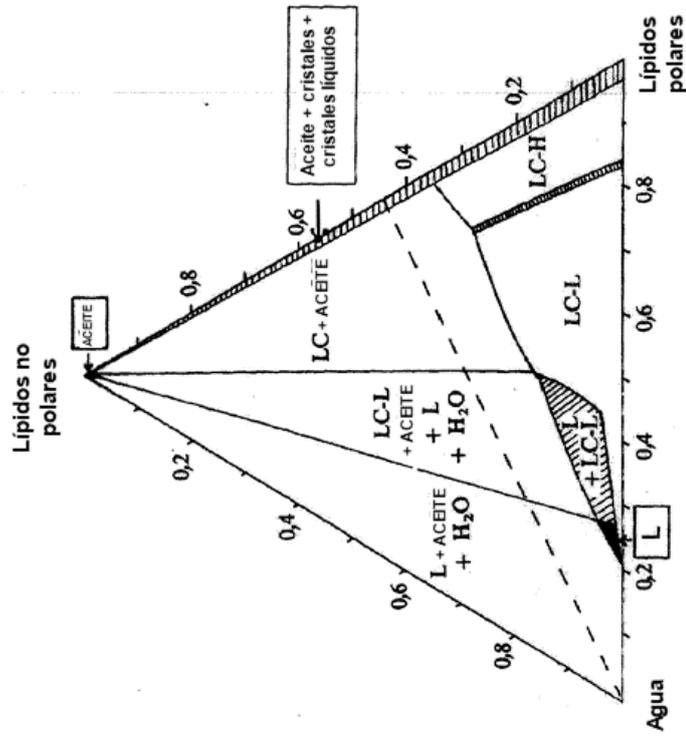
## REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una dispersión de lípidos polares en una mezcla de etanol-agua, comprendiendo dichos lípidos polares los galactolípidos, **caracterizado por** diluir un aceite que contiene lípidos polares que comprenden galactolípidos usando una primera mezcla de etanol-agua que tiene una concentración de etanol, calculada como % en volumen basado en la cantidad total de etanol y agua, que está en el intervalo del 15 % en unidades de volumen por debajo de la polaridad crítica de la mezcla de etanol-agua, con respecto a dicho aceite, al 15 % en unidades de volumen por encima de dicha polaridad crítica, en donde la polaridad crítica de dicha primera mezcla de etanol-agua está en el intervalo del 25-75 % en volumen de etanol en la mezcla de etanol-agua y en donde tras la dilución, dichos lípidos polares forman una fase cristalina líquida laminar, sin formar primero una fase HII hexagonal, en donde la polaridad crítica define la concentración de etanol y agua del sistema disolvente cuando una emulsión de disolvente en aceite se transforma en una emulsión de aceite en disolvente, y la polaridad crítica se detecta por la viscosidad o al microscopio.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha primera mezcla de etanol-agua tiene una concentración de etanol calculada como % en volumen basado en la cantidad total de etanol y agua, que está en el intervalo del 10 % en unidades de volumen y preferiblemente del 5 % en unidades de volumen por debajo de la polaridad crítica de la mezcla de etanol-agua, con respecto a dicho aceite, al 10 % en unidades de volumen y preferiblemente al 5 % en unidades de volumen por encima de dicha polaridad crítica.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** la polaridad crítica de dicha primera mezcla de etanol-agua puede estar en el intervalo del 30-70, preferiblemente del 35-65, más preferiblemente del 40-60 y lo más preferido en el intervalo del 45-55 % en volumen de etanol en la mezcla de agua-etanol.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado por que** la dilución de dicha dispersión se puede llevar a cabo con dicha primera mezcla de etanol-agua y/o una segunda mezcla de etanol-agua y/o con agua hasta que se obtiene una dispersión coloidal de dichos lípidos polares, en donde dichos lípidos polares forman partículas coloidales en la forma de liposomas, partículas cúbicas y/o gotículas de aceite revestidas de fase cristalina líquida laminar.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** la relación como % en volumen entre el etanol y el agua en la segunda mezcla de etanol-agua usada para diluir los lípidos polares que forman una fase cristalina líquida laminar en dicha primera mezcla de etanol-agua es diferente a la de dicha primera mezcla de etanol-agua, de tal forma que la segunda mezcla de etanol-agua contiene una proporción mayor de agua que la primera mezcla de disolvente polar.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** tras realizar la dilución de dicha dispersión que comprende dichos lípidos polares en una fase cristalina líquida laminar, se obtiene una dispersión coloidal de liposomas.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado por que** dicho aceite puede contener al menos un 25 % en peso de monoglicéridos de ácidos oleico y/o linoleico, calculado sobre la cantidad total de lípidos en dicho aceite, en donde, después de realizar la dilución de dicha dispersión que comprende dichos lípidos polares, se forma una dispersión coloidal de cubosomas.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** evaporar el etanol de la dispersión para proporcionar una dispersión acuosa que contiene menos del 10 % en peso, preferiblemente menos del 5 % en peso y más preferiblemente menos del 1 % en peso de etanol.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dichos lípidos polares también comprenden fosfolípidos.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado por que** dicho aceite contiene entre el 30-95, preferiblemente entre el 30-90 % de lípidos no polares y dicha dispersión contiene al menos un 30 % en peso, preferiblemente al menos un 40 % en peso y más preferiblemente al menos un 50 % en peso de lípidos totales, dando como resultado una emulsión de aceite en agua en la que los lípidos no polares forman gotículas que están revestidas por una fase cristalina líquida laminar de dichos lípidos polares.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado por** evaporar el etanol y el agua de dicha dispersión para proporcionar un aceite que contiene menos del 1 % en peso de etanol.
12. Una dispersión acuosa coloidal de lípidos polares, comprendiendo dichos lípidos polares galactolípidos, **caracterizada por que** dicha dispersión acuosa coloidal se puede obtener por el método de la reivindicación 1 seguido de la realización de la dilución de dicha dispersión que comprende lípidos polares en una fase cristalina líquida laminar, en donde dichos lípidos polares que comprenden galactolípidos forman liposomas que comprenden al menos un 50 % en lípidos de lípidos polares y al menos un 2 % en lípidos de lípidos no polares, en donde % en

lípidos se refiere al % en peso de lípidos polares y lípidos no polares, respectivamente, calculado sobre la cantidad total de lípidos.

- 5 13. La dispersión de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizada por que** los liposomas tienen un tamaño nanométrico con un diámetro promedio que es inferior a 100 nm y al menos el 80 % de los liposomas tienen un diámetro de menos de 200 nm.
- 10 14. Una dispersión acuosa coloidal de lípidos polares y lípidos no polares, en el que al menos un 25 % en peso son monoglicéridos de ácidos oleico y/o linoleico, tal como se calcula sobre la cantidad total de lípidos, comprendiendo dichos lípidos polares galactolípidos, **caracterizada por que** los lípidos polares que comprenden galactolípidos y los monoglicéridos forman cubosomas coloidales.
- 15 15. La dispersión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, **caracterizada por que** los lípidos polares también comprenden fosfolípidos.
- 20 16. La dispersión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, **caracterizada por que** los liposomas y/o los cubosomas contienen al menos un 60 % en lípidos, preferiblemente al menos un 75 % en lípidos de lípidos polares, siendo el resto lípidos no polares, en donde % en lípidos se refiere al % en peso de lípidos polares calculado sobre la cantidad total de lípidos.
- 25 17. La dispersión de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizada por que** los liposomas contienen al menos un 5 % en lípidos, preferiblemente al menos un 10 % en lípidos de lípidos no polares, siendo el resto de los lípidos, lípidos polares, en donde % en lípidos se refiere al % en peso de lípidos no polares calculado sobre la cantidad total de lípidos.
- 30 18. Una dispersión acuosa en forma de una emulsión de aceite en agua de lípidos polares que comprenden galactolípidos y lípidos no polares, **caracterizada por que** los lípidos no polares forman gotículas de aceite que están revestidas de una fase cristalina líquida laminar de dichos lípidos polares, en donde dichos lípidos polares que comprenden galactolípidos son de un tipo que formará una fase HII hexagonal tras la exposición directa al agua.
- 35 19. Un aceite que contiene lípidos polares que comprenden galactolípidos, **caracterizado por que** dicho aceite se puede obtener por el método de reivindicación 1, seguido de la evaporación del etanol y el agua de dicha dispersión para proporcionar un aceite que contiene menos del 1 % en peso de etanol y menos del 3 % en peso de azúcar, preferentemente menos del 2 % en peso de azúcar y más del 25 % en peso de lípidos polares, preferiblemente más del 30 % en peso de lípidos polares, y dicho aceite también está **caracterizado por** formar menos fase hexagonal que fase cristalina líquida laminar durante un proceso posterior de hinchamiento en agua que da como resultado una emulsificación espontánea.
- 40 20. Un aceite de acuerdo con la reivindicación 19, **caracterizado por que** dicho aceite se deriva de la avena.
- 45 21. Una dispersión acuosa coloidal y/o un aceite que se pueden obtener de acuerdo con el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12-20 para su uso en el tratamiento de la obesidad.
- 50 22. Una dispersión acuosa coloidal y/o un aceite para el uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que dicha dispersión y/o dicho aceite se derivan de la avena.
- 55 23. Una formulación farmacéutica que comprende una dispersión acuosa coloidal y/o un aceite que se pueden obtener de acuerdo con el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o definido en cualquiera de las reivindicaciones 12-20 opcionalmente en premezcla con un adyuvante, un diluyente o un vehículo farmacéuticamente aceptables, en donde la dispersión y/o el aceite actúan como un principio activo o como un vehículo para liberar un principio activo.
24. Un artículo que comprende una dispersión acuosa coloidal y/o un aceite que se pueden obtener de acuerdo con el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12-20, en donde dicho artículo se ha seleccionado entre el siguiente grupo de composiciones: una composición cosmética, una composición alimenticia, una composición un suplemento alimenticio y/o una composición de pienso para animales.

Figura 1



Fuente: Carlsson, Larsson, Mieziis 1978

Figura 2



Figura 3

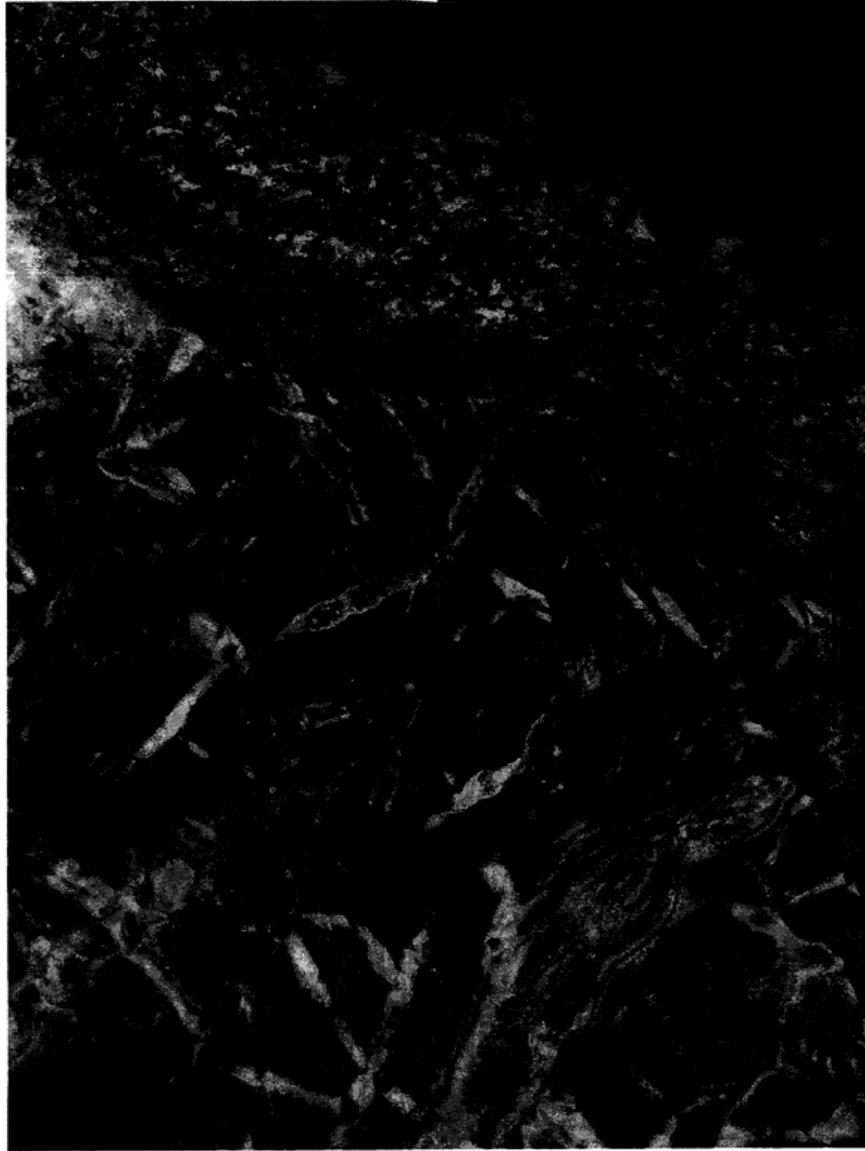


Figura 4

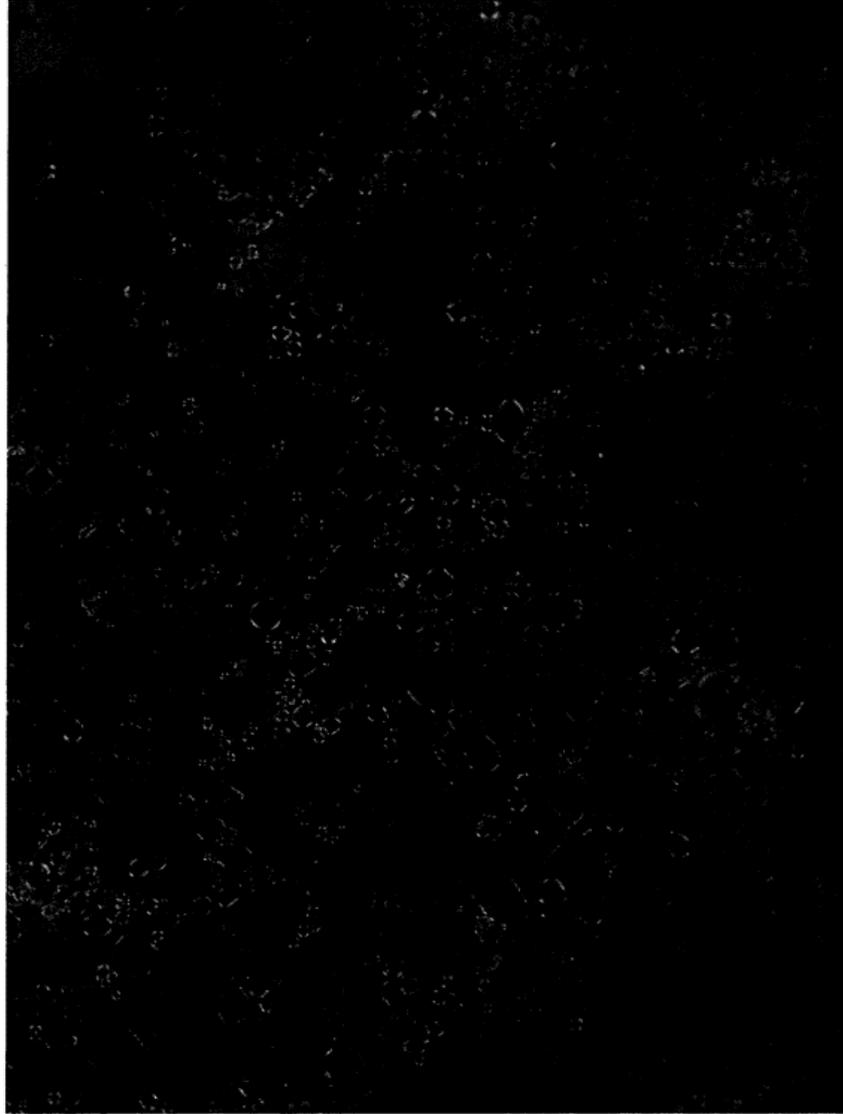


Figura 5

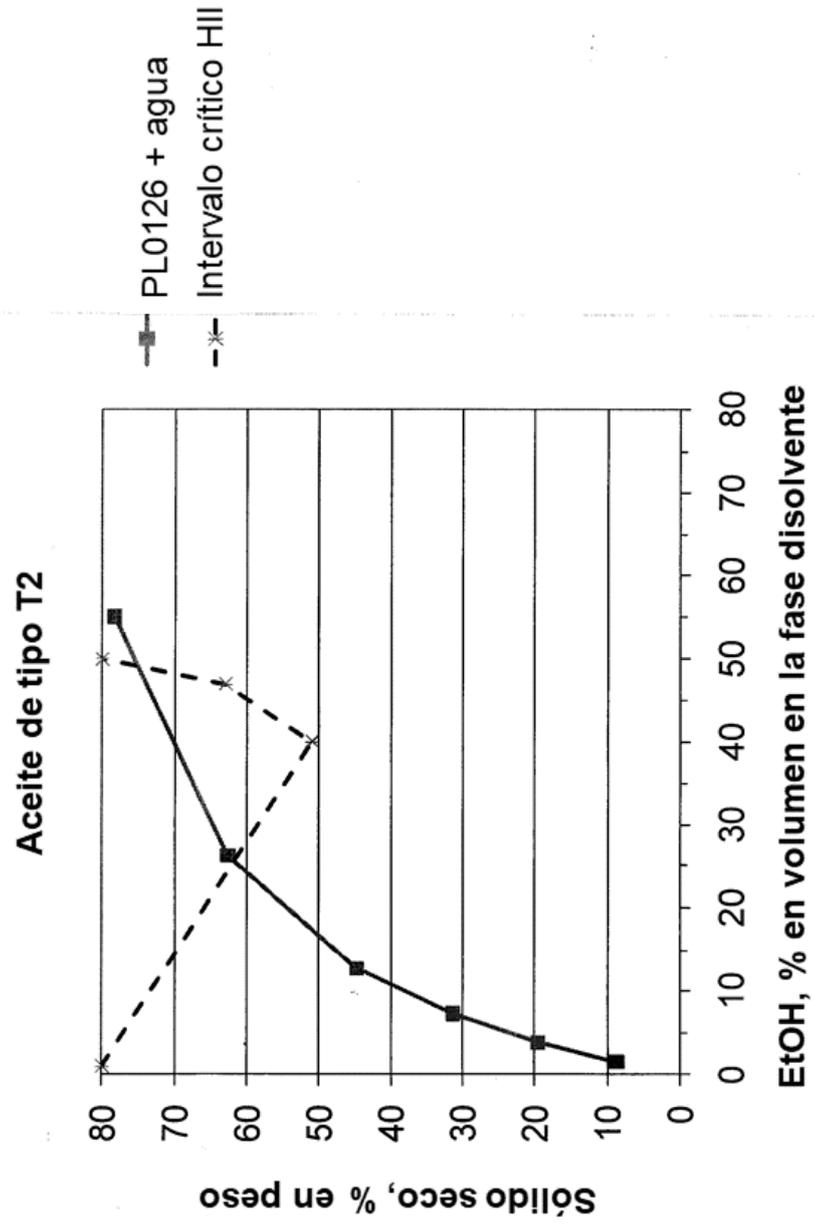


Figura 6

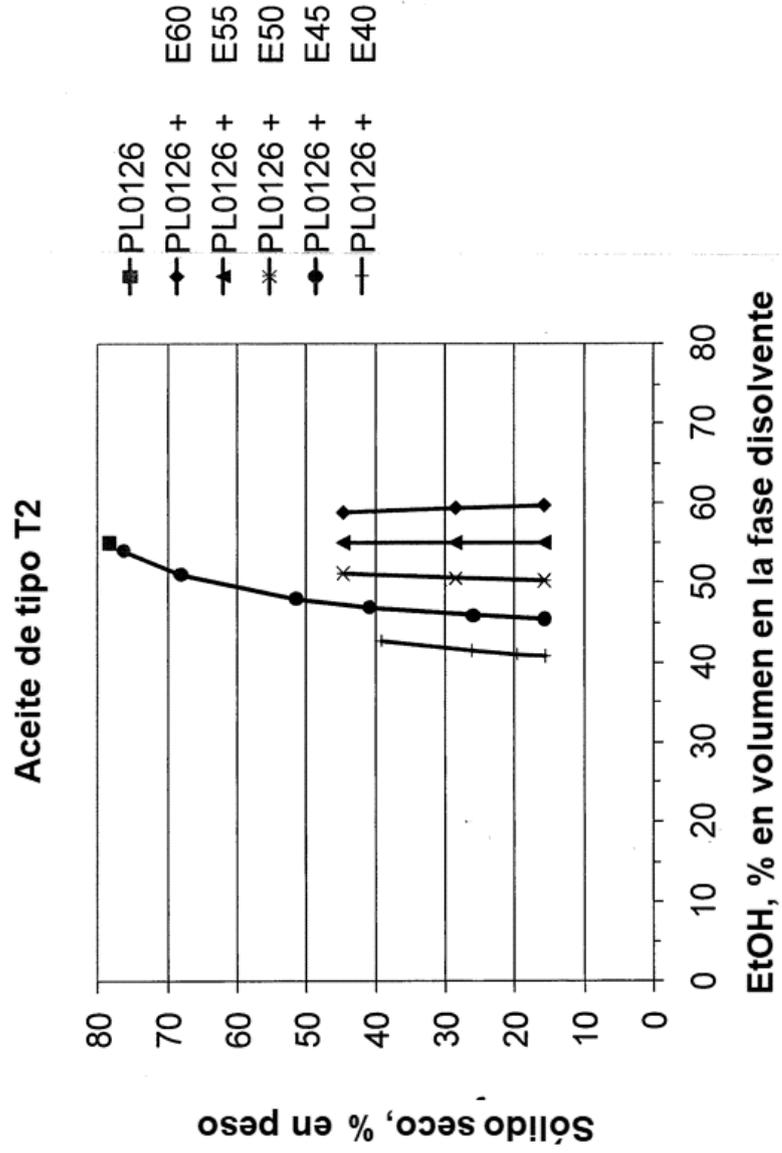


Figura 7

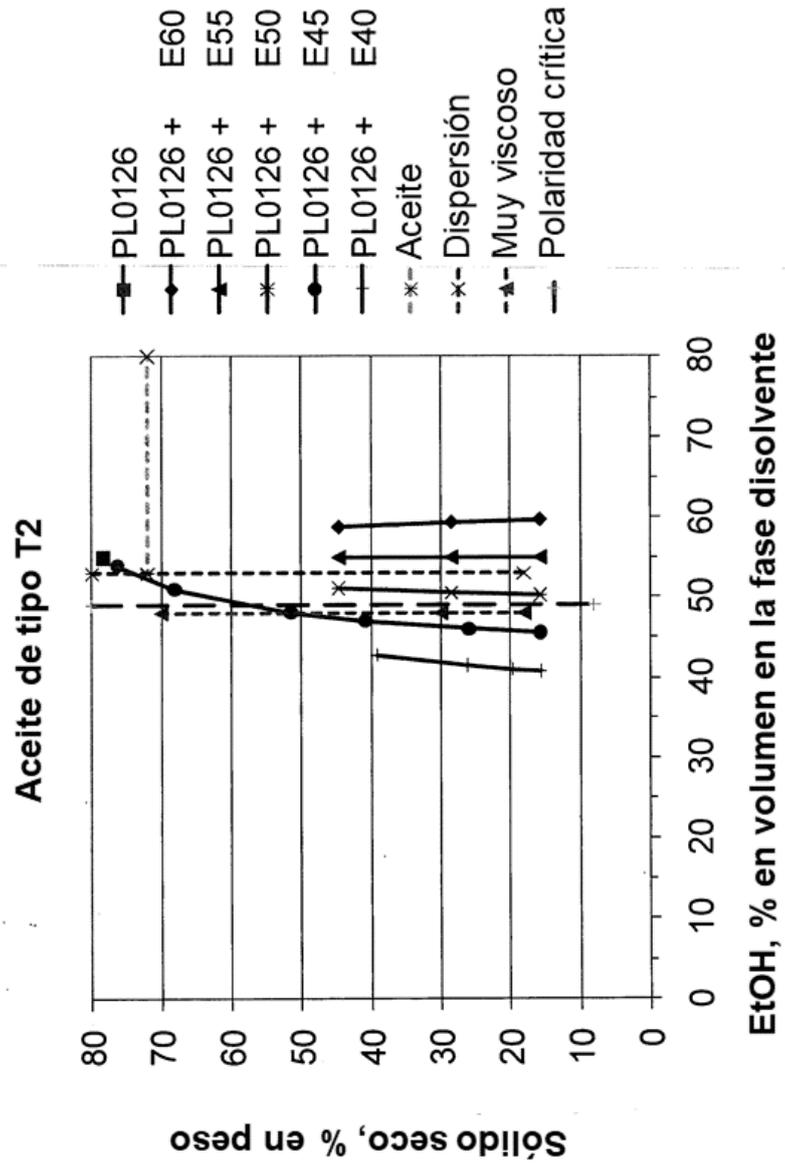


Figura 8

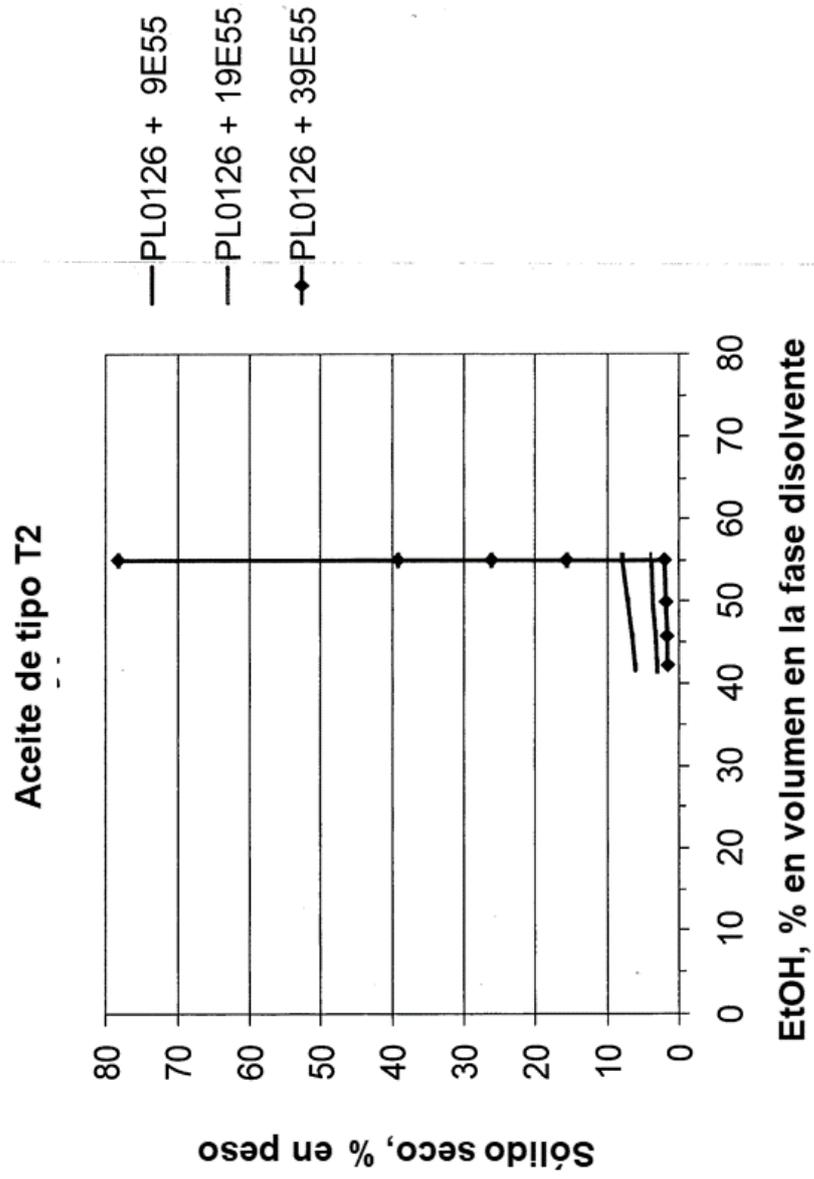


Figura 9

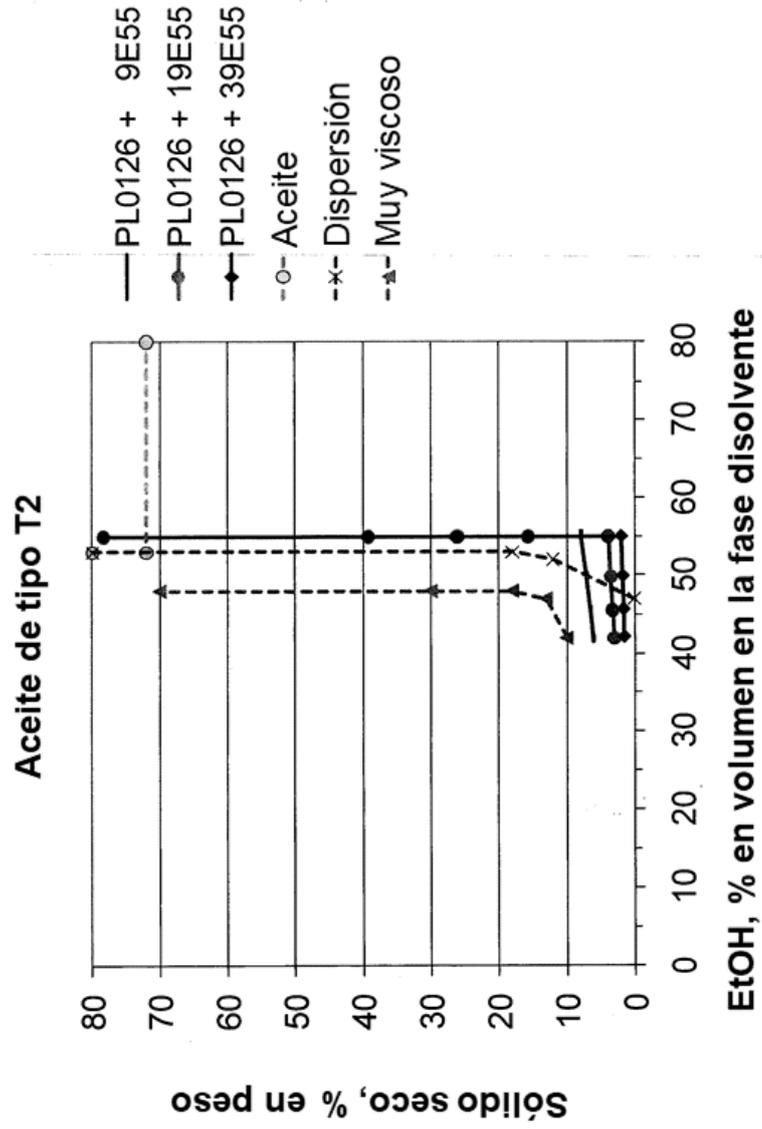


Figura 10

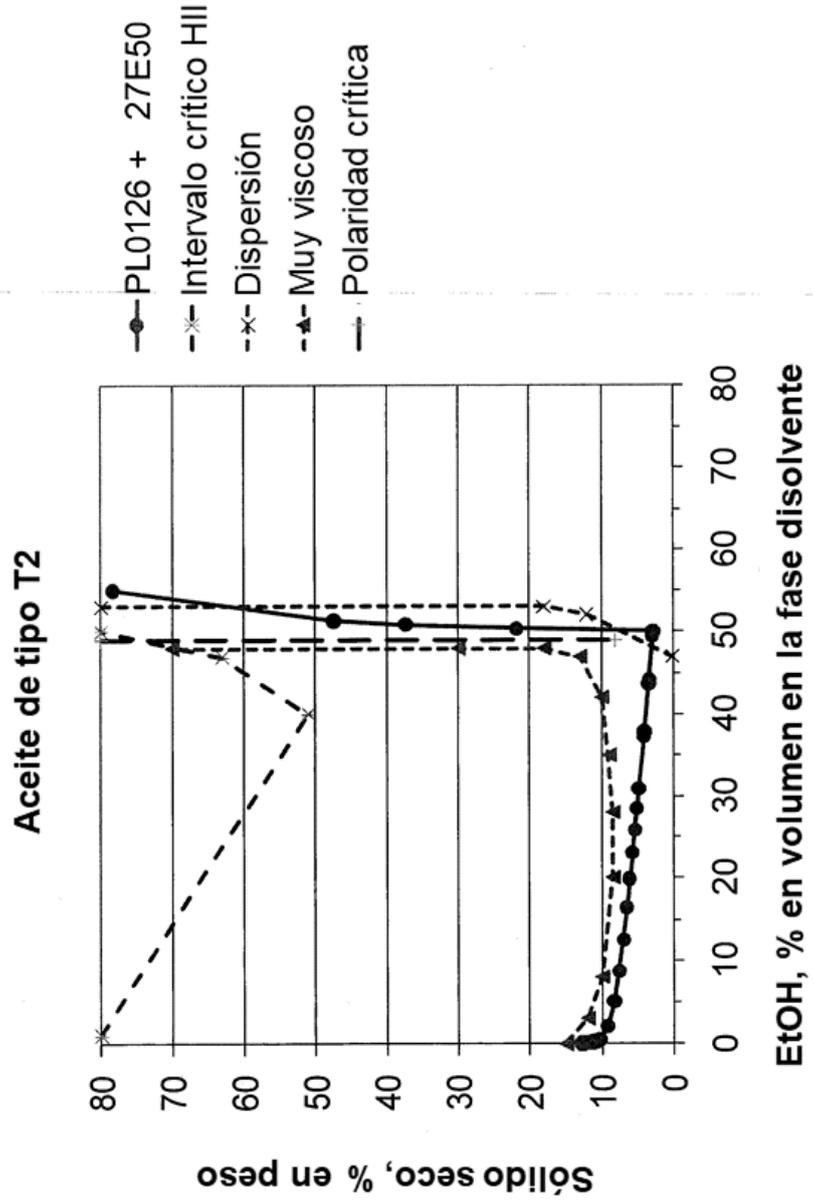


Figura 11

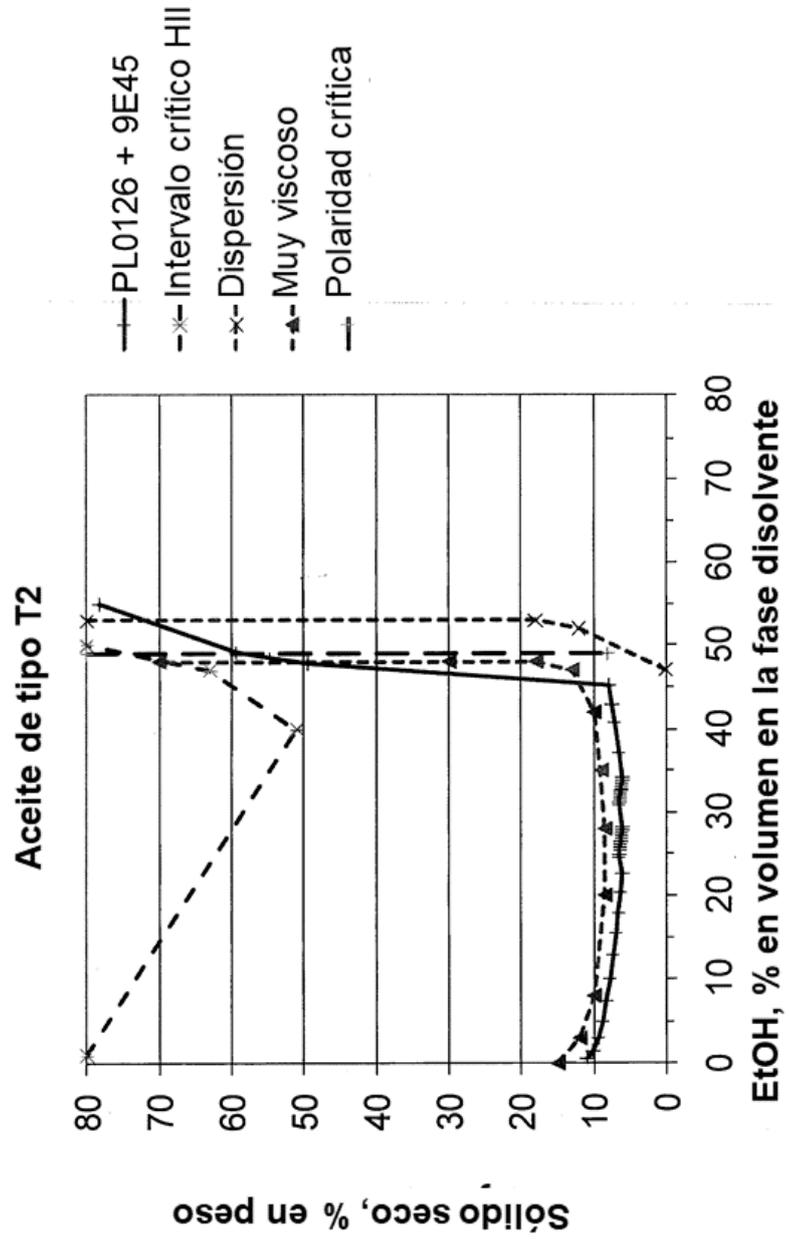


Figura 12

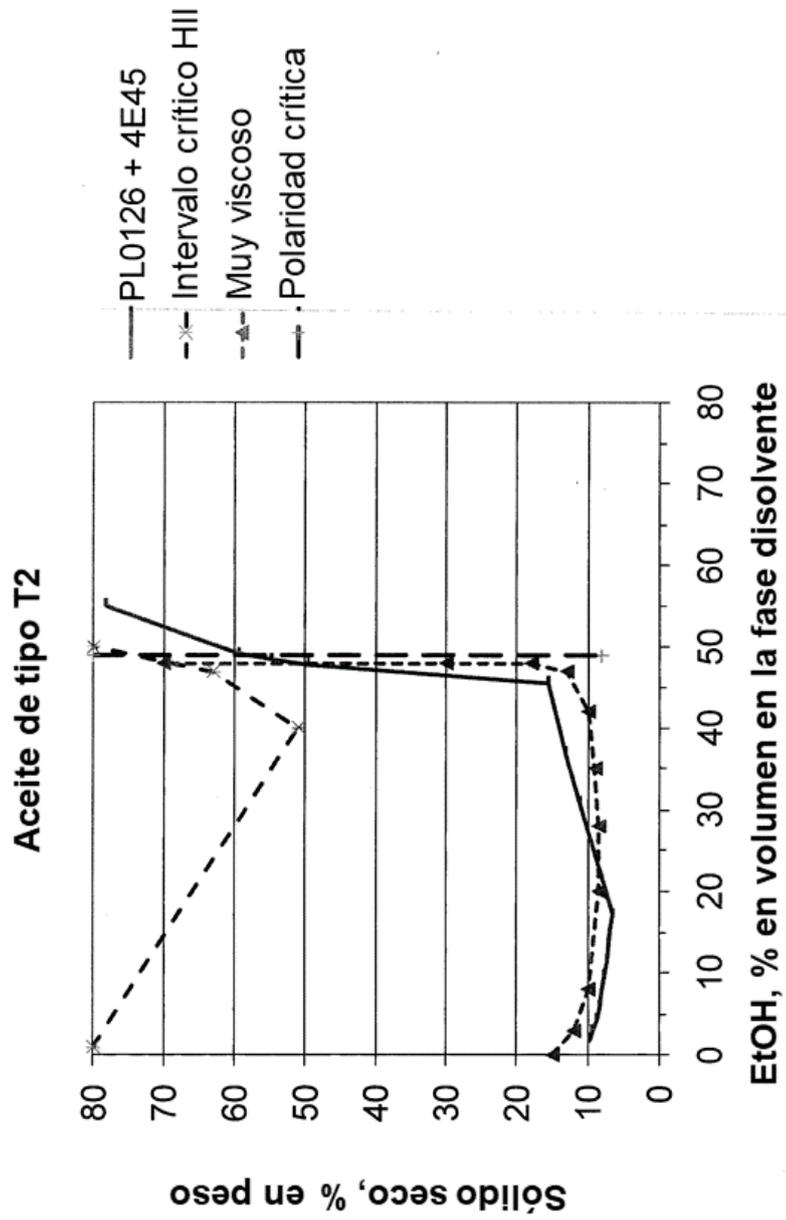


Figura 13

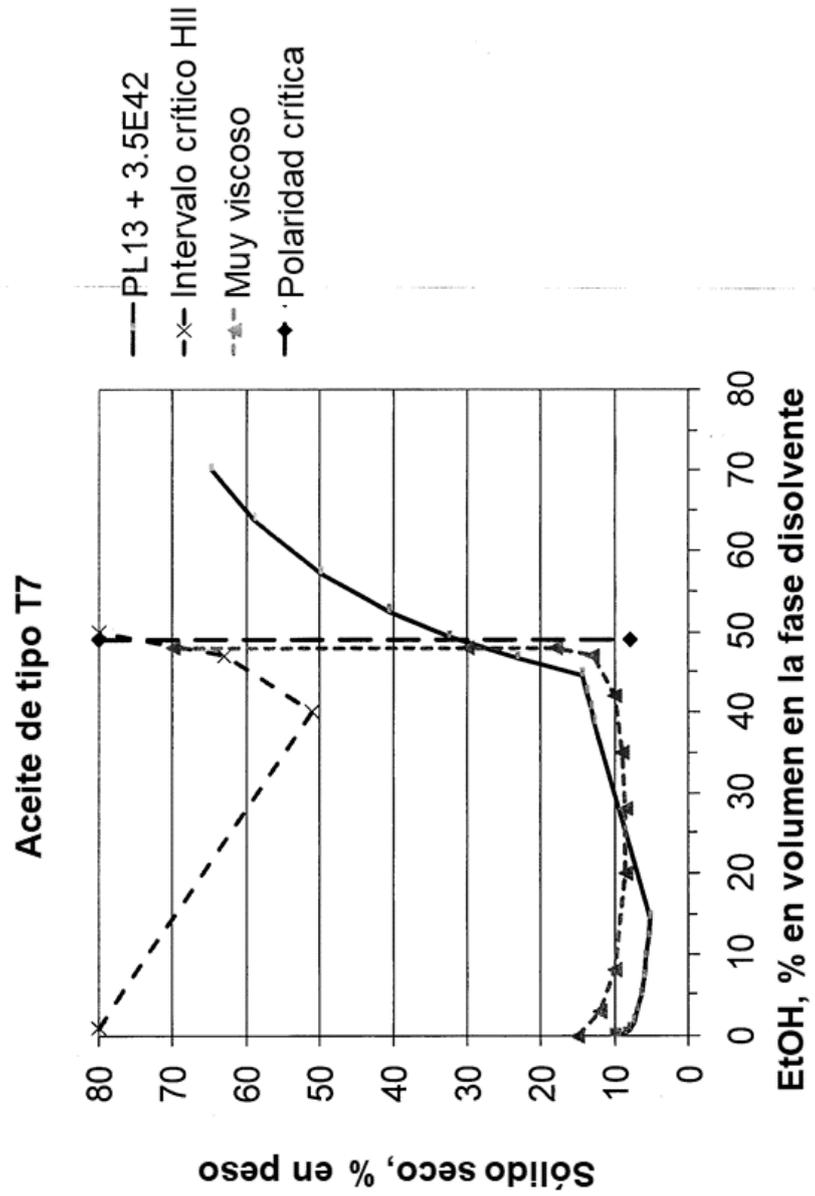


Figura 14

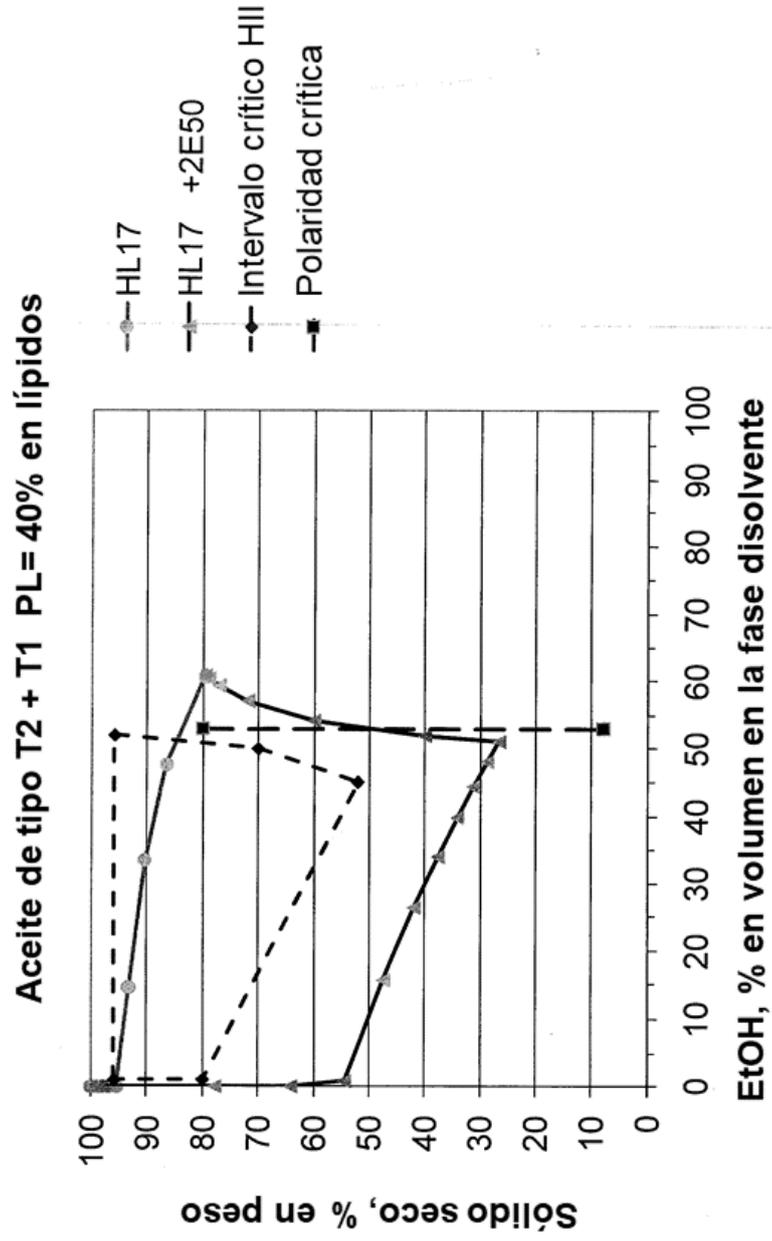


Figura 15

