

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 488**

51 Int. Cl.:

A23L 33/105 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61J 3/07 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2015** **E 15382389 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** **EP 3123874**

54 Título: **Formulaciones que comprenden glucosinolatos y mirosinasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.09.2018

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN TECNALIA RESEARCH &
INNOVATION (100.0%)
Parque Científico y Tecnológico de Gipuzkoa,
Mikeletegi Pasealekua, 2
20009 San Sebastian (Gipuzkoa), ES**

72 Inventor/es:

**SÁENZ GÓMEZ, JESSICA;
OLIVER GARCÍA, LAURA y
VILLARÁN VELASCO, MARÍA CARMEN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 681 488 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

Formulaciones que comprenden glucosinolatos y mirosinasa

5 Campo de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de los alimentos y suplementos nutricionales funcionales. Se refiere a una formulación que comprende microcápsulas que comprenden un núcleo que comprende un extracto rico en glucosinolatos obtenido a partir de crucíferas y un biopolímero, y una cubierta entérica que comprende mirosinasa y un biopolímero. La invención se refiere asimismo a un procedimiento para su obtención y al uso de la formulación como tal, o en alimentos y suplementos dietéticos para seres humanos o animales por su contenido de glucosinolatos, precursores del sulforafano con actividad inmunoestimulante.

Antecedentes de la invención

Los glucosinolatos son un grupo de glucósidos almacenados en el interior de las vacuolas celulares de todos los vegetales de plantas dicotiledóneas, y son especialmente abundantes en la familia de las Brassicaceae (crucíferas). Ejemplos de estas verduras son el brócoli, las coles de Bruselas, la coliflor, la col rizada, los nabos, los rábanos, los berros, etc., destacando por su contenido de glucosinolatos, el brócoli y las coles de Bruselas. El contenido de glucosinolatos de las plantas depende de la especie y de las condiciones ambientales y agrícolas de crecimiento, así como del proceso de transformación y preparado seguido tras su recolección.

Los glucosinolatos no exhiben actividad biológica, sin embargo existe una reacción a través de la cual la enzima mirosinasa (tioglucosidasa glucohidrolasa), que también se encuentra en las células vegetales, es capaz de catalizar estos compuestos hacia varios productos hidrolizados, incluyendo isotiocianatos e índoles.

Entre estos isotiocianatos destaca el sulforafano con conocida actividad inmunoestimulante que puede desempeñar un papel protector y preventivo frente a enfermedades de alta incidencia como enfermedades cardiovasculares, cáncer de pulmón y vejiga, tumores y enfermedades gastrointestinales o diabetes. El sulforafano, contribuye a incrementar la actividad de la enzima glutatión S-transferasa que interviene en el metabolismo del glutatión, un importante antioxidante del cuerpo humano

Desgraciadamente, el sulforafano no se puede suministrar directamente en la dieta con la intención de obtener un efecto inmunoestimulante, puesto que es un compuesto inestable que hace inviable esta opción.

Tanto los glucosinolatos, concretamente y como mayoritario la glucorafanina, como la mirosinasa son segregados por la propia planta pero no pueden reaccionar de manera espontánea entre ellos en el interior de la planta, pues se encuentran físicamente separados entre sí. La reacción comienza cuando la planta es masticada o cortada, ya que esta acción produce un daño celular que hace que ambos compuestos entren en contacto. Por otra parte, cuando las plantas son cocinadas, la mirosinasa es inactivada, (al menos parcialmente), y en consecuencia, la producción de sulforafano desciende o incluso desaparece.

Aunque la flora intestinal es capaz de transformar los glucosinolatos, concretamente la glucorafanina ingerida en sulforafano, este proceso es poco eficiente en ausencia de mirosinasa activa. Puesto que la ingestión de glucosinolatos suele producirse tras el procesado y/o cocinado de la planta, la presencia de mirosinasa activa es muy baja y la eficiencia en el proceso de conversión de glucorafanina ingerida en sulforafano también es muy baja. Por lo tanto, a día de hoy resulta prácticamente imposible conseguir llegar a cumplir con la ingesta de la cantidad recomendada de estos compuestos a través de la dieta.

Recientemente en la técnica anterior se han divulgado algunos desarrollos alimenticios que han intentado solucionar este problema con la adición directa de los glucosinolatos y la enzima. En este contexto, la solicitud WO2012/074412 A1 describe una composición oral que consiste en una combinación encapsulada de polvos o extracto de planta y de una enzima. Esta alternativa, sin embargo, no detalla una separación efectiva del extracto y la mirosinasa, pudiendo reaccionar antes de llegar al intestino grueso donde se asimila, por lo que no se garantiza la estabilidad y funcionalidad de los compuestos.

Con el objetivo de lograr una mayor bioactividad de los glucosinolatos, se han propuesto otras soluciones para protegerlos hasta su lugar de asimilación. Estas soluciones van desde extrusionados directos de alimentos con los extractos incluidos como se describe en US 2008/0311192 A1, hasta su encapsulación directa por secado por pulverización. Otras soluciones consisten en formulados en los que los extractos y la mirosinasa son encapsulados separadamente, generalmente mediante secado por pulverización (WO 2012/116018 A1, WO2013/179056 A1) o incluso conjuntamente mediante un proceso de encapsulación del extracto y posteriores etapas de recubrimiento de uno o varios materiales para lograr la adecuada inclusión de mirosinasa en el producto y evitar su contacto con los glucosinolatos (EP 2213280 A1).

Los documentos US 2013/323225 A1, US 2015/118306 A1 y US 2008/226772 A1 también divulgan varios

procedimientos de encapsulación. Todas estas soluciones, requieren el empleo de dos o más procesos consecutivos de encapsulado y recubrimiento, para lograr un producto con el que poder proporcionar a un ser humano o un animal sulforafano, lo que complica y encarece su proceso de obtención.

- 5 A la vista de lo anterior existe la necesidad en el estado de la técnica de proporcionar un nuevo procedimiento sencillo y económico que permita la obtención de una formulación alternativa, estable, que permita suministrar eficazmente el sulforafano a un ser humano o un animal.

Descripción de los dibujos

10

Figura 1: se muestran los resultados de UPLC-MS del Ejemplo 5.

Descripción de la invención

- 15 En un primer aspecto, la invención se refiere a una formulación de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. El núcleo comprende un biopolímero, preferentemente un polisacárido, y más preferentemente alginato. El biopolímero es, preferentemente, de calidad alimentaria.

- 20 El extracto rico en glucosinolatos se obtiene a partir de plantas de la familia de las Brassicaceae (crucíferas). Algunos ejemplos de plantas de esta familia son el brócoli, las coles de Bruselas, el repollo, la coliflor, la col rizada, los nabos, los rábanos, los berros, etc. En una realización preferente la planta de la que se obtiene el extracto rico en glucosinolatos es el brócoli.

- 25 El extracto puede obtenerse de cualquier parte de la planta que contenga glucosinolatos, por ejemplo, de los tallos y los floretes. En una realización preferente se utilizan los tallos y/o los restos de floretes, no procesados por la industria alimentaria, que constituyen un subproducto de esta industria. En una realización más preferente se utilizan los tallos y/o los restos de floretes de brócoli. Esta realización proporciona una ventaja adicional ya que permite el aprovechamiento de un subproducto, cuya acumulación constituye un problema para la industria, revalorizándolo y generando una fuente de ingresos adicionales. Además, su aprovechamiento se alinea con las políticas de aprovechamiento eficiente de recursos naturales.

- 30 El término "extracto rico en glucosinolatos" en la presente invención debe entenderse en el sentido de que éste contiene mayor cantidad de glucosinolatos de la que tiene el mismo peso del producto natural del que se obtiene. El grado de enriquecimiento del extracto variará dependiendo de factores como, por ejemplo, el propio proceso de obtención del extracto, de la planta de la que se obtiene, de la parte de la planta, de si se concentra, etc. No hay ninguna especial limitación respecto al grado de enriquecimiento del extracto que puede utilizarse.

- 35 El extracto rico en glucosinolatos que se utiliza en la presente invención puede ser el que proviene directamente de un procedimiento de extracción de la planta, y puede ser el extracto resultante de un posterior clarificado, blanqueado, y/o concentrado, como se expone más abajo.

- 40 El recubrimiento comprende la enzima mirosinasa y al menos un biopolímero. El recubrimiento puede comprender más de un biopolímero, por ejemplo dos, tres o más. El recubrimiento debe ser entérico. En una realización particular el recubrimiento comprende una mezcla de alginato-quitosano. En otra realización particular comprende pectina. En otra realización particular comprende una mezcla de alginato y pectina.

La mirosinasa puede adquirirse de forma comercial (por ejemplo de Sigma Aldrich T4528).

- 50 El hecho de que el recubrimiento de las microcápsulas sea entérico permite que las microcápsulas puedan discurrir por el tracto gastrointestinal y lleguen intactas al intestino grueso, lugar donde tiene lugar la asimilación del sulforafano

- 55 La relación en peso entre el extracto rico en glucosinolatos y la mirosinasa en la formulación puede variar entre amplios márgenes. Sin embargo, en una realización particular, la relación es tal, que la cantidad de enzima está en una relación entre, 5-50 %, preferentemente entre 10-45 %, más preferentemente entre 20-40 % en peso respecto a la cantidad de glucorafanina presente en el extracto empleado en el núcleo.

- 60 La relación en peso entre el biopolímero del núcleo y el extracto puede variar en un amplio rango. Normalmente la relación está entre 0,5 %-5 % de biopolímero y 95 %-99,5 % de extracto, preferentemente 1 %-3 % de biopolímero y 97 %-99 % de extracto

- 65 El número de capas mínimo de las microcápsulas de la invención es de dos, una interior o núcleo y una exterior o recubrimiento. No obstante las microcápsulas pueden comprender una o más capas adicionales iguales o diferentes entre sí. De acuerdo con una realización particular las microcápsulas presentan una tercera capa que recubre el recubrimiento. En una realización más particular, esta tercera capa puede aplicarse para incrementar la estabilidad de las microcápsulas frente a temperatura. Esta capa comprende en una realización particular una cera.

La presencia de glucosinolatos y mirosinasa en capas separadas evita la interacción y por tanto la reacción entre ellos dando lugar a una formulación estable. El término “estable” referido a la formulación se refiere a que se garantiza la integridad de estos precursores para la formación de un sulforafano biodisponible y funcional, esto es, que los glucosinolatos y la mirosinasa permanecen intactos hasta que la formulación llega al intestino grueso, lugar donde se rompen las microcápsulas, y donde se produce la asimilación de sulforafano.

Pero además, se ha comprobado que la formulación también es estable frente a la temperatura en un amplio intervalo. Así, se ha observado que la formulación que comprende microcápsulas que presentan solo el núcleo y el recubrimiento, es ventajosamente estable a temperaturas superiores a 4 °C, como por ejemplo a temperatura ambiente (normalmente entre 15 y 30 °C).

La forma de la formulación puede ser diversa según sea su grado de humedad: En estado húmedo, recién obtenida, presenta el aspecto de esferas uniformes de gelatina y en estado seco presenta el aspecto de un polvo.

La formulación puede comprender también compuestos auxiliares útiles para la formulación que modifiquen algunas de sus propiedades tales como la estabilidad de almacenamiento, la percepción visual, la estabilidad física, valor nutricional, etc. Los compuestos auxiliares preferentemente también se seleccionan de entre aquellos compuestos que pueden utilizarse para su aplicación en alimentos y suplementos alimenticios. La cantidad de compuestos auxiliares puede variar en función de cada caso particular entre amplios márgenes. Ejemplos ilustrativos, pero no limitativos de auxiliares son antioxidantes, colorantes, saborizantes, vitaminas, y mezclas de los mismos.

Obtención del extracto:

El extracto rico en glucosinolatos puede prepararse de forma previa por cualquier método convencional conocido para un experto, tal como por extracción con un disolvente adecuado, o por extracción con fluidos supercríticos.

Cualquier parte de la planta crucífera es útil como por ejemplo floretes, tallos, etc., aunque en una realización particular, se parte de un subproducto de la planta, como por ejemplo tallos y restos de floretes. El empleo de los tallos y restos de floretes de brócoli constituye una ventaja adicional en el procedimiento de la invención ya que éstos constituyen restos o subproductos del procesado industrial en transformados (conservas, congelados, etc.), y tienen un elevado contenido de glucosinolatos. Por lo tanto, la utilización de estos subproductos adecuadamente tratados para evitar el deterioro de sus principios activos como materia prima para la obtención del extracto de glucosinato es una opción ventajosa que revaloriza estos subproductos y evita su desecho.

En una realización particular, el extracto se obtiene por extracción sólido/líquido, donde el disolvente empleado es alcohol, o una mezcla de alcohol y agua. En una realización preferente el alcohol es etanol. En una realización particular la relación en volumen alcohol:agua está comprendida entre 100:0 y 70:30, por ejemplo 80:20.

Los extractos resultantes de un procedimiento de extracción pueden filtrarse a continuación para eliminar restos sólidos en suspensión. Asimismo, opcionalmente un extracto obtenido puede clarificarse o blanquearse, o clarificarse y blanquearse, para eliminar su coloración y/o reducir impurezas como por ejemplo proteínas.

La clarificación del extracto se lleva a cabo por tratamiento del mismo en medio ácido. Concretamente, mediante la adición de un ácido, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido ascórbico o ácido acético hasta alcanzar un pH ácido de entre 2 y 3 normalmente. A continuación, se deja precipitar el extracto resultante, se centrifuga y se devuelve el pH a su valor original. El blanqueamiento se realiza por ejemplo haciendo pasar la solución del extracto a través de carbón activo con objeto de eliminar el color de la solución y obtener una solución transparente.

El blanqueamiento y la clarificación se pueden llevar a cabo sucesivamente o de forma individual.

Procedimiento de obtención de la formulación:

La formulación de la invención se obtiene mediante la aplicación de la técnica de vibración con un equipo de encapsulación. Esta técnica se basa en el principio de que un chorro de líquido que fluye en régimen laminar por el interior de una boquilla, se fracciona en gotitas de igual tamaño por efecto de una vibración. Estas microgotas caen a una solución o baño de gelificación adecuadamente formulado produciéndose su gelificación y consecuente formación de las microcápsulas.

En el caso de la presente invención, el equipo de encapsulación utilizado comprende un sistema de boquilla doble concéntrica, de tal manera que en todo momento se hacen circular dos soluciones diferentes por su interior, una primera solución, que da lugar al núcleo y que se hace circular por la boquilla interior, y una segunda solución, que da lugar a la capa externa y que se hace circular simultáneamente por la boquilla exterior. Cuando las microgotas formadas caen en el interior de una solución gelificante dan lugar a las microcápsulas de doble capa tipo núcleo/recubrimiento de la invención.

El procedimiento de la invención comprende, por tanto, utilizar un equipo de encapsulación que comprende un

sistema de boquilla doble concéntrica y las etapas de:

- a) Preparar una primera solución de al menos un biopolímero y extracto rico en glucosinolatos;
- b) Preparar una segunda solución de al menos un biopolímero y mirosinasa;
- c) Hacer fluir la primera solución por la boquilla interior y la segunda solución por la boquilla exterior de manera simultánea y aplicando vibración al chorro de líquido que fluye en régimen laminar, y
- d) Dejar caer las microgotas formadas en un baño de gelificación, y en su caso sumergir las microgotas gelificadas en una solución adicional que contiene un biopolímero entérico.

En la etapa a) de preparación de una solución de al menos un biopolímero y extracto rico en glucosinolatos la proporción biopolímero y extracto es como se ha descrito anteriormente. En una realización preferente el biopolímero es alginato, y más preferentemente la relación en peso de alginato extracto es una relación de entre 0,5 %-5 % de alginato y 99,5 %-95 % de extracto, preferentemente entre 1-3 % de alginato y 99-97 % de extracto.

En la etapa b) se prepara una segunda solución de al menos un biopolímero y mirosina. En una realización particular dicho biopolímero es alginato. En otra realización particular el biopolímero es pectina.

Para la etapa c) se puede utilizar cualquier equipo de encapsulación convencional provisto de un sistema de boquilla doble concéntrica. Se hace pasar de manera simultánea la primera solución preparada en a) por la boquilla interior y la segunda solución preparada en b) por la boquilla exterior aplicando vibración, de modo que se generan microgotas.

El tamaño de las boquillas concéntricas puede variar y en función del mismo, y de otros parámetros del proceso, como la frecuencia de vibración, la velocidad del fluido y la presión de aire, podrá variar también el tamaño de las microcápsulas que se obtienen. Normalmente el tamaño de la boquilla es de 200 μm la interior y 300 μm la exterior. La primera solución se carga en la jeringa del equipo, y se bombea a través de la boquilla interior controlando la velocidad de la bomba. Velocidades típicas de la bomba están comprendidas entre 3 y 10 ml/min. La segunda solución se hace pasar por la boquilla exterior controlando el flujo mediante presión de aire. La presión de aire generalmente está comprendida entre 0,05 y 0,2 MPa (0,5 y 2 bar).

La frecuencia de vibración que se aplica al sistema de boquilla doble concéntrica puede variar, aunque generalmente está comprendida entre 1000 y 7000 Hz.

En la siguiente etapa d), se dejan caer las microgotas así formadas en un baño de gelificación que comprende cloruro cálcico. El baño de gelificación se mantiene preferentemente con agitación para permitir la suspensión de las microcápsulas que se forman en él.

El baño de gelificación puede ser preparado fácilmente por un experto en la materia en función de cómo sea la segunda solución y teniendo en cuenta el carácter entérico que deben tener las microcápsulas.

En este sentido, si el biopolímero que se utiliza para la segunda solución no es entérico (alginato, por ejemplo) es necesario incorporar a el recubrimiento un biopolímero entérico. Como biopolímero entérico entonces se puede incorporar un biopolímero que no interacciona con el cloruro de calcio, por ejemplo quitosano, o un biopolímero que interaccione con ClCa_2 como por ejemplo pectina. Así, de acuerdo con una realización particular cuando se incorpora quitosano, el baño de gelificación puede incorporar ClCa_2 y el quitosano, y no es necesario utilizar ninguna solución adicional en la etapa d). De acuerdo con otra realización particular cuando se incorpora a el recubrimiento un biopolímero que interacciona con el ClCa_2 , como pectina, la etapa d) comprende gelificar las microgotitas en un baño de gelificación que contiene ClCa_2 , y a continuación es necesario sumergirlas en una solución que contiene dicho biopolímero (por ejemplo, pectina).

Por tanto en una realización particular del procedimiento, la segunda solución comprende alginato y mirosinasa, y el baño de gelificación comprende una solución con cloruro cálcico, quitosano y un ácido débil para regular el pH, como por ejemplo, ácido acético. Un ácido débil se refiere en la presente invención a un ácido que no está completamente dissociado en solución acuosa. En otra realización particular, la segunda solución comprende pectina y el baño de gelificación comprende una solución con cloruro cálcico, preferentemente en concentración igual o superior al 9 % en peso.

En otra realización particular, la segunda solución comprende alginato como biopolímero, el baño de gelificación comprende una solución con cloruro cálcico. En este caso posteriormente las microcápsulas son tratadas en una solución adicional que comprende pectina para proporcionarles el carácter entérico.

El resultado del procedimiento es la obtención de una formulación según la invención que comprende microcápsulas uniformes y esféricas. Inicialmente la formulación se obtiene en húmedo.

El tamaño de las microcápsulas en húmedo se ha determinado y está normalmente comprendido entre 300 y 1000 micrómetros de diámetro, aunque no limitado a este intervalo. La distribución de tamaños es en una realización

particular reducida y uniforme.

En una realización particular el tamaño en húmedo está entre 600-900 micrómetros. El tamaño no se considera una característica esencial de las microcápsulas de la invención.

El procedimiento de la invención comprende además opcionalmente una etapa adicional de secado. El secado reduce la actividad del agua y aumenta la vida útil de las microcápsulas. Éstas después del secado, tienen forma de un polvo. El secado puede hacerse de cualquier manera convencional, como lecho fluido, liofilización, secado por aire, a vacío, etc. En una realización particular se emplea un lecho fluido, y se lleva a cabo a temperatura igual o inferior a 30 °C, durante un tiempo variable, normalmente de entre 10 y 20 minutos.

En una realización preferente, los materiales utilizados para la obtención de la formulación de la invención son de grado alimentario.

La formulación se puede utilizar en alimentos, tanto para seres humanos como para animales, y como suplemento dietético.

Por ello, en un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de la formulación de la invención en un alimento.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de la formulación de la invención en un suplemento dietético.

En el contexto de la invención, un alimento, se refiere a productos alimenticios líquidos, semisólidos, sólidos, así como en forma de pasta o gel y similares. Los productos alimenticios comprenden alimentos para los seres humanos, así como para los animales y constituyen un aspecto adicional de la invención.

Un suplemento dietético, también conocido como complemento alimenticio o suplemento nutricional, es un preparado destinado a suministrar nutrientes, como vitaminas, minerales, ácidos grasos, aminoácidos etc., que faltan o no se consumen en cantidad suficiente en la dieta de una persona o animal. En un aspecto adicional, la invención se refiere a un suplemento dietético que comprende la formulación de la invención.

El producto alimenticio puede estar en una forma lista para consumir, lo que significa una forma, que es adecuada para comer sin más procesamiento. Pero también es posible que el producto alimenticio esté en una forma que necesita más procesamiento para dar lugar al producto a ingerir, por ejemplo calentamiento, disolución, etc.

Los productos alimenticios destinados a seres humanos pueden ser cualesquiera. Ejemplos ilustrativos son bebidas instantáneas, tabletas efervescentes, barras (cereales, chocolate), productos lácteos, alimentos preparados, o alimentos deshidratados, como sopas de paquete, tabletas, aperitivos etc.

Los productos alimenticios para animales (productos de alimentación) pueden estar en cualquier forma comúnmente utilizada en este tipo de alimentación.

Ejemplos

Se utilizó un equipo de encapsulación: Inotech IE50-R de la firma Inotech Encap Bio Systems Inc.

Ejemplo 1. Preparación de microcápsulas bicapa (núcleo/recubrimiento) de extracto de brócoli rico en glucosinolatos con alginato en el núcleo y mirosinasa y alginato-quitosano en el recubrimiento.

Etapas 1. Estabilización y pretratamiento del subproducto de brócoli.

Escaldado de los tallos de brócoli durante 5-10 minutos a 80-95 °C, enfriamiento con agua vaporizada, y ultracongelación durante unos 5-15 min. Conservación a -20 °C hasta su procesamiento. De manera previa a la realización de la extracción, el subproducto congelado es secado a vacío por diversas vías, entre ellas liofilización, y posteriormente triturado.

Etapas 2. Obtención del extracto rico en glucosinolatos

Obtención del extracto rico en glucosinolatos mediante extracción sólido/líquido empleando disolvente y el polvo de brócoli obtenido en la etapa anterior. La Proporción de polvo/líquido varía entre 25-75 g de polvo por cada 2 litros de solvente. Con ello se obtiene un extracto con una concentración de glucosinolatos de entre 200 y 400 mg/l, siendo el contenido de glucorafanina entre un 50-85 % en peso de los mismos.

El disolvente empleado es una mezcla etanol:agua en proporciones 80:20. La temperatura de extracción fue la temperatura ambiente y el tiempo de extracción fue de 30 minutos.

Etapas 3. Concentración del extracto

El extracto obtenido en la etapa 2 es filtrado para eliminar sólidos en suspensión y la solución resultante se concentra mediante destilación a vacío, a temperatura entre 20-40 °C y 3000-4000 Pa. El extracto resultante posee una concentración entre 1150 y 4000 mg/l de glucosinolatos, con un porcentaje de glucorafanina de entre el 50 y el 85 %.

Etapas 4. Clarificación del extracto

La clarificación del extracto es opcional y se puede realizar por dos métodos.

El primero se llevó a cabo por tratamiento del mismo en medio ácido, mediante la adición de ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido ascórbico o ácido acético hasta alcanzar un pH:2-3. Se dejó actuar entre 20-40min hasta que precipitó, se centrifugó a 4000rpm durante 15-30 minutos y se devolvió al pH original de la muestra con NaOH 0,1M.

El segundo se realizó con carbón activo, haciendo pasar el extracto por un cartucho comercial Superclean ENVI-Carb SPE Tube

Etapas 5. Microencapsulación del extracto

Desarrollo de microcápsulas por la tecnología de vibración anteriormente descrita.

Las microcápsulas obtenidas constan de un núcleo de alginato y el extracto rico en glucosinolatos y una cubierta de alginato, quitosano y mirosinasa.

Se empleó para ello como material para el núcleo una solución de alginato y extracto rico en glucosinolatos procedente de la etapa 3 o 4 en una relación de alginato:extracto de entre 1:99 y 3:97 en peso. Los materiales empleados para el recubrimiento fueron una solución de alginato de concentración entre 1 y 3 % en peso, y mirosinasa presente en una cantidad tal que la enzima se encontraba en una proporción de entre 20 y 40 % en peso respecto a la cantidad de glucorafanina presente en el extracto empleado en el núcleo.

El baño de gelificación incorporaba entre 1-3 % en peso de CaCl_2 , entre 0,2-1 % en peso de quitosano y ácido acético para lograr una solución de pH entre 3-4 que permitió obtener las microcápsulas entéricas.

Los parámetros de encapsulación fueron:

- Un sistema de boquilla doble concéntrica: 200-300 μm de diámetro la boquilla interior y exterior respectivamente
- Presión de aire 0,05 y 0,1 MPa (0,5-1 bar)
- Velocidad bomba 200-300 (4-7,5 ml/min)
- Frecuencia de vibración 2000-5300Hz

Por la boquilla interior se hizo pasar la solución mezcla de alginato y extracto rico en glucosinolatos y por la boquilla exterior se hizo pasar la solución de alginato con mirosinasa.

Para hacer la solución mezcla de alginato y extracto, al extracto rico en glucosinolatos se le añadió alginato y se colocaron en la jeringa del equipo Inotech unos 50mL y se bombearon a través de la boquilla interior controlando la velocidad de la bomba.

Simultáneamente, se hizo pasar por la parte exterior de la boquilla la solución de mirosinasa y alginato controlando el flujo mediante la presión de aire.

Las gotas formadas por ambas soluciones cayeron en un baño de gelificación en agitación, donde tuvo lugar la formación de la microcápsula núcleo/cubierta.

Ejemplo 2. Preparación de microcápsulas bicapa (núcleo/recubrimiento) de extracto de brócoli rico en glucosinolatos con alginato en el núcleo y mirosinasa y alginato-pectina en el recubrimiento.

Las Etapas 1, 2 y 3 fueron las mismas que en el Ejemplo 1.

Etapas 5. Microencapsulación del extracto

La microcápsula consta de un núcleo de alginato y extracto rico en glucosinolatos y una cubierta de alginato, pectina y mirosinasa.

Se empleó para formar el núcleo una solución de alginato y extracto procedente de la etapa 3 en una relación de

alginato:extracto de entre 1:99 y 3:97 en peso. Los materiales empleados para la capa externa fueron una solución de alginato de concentración entre 1 y 3 % en peso, y mirosinasa presente en una cantidad tal que la enzima se encontraba en una proporción de entre 20 y 40 % en peso respecto a la cantidad de glucorafanina presente en el extracto empleado en el núcleo.

El baño de gelificación fue una solución con entre 1-3 % en peso de CaCl_2 . Posteriormente las microcápsulas gelificadas se sumergieron en una solución con entre 0,1-1 % en peso de pectina para obtener las microcápsulas entéricas.

Los parámetros de encapsulación fueron los mismos del Ejemplo 1.

Ejemplo 3. Preparación de microcápsulas bicapa (núcleo/cubierta) de extracto de brócoli rico en glucosinolatos con alginato en el núcleo y mirosinasa y pectina en el recubrimiento

Las Etapas 1, 2 y 3 fueron las mismas del Ejemplo 1.

Etapas 4. Microencapsulación del extracto

La microcápsula tiene un núcleo de alginato y glucosinolatos y un recubrimiento de pectina y mirosinasa.

Se empleó para el núcleo una solución de alginato y extracto procedente de la etapa 3 en una relación de alginato:extracto de entre 1:99 y 3:97 en peso. Los materiales empleados para el recubrimiento fueron una solución de pectina de concentración entre 3 y 6 % en peso, y mirosinasa presente en una cantidad tal que la enzima se encontraba en una proporción de entre 20 y 40 % en peso respecto a la cantidad de glucorafanina presente en el extracto empleado en el núcleo.

El baño de gelificación consistió en una solución de CaCl_2 con una concentración del 10 %.

Los parámetros de encapsulación fueron:

- Sistema de boquilla doble concéntrica: 200-300 μm de diámetro la boquilla interior y exterior respectivamente
- Presión de aire 0,5-1 bar
- Velocidad bomba 200-300 (4-7,5 ml/min)
- Frecuencia de vibración 3000-7000Hz

Ejemplo 4. Prueba de estabilidad de la formulación de la invención en el tracto gastrointestinal

Para lograr la correcta funcionalidad de la formulación es necesario que las microcápsulas soporten las condiciones ácidas del estómago, permanezcan intactas durante toda su estancia en el intestino delgado y se liberen, el extracto y la enzima, en el intestino grueso.

Para verificar esto, las microcápsulas desarrolladas han sido sometidas a un proceso de simulación gástrica e intestinal.

En primer lugar, las microcápsulas fueron secadas utilizando un lecho fluido modelo Uni-Glatt de la firma Glatt GmbH System. La temperatura máxima de secado fue de 30 °C durante un máximo de 15 minutos.

Para esta prueba, se llevó a cabo con las microcápsulas secas obtenidas y se analizó el efecto del pH y de la sal biliar en ellas.

-Efecto del pH:

Se preparó una solución acuosa con un 0,9 % en peso de NaCl, 3 g/l de pepsina y se ajustó el pH a 2 con 0,08M HCl o 0,1 M NaOH. Se tomaron 25 mililitros de esta solución y se añadieron entre 0,2 y 0,4 g de microcápsulas obtenidas según el Ejemplo 1.

Se mantuvieron en agitación durante dos horas, a 37 °C. A continuación se recoge una alícuota y se lleva a cabo el análisis de los compuestos de interés (glucorafanina y sulforafano) por cromatografía líquida de ultrapresión en tándem con espectrómetro de masas (UPLC-MS: Acquity H-class Waters).

No se detectó presencia ni de glucorafanina ni de sulforafano, lo que implica que las microcápsulas no se habían roto y permanecían estables.

-Efecto de la sal biliar:

Se preparó una solución de 3 g de bilis en un litro en una solución intestinal (6,5 g/l NaCl; 0,835 g/l KCl, 0,22 g/l

CaCl₂ y 1,386 g/l NaHCO₃) a pH 7,5 ajustado con HCl y NaOH.

5 Se añadieron 25 mililitros de esta solución a la solución procedente del análisis del efecto del pH del apartado anterior y se mantuvo en agitación durante 2h a 37 °C. Se tomó una muestra de la solución para analizar los compuestos (glucorafanina y sulforafano) en el UPLC-MS. No se detectó presencia de glucorafanina ni de sulforafano, lo que supone que las microcápsulas no se habían roto y permanecían estables.

10 Las microcápsulas se separaron del medio y se añadieron en una solución de tampón fosfato, simulando el intestino grueso, donde permanecieron en agitación a 37 °C. El análisis posterior del medio y concretamente del contenido de glucorafanina y sulforafano demostraron que las cápsulas se habían roto. Ello pone de manifiesto el carácter entérico de las mismas.

15 **Ejemplo 5.** Rotura de microcápsulas secas y análisis de la reacción extracto mirosinasa para la producción de sulforafano

Entre 0,5 y 1 g de microcápsulas obtenidas según Ejemplo 1 se añadieron a 25 ml de citrato de sodio 0,1M para lograr la total rotura de las microcápsulas.

20 Paralelamente, se analizaron por UPLC-MS los compuestos generados al poner en contacto el extracto rico en glucorafanina y la mirosinasa a 37 °C. Se observó como la glucorafanina (GLF) fue reaccionando progresivamente con la mirosinasa y disminuyendo su presencia, y como se fue formando y detectando el sulforafano (SFN). (Véase la Figura 1 donde se representa el porcentaje en peso de los compuestos GLF y SFN frente al tiempo (minutos).

REIVINDICACIONES

1. Una formulación que comprende microcápsulas que comprenden dos capas: (i) un núcleo o parte central interior que comprende un extracto rico en glucosinolatos y al menos un biopolímero, que es un polisacárido, y (ii) un recubrimiento entérico o capa exterior que rodea al núcleo y que comprende mirosinasa y al menos un biopolímero.
2. Formulación según la reivindicación 1 en la que el extracto rico en glucosinolatos es obtenido a partir de una planta crucífera.
3. Formulación según la reivindicación 2, en la que la planta es brócoli.
4. Formulación según las reivindicaciones 1 o 3, en la que el polisacárido del núcleo es alginato.
5. Formulación según una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el biopolímero del recubrimiento se selecciona de entre (i) alginato-quitosano, (ii) pectina y (iii) alginato- pectina.
6. Formulación según una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la relación en peso entre extracto rico en glucosinolatos y mirosinasa es tal, que la cantidad de mirosinasa está en una relación entre el 5-50 %, en peso respecto a la cantidad de glucorafanina presente en el extracto empleado en la capa interna.
7. Formulación según la reivindicación 6, en la que la relación en peso entre extracto rico en glucosinolatos y mirosinasa es tal, que la cantidad de mirosinasa está en una relación entre el 10-45 %, más preferentemente entre el 20-40 % %, en peso respecto a la cantidad de glucorafanina presente en el extracto empleado en el núcleo.
8. Formulación según una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la relación en peso entre el biopolímero del núcleo y el extracto está entre el 0,5 %-5 % de biopolímero y el 95 %-99,5 % de extracto.
9. Formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una tercera capa que recubre el recubrimiento con cera.
10. Procedimiento para obtener la formulación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende utilizar un equipo de encapsulación que comprende un sistema de boquilla doble concéntrica y las etapas de:
 - a) Preparar una primera solución de al menos un biopolímero que es un polisacárido y extracto rico en glucosinolatos;
 - b) Preparar una segunda solución de al menos un biopolímero y mirosinasa;
 - c) Hacer fluir la primera solución por la boquilla interior y la segunda solución por la boquilla exterior de manera simultánea y aplicando vibración al chorro de líquido que fluye en régimen laminar, y
 - d) Dejar caer las microgotas formadas en un baño de gelificación y si es necesario sumergir las microgotas gelificadas en una solución que contiene un biopolímero entérico.
11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que la segunda solución comprende alginato y mirosinasa y el baño de gelificación comprende cloruro cálcico, quitosano y ácido débil.
12. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que la segunda solución comprende pectina y mirosinasa y el baño de gelificación comprende cloruro cálcico.
13. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que la segunda solución comprende alginato y mirosinasa, el baño de gelificación comprende una solución de cloruro cálcico y las microcápsulas gelificadas se sumergen en una solución adicional que comprende pectina.
14. Uso de la formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en un alimento para seres humanos o animales o en suplemento alimenticio.
15. Alimento para seres humanos o animales o suplemento dietético que comprende la formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

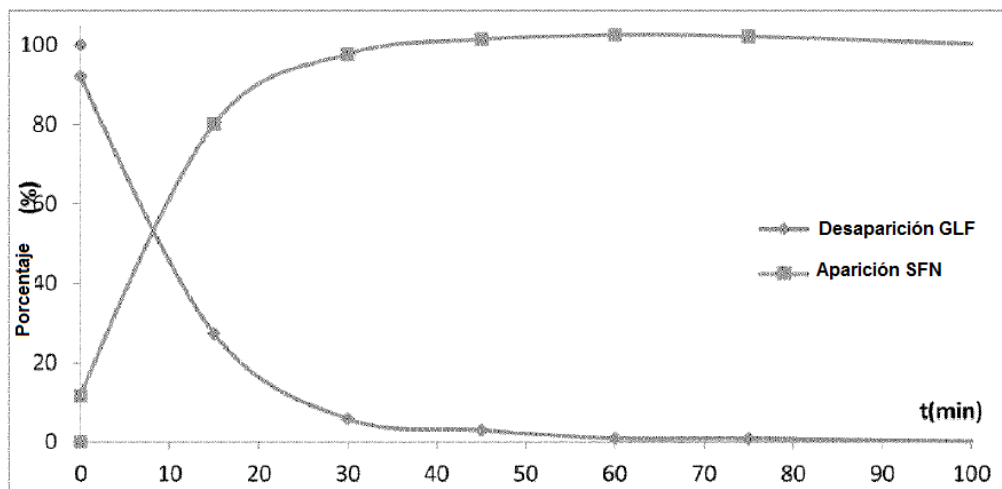


Fig. 1