

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 301**

21 Número de solicitud: 201730956

51 Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)

A01N 25/28 (2006.01)

A01N 31/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.01.2019

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL
HERRIKO UNIBERTSITATEA (100.0%)
Barrio Sarriena, S/N
48940 Leioa (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**VENERANDA, Marco;
MADARIAGA MOTA, Juan Manuel y
CASTRO ORTIZ DE PINEDO, Kepa**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

54 Título: **NANOEMULSIONES PARA PREVENIR LA COLONIZACIÓN BIOLÓGICA DE SUPERFICIES**

57 Resumen:

Nanoemulsiones para prevenir la colonización biológica de superficies.

La invención describe un procedimiento para preparar una nanoemulsión que comprende nanocápsulas con aceite esencial que comprende: preparar una solución de zeína y aceite esencial en agua-alcohol (solución A); una solución de caseína en agua (solución B) y una solución de pectina en agua (solución C); añadir la solución A sobre la mezcla de las soluciones B y C, o alternativamente añadir la solución A y la solución B sobre la solución C. La invención describe también la nanoemulsión obtenible mediante dicho procedimiento cuyas nanocápsulas comprenden: un núcleo central que comprende una matriz de zeína y el aceite esencial; una primera capa de recubrimiento del núcleo que comprende caseína y una segunda capa de recubrimiento exterior sobre la primera que comprende pectina, así como el uso de la nanoemulsión para el tratamiento antimicrobiano de un sustrato contaminado y/o para la prevención de la colonización biológica de un sustrato.

ES 2 697 301 A1

DESCRIPCIÓN

NANOEMULSIONES PARA PREVENIR LA COLONIZACIÓN BIOLÓGICA DE SUPERFICIES

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nanoemulsiones con aceites esenciales nanoencapsulados para el tratamiento y prevención de la contaminación biológica de superficies inorgánicas en general y a su fabricación.

10 **Antecedentes de la invención**

La colonización biológica representa uno de los procesos de deterioro que más afectan superficies murarias y morteros. Cuando se presentan condiciones ambientales favorables (altos valores de humedad, contacto directo con la luz solar), diferentes tipos de hongos, bacterias, algas y mohos pueden colonizar las paredes produciendo daños de tipo químico, físico y estético. Aunque la mayoría de las degradaciones solo pueden ser apreciadas a escala microscópica, esta problemática adquiere una gran importancia cuando la colonización tiene lugar sobre superficies de interés como materiales y estructuras que pertenecen al patrimonio cultural inmueble (pinturas murales, sitios arqueológicos, edificios históricos, etc.).

Proteger estas y otras superficies en general del ataque de microorganismos es una tarea extremadamente complicada ya que, a día de hoy, no existe ningún producto eco-compatible y reversible capaz de prevenir su colonización. Por este motivo, la única manera actualmente disponible para limitar los fenómenos de biodeterioro es recurrir a la eliminación periódica de las pátinas biológicas que van desarrollándose de manera cíclica.

Hoy en día, el tratamiento de eliminación más empleado por los restauradores consiste en la aplicación de productos antimicrobianos seguida por la exportación mecánica de la pátina tratada. Los productos antimicrobianos más utilizados para este fin son los ácidos, las pirimidinas y los compuestos organometálicos, mientras que la remoción mecánica de las patinas biológicas suelen llevarse a cabo empleando bisturís y espátulas que causan daños a los sustratos. Sin embargo utilizar esta técnica de limpieza para tratar una superficie mural de interés cultural puede ser muy caro, ya que el precio de estos tratamientos puede variar desde 450 hasta los 700 euros por m².

A pesar de la eficacia de los compuestos antimicrobianos actualmente empleados, el mundo de la investigación está en constante búsqueda de alternativas eco-compatibles que respeten los principios de la química verde.

En este contexto, varios grupos de investigación están experimentando con el uso de aceites esenciales con propiedades antimicrobianas como alternativa biológica a los productos químicos convencionales antes mencionados. Las investigaciones llevadas a cabo hasta ahora han producido resultados muy prometedores. Por ejemplo, los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas como *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Lavandula angustifolia*, han demostrado neutralizar con éxito algunos de los biodeteriogenos que más comúnmente comprometen la conservación del patrimonio cultural inmueble.

Sin embargo su utilización en estado puro no permite prevenir la colonización biológica a largo plazo, debido fundamentalmente a la alta volatilidad de los mismos que hace que este tratamiento solo pueda ser empleado para neutralizar las pátinas biológicas que ya han colonizado la superficie mural. Esta limitación puede ser superada a través de la encapsulación del aceite esencial en nanoemulsiones inteligentes que impiden la evaporación del compuesto activo y permiten controlar su liberación. De hecho se conoce bien el empleo de compuestos biológicos como zeína, caseína, huevo, pectina, alginato y quitosano, para formar nanocápsulas biocompatibles y estables que están siendo empleadas en campo médico y alimenticio para prevenir la degradación y la evaporación de los aceites esenciales y al mismo tiempo controlar su liberación.

A la vista de lo expuesto, y a pesar de los avances logrados hasta el momento, sigue existiendo la necesidad de proporcionar productos eficaces alternativos para el tratamiento de superficies contaminadas y especialmente para la prevención efectiva de la colonización biológica, superando al menos parte las desventajas de los productos del estado de la técnica actual.

Sorprendentemente, los autores de la invención han descubierto que es posible obtener una nanoemulsión de una forma sencilla mediante la encapsulación de aceites esenciales en nanocápsulas, formadas por un núcleo central a base de una matriz de zeína, en la que el aceite esencial está embebido, y protegido por dos capas de recubrimiento de pectina y caseína respectivamente. Esta nueva nanoemulsión de nanocápsulas es capaz de proporcionar mejores resultados en el tratamiento y prevención de la contaminación biológica, garantizando una elevada durabilidad y estabilidad del producto a temperatura ambiente.

60 **Descripción de las figuras**

Figura 1: imagen óptica y caracterización de la nanoemulsión mediante un sistema Nano Zetasizer ZS.

Figura 2: caracterización de la estructura de las nanocápsulas mediante espectroscopía infrarroja en transformada de Fourier (FTIR) en modo de transmisión o de reflectancia total atenuada (ATR)

Figura 3: imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) realizadas después de 6 meses de envejecimiento a temperatura ambiente.

Descripción de la invención

En un primer aspecto la invención se refiere a un procedimiento para preparar una nanoemulsión que comprende nanocápsulas con aceite esencial. Este procedimiento, en adelante procedimiento de la invención comprende las siguientes etapas:

- 5 (i) preparar una solución de zeina y aceite esencial en agua-alcohol (solución A); una solución de caseína en agua (solución B) y una solución de pectina en agua (solución C);
 (ii) añadir la solución A sobre la mezcla de las soluciones B y C, o alternativamente, añadir la solución A y la solución B de forma simultánea sobre la solución C, y
 10 (iii) obtención de una nanoemulsión de nanocápsulas.

El procedimiento de la invención conduce a la formación espontánea de nanocápsulas estables debido a los procesos físicoquímicos que tienen lugar cuando se combinan las soluciones A, B y C de la forma definida en la etapa (ii). Las nanocápsulas resultantes se caracterizan porque comprenden:

- 15 (a) un núcleo central que comprende una matriz de zeina y un aceite esencial;
 (b) una primera capa de recubrimiento del núcleo central que comprende caseína y
 (c) una segunda capa de recubrimiento exterior sobre la primera capa de recubrimiento que comprende pectina.

20 La solución A para poner en práctica la invención se prepara a partir de zeina y aceite esencial que se disuelven en una mezcla de agua-alcohol, donde el alcohol es preferentemente etanol. La cantidad de alcohol en la solución A puede variar entre el 50% y el 99,5% v/vt (volumen/volumen total), preferiblemente entre el 55 y el 90% v/vt, más preferiblemente entre el 60 y 85% v/vt y aún más preferiblemente entre el 65 y el 75% v/vt. La solución A se prepara por agitación a temperatura ambiente. La concentración de zeina y aceite esencial en la solución A no está particularmente limitada. En general la concentración de zeina es de entre 0,1 y 1,5% m/vt, preferiblemente entre el 0,2 y 1,0% m/vt, más preferiblemente entre 0,3 y 0,8% m/vt y aún más preferiblemente entre el 0,4 y 0,6% m/vt (masa/volumen total). En general la concentración de aceite esencial es de entre 0,5 y 5% v/vt, preferiblemente entre el 1,0 y 4,0% v/vt, más preferiblemente entre 1,7 y 3,0% v/vt y aún más preferiblemente entre el 2,3 y 2,7% v/vt. La solución B se prepara dispersando una sal derivada de la caseína en agua, por ejemplo caseinato sódico. La dispersión se lleva a cabo a temperatura ambiente bajo agitación. La solución C se prepara dispersando pectina en agua. La dispersión se lleva a cabo a temperatura ambiente bajo agitación. En una realización preferente el pH de la solución C se ajusta a un valor inferior a pH 4,6 con una base, por ejemplo una solución básica, preferiblemente una solución de hidróxido sódico.

El agua utilizada para preparar las soluciones es preferiblemente agua ultrapura.

35 En el contexto de la presente invención la temperatura ambiente debe entenderse como comprendida entre 20 °C y 30 °C, preferiblemente alrededor de 25 °C.

La etapa (ii) en la que se ponen en contacto las 3 soluciones puede ser realizada según dos alternativas distintas.

40 De acuerdo con una realización particular del procedimiento, se mezclan primero las soluciones B y C, y se añade la solución A sobre las mismas. La mezcla de B y C se hace preferiblemente bajo agitación magnética y a temperatura ambiente. Típicamente la agitación se lleva a cabo durante un tiempo de 1 hora a 1000rpm. La solución A se añade a continuación sobre la mezcla de las soluciones B y C. Preferiblemente la solución A se añade gota a gota de manera manual (por ejemplo, mediante micro pipeta) o automática (por ejemplo, mediante bomba peristáltica) y la mezcla que va resultando, se somete a agitación magnética a temperatura ambiente. En general la agitación se lleva a cabo durante un tiempo igual o superior a 30 minutos, preferiblemente durante 1 hora, a 1000 rpm.

50 De acuerdo con otra realización particular del procedimiento, las soluciones A y B se añaden gota a gota de manera simultánea (manualmente o, más preferiblemente, automáticamente mediante bombas peristálticas) a la solución C. La mezcla que va resultando, se somete a agitación magnética a temperatura ambiente. En general la agitación se lleva a cabo durante un tiempo igual o superior a 30 minutos, preferiblemente durante 1 hora, a 1000 rpm.

55 En el procedimiento de la invención la formación espontánea de las nanocápsulas ocurre porque la concentración de alcohol en la mezcla de las soluciones A, B y C, disminuye progresivamente. El aceite esencial y la zeina, volviéndose inmiscibles en la solución final, forman (bajo agitación) gotas de aceite esencial/zeina de escala nanométrica. La caseína, siendo una proteína anfifílica, crea una primera capa protectora que recubre las gotas de aceite esencial/zeina (a través de interacciones hidrofóbicas), y proporciona repulsión estérica y electrostática entre las nanopartículas (a través de la porción hidrófila). Finalmente la pectina, teniendo una carga neta opuesta a la caseína, crea un complejo de naturaleza electrostática con la misma. Siendo una sustancia surfactante, la capa exterior de pectina estabiliza las nanopartículas en la solución acuosa.

Los inventores han observado que la formación de las nanocápsulas tiene lugar cuando la concentración del alcohol en la mezcla de las soluciones se hace igual a, o inferior, al 15% v/vt, preferiblemente igual o inferior al 12% v/vt, más preferiblemente igual o inferior al 10% v/vt y aún más preferiblemente igual o inferior al 7% v/vt.

65 El experto en la materia puede calcular en cada caso particular la relación en volumen en la que se han de mezclar las soluciones A, B y C para alcanzar dicha concentración de alcohol y conseguir la formación

espontánea de la nanoemulsión de la invención.

La nanoemulsión de la invención presenta entre 0,05% y 2,00% m/vt (masa/volumen total) de zeína, preferiblemente entre 0,05 y 0,5% m/vt, y más preferiblemente entre 0,05 y 0,25% m/vt; entre 0,05 y 2,00% v/vt (volumen/volumen total) de aceite esencial preferiblemente entre 0,10 y 1,00% v/vt, y más preferiblemente entre 0,20 y 0,50% v/vt; entre 0,10 y 1,50% m/vt de pectina, preferiblemente entre 0,10 y 0,50% m/vt, más preferiblemente entre 0,20 y 0,40% m/vt; y entre 0,10 y 1,50% m/vt de caseína, preferiblemente entre 0,10 y 0,50% m/vt, más preferiblemente entre 0,20 y 0,40% m/vt. El resto hasta el 100% corresponde a la fase acuosa (agua-alcohol).

El aceite esencial que puede emplearse en la invención puede ser uno o una mezcla de dos o más aceites esenciales con propiedades antimicrobianas tales como por ejemplo, lavanda, eucalipto, orégano, canela, el clavo y el tomillo blanco, romero, entre otros. Su uso como antimicrobiano es muy atractivo por tratarse de compuestos naturales que se pueden obtener a partir de una amplia variedad de plantas.

Independientemente de que el procedimiento se lleve a cabo según una u otra realización particular, se obtiene espontáneamente una nanoemulsión de nanocápsulas con un diámetro medio alrededor de entre 300 nm y 200 nm. En una realización particular el diámetro medio está entre 275 nm y 225 nm, preferiblemente entorno a 250 nm. Las nanocápsulas resultantes presentan elevada estabilidad lo cual es importante para asegurar que mantienen su actividad antimicrobiana durante un tiempo prolongado después de ser aplicadas sobre las superficies a tratar.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, una vez obtenida la nanoemulsión de nanocápsulas en la etapa (iii), se ajusta el pH de la misma a un valor cercano al punto isoeléctrico de la zeína, preferiblemente entre 6,2 y 8,2, y más preferiblemente entre 6,6 y 7,0 y se aplica un tratamiento térmico que comprende someter la nanoemulsión a una temperatura, de entre 60 y 90 °C, preferiblemente de entre 65 y 85 °C, y más preferiblemente entre 70 y 80 °C. De este modo se consigue una nanoemulsión de nanocápsulas aún más estables y con un diámetro medio menor comprendido entre 120 nm y 190 nm, preferiblemente comprendido entre 125 nm y 180 nm, más preferiblemente comprendido entre 130 nm y 160 nm. En una realización particular el diámetro medio es igual o inferior a 170 nm. En otra realización particular es igual o inferior a 150 nm. La reducción de tamaño que tiene lugar se debe por un lado, a que el aumento de temperatura facilita la desnaturalización de las proteínas, en este caso del caseinato, y provoca su consecuente compactación. Por el otro se favorece que el alcohol presente (por ejemplo, etanol) evapore, provocando una posterior disminución de la solubilidad de la zeína y del aceite esencial, con la consecuente compactación de las nanocápsulas.

En una realización particular el tratamiento térmico se hace poniendo la nanoemulsión resultante de la etapa (iii) en un baño de agua. Generalmente el tratamiento térmico se lleva a cabo durante un tiempo igual o superior a 1 hora y bajo constante agitación.

La nanoemulsión que se obtiene en este procedimiento constituye un aspecto adicional de la presente invención. La nanoemulsión comprende nanocápsulas caracterizadas porque comprenden:

- (a) un núcleo central que comprende una matriz de zeína y un aceite esencial;
- (b) una primera capa de recubrimiento del núcleo central que comprende caseína y
- (c) una segunda capa de recubrimiento exterior sobre la primera capa de recubrimiento que comprende pectina.

La nanoemulsión ha sido caracterizada por diversas técnicas que han puesto de manifiesto que las nanocápsulas son esféricas, uniformes con un índice de polidispersidad comprendida entre 0,18 y 0,25 (preferiblemente entre 0,21 y 0,23), tienen un diámetro medio que varía según se ha definido anteriormente, y son estables con potenciales Z muy inferiores a -30 d.nm, valores que además se mantienen bastante constantes en el tiempo (ver Ejemplo 1, Tabla 1).

El ejemplo 2 muestra un ensayo comparativo en el que se preparó una nanoemulsión siguiendo el método del Ejemplo 1, pero sin caseína. Los resultados que se muestran en la Tabla 2 de diámetro medio, índice de polidispersidad y potencial Z indican que las nanocápsulas de la nanoemulsión, y la propia nanoemulsión son menos estables en el tiempo que en el caso de la presente invención. En este sentido puede observarse que mientras que el diámetro medio de las nanocápsulas en el Ejemplo 2 aumenta un 25% en el Ejemplo 1 en dos meses el diámetro medio de las nanocápsulas de la invención aumenta un 15% solamente. Este dato indica que la nanoemulsión de la invención hace que estas últimas se mantengan más compactas y por tanto sea más estable. Por otra parte los datos del potencial Z reflejan la estabilidad de las nanoemulsiones. En este sentido, aunque las nanocápsulas sin caseína a tiempo 0 tienen un valor más negativo en el Ejemplo 2 que en el Ejemplo 1 se comprueba que con el tiempo el potencial Z va disminuyendo de manera más rápida: en concreto, en 8 semanas (56 días) las nanocápsulas del Ejemplo 2 pierden un 7,6% de carga, mientras que las de la invención con caseína pierden solo un 2,3%. Esto indica claramente que a largo plazo las nanocápsulas en la nanoemulsión de la invención se mantienen sorprendentemente estables por más tiempo sin precipitar.

El aceite esencial antimicrobiano se encuentra embebido en la matriz de zeína, y además protegido por la primera y la segunda capa de los fenómenos de oxidación y evaporación, confiriéndole elevada estabilidad, y salvaguardando sus propiedades antimicrobianas a largo plazo. Por otro lado, la propia naturaleza y disposición de los compuestos de las nanocápsulas es ventajosa en cuanto que permite la liberación inteligente del aceite esencial, es decir, la liberación solo tiene lugar en presencia de microorganismos tales como hongos, algas, bacterias y mohos que, sintetizan enzimas las cuales despolimerizan los compuestos de las nanocápsulas liberando el aceite esencial que puede entonces actuar como antimicrobiano.

Por ello en otro aspecto adicional la invención se relaciona con el uso de la nanoemulsión de la invención para el tratamiento antimicrobiano de un sustrato inorgánico contaminado y/o para la prevención de la colonización biológica de un sustrato inorgánico.

El uso comprende poner la nanoemulsión en contacto con la superficie inorgánica de dicho sustrato. La nanoemulsión de la invención puede aplicarse directamente, o puede previamente diluirse en un disolvente adecuado y en la proporción adecuada en cada caso. La puesta en contacto de la superficie del sustrato y la nanoemulsión se lleva a cabo mediante cualquier método convencional, por ejemplo mediante esprayado. La cantidad adecuada en cada caso dependerá de la realización particular concreta, tal como el tipo de sustrato, el área de la superficie del sustrato a tratar, etc.

El uso de la nanoemulsión para el tratamiento antimicrobiano de un sustrato supone reducir o eliminar la colonización biológica del sustrato. El uso de la nanoemulsión para la prevención de la colonización biológica de un sustrato supone evitar la colonización biológica de un sustrato. El uso según la invención presenta además la ventaja de que no afecta al aspecto, ni a las propiedades químico-físicas del sustrato tratado, lo cual es especialmente ventajoso en el caso de sustratos de interés cultural como los del Patrimonio Cultural.

Los aceites esenciales, siendo 100% volátiles, no dejan depósitos sobre la superficie tratada. Por esto, la nanoemulsión puede ser ventajosa y potencialmente aplicada a cualquier tipo de superficie muraria, mortero y piedra susceptible al fenómeno de colonización biológica.

Desde un punto de vista económico, el bajo coste de los compuestos utilizados, y del procedimiento de obtención permite obtener un producto extremadamente económico. Además al ser una nanoemulsión obtenida a partir de productos naturales, ecológicos y biodegradables, garantiza la seguridad de los trabajadores y el respeto al medioambiente. El procedimiento de obtención de la nanoemulsión es sencillo, y sólo requiere de simple agitación a temperatura ambiente.

La presente invención consigue proporcionar una solución a un problema de gran importancia en el mundo de la conservación del patrimonio cultural, de superficies en general y en particular de superficies murarias, morteros y esculturas por parte de biodeteriogenos.

A continuación se presentan ejemplos para ilustrar la invención que no deben ser considerados en ningún caso como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de una nanoemulsión

Se preparó una nanoemulsión con nanocápsulas estables y de tamaño inferior a 150 nm utilizando aceite esencial extraído de la planta de clavo (cuya capacidad fungicida y bactericida ha sido comprobada en numerosos trabajos). Para ello en primer lugar se prepararon las soluciones **A**, **B** y **C** como sigue:

- **Solución A:** 30mg de zeína (tipo Z3625 Sigma Aldrich Corp) y 150µl de aceite esencial fueron disueltos en 5ml de solución acuosa de etanol al 70%. La dispersión fue sometida a agitación magnética (1000rpm) durante 150 minutos a 25°C;
- **Solución B:** 120mg de caseína (tipo C8654 Sigma Aldrich Corp) fueron disueltos en 5ml de agua ultrapura. La dispersión fue sometida a agitación magnética (1000rpm) durante 120 minutos a 25°C;
- **Solución C:** 48mg de pectina (tipo P9135, Sigma-Aldrich Corp.) fueron disueltos en 20ml de agua ultrapura. La dispersión fue sometida a agitación magnética (1000rpm) durante 240 minutos a 25°C; Seguidamente, el pH de la solución fue ajustado a pH 4,0 utilizando una solución de HCl 10mM;

1 ml de solución A y un 1 ml de solución B se vertieron de manera simultánea en 10 ml de solución C mediante el uso de una pipeta multicanal (eppendorf). Seguidamente, la solución fue agitada magnéticamente durante 1 hora, a 1000 rpm y a una temperatura de 25°C.

De esta manera, se obtuvo una solución acuosa de etanol al 6,4% y compuesta por el 0,05% m/vt de zeína, el 0,25% v/vt de aceite esencial, el 0,20% m/vt de caseína y el 0,20% m/vt de pectina.

Finalmente, el pH de la suspensión se ajustó a un valor igual a 6,6 mediante una solución de NaOH 10mM. Después de 60 minutos de agitación magnética a 1000rpm y a temperatura ambiente, se aplicó un tratamiento térmico (baño de agua a 80 °C) durante 60 minutos con el fin de inducir la desnaturalización de las proteínas y la

evaporación del etanol.

Caracterización de las nanoemulsión y las nanocápsulas:

Una vez terminado el proceso de síntesis, las técnicas analíticas han sido empleadas con el fin de caracterizar la nanoemulsión.

Los análisis llevados a cabo mediante el sistema Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK) han permitido verificar que la nanoemulsión obtenida está compuesta por nanocápsulas, uniformes (es decir con un índice de polidispersidad (PDI) = $0,229 \pm 3,4$), estables (potencial Z:= $-47,2 \pm 2,6$) y de tamaño medio de partícula inferior a 150nm (Z size: $133,2 \pm 3,4$ nm) (ver Figura 1).

Una parte de la nanoemulsión se secó por pulverización mediante el uso de un Nano Spray Dryer B-90 (BUCHI, Labortechnik Ag, Flawill, Switzerland) y el polvo obtenido fue caracterizado con espectroscopia infrarroja en transformada de Fourier (FTIR) en modalidad ATR.

Como se muestra en la Figura 2, en el espectro de la muestra pulverizada se han detectado los picos principales de los compuestos zeína, caseína y pectina (espectro más inferior: S1). La ausencia de los picos identificativos del aceite esencial confirma que el compuesto activo está localizado en el núcleo de las nanocápsulas.

Además cabe destacar que, con el fin de evaluar su estabilidad en el tiempo, la nanoemulsión fue semanalmente analizada mediante el equipo Nano Zetasizer durante un periodo de tiempo de dos meses. Como se puede observar en la siguiente Tabla 1, las nanopartículas han demostrado tener una excelente estabilidad en el tiempo.

Estabilidad de la nanoemulsión			
Días	Tamaño Z (d.nm)	Índice de polidispersidad	Potencial Z (mV)
1	$133,2 \pm 3,4$	$0,229 \pm 0,010$	$-47,2 \pm 3,4$
7	$145,6 \pm 3,9$	$0,191 \pm 0,018$	$-46,1 \pm 3,8$
14	$143,5 \pm 4,4$	$0,197 \pm 0,009$	$-43,9 \pm 2,0$
21	$141,5 \pm 4,8$	$0,177 \pm 0,041$	$-44,7 \pm 6,1$
28	$141,3 \pm 8,1$	$0,181 \pm 0,016$	$-41,6 \pm 1,2$
35	$138,4 \pm 3,0$	$0,200 \pm 0,014$	$-44,0 \pm 3,8$
42	$144,2 \pm 11,0$	$0,194 \pm 0,015$	$-46,4 \pm 2,1$
49	$146,0 \pm 7,4$	$0,203 \pm 0,012$	$-44,4 \pm 4,7$
56	$153,3 \pm 1,3$	$0,197 \pm 0,009$	$-46,1 \pm 3,1$

Finalmente gracias a las imágenes capturadas a través de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) ha sido posible observar que las nanocápsulas, después de 6 meses de envejecimiento, todavía conservaban una forma perfectamente esférica (Figura 3, donde a) es la imagen a tiempo cero y b) es la imagen a los 6 meses).

Ejemplo 2 Comparativo: Preparación de una nanoemulsión

Se preparó una nanoemulsión siguiendo exactamente el método descrito en el Ejemplo 1 excepto que la solución B no contenía caseína y era solo agua ultrapura. A continuación se caracterizó de igual modo que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2:

Estabilidad de la nanoemulsión			
Días	Tamaño Z (d.nm)	Índice de polidispersidad	Potencial Z (mV)
1	$145,9 \pm 8,2$	$0,181 \pm 0,032$	$-50,0 \pm 1,7$
7	$159,1 \pm 1,9$	$0,169 \pm 0,012$	$-44,2 \pm 4,7$
14	$158,7 \pm 1,5$	$0,152 \pm 0,010$	$-45,2 \pm 1,0$
21	$159,5 \pm 3,0$	$0,149 \pm 0,016$	$-40,7 \pm 1,9$
28	$176,3 \pm 4,9$	$0,163 \pm 0,009$	$-46,9 \pm 2,6$
35	$174,2 \pm 12,3$	$0,167 \pm 0,004$	$-45,6 \pm 6,4$
42	$173,5 \pm 3,7$	$0,166 \pm 0,014$	$-48,7 \pm 4,1$
49	$185,9 \pm 8,0$	$0,161 \pm 0,011$	$-46,3 \pm 4,0$
56	$182,6 \pm 2,0$	$0,163 \pm 0,006$	$-46,2 \pm 1,5$

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para preparar una nanoemulsión que comprende nanocápsulas con aceite esencial que comprende las siguientes etapas:
- 5 (i) preparar una solución de zeina y aceite esencial en agua-alcohol (solución A); una solución de caseína en agua (solución B) y una solución de pectina en agua (solución C);
 - 10 (ii) añadir la solución A sobre la mezcla de las soluciones B y C, o alternativamente añadir la solución A y la solución B de forma simultánea o de forma secuencial sobre la solución C, y
 - 10 (iii) obtención de una nanoemulsión de nanocápsulas.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que el alcohol de la solución A es etanol.
- 15 3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el alcohol en la solución A está presente en una cantidad entre el 50% y el 99,5% v/vt, preferiblemente entre el 55 y el 90% v/vt, más preferiblemente entre el 60 y 85% v/vt y aún más preferiblemente entre el 65 y el 75% v/vt.
- 20 4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el pH de la solución C se ajusta a un valor inferior a pH 4,6.
5. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el aceite esencial es uno o más aceites esenciales.
- 25 6. Un procedimiento según la reivindicación 5 en el que el aceite esencial es de clavo.
7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende además ajustar el pH de la nanoemulsión de nanocápsulas obtenida en la etapa (iii) a un valor comprendido entre 6,2 y 8,2 y aplicar un tratamiento térmico que comprende someter la nanoemulsión a una temperatura de entre 60 y 90 °C.
- 30 8. Un procedimiento según la reivindicación 7 en el que el valor de pH es entre 6,6 y 7,0.
9. Un procedimiento según la reivindicación 7 u 8 en el que la temperatura es entre 70 y 80 °C.
- 35 10. Una nanoemulsión que comprende nanocápsulas caracterizadas porque comprenden:
- (a) un núcleo central que comprende una matriz de zeina y un aceite esencial;
 - (b) una primera capa de recubrimiento del núcleo central que comprende caseína y
 - (c) una segunda capa de recubrimiento exterior sobre la primera capa de recubrimiento que comprende pectina.
- 40 11. Una nanoemulsión según la reivindicación 10, en la que las nanocápsulas presentan un diámetro medio de entre 300 nm y 200 nm.
- 45 12. Una nanoemulsión según la reivindicación 10, en la que las nanocápsulas presentan un diámetro medio de entre 120 nm y 190 nm.
- 50 13. Uso de la nanoemulsión según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para el tratamiento antimicrobiano de un sustrato contaminado y/o para la prevención de la colonización biológica de un sustrato inorgánico.

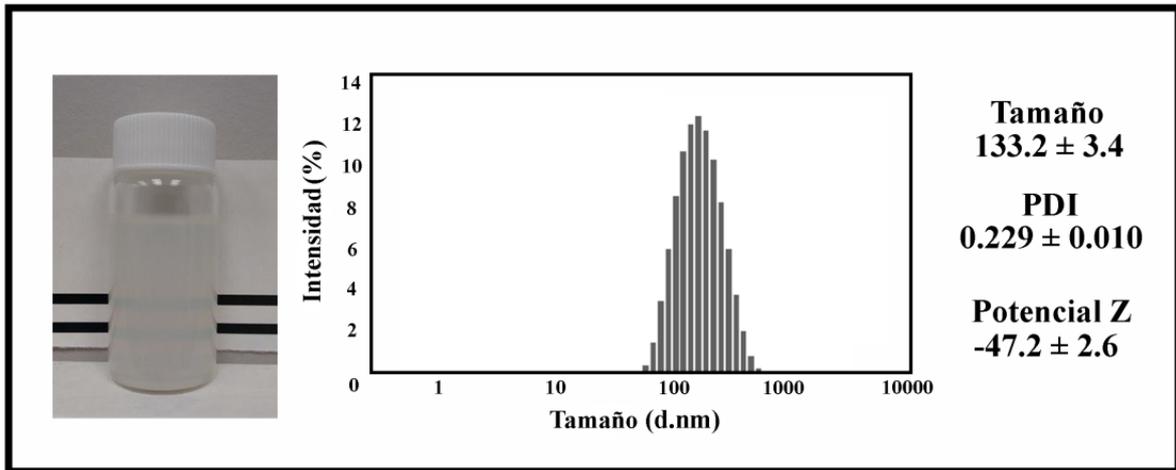


Fig.1

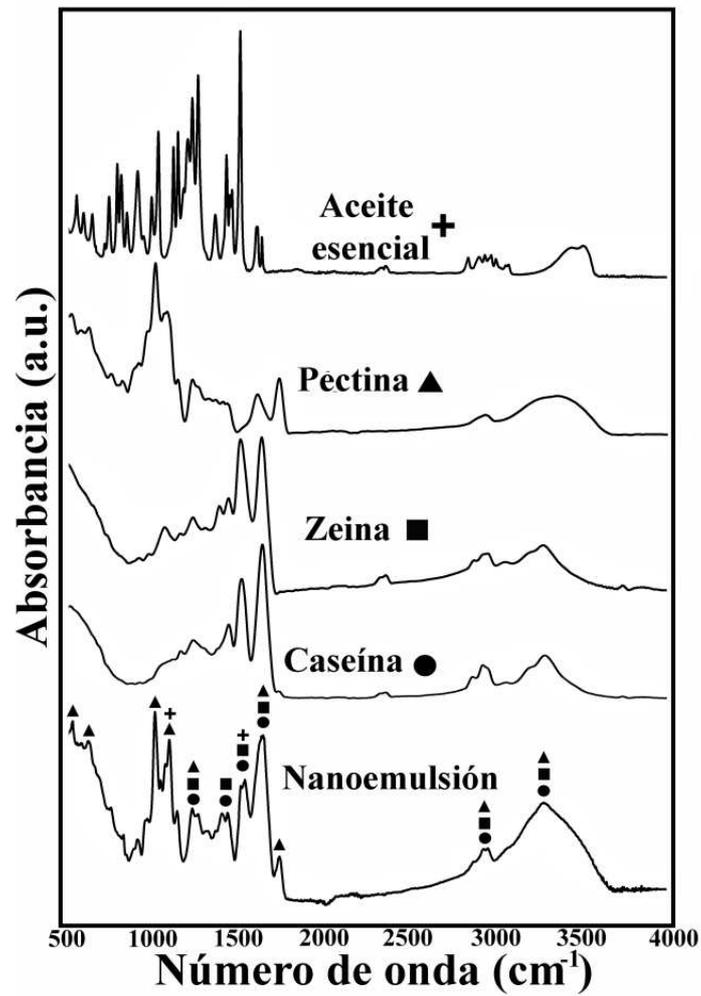


Fig. 2

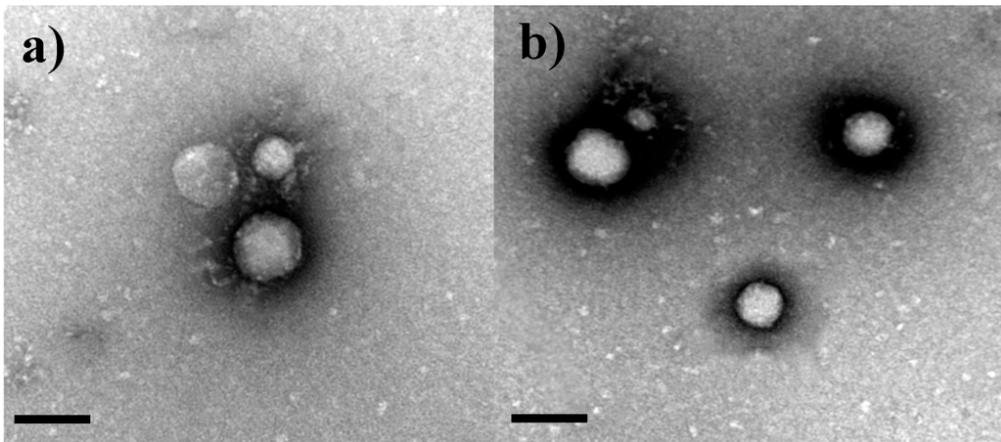


Fig. 3



- ②① N.º solicitud: 201730956
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.07.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	CHANG, C. et al. "Zein/caseinate/pectin complex nanoparticles: Formation and characterization". INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, 01/06/2017, Vol. 104, Páginas 117-124, <DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.178>, todo el documento, especialmente página 118, materiales y métodos, apartado 2.2.	1-3, 5-9 10-13
X	LUO, Y. et al. "Casein/pectin nanocomplexes as potential oral delivery vehicles". INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, 20/03/2015, Vol. 486, Páginas 59-68, <DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.03.043>. Introducción párrafo 2.	4
Y	CHEN, H. et al. "Physical and antimicrobial properties of spray-dried zein-casein nanocapsules with co-encapsulated eugenol and thymol". JOURNAL OF FOOD ENGINEERING, 01/01/2015, Vol. 144, Páginas 93-102, <DOI: doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.07.021>. Conclusiones.	10-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
02.01.2018

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K9/107 (2006.01)

A01N25/28 (2006.01)

A01N31/08 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, REGISTRY, HCAPLUS