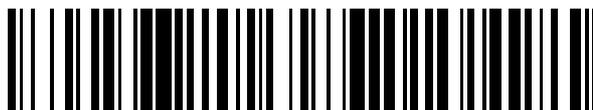


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 399**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2008 PCT/EP2008/053104**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2008 WO08110626**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08717845 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2117512**

54 Título: **Partículas micronizadas estabilizadas**

30 Prioridad:

15.03.2007 EP 07104248

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

30.05.2018

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**HEE, VAN, PIM;
MEESTERS, GABRIEL MARINUS HENRICUS;
WILDEBOER, WILLEM JOHANNES;
HENNART, STÉPHEN L. A. y
VIS, ALBERT-JON**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 670 399 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

Partículas micronizadas estabilizadas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la reducción del tamaño de partículas, en particular a un método para la reducción del tamaño de partículas de compuestos orgánicos.

10

Antecedentes de la invención

Se conocen varios métodos para la reducción del tamaño de partículas. Estos métodos implican la reducción del tamaño de polvos secos y partículas suspendidas en un líquido. En la mayoría de los casos, esta última categoría emplea estabilizantes para prevenir la agregación de las partículas suspendidas. Los estabilizantes están constituidos por surfactantes, espesantes, p. ej. hidrocoloides, y/u otros agentes que ejercen un efecto sobre la interacción entre las partículas y el movimiento de las partículas en la fase líquida/fluida. Cuando las partículas son suficientemente grandes, se puede producir la sedimentación de las partículas suspendidas en el líquido. Con el fin de evitar este fenómeno, se incrementa la viscosidad de la fase líquida mediante la adición de estabilizantes tales como espesantes, p. ej., hidrocoloides y otros polímeros solubles.

15

20

A pesar de ello, se puede dar el caso de que la adición de espesantes no evite totalmente la sedimentación de partículas grandes. Por lo tanto, las partículas acabarán formando un sedimento. Esto supone una desventaja importante para la aplicación de las suspensiones de partículas debido a que 1) a menudo el sedimento no se puede volver a suspender tan fácilmente y 2) las partículas no se encuentran distribuidas homogéneamente en la suspensión.

25

La sedimentación no se producirá en absoluto cuando las partículas sean muy pequeñas. Por lo tanto, resulta favorable reducir el tamaño de las partículas. A pesar de ello, las partículas pequeñas pueden formar agregados fácilmente que sedimentarán cuando los agregados sean lo suficientemente grandes. Por lo tanto, se debe evitar la agregación de las partículas en estos sistemas. Una estrategia consiste en formular la suspensión inmediatamente después de la molienda. Sin embargo, esto no es posible en todas las aplicaciones. Otra estrategia consiste en utilizar aditivos tales como estabilizantes.

30

El documento WO 98/35666 describe cómo el naproxeno obtenido del proveedor en forma de polvo se convierte en forma de nanopartículas mediante técnicas de molienda en presencia de un modificador de la superficie.

35

El documento WO 91/06292 describe un proceso para preparar un sólido hidrófobo/aerófilo que se puede dispersar en agua en forma de micropartículas discretas, donde el sólido se muele en un medio acuoso en presencia de un hidrocoloide para obtener una suspensión de micropartículas.

40

El documento US 2 876 160 describe cómo la estabilidad física de un material insoluble en agua se protege embebiendo el material en almidón modificado químicamente.

45

En el documento US 4 006 025, un tinte de sensibilización espectral sustancialmente insoluble en agua se dispersa en agua y a continuación se muele, o preferentemente se homogeneiza, a una temperatura elevada en presencia de un surfactante.

50

El documento US 5 858 410 describe un método para preparar nanosuspensiones mediante cavitación o cizallamiento y fuerzas de impacto en presencia de surfactantes o espesantes.

El documento WO 2007/014566 describe suspensiones que comprenden partículas cristalinas de Coenzima Q10 dispersadas en una solución acuosa de un material de tipo matriz tal como polisacáridos de origen natural o modificados, hidrocoloides de origen natural, almidón derivado de una fuente natural o almidón modificado.

55

El documento EP 0807431 describe un proceso para la elaboración de composiciones de carotenoides que comprenden un surfactante.

El documento GB 1 148 801 describe composiciones de nistatina estabilizadas que comprenden sílice coloidal.

60

Yokoyama T. *et al.* (KONA N.º 23 (2005), 7-17) describe que el tamaño de partículas se puede reducir mediante el ajuste del pH, pero no comenta nada sobre los efectos de esto en la estabilidad.

65

La agregación, y como consecuencia de ella la sedimentación, de partículas pequeñas se suele evitar mediante la adición de estabilizantes. A pesar de ello, como se ha indicado anteriormente, la adición de estos compuestos frecuentemente no es suficiente para conseguir evitar la agregación y sedimentación de las partículas. Además, la

adición de estabilizantes puede resultar indeseada en ciertas aplicaciones, tales como las aplicaciones en las que las composiciones exentas de estabilizantes son más adecuadas, los estabilizantes no están permitidos por la legislación y/o los estabilizantes no son compatibles con el compuesto activo. Es más, la adición de un estabilizante puede conllevar costes más elevados y, por lo tanto, puede no resultar atractiva desde un punto de vista económico. Además, el uso de un estabilizante puede no resultar atractivo desde un punto de vista medioambiental.

Teniendo esto en cuenta, resulta necesario disponer de composiciones estables de partículas pequeñas que presenten unas buenas propiedades de sedimentación y que estén sustancialmente exentas de estabilizantes.

10 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un método para preparar una suspensión estable de partículas micronizadas de natamicina en ausencia de un estabilizante, comprendiendo el método los pasos de: a) someter la natamicina a una molienda por vía húmeda a diferentes valores de pH para obtener suspensiones de partículas micronizadas de natamicina que tengan cada una un valor diferente de pH, o someter la natamicina a una molienda por vía húmeda a un valor de pH y ajustar el pH de la suspensión después de la molienda para obtener suspensiones de partículas micronizadas de natamicina que tengan cada una un valor diferente de pH, b) medir el potencial zeta de las suspensiones obtenidas y determinar cuál de las suspensiones obtenidas tiene un potencial zeta de 10 mV o superior o -20 mV o inferior, y c) preparar una suspensión de partículas micronizadas de natamicina sometiendo la natamicina a una reducción del tamaño mediante una molienda por vía húmeda en condiciones de pH, donde la suspensión tiene un potencial zeta de 10 mV o superior o -20 mV o inferior de acuerdo con el paso b). El método comprende someter la natamicina a una reducción del tamaño mediante una molienda por vía húmeda en condiciones de pH, donde la carga superficial intrínseca del compuesto orgánico de tamaño reducido es suficiente para mantener la suspensión estable. En una realización, la suspensión preparada de acuerdo con un método de acuerdo con la invención es estable y está sustancialmente exenta de estabilizante. Dicho de otro modo, la suspensión es estable en condiciones sustancialmente exentas de estabilizante. La suspensión estable que contiene las partículas de tamaño reducido se puede preparar mediante una molienda por vía húmeda en ausencia de un aditivo sustancial de estabilizante (aditivo que incrementa la estabilidad). No se necesita un estabilizante antes, durante ni después de la técnica de reducción del tamaño aplicada (p. ej., molienda por vía húmeda) para mantener la suspensión estable. Resulta evidente para un experto en la técnica que el término «sustancialmente» a este respecto se refiere a que la suspensión puede contener un estabilizante, pero que si la suspensión comprende un estabilizante la cantidad de este en la suspensión es demasiado baja como para tener ningún efecto estabilizante significativo sobre la suspensión. En una realización, la suspensión está exenta de cualquier estabilizante.

Un aspecto de la invención se refiere a un método para preparar una suspensión estable de partículas micronizadas de natamicina en ausencia de un estabilizante, comprendiendo el método los pasos de a) someter el compuesto orgánico sólido a una molienda por vía húmeda a diferentes valores de pH para obtener suspensiones de partículas micronizadas del compuesto orgánico sólido que tengan cada una un valor diferente de pH; b) determinar cuál de las suspensiones obtenidas es estable; y c) preparar una suspensión estable de partículas micronizadas del compuesto orgánico sólido sometiendo el compuesto orgánico sólido a una reducción del tamaño mediante una molienda por vía húmeda en condiciones de pH, donde la suspensión es estable de acuerdo con el paso b). En el paso a), el compuesto orgánico sólido se puede suspender en diferentes líquidos o fluidos supercríticos que contengan uno o más agentes tamponantes y que tengan diferentes valores de pH y, a continuación, cada suspensión se puede someter a una molienda por vía húmeda para obtener suspensiones de partículas micronizadas del compuesto orgánico sólido. Como alternativa, en el paso a), el compuesto orgánico sólido se puede suspender en un líquido o fluido supercrítico que tenga un valor de pH, p. ej., agua o una solución que tenga un agente tamponante y, ya sea antes de la molienda por vía húmeda o durante la molienda por vía húmeda, se ajusta el pH de la suspensión, p. ej., mediante la adición de un ácido, una base o un agente tamponante, a diferentes valores de pH. En cualquier caso, se consigue una molienda por vía húmeda a diferentes valores/condiciones de pH. Obviamente, la molienda por vía húmeda del compuesto orgánico sólido a diferentes valores de pH en el paso a) se puede llevar a cabo de forma simultánea, pero también se puede llevar a cabo de forma consecutiva. Con el fin de encontrar las condiciones óptimas para la preparación de una suspensión estable de partículas micronizadas de un compuesto orgánico sólido en ausencia de un estabilizante, los pasos a) y b) se pueden repetir opcionalmente al menos una vez.

En otro aspecto, la invención proporciona una suspensión de partículas micronizadas de natamicina, que se puede obtener mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7. El método que comprende los pasos de a) someter el compuesto orgánico sólido a una molienda por vía húmeda a un valor de pH y ajustar el pH de la suspensión tras la molienda para obtener suspensiones de partículas micronizadas del compuesto orgánico sólido que tengan cada una un valor diferente de pH; b) determinar cuál de las suspensiones obtenidas es estable; y c) preparar una suspensión estable de partículas micronizadas del compuesto orgánico sólido sometiendo el compuesto orgánico sólido a una reducción del tamaño mediante una molienda por vía húmeda en condiciones de pH, donde la suspensión es estable de acuerdo con el paso b). En el paso a), el compuesto orgánico sólido se puede suspender en un líquido o fluido supercrítico que tenga un valor de pH y a continuación se puede someter a una molienda por vía húmeda a este valor de pH para obtener una suspensión de partículas micronizadas. A continuación, se toman muestras de la suspensión de partículas micronizadas (que tiene un valor de pH) y el pH de cada muestra se ajusta a un valor diferente de pH con un compuesto adecuado, p. ej., un ácido, una base o un

agente tamponante, para obtener suspensiones que tengan cada una un valor diferente de pH. Con el fin de encontrar las condiciones óptimas para la preparación de una suspensión estable de partículas micronizadas de un compuesto orgánico sólido en ausencia de un estabilizante, los pasos a) y b) se pueden repetir opcionalmente al menos una vez.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para preparar una suspensión estable de partículas micronizadas de un compuesto orgánico sólido en ausencia de un estabilizante, comprendiendo el método los pasos de a) suspender el compuesto orgánico sólido en un líquido o fluido supercrítico; b) medir el potencial zeta de la suspensión a diferentes valores de pH; y c) preparar una suspensión estable de partículas micronizadas del compuesto orgánico sólido sometiendo el compuesto orgánico sólido a una reducción del tamaño mediante una molienda por vía húmeda en condiciones de pH, donde la suspensión es estable de acuerdo con el paso b). Los diferentes valores de pH se pueden conseguir suspendiendo el compuesto orgánico sólido en líquidos o fluidos supercríticos, teniendo cada líquido o fluido un valor diferente de pH. Como alternativa, el compuesto orgánico sólido se puede suspender en un líquido o fluido supercrítico que tenga un valor de pH y las diferentes condiciones de pH se crean en el aparato que mide el potencial zeta de la suspensión obtenida (el potencial zeta se mide con un perfil de pH).

20 Para determinar cuál de las suspensiones obtenidas es estable, se pueden utilizar métodos conocidos en la técnica, que incluyen determinar el potencial zeta de las suspensiones que comprenden partículas micronizadas del compuesto orgánico sólido; determinar la sedimentación de las partículas micronizadas en las suspensiones en función del tiempo o determinar el tamaño de las partículas micronizadas en las suspensiones en función del tiempo. Obviamente, también se puede utilizar una combinación de estos métodos.

25 Las condiciones/valores de pH utilizados en el paso a) o b) de un método de acuerdo con la invención están preferentemente entre un pH de 1 y 14. El término «diferente», tal como se utiliza en la presente, se refiere a varias suspensiones, teniendo cada suspensión un pH distinto, por ejemplo, una suspensión que tenga un pH de 2, una suspensión que tenga un pH de 3, etc. Preferentemente, se preparan al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 suspensiones distintas, teniendo cada suspensión un valor diferente del pH comprendido entre un pH de 1 y 14. Preferentemente, se incluyen suspensiones que tienen al menos un valor de pH por unidad de pH.

30 En el paso b), se determina la estabilidad de las suspensiones obtenidas en el paso a), es decir, se determina qué suspensión es estable y qué suspensión no es estable. Por lo tanto, el paso b) puede incluir el paso de determinar la estabilidad de las suspensiones y, en función de esto, determinar/evaluar qué suspensiones son estables y cuáles no lo son. Los métodos adecuados para determinar/medir la estabilidad incluyen los métodos proporcionados anteriormente. Obviamente, en la presente invención también se incluyen otros métodos para determinar/medir la estabilidad de suspensiones que contienen partículas. Un experto en la técnica estará familiarizado con otros métodos adecuados.

40 Cuando se utilizan mediciones de potencial zeta para determinar la estabilidad, las suspensiones se consideran estables en el contexto de la presente invención cuando el potencial zeta medido por dispersión dinámica de la luz según se expone en la presente es, p. ej., de al menos 10 mV o superior o, p. ej., de al menos -10 mV o inferior. Preferentemente, el potencial zeta es de al menos 15 mV o superior, al menos 20 mV o superior, al menos 25 mV o superior, al menos 30 mV o superior, al menos 35 mV o superior, al menos 40 mV o superior, al menos 45 mV o superior, al menos 50 mV o superior, al menos 55 mV o superior y de la forma más preferida al menos 60 mV o superior. Como alternativa, el potencial zeta también puede ser preferentemente de al menos -15 mV o inferior, al menos -20 mV o inferior, al menos -25 mV o inferior, al menos -30 mV o inferior, al menos -35 mV o inferior, al menos -40 mV o inferior, al menos -45 mV o inferior, al menos -50 mV o inferior, al menos -55 mV o inferior y de la forma más preferida al menos -60 mV o inferior.

50 Cuando se utiliza la sedimentación de partículas micronizadas de las suspensiones como método para determinar la estabilidad de las suspensiones, se considera que las suspensiones son estables en el contexto de la presente invención cuando, p. ej., el porcentaje por debajo del frente de sedimentación medido como se expone en la presente es de al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y preferentemente 8 días (tras la molienda).

55 Cuando se determina el tamaño de las partículas en las suspensiones para obtener una indicación de la estabilidad de las suspensiones, se considera que las suspensiones son estables en el contexto de la presente invención cuando, p. ej., el tamaño medio de las partículas proporcionado mediante la fórmula de Stokes para una sedimentación impedida en un flujo laminar no se incrementa más de un factor de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, más preferentemente el incremento del tamaño medio de las partículas debe ser inferior a un factor de 1.5, 1.3, 1.2, 1.1, 1.05, 1.01, 1.005, 1.001, durante un periodo de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 días después de la reducción del tamaño, p. ej., mediante molienda. En una realización preferida, el tamaño medio de las partículas no se incrementa en absoluto durante el periodo indicado. La fórmula de Stokes es la siguiente:

$$D_{\text{stokes}} = \sqrt{\frac{V_s \cdot 18 \cdot \mu_{\text{fluida}}}{g \cdot (\rho_{\text{partícula}} - \rho_{\text{fluida}})}}$$

D_{stokes} : diámetro de Stokes de la partícula
 V_s : velocidad inicial de sedimentación determinada experimentalmente
 μ_{fluida} : viscosidad de la fase líquida
 g : gravedad
 ρ_{fluida} : densidad de la fase líquida
 $\rho_{\text{partícula}}$: densidad de la partícula del producto

En la fórmula anterior, el diámetro de Stokes de la partícula, como resultado del comportamiento hidrodinámico de la partícula en un fluido, se califica como equivalente al diámetro de una partícula esférica que tenga el mismo comportamiento hidrodinámico (remítase, p. ej., a Camp T.R. (1946), *Sedimentation and the design of settling tanks*, *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.* 111:895-958; Dobbins W.E. (1944), *Effect of turbulence on sedimentation*. *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.* 109:629-653).

Como alternativa, se considera que las suspensiones son estables en el contexto de la presente invención cuando el tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) determinado mediante análisis de difracción láser no se incrementa más de un factor de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, más preferentemente el incremento del tamaño medio de las partículas debe ser inferior a un factor de 1.5, 1.3, 1.2, 1.1, 1.05, 1.01, 1.005, 1.001, durante un periodo de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 días después de la reducción del tamaño, p. ej., mediante molienda. En una realización preferida, el tamaño medio de las partículas no se incrementa en absoluto durante el periodo indicado.

Basándose en los métodos anteriores, se seleccionan las condiciones/valores de pH adecuados para la molienda. Por ejemplo, durante la molienda por vía húmeda en el paso c) de un método de la invención para preparar una suspensión estable de partículas micronizadas del compuesto orgánico sólido, se pueden aplicar unas condiciones/valores de pH donde las suspensiones sean estables, p. ej., unas condiciones/valores de pH de las suspensiones que tengan un potencial zeta que sea de al menos -10 mV o inferior o donde el porcentaje por debajo del frente de sedimentación medido como se expone en la presente sea de al menos un 70% después de 8 días (tras la molienda). En el paso b) ya se puede producir una suspensión estable de partículas micronizadas si una de las suspensiones evaluadas es estable. A pesar de ello, los pasos a) y b) se dirigen principalmente a preparaciones de pequeña escala y a la evaluación de las estabildades en suspensión. Un experto en la técnica comprenderá que la evaluación de la estabilidad de las suspensiones no se llevará a cabo a gran escala, por ejemplo, a escala industrial. El paso c) se dirige a la preparación concreta de las suspensiones estables, p. ej., a una preparación a escala industrial.

En una realización, la presente invención proporciona un método para preparar una suspensión estable de partículas micronizadas de un compuesto orgánico sólido en ausencia de un estabilizante de acuerdo con la invención, comprendiendo el método el paso de, p. ej., someter el compuesto orgánico sólido a una reducción del tamaño mediante una molienda por vía húmeda en condiciones de pH donde el potencial zeta del compuesto orgánico de tamaño reducido es de 10 mV o superior o -10 mV o inferior. En estas condiciones de potencial zeta, se determina que las suspensiones son estables. Por consiguiente, en una realización, la reducción del tamaño mediante la molienda por vía húmeda se lleva a cabo en ausencia de un estabilizante en condiciones de pH, donde el potencial zeta del compuesto orgánico de tamaño reducido es de 10 mV o superior. Preferentemente, el potencial zeta del compuesto orgánico de tamaño reducido es de 15 mV o superior, 20 mV o superior, 25 mV o superior, 30 mV o superior, 35 mV o superior, 40 mV o superior, 45 mV o superior, 50 mV o superior, 55 mV o superior y de la forma más preferida 60 mV o superior. En otra realización, la reducción del tamaño mediante la molienda por vía húmeda se lleva a cabo en ausencia de un estabilizante en condiciones de pH, donde el potencial zeta del compuesto orgánico de tamaño reducido es de -10 mV o inferior. Preferentemente, el potencial zeta del compuesto orgánico de tamaño reducido es de -15 mV o inferior, -20 mV o inferior, -25 mV o inferior, -30 mV o inferior, -35 mV o inferior, -40 mV o inferior, 45 mV o inferior, -50 mV o inferior, -55 mV o inferior y de la forma más preferida -60 mV o inferior.

La principal ventaja del método de acuerdo con la invención es que, debido al método de acuerdo con la invención, no es necesario utilizar estabilizantes que se emplean habitualmente para proporcionar estabilización electrostática o estérica a las suspensiones o que incrementan la viscosidad de las suspensiones. Una suspensión preparada mediante el método de la invención sigue siendo estable durante un periodo prolongado, a varios valores de pH e incluso sin estar tamponada.

En el contexto de la presente invención, el término «suspensión» se refiere a una mezcla de un sólido en un líquido o fluido supercrítico. Dicho de otro modo, se refiere a partículas sólidas en un medio líquido. Los términos «suspensión» y «dispersión» se utilizan indistintamente en el contexto de la presente invención. El medio puede ser acuoso, parcialmente acuoso o incluso no acuoso. El medio también puede ser un fluido supercrítico. Preferentemente, el medio es un líquido cuyo pH se puede fijar.

El término «estabilizantes», tal como se utiliza en la presente, se refiere, p. ej., a agentes tensioactivos tales como surfactantes, espesantes, p. ej. hidrocoloides, polielectrolitos, copolímeros en bloque, y cationes y aniones multivalentes, los cuales se utilizan habitualmente para proporcionar estabilización electrostática o estérica a las suspensiones.

En el contexto de la presente invención, la expresión «carga superficial intrínseca» se refiere a la carga superficial «natural» de una partícula, es decir, la carga superficial que no ha sido modificada por la adición de estabilizantes. La carga superficial de una partícula se puede medir utilizando métodos conocidos en la técnica tales como, p. ej., la titulación.

El término «estable», en el contexto de una suspensión estable, se refiere a una suspensión en la que la agregación de las partículas se previene de forma sustancial o completa, es decir, a una suspensión en la que el tamaño medio de las partículas durante un periodo de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 días después de la reducción del tamaño, p. ej., mediante molienda, no se incrementa más de un factor de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, más preferentemente el incremento del tamaño medio de las partículas durante este periodo debe ser inferior a un factor de 1.5, 1.3, 1.2, 1.1, 1.05, 1.01, 1.005, 1.001. En una realización preferida, el tamaño de las partículas no se incrementa en absoluto. En la presente invención, la estabilidad se consigue mediante una molienda por vía húmeda a un pH en el que la carga superficial intrínseca del compuesto es suficiente para minimizar la agregación, es decir, a un pH en el que la agregación está impedida. El experto será capaz de pensar en varios métodos para determinar el pH adecuado. En una realización, el pH adecuado se determina (i) mediante una molienda por vía húmeda a diferentes valores de pH, (ii) determinando a qué pH el tamaño medio de las partículas no se incrementa más de un factor de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 durante un periodo de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 días después de la molienda y a continuación (iii) seleccionando ese pH para las condiciones de la molienda por vía húmeda. El pH seleccionado es el pH adecuado, es decir, el pH en el que se pueden producir las partículas micronizadas sin necesidad de utilizar estabilizantes para estabilizar la suspensión. El pH adecuado puede ser un intervalo de valores de pH (por ejemplo, $\text{pH} \leq 4$ o $\text{pH} \geq 8$ o un pH comprendido entre 5 y 9, para dar tan solo algunos ejemplos), lo que significa que no solo un valor de pH específico es adecuado, sino que varios valores de pH dentro de un intervalo son adecuados para preparar una suspensión estable de partículas micronizadas. En una realización, la invención proporciona un método para preparar una suspensión estable de partículas micronizadas de un compuesto orgánico sólido en ausencia de un estabilizante de acuerdo con la invención, comprendiendo el método los pasos de, p. ej., a) someter el compuesto orgánico sólido a una molienda por vía húmeda a diferentes valores de pH, b) determinar el tamaño medio de las partículas del compuesto orgánico sólido de tamaño reducido obtenido durante un periodo de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 días después de la molienda por vía húmeda, y c) preparar la suspensión estable de partículas micronizadas del compuesto orgánico sólido sometiendo el compuesto orgánico sólido a una reducción del tamaño mediante una molienda por vía húmeda en condiciones de pH, donde el tamaño medio de las partículas del compuesto orgánico sólido de tamaño reducido obtenido no se incrementa más de un factor de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, más preferentemente el incremento del tamaño medio de las partículas debe ser inferior a un factor de 1.5, 1.3, 1.2, 1.1, 1.05, 1.01, 1.005, 1.001 durante un periodo de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 días después de la molienda por vía húmeda.

El experto puede utilizar el potencial zeta, que está relacionado con la carga superficial intrínseca, para obtener una indicación del intervalo de pH adecuado. La significancia del potencial zeta es que su valor se puede relacionar con la estabilidad de las suspensiones. Los compuestos con un potencial zeta «elevado» están eléctricamente estabilizados. Para suspensiones idénticas, se aplica lo siguiente: cuanto mayor sea el valor absoluto del potencial zeta, mayor será el valor absoluto de la carga superficial efectiva y más estable será la suspensión. El potencial zeta se puede medir utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando un analizador de potencial zeta según se describe en Hunter R.J. (1998), *Introduction to modern colloid science*, Oxford Science press, páginas 241-247.

Preferentemente, el método de acuerdo con la invención, es decir, la molienda, se lleva a cabo con una fuerza iónica baja, es decir, con una fuerza iónica inferior a 0.50 M, 0.40 M, 0.30 M o 0.20 M, más preferentemente inferior a 0.10 M o 0.05 M, aún más preferentemente inferior a 0.01 M (remítase, p. ej., a Hunter R.J. (1998), *Introduction to modern colloid science*, Oxford Science press, página 207).

En el contexto de la presente invención, la expresión «partículas micronizadas» se refiere a partículas con un diámetro medio de 10 μm o inferior. En una realización preferida, el diámetro de las partículas es de 5 μm o inferior, 3 μm o inferior, 1 μm o inferior, 0.9 μm o inferior, 0.8 μm o inferior, 0.7 μm o inferior, 0.6 μm o inferior, 0.5 μm o inferior, 0.4 μm o inferior, 0.3 μm o inferior y más preferentemente 0.2 μm o inferior. De la forma más preferida, se refiere a partículas con un diámetro de 0.1 μm o inferior, 0.075 μm o inferior, 0.050 μm o inferior o incluso 0.040 μm o inferior. El tamaño de las partículas se determina basándose en el tamaño medio de las partículas, el cual en el contexto de la presente invención se expresa como $d_{4,3}$ que se mide mediante técnicas de difracción láser, p. ej., dispersión de la luz. La dispersión de la luz devuelve una señal que se traduce en un diámetro de una esfera equivalente. El equipo de dispersión de la luz es muy conocido en la técnica, por ejemplo, un analizador del tamaño de partículas por difracción láser de Beckmann Coulter denominado LS230, el cual utiliza la dispersión de la luz láser acoplada con mediciones de ángulo ancho de la luz dispersada. Preferentemente, al menos un 50%, 60%, 70%,

80%, 90%, 95%, 97% y de la forma más preferida un 99% (p/p) o más de las partículas en una suspensión tienen el diámetro medio inferior o igual al diámetro medio dado anteriormente. Obviamente, para determinar el tamaño de las partículas también se pueden utilizar otras técnicas de determinación del tamaño de las partículas tales como microscopía, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transición (TEM), Halo LM10 (Nanosight), Coulter Counter Multisizer 3 (Beckman Coulter).

La reducción del tamaño se consigue mediante una molienda por vía húmeda. Las técnicas de molienda son muy conocidas en la materia e incluyen la trituración con medios tal como la trituración con microesferas, trituración vibratoria, trituración con bolas; trituración por inyección, por ejemplo, utilizando un micronizador, un molino jet-mixer o un pulverizador por inyección; trituración por dispersión y trituración de coloides; trituración por abrasión de discos; y homogeneización. Los molinos y homogeneizadores utilizados pueden disponer de un equipo de refrigeración para mantener la temperatura por debajo de un valor en el que los materiales que se han de triturar descomponen o pierden actividad de otro modo y pueden disponer de un equipo para mantener los materiales que se han de triturar en una atmósfera controlada.

En el contexto de la presente invención, la expresión «molienda por vía húmeda» se refiere al proceso de ejercer fuerzas mecánicas sobre un material sólido de interés que está dispersado o suspendido en una fase líquida o fluida (en el caso de fluidos supercríticos) con el fin de romper el material sólido en fragmentos más pequeños (es decir, reducción del tamaño de las partículas). Las fuerzas mecánicas para la molienda por vía húmeda se pueden aplicar de muchos modos y existen muchas técnicas diferentes disponibles para la molienda por vía húmeda. La «molienda por vía húmeda», tal como se utiliza en la presente, también incluye técnicas de homogeneización tales como técnicas en las que una fuerza provocada por una gran caída de presión sobre un área pequeña se aplica sobre el material sólido. En el presente contexto, los términos «trituración» y «molienda» se utilizan indistintamente. En una realización de la invención, la molienda por vía húmeda en el método de acuerdo con la invención va precedida por una trituración por vía seca.

La molienda por vía húmeda en el método de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo con o sin el uso de un medio de molienda. En una realización de la invención, la molienda por vía húmeda se lleva a cabo utilizando un medio de molienda. En el contexto de la presente invención, la expresión «medio de molienda» se refiere a microesferas esféricas de plástico tal como poliestireno, metal tal como óxido de zirconio o acero, o vidrio, de las cuales existe constancia en la técnica que se utilizan para moler compuestos. Los medios de molienda pueden tener una dureza y densidad diferentes dependiendo del material utilizado. Los medios de molienda metálicos se pueden estabilizar, por ejemplo, con itrio. Se pueden utilizar mezclas de microesferas de diferente composición. En una realización, se utiliza un medio de molienda de óxido de zirconio estabilizado con itrio.

El tamaño de las microesferas en el medio de molienda puede variar. En el método de acuerdo con la invención, se utilizan microesferas con un diámetro medio comprendido en el intervalo desde unos micrómetros hasta varios milímetros. También se pueden utilizar mezclas de microesferas de diferentes tamaños en el método de la invención. En una realización, se utilizan microesferas de óxido de zirconio de 0.3, 0.5 y 0.8 mm estabilizadas con itrio (Tosoh Corporation, Japón).

En el contexto de la presente invención, la expresión «compuesto orgánico» se refiere a cualquier miembro de la amplia clase de compuestos cuyas moléculas contienen carbono e hidrógeno; por consiguiente, los carburos, carbonatos, óxidos de carbono y el carbono elemental no se consideran orgánicos según se interpreta en la presente. Los derivados semisintéticos de los compuestos orgánicos también se incluyen en la presente invención. El método de la invención se puede utilizar convenientemente para compuestos orgánicos poco solubles. En el contexto de esta invención, un compuesto es poco soluble en un disolvente específico si tiene una solubilidad inferior a 30 g/l a temperatura ambiente en ese disolvente específico tal como, por ejemplo, en disolventes orgánicos tales como etanol, en aceite o en agua. Preferentemente, el compuesto orgánico es un producto alimentario, suplemento alimentario, producto para piensos, producto agrícola o un compuesto farmacéutico, tal como un pigmento orgánico, p. ej., un carotenoide, p. ej., beta-caroteno, apocarotenal o su éster, licopeno, luteína, zeaxantina, cantaxantina o astaxantina; un antibiótico, p. ej., una beta-lactama; una vitamina; una benzoquinona, p. ej., la coenzima Q10; una proteína; una enzima; un péptido; un lípido; un polisacárido; o un antibiótico poliélico, p. ej., natamicina, nistatina, anfotericina B, trienina, etruscomicina, filipina, chainina, dermostatina, linfosarcina, candidicina, aureofungina A, aureofungina B, hamicina A, hamicina B o lucensomicina. En otra realización más, el compuesto orgánico es café, cacao, grano/maíz, gránulos de almidón, por nombrar tan solo algunos.

En el contexto de la presente invención, el término «natamicina» se refiere a cualquier tipo de natamicina, compuesto que también se conoce como pimarcina y el cual es un compuesto antifúngico poliélico. La natamicina es muy conocida en la técnica, remítase, por ejemplo, a los documentos EP 0678241, US 5 942 611, US 5 591 438 y EP 0600983.

La suspensión de partículas micronizadas obtenida utilizando el método de acuerdo con la invención se puede tratar posteriormente para separar físicamente las partículas y el medio de molienda, con el fin de eliminar el medio de molienda del producto final. Esto se puede llevar a cabo utilizando cualquier método conocido en la técnica para

separar sólidos de una suspensión, que incluye centrifugación, filtración y sedimentación, para nombrar tan solo algunos.

5 La suspensión de partículas micronizadas obtenida mediante el método de la invención se puede formular finalmente en un producto mediante la adición de aditivos y compuestos conocidos en la técnica para formular un producto tal como la adición de espesantes, surfactantes y polímeros. En una realización preferida, la suspensión de partículas micronizadas obtenida mediante el método de la invención es estable. La formulación de la suspensión en un producto también puede implicar el secado de la suspensión. La suspensión se puede secar utilizando cualquier método conocido en la técnica que no perjudique al producto. En una realización, la suspensión se seca mediante un secado por pulverización, secado al vacío, refrigeración por pulverización, secado por pulverización modificado, secado en láminas, prensado, liofilización o procesos de secado que utilizan CO₂ supercrítico o cualquier otro fluido supercrítico.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una suspensión de partículas micronizadas de un compuesto orgánico sólido que se puede obtener de acuerdo con un método de acuerdo con la invención. Preferentemente, la suspensión es estable y está sustancialmente exenta de estabilizantes, preferentemente está exenta de estabilizantes. La suspensión puede ser líquida, pero también se puede haber sometido a un secado y, por lo tanto, estar seca, p. ej., puede ser un polvo.

20 En otro aspecto de la invención, la suspensión de partículas micronizadas producida mediante el método de acuerdo con la invención se utiliza en un método para producir un polvo, un recubrimiento, una película o una lámina. Este método comprende utilizar una suspensión de partículas micronizadas y formular la suspensión para obtener una suspensión concentrada, una pasta, un polvo, una película, un recubrimiento o una lámina utilizando métodos de vanguardia conocidos por el experto. Una suspensión concentrada, pasta, polvo, película, recubrimiento o lámina que se pueda obtener mediante el método constituye otro aspecto de la presente invención. Utilizando el método de la invención, se puede obtener un polvo dispersable que proporciona partículas micronizadas cuando se dispersa en un líquido. Tal polvo dispersable también está englobado en la presente invención. La dispersión obtenida con partículas micronizadas es estable en condiciones sustancialmente exentas de estabilizantes.

30 Las partículas micronizadas, ya sea en forma de una suspensión, una suspensión concentrada, una pasta, un polvo, un recubrimiento, una película o una lámina o cualquier otra forma adecuada, se pueden utilizar en la industria alimentaria o de piensos, en horticultura, en agricultura o en la industria farmacéutica. En una realización, se utilizan en o sobre un producto lácteo tal como sobre queso o en recubrimientos de queso. En otra realización, se utilizan en o sobre fruta, freza o sustrato de crecimiento de champiñones, patatas, bulbos y sobre plantas y flores. En otra realización más, la suspensión u otras formas se utilizan en formulaciones farmacéuticas tales como en la producción de cápsulas y comprimidos, donde se pueden utilizar como principio activo o como excipiente o aditivo, por ejemplo, en formulaciones para liberación controlada. En una realización, se utiliza una suspensión en el recubrimiento, como aditivo de color o pigmento.

40 Un producto alimentario, producto de pienso, producto de horticultura, producto agrícola o producto farmacéutico que comprenda una suspensión de partículas micronizadas de acuerdo con la invención o una suspensión concentrada, una pasta, un polvo, una película, un recubrimiento o una lámina de acuerdo con la invención constituyen otra parte de la presente invención.

45 Ejemplos

Ejemplo 1

50 **Medición de la distribución de tamaños de partículas y tamaño medio de las partículas de diferentes compuestos orgánicos**

Se realizaron mediciones para los siguientes compuestos orgánicos: natamicina (DSM Gist, Delft, Países Bajos), nistatina (DSM, Delft, Países Bajos), cacao (cacao Blooker, Amsterdam, Países Bajos) y café (café Douwe Egberts, Utrecht, Países Bajos). Para la natamicina, se incluyeron en el ejemplo dos productos que contenían cada uno de ellos partículas de natamicina de diferente forma: un producto de natamicina que comprendía partículas en forma de discos y un producto de natamicina que comprendía partículas en forma de agujas. Antes de su uso, el café se filtró a través de un tamiz de 150 µm. Las muestras de los compuestos orgánicos anteriores se dispersaron en agua desmineralizada hasta que el valor de oscurecimiento de la luz, el cual se midió mediante tecnología de difracción láser utilizando un analizador del tamaño de partículas por difracción láser LS230 de BeckmanCoulter, Fullerton, CA, EE. UU., estuvo comprendido entre un 45 y un 55%. Este valor de oscurecimiento se alcanzó con una concentración de partículas de aproximadamente un 1% p/p. A continuación, se analizó la distribución de tamaños de partículas con el dispositivo durante 90 segundos. El dispositivo utilizó un láser rojo y una lámpara de tungsteno con longitudes de onda de 450, 600 y 900 nm para medir el tamaño de las partículas. El dispositivo requirió el índice refractivo de la fase líquida y las partículas y el índice refractivo imaginario de las partículas para determinar la distribución de tamaños de partículas a partir de los datos no procesados. Estos valores se entraron manualmente en el dispositivo de medición (índice refractivo del líquido: 1.33; índice refractivo de la natamicina: 1.6; nistatina: 1.6; cacao: 2.0; café:

2.0; índice refractivo imaginario de la natamicina: 0.01; nistatina: 0.01; cacao: 1.0; café: 1.0). El tamaño medio de las partículas se determinó a partir de la distribución de tamaños de partículas. El tamaño medio de las partículas proporcionado por el dispositivo de medición fue un tamaño de las partículas basado en el volumen, $d_{4,3}$. La distribución por intervalo de tamaños de partículas se proporciona como un porcentaje del total.

A partir de la Tabla 1, se puede concluir que la mayoría de las partículas del producto de natamicina en forma de discos tienen un diámetro comprendido entre 10.0 y 50.0 μm , mientras que la mayoría de las partículas del producto de natamicina en forma de agujas tienen un diámetro comprendido en el intervalo de 5.0 a 10.0 μm . La mayoría de las partículas de nistatina tienen un diámetro comprendido en el intervalo de 2.0 a 5.0 μm . La mayoría de las partículas de cacao tienen un diámetro comprendido en el intervalo de 10.0 a 50.0 μm . La mayoría de las partículas de café tienen un diámetro comprendido en el intervalo de 50.0 a 200.0 μm . Basándose en la distribución de tamaños de partículas, se calculó el diámetro medio de los diferentes compuestos orgánicos. El tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) para las partículas del producto de natamicina en forma de discos es de 14.6 μm ; el tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) para las partículas del producto de natamicina en forma de agujas es de 6.4 μm ; el tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) para las partículas del producto de nistatina es de 3.4 μm ; el tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) para las partículas del producto de cacao es de 22.6 μm ; el tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) para las partículas del producto de café es de 76.5 μm .

Tabla 1. Distribución de tamaños de partículas para las partículas de varios compuestos orgánicos.

Tamaño de las partículas (μm)	Natamicina en forma de discos (% p/p)	Natamicina en forma de agujas (% p/p)	Nistatina (% p/p)	Cacao (% p/p)	Café (% p/p)
0-0.2	0.0	10.2	7.4	0.0	0.0
0.2 - 0.8	0.0	7.2	4.4	0.6	0.3
0.8 - 2.0	0.8	10.5	27.2	2.8	1.1
2.0 - 5.0	18.4	24.9	46.7	9.2	1.2
5.0 - 10.0	32.6	31.7	12.2	19.1	1.6
10.0 - 50.0	47.8	15.6	2.1	64.0	35.9
50.0 - 200.0	0.4	0.0	0.0	4.3	59.8

Ejemplo 2

Preparación de una suspensión de partículas micronizadas de natamicina en un molino de bolas utilizando un medio de molienda con diferentes tiempos de molienda.

Se preparó una solución tampón de pH 8 mezclando 13.75 ml de una solución de ácido cítrico de 0.1 mol/l con 486.25 ml de una solución de hidróxido de sodio de 0.2 mol/l. Se añadieron 25 g de natamicina en forma de discos ($d_{4,3}$: 14.6 μm ; DSM Gist, Delft, Países Bajos) a la solución tampón y el polvo se dispersó mediante agitación. La cámara de molienda (300 ml) del molino de bolas (Dynomill KDL Special de Bachofen AG, Basilea, Suiza) se llenó hasta un 75% (v/v) con microesferas de óxido de zirconio de 0.3 mm estabilizadas con itrio (Tosoh Corporation, Tokio, Japón). El molino de bolas se operó a 2000 rotaciones por minuto. La suspensión de natamicina se bombeó a través del molino de bolas con una tasa de flujo de 6.1 g/s. La suspensión que salió del molino de bolas se volvió a introducir en el recipiente que contenía el resto de la suspensión. La suspensión se hizo pasar a través de la cámara del molino de bolas múltiples veces durante el experimento de molienda. El tiempo de residencia de la suspensión en la cámara de molienda y el recipiente fue de 26.7 segundos y 59.4 segundos, respectivamente. Se tomaron muestras de la suspensión que salía del molino después de 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos. Se midió el tamaño de las partículas de las muestras en suspensión para cada muestra mediante difracción láser utilizando el analizador del tamaño de partículas por difracción láser LS230 de BeckmanCoulter (Fullerton, CA, EE. UU.). En la Tabla 2 se muestra el tamaño medio de las partículas que se midió.

Tabla 2: Tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) para partículas de natamicina micronizadas en función del tiempo de molienda.

Tiempo (min)	$d_{4,3}$ (μm)
0	14.58
2	8.57
5	5.69
10	2.90
20	1.12

Tiempo (min)	d _{4,3} (µm)
30	0.45
45	0.37
60	0.21
75	0.18
90	0.18

Ejemplo 3

5 Influencia del tamaño de las microesferas del medio de molienda y la velocidad de rotación sobre el tamaño medio de las partículas

El experimento descrito en el Ejemplo 2 se repitió con el mismo tipo de medio de molienda. Además, se utilizaron medios de molienda con tamaños de las microesferas de 0.5 mm y 0.8 mm y una velocidad de rotación de 3000 rpm, 4500 rpm y 6000 rpm. Los resultados en la Tabla 3 muestran que el tiempo de molienda se reduce cuando el tamaño de las microesferas es más pequeño y/o la velocidad de rotación es más elevada. Esto implica que la reducción del tamaño de las partículas es más rápida en el caso en que el tamaño de las microesferas del medio de molienda es más pequeño y/o la velocidad de rotación es más elevada.

Tabla 3. Tiempo de molienda requerido (en minutos) para obtener partículas de natamicina con un tamaño medio de las partículas de 0.18 µm.

Velocidad de rotación (rpm)	Tamaño del medio de molienda (mm)		
	0.3	0.5	0.8
2000	60-75	140-180	240-270
3000	40-50	120-135	180-210
4500	30-40	105-120	150-180
6000	20-25	45-60	120-140

Ejemplo 4

20 Influencia del sistema tampón utilizado durante la molienda sobre el tamaño medio de las partículas

El experimento descrito en el Ejemplo 2 se repitió, con la condición de que la natamicina se suspendió en agua. El pH de la suspensión de natamicina micronizada obtenida fue de 5.5. El tamaño medio de las partículas tras la molienda fue de 0.18 µm.

25 El experimento descrito en el Ejemplo 2 también se repitió utilizando un tampón de hidrogenofosfato de dinatrio (0.20 mol/l) y ácido cítrico (0.10 mol/l) con diferentes valores de pH comprendidos en el intervalo de 6 a 8. Los resultados en la Tabla 4 muestran que el pH en el intervalo estudiado no ejerce ninguna influencia significativa sobre el tamaño medio final de las partículas (0.18 µm) y que el tiempo necesario para alcanzar la partícula final fue esencialmente igual para todos los valores de pH. Esto indica que el pH no ejerce ningún efecto significativo sobre la eficacia de la molienda.

Tabla 4. Influencia del pH sobre el tamaño medio de las partículas y el tiempo de molienda.

pH	6	7	8
Tiempo de molienda (minutos)	75-90	60-75	60-75
Tamaño medio de las partículas d _{4,3} (µm)	0.18	0.18	0.18

35 Ejemplo 5

Reducción del tamaño de las partículas utilizando un homogeneizador

Se dispersó natamicina en forma de discos en polvo, en agua con una concentración de 3000 ppm. El tamaño medio de las partículas de la suspensión de natamicina era de aproximadamente 15 µm. La suspensión se homogeneizó con un homogeneizador (Panda 2K, ns100L, GEA NIRO SOAVI, disruptor celular (tipo R)) y se obtuvo una suspensión que comprendía partículas micronizadas de natamicina. En la Tabla 5 se muestra el tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) para las partículas de la suspensión obtenida en función de la presión de homogeneización para un número diferente de ciclos de homogeneización. Los resultados de la Tabla 5 muestran que el tamaño medio de las partículas se puede reducir de forma significativa con un homogeneizador y que la reducción del tamaño de las partículas se mejora incrementando la presión de la homogeneización y el número de ciclos a través del homogeneizador.

Tabla 5: Tamaño medio de las partículas en función de la presión y el número de ciclos del homogeneizador.

Presión de la homogeneización (bar)	Número de ciclos	Tamaño medio de las partículas (µm)
750	3	3.8
1200	5	2.2
1500	25	2.0

Ejemplo 6

Determinación del potencial zeta de suspensiones de natamicina micronizada

Se preparó una suspensión que comprendía natamicina micronizada esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2, pero la molienda se llevó a cabo en agua desmineralizada sin corrección del pH con ácido o base. La muestra del producto micronizado se añadió a una solución acuosa que contenía KCl 1 mM y se obtuvieron soluciones acuosas que contenían un 0.1% (p/p) del producto micronizado. El pH de la suspensión se ajustó mediante una titulación con HCl 0.25 M y NaOH 0.10 M en el dispositivo de medición del potencial zeta (sistema automatizado). Se varió el pH en el intervalo de pH 3 a 10 con pasos de 1 ± 0.2 unidades de pH. El potencial zeta se midió para cada valor de pH en un instrumento Zetasizer (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Los resultados se muestran en la Tabla 6. A partir de los resultados, se puede deducir que el punto isoeléctrico de la natamicina micronizada se encuentra alrededor de un pH de 5.4. Los resultados muestran que un pH adecuado para formar suspensiones estables de natamicina micronizada mediante una molienda por vía húmeda en ausencia de un estabilizante se puede encontrar en un pH de alrededor de 4.6 o inferior (potencial zeta de aproximadamente +10 mV o superior o en un pH de alrededor de 6.7 o superior (potencial zeta de aproximadamente -20 mV o inferior).

Tabla 6: Potencial zeta de suspensiones de natamicina micronizada para varios valores de pH.

pH	Potencial zeta (mV)
3	+40
4	+21
5	+3
6	-8
7	-24
8	-39
9	-49
10	-53

Ejemplo 7

Propiedades de sedimentación de suspensiones de natamicina micronizada y no micronizada

En este experimento se analizó la estabilidad de suspensiones de natamicina micronizada y no micronizada observando el comportamiento de sedimentación de las suspensiones. Se preparó una suspensión de natamicina micronizada esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2, con la condición de que la natamicina se suspendió en agua desmineralizada y no se fijó el pH. A continuación, se preparó una suspensión con una concentración final de natamicina de un 1% (p/p) en una solución acuosa que contenía NaCl 0.01 M. El pH de las muestras de la suspensión se fijó con NaOH 0.01 M y HCl 0.01 M. Las muestras de la suspensión se almacenaron y el pH se ajustó después de 10 y 24 horas, cuando fue necesario. Después de 24 horas, el pH de las muestras de la suspensión permaneció constante. Se colocaron 10 ml de cada muestra por separado en una pipeta de plástico (pipeta de

plástico desechable y estéril de 10 ml; diámetro interno de 7 mm; Bibby Sterilin Ltd. Stone, Staffordshire, Reino Unido), la cual se cerró en ambos extremos y se almacenó verticalmente a 4 °C. El comportamiento de sedimentación de las muestras se siguió en función del tiempo midiendo el volumen por encima y por debajo del frente de sedimentación en cada pipeta.

5 Los resultados se muestran en la Tabla 7. Los porcentajes indican la fracción del volumen por debajo del frente de sedimentación. La tabla muestra que los porcentajes en volumen por debajo del frente de sedimentación se reducen en función del tiempo para ciertas condiciones de pH. Esto implica que las partículas forman un sedimento. La velocidad a la que esto sucede varía con el pH. Por ejemplo, a pH 3 y pH 10 la sedimentación no es significativa, mientras que, p. ej., a pH 4 la sedimentación es significativa.

15 Además de las propiedades de sedimentación de una suspensión de natamicina micronizada, se determinaron las propiedades de sedimentación del material de partida, es decir, natamicina no micronizada con un tamaño de las partículas de alrededor de 15 µm, para los valores de pH indicados en la Tabla 7. En un periodo de 24 horas, todas las partículas de la suspensión para todos los diferentes valores de pH (pH de 3 a 10) se sedimentaron completamente. Esto difiere del comportamiento de sedimentación de cualquiera de las muestras de la suspensión de natamicina micronizada, donde no se observó prácticamente ninguna sedimentación después de 24 horas (remítase a la Tabla 7). Por consiguiente, se puede concluir que la tasa de sedimentación de la suspensión de natamicina micronizada se reduce significativamente en comparación con la de la suspensión de natamicina no micronizada.

20 La comparación de los resultados de la Tabla 7 con el potencial zeta medido en el Ejemplo 6 muestra que la tasa de sedimentación se reduce cuando la diferencia entre el pH y el punto isoeléctrico (pI) se incrementa. Este comportamiento se puede explicar por el incremento de la repulsión electrostática con el incremento de la diferencia entre el pH y el pI.

Tabla 7: Comportamiento de sedimentación de la natamicina micronizada.

Tiempo (días)	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8
pH 3	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	98%	98%
pH 4	100%	96%	97%	88%	87%	85%	83%	81%	79%	77%
pH 5	100%	97%	92%	85%	79%	75%	72%	70%	68%	66%
pH 6	100%	98%	94%	89%	83%	79%	76%	73%	70%	68%
pH 7	100%	98%	94%	89%	84%	80%	77%	74%	72%	71%
pH 8	100%	100%	98%	96%	93%	92%	90%	88%	86%	84%
pH 9	100%	100%	99%	97%	96%	95%	93%	92%	90%	89%
pH 10	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%

30 **Ejemplo 8**

Preparación de un polvo dispersable de una suspensión que comprende partículas micronizadas de natamicina

35 Se preparó una suspensión de natamicina micronizada en agua esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 4. Las partículas de la suspensión tenían un tamaño medio de las partículas de 0.18 µm. Se congelaron 20 ml de la suspensión de natamicina micronizada en nitrógeno líquido antes de someterlos a un vacío elevado durante 24 horas. Este proceso de liofilización dio como resultado un polvo seco. Una muestra representativa de este polvo se volvió a dispersar en agua mediante agitación con una fuerza muy baja y la suspensión obtenida se introdujo en el

40 equipo para el tamaño de partículas por difracción láser LS230 (BeckmanCoulter, Fullerton, CA, EE. UU.). La suspensión se bombeó de forma continua a través del equipo y se midió la distribución de tamaños de partículas. Los resultados de esta medición se muestran en la Tabla 8. Los resultados demuestran que los gránulos de partículas micronizadas obtenidos mediante una molienda por vía húmeda y secados posteriormente (mediante, p. ej., liofilización) se pueden, al menos parcialmente, volver a dispersar en la suspensión de partículas original (es

45 decir, micronizadas) cuando se introducen en un medio líquido, p. ej., agua.

Tabla 8: Tamaño medio de las partículas y cantidad de partículas con un diámetro < 0.5 µm.

Tiempo (minutos)	Tamaño medio de las partículas $d_{4,3}$ (µm)	% (p/p) de partículas con un diámetro < 0.4 µm
0	13.8	6.6
2	13.4	10.9
4	12.6	15.5
7	10.2	20.6
11	8.5	34.0
15	4.2	49.6
17	0.46	84.2
19	0.45	84.7
36	0.40	87.7
40	0.40	87.5
50	0.39	88.2
61	0.34	90.7
70	0.31	92.6
Partículas micronizadas de natamicina	0.18	100.0

5 **Ejemplo 9**

Prueba de disolución de natamicina micronizada

Una suspensión de natamicina micronizada preparada esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 7 (con un tamaño inferior a 0.2 µm) se diluyó 70 veces con agua a temperatura ambiente. Se agitó la suspensión. Se tomaron muestras después de 5 segundos y a continuación cada 10 segundos. Las partículas se eliminaron de la suspensión mediante filtración con un filtro de jeringa de 0.02 µm (Whatman International Ltd, Inglaterra). La concentración de natamicina en la solución restante se midió con un espectrofotómetro (Uvikon 933, Kontron Instruments). Los resultados muestran que en las partículas micronizadas se disuelven muy rápido. La solución alcanzó la saturación en 5 segundos (aproximadamente 43 ppm de natamicina en solución y partículas sólidas restantes). Se repitió la misma prueba con partículas de natamicina en forma de discos no molidas con un tamaño medio de las partículas de alrededor de 15 µm. En este caso, la concentración de saturación se alcanzó después de aproximadamente 2 horas.

En un experimento alternativo, se analizó el comportamiento de disolución de diferentes suspensiones de natamicina suspendiendo una cantidad conocida de partículas de natamicina en 500 ml de una solución tampón de fosfato (0.01 M, pH 6.8). La suspensión obtenida se agitó a 300 rpm con un agitador magnético. Se tomaron muestras de la suspensión en función del tiempo. Estas muestras se filtraron con un filtro de jeringa de 0.02 µm (Whatman International Ltd, Inglaterra) para eliminar las partículas de natamicina suspendidas. A continuación, se analizó la concentración de natamicina en el filtrado mediante espectrofotometría de luz UV (Uvikon 933, Kontron Instruments) con una longitud de onda de 304 nm. Se construyó una curva de calibrado para traducir la absorbancia que se midió con el espectrofotómetro en la concentración de natamicina en ppm. Se utilizó análisis de HPLC como segundo método de cuantificación de la natamicina. Para esta medición, se añadió metanol al filtrado (1:1 en volumen). A continuación, la mezcla se introdujo en una columna de HPLC para cuantificar la natamicina.

En la Tabla 9 se muestran los resultados para diferentes concentraciones de tres tipos de suspensiones de natamicina: suspensiones que comprenden partículas de natamicina con un tamaño medio de las partículas de aproximadamente 15 µm; suspensiones que comprenden partículas de natamicina con un tamaño medio de las partículas de aproximadamente 6 µm; y suspensiones que comprenden partículas micronizadas de natamicina con un tamaño medio de las partículas de aproximadamente 0.18 µm. Estos tamaños medios de las partículas se midieron con el método de difracción láser descrito anteriormente (LS230, Beckman Coulter; remítase a *Introduction to modern Colloid Science*, Robert J. Hunter (1993), Oxford Science Publications).

Las soluciones que se analizaron fueron las siguientes:

40 A: Suspensión de partículas de natamicina en forma de discos de 15 µm (concentración: 837 ppm)

- B: Suspensión de partículas de natamicina en forma de discos de 15 µm (concentración: 94.5 ppm)
- C: Suspensión de partículas de natamicina en forma de agujas de 6 µm (concentración: 765 ppm)
- D: Suspensión de partículas de natamicina en forma de agujas de 6 µm (concentración: 76.5ppm)
- E: Suspensión de partículas micronizadas de natamicina (concentración: 1185 ppm)
- 5 F: Suspensión de partículas micronizadas de natamicina (concentración: 719 ppm)
- G: Suspensión de partículas micronizadas de natamicina (concentración: 118 ppm)
- H: Suspensión de partículas micronizadas de natamicina (concentración: 74 ppm)
- I: Suspensión de partículas micronizadas de natamicina (concentración: 50 ppm)
- J: Suspensión de partículas micronizadas de natamicina (concentración: 23 ppm)
- 10 K: Suspensión de partículas micronizadas de natamicina (concentración: 5 ppm)

Tabla 9: Concentración de natamicina disuelta en función del tiempo (en min) para tres tipos de partículas de natamicina con varias concentraciones de natamicina en suspensión (las concentraciones están en ppm).

Muestra	0 (min)	1 (min)	5 (min)	10 (min)	30 (min)	60 (min)	120 (min)	180 (min)	300 (min)
A	0	20	27	28	30	31	32	34	33
B	0	ND	5	15	21	22	24	24	28
C	1	ND	35	33	34	39	43	39	43
D	0	16	23	25	26	29	32	32	32
E	1	45	49	46	49	49	49	49	49
F	1	45	43	45	46	47	46	48	48
G	0	38	40	42	41	42	44	44	42
H	0	34	36	37	36	38	40	40	41
I	0	30	32	32	32	32	32	ND	ND
J	0	19	20	20	20	20	20	20	21
K	0	5	5	5	5	5	5	5	ND

ND significa no determinado

15 La comparación del compartimento de disolución de las suspensiones A y F muestra que la concentración de natamicina disuelta es más elevada para las partículas micronizadas de natamicina que para las partículas de natamicina de 15 µm, a pesar de que la concentración de natamicina es más baja en la suspensión que comprende las partículas micronizadas de natamicina (719 ppm frente a 837 ppm).

20 La comparación del compartimento de disolución de las suspensiones C y F muestra que la concentración de natamicina disuelta es más elevada para las partículas micronizadas de natamicina que para las partículas de natamicina de 6 µm, a pesar de que la concentración de natamicina es más baja en la suspensión que comprende las partículas micronizadas de natamicina (719 ppm frente a 765 ppm).

25 Los resultados demuestran que las partículas micronizadas de natamicina tienen tasa de solubilización y solubilidad más elevadas en comparación con las partículas de natamicina de 6 µm y 15 µm. Esto puede resultar beneficioso especialmente en aplicaciones en las que se requiere una concentración de natamicina disuelta elevada.

30 **Ejemplo 10**

Preparación de suspensiones de partículas micronizadas de nistatina en un molino de bolas utilizando un medio de molienda con diferentes tiempos de molienda.

35 El experimento se llevó a cabo esencialmente como para la natamicina (remítase al Ejemplo 2). En la Tabla 10 se muestra el tamaño de las partículas obtenido. Se obtuvieron tamaños medios de las partículas similares cuando el experimento se repitió en un tampón de hidrogenofosfato de dinatrio/ ácido cítrico de pH 5 ($d_{4,3}$: 0.17 µm tras un tiempo de molienda de 240-270 minutos) o pH 8 ($d_{4,3}$: 0.17 µm tras un tiempo de molienda de 210-240 minutos) o cuando el experimento se repitió en agua desmineralizada ($d_{4,3}$: 0.17 µm).

40 Tabla 10: Tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) para partículas de nistatina micronizadas en función del tiempo de molienda.

Tiempo (min)	d _{4,3} (µm)
0	3.42
5	1.43
10	0.77
20	0.38
30	0.34
45	0.23
60	0.21
75	0.16
90	0.15
105	0.15

Ejemplo 11

5 Determinación del potencial zeta de nistatina micronizada

Se molió la nistatina y se midió el potencial zeta esencialmente como se ha descrito para la natamicina en el Ejemplo 6. Los resultados se muestran en la Tabla 11. A partir de los resultados, se puede deducir que el punto isoeléctrico de la nistatina micronizada se encuentra alrededor de un pH de 4.6. A partir de los resultados, se puede concluir que un pH adecuado para formar suspensiones estables de nistatina micronizada mediante una molienda por vía húmeda en ausencia de un estabilizante se puede preparar a un pH de aproximadamente 4.4 o inferior (potencial zeta de aproximadamente 10 mV o superior) o a un pH de aproximadamente 5.8 o superior (potencial zeta de aproximadamente -20 mV o inferior).

15 Tabla 11: Potencial zeta de suspensiones de nistatina micronizada para varios valores de pH.

pH	Potencial zeta (mV)
3	+39
4	+14
5	-7
6	-23
7	-33
8	-41
9	-48
10	-55

Ejemplo 12

20 Propiedades de sedimentación de suspensiones de nistatina micronizada

El experimento se llevó a cabo esencialmente como para la natamicina (remítase al Ejemplo 7). Los resultados se muestran en la Tabla 12. Los porcentajes indican la fracción del volumen por debajo del frente de sedimentación. La tabla muestra que los porcentajes en volumen por debajo del frente de sedimentación se reducen en función del tiempo para ciertas condiciones de pH. Esto implica que las partículas forman un sedimento. La velocidad a la que esto sucede varía con el pH. A un pH de 8 y superior la sedimentación no es significativa, mientras que, p. ej., a un pH de 4 la sedimentación es mucho más rápida.

30 Además de las propiedades de sedimentación de las suspensiones de nistatina micronizada, se determinaron las propiedades de sedimentación del material de partida, es decir, nistatina no micronizada con un tamaño de las partículas de alrededor de 3.4 µm para diferentes valores de pH. Las suspensiones de nistatina no micronizada con un pH de 4 a 6 presentaron un porcentaje en volumen por debajo del frente de sedimentación de alrededor de un 25% después de un día. Esto difiere del comportamiento de sedimentación de las suspensiones de nistatina micronizada, donde no se observó prácticamente ninguna sedimentación después de un día. Por consiguiente, se

puede concluir que la tasa de sedimentación de las suspensiones de nistatina micronizada se reduce significativamente en comparación con la de las suspensiones de nistatina no micronizada.

5 La comparación de los resultados anteriores con el potencial zeta medido en el Ejemplo 11 muestra que la tasa de sedimentación se reduce cuando la diferencia entre el pH y el punto isoeléctrico (pI) se incrementa. Este comportamiento se puede explicar por el incremento de la repulsión electrostática con el incremento de la diferencia entre el pH y el pI.

10 Tabla 12: Comportamiento de sedimentación de la nistatina micronizada.

Tiempo (días)	0	0.5	1	2	3	4	7	8	9
pH 4	100%	99.5%	95.9%	91.3%	85.0%	84.0%	75.1%	72.5%	70.1%
pH 5	100%	99.2%	97.0%	94.0%	89.5%	88.9%	84.0%	82.9%	81.6%
pH 6	100%	100%	99.1%	97.8%	95.1%	94.9%	91.5%	90.4%	89.1%
pH 7	100%	100%	99.9%	99.4%	98.1%	97.9%	95.0%	93.0%	91.0%
pH 8	100%	100%	99.9%	99.7%	99.0%	98.8%	96.8%	96.1%	95.7%
pH 9	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
pH 10	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Ejemplo 13

Prueba de estimulación utilizando natamicina micronizada

15 Para evaluar la eficacia de la natamicina micronizada en una aplicación de queso, se llevó a cabo un experimento en el que la superficie de quesos Gouda recién introducidos en salmuera se estimuló con cepas de *Penicillium discolor* y se trató con formulaciones que comprendían natamicina con diferentes tamaños de partícula. La cantidad de esporas de moho que fueron capaces de germinar sobre las superficies tratadas del queso es una indicación de la actividad antifúngica de la natamicina analizada. Se consideró que los quesos (10 por cada tipo de partícula de natamicina) ya no estaban protegidos por la natamicina cuando al menos un 50% de los quesos analizados tenían más de dos colonias en crecimiento.

20 Los quesos se recubrieron con un recubrimiento que contenía el polímero base Craymul 4386 (Cray Valley, Brummen) y que contenía partículas de natamicina. A continuación, los quesos se contaminaron el día cero con *Penicillium discolor* PED1, CR1A y *Penicillium discolor* PED74, L1 con una concentración de $1.1 \times 10^3 / \text{cm}^2$. Los quesos se examinaron visualmente para determinar el crecimiento fúngico a diario durante tres semanas. El experimento se llevó a cabo con tres partículas de natamicina diferentes: partículas de natamicina en forma de discos con un diámetro medio de las partículas de 15 μm ; partículas de natamicina en forma de discos molidas para las que la molienda se detuvo cuando el diámetro medio de las partículas fue de 1.23 μm ; y partículas micronizadas de natamicina con un diámetro medio de las partículas de 0.18 μm . La molienda para ambos productos se llevó a cabo en agua; el pH de la suspensión fue de 5.9; el pH no se fijó con ácido o base. La concentración de natamicina en el recubrimiento fue de 150 ppm o 250 ppm para todas las partículas de natamicina. Como control, se analizaron 10 quesos que no comprendían natamicina en el recubrimiento. Estos quesos tenían un tiempo de protección medio de 5 a 6 días. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

35 A partir de los resultados, se puede concluir que la protección contra el crecimiento fúngico se incrementa cuando se utilizan concentraciones de natamicina más elevadas. Las partículas micronizadas de natamicina proporcionan la protección más prolongada contra el crecimiento de moho. Resulta obvio a partir de los resultados del experimento que una reducción del tamaño de las partículas de natamicina incrementa la protección contra el crecimiento fúngico.

40 Tabla 13. Protección del queso contra el crecimiento fúngico en días.

Cantidad de natamicina (ppm)	Natamicina (15 μm)	Natamicina (1.23 μm)	Natamicina micronizada (0.18 μm)
150	16	-	21
250	18	21	25

45 **Ejemplo 14**

Preparación de una suspensión de partículas micronizadas de cacao en un molino de bolas utilizando un medio de molienda

5 La preparación de las partículas micronizadas se realizó esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2, con la excepción de que se suspendió cacao en polvo (cacao Blooker, Amsterdam, Países Bajos) en agua desmineralizada para obtener una suspensión de cacao al 1% (p/v). Se introdujeron 100 ml de la suspensión obtenida en la cámara de molienda del molino de bolas (Dynomill KDL Special de Bachofen AG, Basilea, Suiza), la cual se llenó hasta un 75% (v/v) con microesferas de óxido de zirconio de 0.3 mm estabilizadas con itrio (Tosoh Corporation, Tokio, Japón). El molino de bolas se operó a 2000 rotaciones por minuto en modo discontinuo. Esto implica que el molino de 10 microesferas se llenó con la suspensión sin circular la suspensión a través del recipiente que estaba conectado con el molino de microesferas. El pH de la suspensión tras la molienda por vía húmeda fue de 6.4. Después de 16 horas de molienda, se obtuvo un tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) de 0.14 μm . El producto de cacao no micronizado presentó un tamaño medio de 22.6 μm , lo cual indica que la molienda por vía húmeda dio como resultado una 15 reducción significativa del tamaño de las partículas.

Ejemplo 15

Propiedades de sedimentación de suspensiones de cacao micronizado

20 El experimento se llevó a cabo esencialmente como para la natamicina (remítase al Ejemplo 7). A un pH de 5 y superior, no se observó ninguna sedimentación significativa en 72 horas. A un pH de 3 y 4, no se observó ninguna sedimentación significativa en 24 horas.

25 Además de las propiedades de sedimentación de las suspensiones de cacao micronizado, se determinaron las propiedades de sedimentación del material de partida, es decir, cacao no micronizado con un tamaño de las partículas de alrededor de 23 μm para unos valores de pH similares a los que se aplicaron en el Ejemplo 7. En un periodo de 24 horas, todas las partículas de las suspensiones para todos los valores de pH se sedimentaron totalmente. Esto difiere del comportamiento de sedimentación de las suspensiones de cacao micronizado, donde no se observó ninguna sedimentación significativa después de 72 horas para valores de pH de 5 y superiores. Por 30 consiguiente, se puede concluir que la tasa de sedimentación de las suspensiones de cacao micronizado se reduce significativamente para ciertos valores de pH en comparación con la de las suspensiones de cacao no micronizado.

Ejemplo 16

Preparación de una suspensión de partículas micronizadas de café en un molino de bolas utilizando un medio de molienda

35 La preparación de las partículas micronizadas se realizó esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2, con la excepción de que se filtró café en polvo (café Douwe Egberts, Utrecht, Países Bajos) a través de un tamiz de 150 40 μm y las partículas finas se suspendieron en agua desmineralizada para obtener una suspensión de café al 1% (p/v). Se introdujeron 100 ml de la suspensión obtenida en la cámara de molienda del molino de bolas (Dynomill KDL Special de Bachofen AG, Basilea, Suiza), la cual se llenó hasta un 75% (v/v) con microesferas de óxido de zirconio de 0.3 mm estabilizadas con itrio (Tosoh Corporation, Tokio, Japón). El molino de bolas se operó a 2000 rotaciones por minuto en modo discontinuo. Esto implica que el molino de microesferas se llenó con la suspensión sin circular la 45 suspensión a través del recipiente que estaba conectado con el molino de microesferas. El pH de la suspensión tras la molienda por vía húmeda fue de 6.9. Después de 8 horas de molienda, se consiguió un tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) de 31 μm . El producto de café no molido presentó un tamaño medio de 76.5 μm , lo cual indica que la molienda por vía húmeda dio como resultado una reducción significativa del tamaño de las partículas. A pesar de ello, el tamaño medio de las partículas fue aún más grande que para otros productos evaluados. Sin embargo, una fracción diferente que representaba un 5.7% p/p del producto estuvo por debajo de 0.2 μm . Para las partículas de 50 café no molidas, ninguna de las partículas fue más pequeña que 0.2 μm . Esto muestra que, mediante la molienda, se puede producir una fracción significativa de partículas de café muy pequeñas. Para la natamicina y nistatina, se observó un claro efecto del tiempo de molienda sobre la reducción del tamaño promedio de las partículas. Por consiguiente, se puede concluir que unos tiempos de molienda más prolongados para las partículas de café podrían 55 dar como resultado una reducción adicional del tamaño de las partículas.

Tabla 14. Distribución de tamaños de partículas para partículas de café molidas y no molidas

Tamaño de las partículas (μm)	Café no molido (% p/p)	Café molido (% p/p)
0 - 0.2	0.0	5.7
0.2 - 0.8	0.3	3.0
0.8 - 2.0	1.1	2.7
2.0 - 5.0	1.2	6.6

Tamaño de las partículas (μm)	Café no molido (% p/p)	Café molido (% p/p)
5.0 - 10.0	1.6	12.9
10.0 - 50.0	35.9	59.1
50.0 - 200.0	59.8	10.2

Ejemplo 17**Propiedades de sedimentación de suspensiones de café molido**

5 El experimento se llevó a cabo esencialmente como para la natamicina (remítase al Ejemplo 7). El producto molido formó un sedimento en ciertas condiciones de pH. A un pH de 5 y superior, no se observó ninguna sedimentación significativa en 24 horas. A un pH más bajo, p. ej., un pH de 3 y un pH de 4, la sedimentación fue significativa en 24 horas.

10 Además de las propiedades de sedimentación de las suspensiones de café micronizado, se determinaron las propiedades de sedimentación del material de partida, es decir, café no micronizado con un tamaño de las partículas de alrededor de 76 μm para unos valores de pH similares a los que se aplicaron en el Ejemplo 7. En un periodo de 24 horas, todas las partículas de las suspensiones para todos los valores de pH se sedimentaron totalmente. Esto difiere del comportamiento de sedimentación de las suspensiones de café micronizado, donde no se observó ninguna sedimentación significativa después de 24 horas para valores de pH de 5 y superiores. Por consiguiente, se puede concluir que la tasa de sedimentación de las suspensiones de café micronizado se reduce significativamente para ciertos valores de pH en comparación con la de las suspensiones de café no micronizado.

15

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para preparar una suspensión estable de partículas micronizadas de natamicina en ausencia de un estabilizador, comprendiendo el método los pasos de:
- a) someter la natamicina a una molienda por vía húmeda a diferentes valores de pH para obtener suspensiones de partículas micronizadas de natamicina que tengan cada una un valor diferente de pH, o someter la natamicina a una molienda por vía húmeda a un valor de pH y ajustar el pH de la suspensión después de la molienda para obtener suspensiones de partículas micronizadas de natamicina que tengan cada una un valor diferente de pH,
- 10 b) medir el potencial zeta de las suspensiones obtenidas y determinar cuál de las suspensiones obtenidas tiene un potencial zeta de 10 mV o superior o -20 mV o inferior, y
- c) preparar una suspensión de partículas micronizadas de natamicina sometiendo la natamicina a una reducción de tamaño mediante una molienda por vía húmeda en condiciones de pH, donde la suspensión tiene un potencial zeta de 10 mV o superior o -20 mV o inferior de acuerdo con el paso b).
- 15 **2.** Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la suspensión comprende una fuerza iónica inferior a 0.50 M.
- 3.** Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la molienda por vía húmeda en el paso a) y/o el paso c) se lleva a cabo utilizando un medio de molienda.
- 20 **4.** Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la molienda por vía húmeda en el paso a) y/o el paso c) va precedida por una trituración por vía seca.
- 5.** Un método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que comprende además el paso de separar físicamente el medio de molienda y las partículas micronizadas.
- 25 **6.** Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además el paso de formular la suspensión de partículas micronizadas de natamicina en un producto.
- 30 **7.** Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que las partículas micronizadas tienen un diámetro medio de las partículas de 1 µm o inferior.
- 8.** Una suspensión de partículas micronizadas de natamicina, que se puede obtener mediante el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 35 **9.** El uso de la suspensión de acuerdo con la reivindicación 8 para producir una suspensión concentrada, una pasta, un polvo, un recubrimiento, una película o una lámina.
- 10.** Un método para producir una suspensión concentrada, una pasta, un polvo, una película, un recubrimiento o una lámina que comprende partículas micronizadas de natamicina, donde el método comprende utilizar una suspensión de partículas micronizadas de acuerdo con la reivindicación 8.
- 40 **11.** Una suspensión concentrada, una pasta, un polvo, una película, un recubrimiento o una lámina que se puede obtener mediante el método de acuerdo con la reivindicación 10.
- 45 **12.** Un polvo de acuerdo con la reivindicación 11, donde el polvo proporciona una suspensión estable de partículas micronizadas cuando se dispersa en un líquido.
- 13.** El uso de una suspensión de partículas micronizadas de acuerdo con la reivindicación 8 o una suspensión concentrada, una pasta, un polvo, una película, un recubrimiento o una lámina de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 en la industria alimentaria o de piensos, en horticultura, en agricultura o en la industria farmacéutica.
- 50 **14.** Un producto alimentario, producto de pienso, producto de horticultura, producto agrícola o producto farmacéutico que comprenda una suspensión de partículas micronizadas de acuerdo con la reivindicación 8 o una suspensión concentrada, una pasta, un polvo, una película, un recubrimiento o una lámina de acuerdo con la reivindicación 11 o 12.
- 55