

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
19 de enero de 2012 (19.01.2012)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/007628 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A23L 1/00 (2006.01) A61K 8/64 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES20 11/0705 18
- (22) Fecha de presentación internacional:
15 de julio de 2011 (15.07.2011)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P20103 1095 16 de julio de 2010 (16.07.2010) ES
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A. [ES/ES]; Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGÍA Y SEGURIDAD ALIMENTARIA, LABORATORIO DEL EBRO [ES/ES]; Ctra. NA - 134, Km 50, E-31570 San Adrián - Navarra (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): AGÜEROS BAZO, Maite [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). ESPARZA CATALÁN, Irene [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). GONZÁLEZ FERRERO, Carolina [ES/ES]; CNTA, Ctra. NA - 134, Km 50, E-31570 San Adrián - Navarra (ES). GONZÁLEZ NAVARRO, Carlos Javier [ES/ES]; CNTA, Ctra. NA - 134, Km 50, E-31570 San Adrián - Navarra (ES). IRACHE CARRETA, Juan Manuel [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). ROMO HUALDE, Ana [ES/ES]; CNTA, Ctra. NA - 134, Km 50, E-31570 San Adrián - Navarra (ES).
- (74) Mandatario: ARIAS SANZ, Juan; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos 16 D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaraciones según la Regla 4.17:**
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(H))
 - sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))
- Publicada:**
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))



WO 2012/007628 A1

(54) Title: NANOPARTICLES FOR ENCAPSULATION OF COMPOUNDS, THE PRODUCTION AND USES THEREOF

(54) Título: NANOPARTÍCULAS PARA ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS, SU OBTENCIÓN Y USOS

(57) Abstract: The nanoparticles comprise a zein matrix and a basic amino acid. Said nanoparticles may encapsulate a water-soluble or liposoluble, biologically active compound. The invention applies to the food, pharmaceutical and cosmetics sectors and to nanotechnology.

(57) Resumen: Las nanopartículas comprenden una matriz de zeína y un aminoácido básico. Dichas nanopartículas pueden encapsular un compuesto biológicamente activo, hidrosoluble o liposoluble. De aplicación en los sectores alimentario, farmacéutico y cosmético y en el de la nanotecnología.

NANOPARTÍCULAS PARA ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS, SU OBTENCIÓN Y USOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se encuadra en los sectores alimentario, farmacéutico y
cosmético y en el de la nanotecnología, y se relaciona con la encapsulación de
compuestos biológicamente activos empleando zeína como agente de recubrimiento. En
particular, la invención se relaciona con unas nanopartículas que comprenden una
matriz de zeína y un aminoácido básico, útiles para encapsular compuestos
10 biológicamente activos, así como con su obtención y aplicaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las industrias, en particular, las industrias alimentaria, cosmética y
farmacéutica, necesitan evolucionar tecnológicamente para satisfacer las nuevas
15 demandas de los consumidores. La nanotecnología puede proporcionar soluciones
interesantes para dichas industrias.

En particular, la nanotecnología presenta un gran potencial para revolucionar la
industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, ya que permite encapsular compuestos
biológicamente activos [CBA], e.g., aceites esenciales, antioxidantes, minerales,
20 prebióticos, sabores, vitaminas, etc., con el fin de obtener diversos beneficios, por
ejemplo, incrementar la vida útil del producto, reducir la cantidad de CBA a utilizar,
controlar su liberación, incrementar su biodisponibilidad, enmascarar sabores
indeseados, etc.

Los antioxidantes, sustancias capaces de generar un beneficio para la salud del
25 consumidor, constituyen un grupo de CBA cuyo empleo despierta cada vez mayor
interés. La encapsulación de dichos compuestos antioxidantes, e.g., quercetina o
resveratrol, en sistemas particulares (e.g., micropartículas o nanopartículas), con el fin
de protegerlos y mantenerlos estables durante su almacenamiento, constituye una
opción muy interesante.

30 Hasta la fecha, la aplicación de compuestos antioxidantes encapsulados se
limita, en general, a los campos cosmético y farmacéutico. A modo ilustrativo, se ha
descrito la encapsulación de quercetina en (i) nanocápsulas formadas por ácido poli-

lactico-co-glicolico (PLGA) y acetato de etilo (Ghosh y col, *Life Sciences* 2009;84:75-80), (ii) nanopartículas formadas por Eudragit® [poli(met)acrilatos] y alcohol polivinílico (Wu y col., *Int J of Pharm* 2008;346:160-168), y (iii) en micropartículas lipídicas formadas con fosfatidilco lina y triesstearina (Sccalia y Mezzena, *J Pharm Biomed Anal* 2009;49:90-94). Asimismo, se ha descrito la encapsulación de resveratrol en (i) nanopartículas de policaprolactona (Lu y col, *Int J of Pharm* 2009; 375:89-96), (ii) micropartículas de pectina (Das y Ng, *Int J of Pharm* 2010;385:20-28), (iii) liposomas (Caddeo y col., *Int J of Pharm* 2008;363:183-191), (iv) microesferas de quitosano (Peng y col., *Food Chem* 2010;121(1):23-28) y (v) microesferas de poliestireno (Nam y col, *Polymer* 2005;46:8956-8963).

Sin embargo, la aplicación de compuestos antioxidantes encapsulados en el campo alimentario se encuentra muy limitada ya que los materiales empleados para encapsular dichos compuestos presentan problemas de toxicidad o no están aprobados para su uso en alimentos. Asimismo, el empleo de compuestos antioxidantes en el diseño de alimentos funcionales se encuentra muy limitado debido, entre otras razones, a su corta vida media, alta labilidad y baja biodisponibilidad oral. La encapsulación de compuestos antioxidantes, tales como quercetina o resveratrol, para protegerlos en el alimento y mantenerlos estables durante todo su período de almacenamiento, permitiendo además una liberación controlada que incremente su biodisponibilidad en el organismo sería muy deseable.

Como es conocido, a la hora de diseñar un vehículo adecuado para encapsular un CBA es muy importante seleccionar correctamente el material utilizado como agente de recubrimiento o matriz; para ello, se deben tener en cuenta, entre otros factores, la forma de administración, su toxicidad, el producto en el que se va a incorporar la formulación, etc.

En el campo de la nanotecnología alimentaria, no resulta recomendable utilizar polímeros sintéticos ya que pueden presentar problemas de toxicidad. Aunque los polímeros naturales no presentan esos inconvenientes, su utilización requiere el desarrollo de métodos de producción de partículas más complicados, y, además, en la mayoría de los casos, el tamaño de partícula obtenido (habitualmente superior a 100 μm) es difícil de controlar, por lo que tales micropartículas pueden ser percibidas por el consumidor y alterar las características organolépticas del alimento diana.

Se ha descrito el empleo de proteínas, tanto de origen animal, e.g., caseína, albúmina, etc., como de origen vegetal, e.g., prolaminas, etc. (ES 2269715, US 2004/86595, US 5679377), como agentes de recubrimiento de CBA.

La zeína es la principal proteína de almacenamiento presente en la semilla del
5 grano de maíz. Se trata de una proteína globular perteneciente al grupo de las prolaminas ya que tiende a presentar un elevado número de aminoácidos prolina y glutamina y se caracteriza por su alta insolubilidad en agua. En los últimos años, esta proteína ha cobrado gran importancia en el ámbito científico e industrial debido a sus
10 particulares propiedades físico-químicas y a su estructura molecular ya que posee características anfifílicas y puede formar diferentes estructuras de autoensamblaje en función de los compuestos hidrofílicos-lipofílicos presentes en el medio (Wang y col., *Food Biophysics* 2008;3:174-181). Por todo ello, la zeína ofrece numerosas ventajas potenciales como materia prima de films, ya que es capaz de formar recubrimientos duros e hidrófobos con unas características de flexibilidad y compresibilidad excelentes,
15 que, además, son resistentes al ataque microbiano.

Gracias a estas propiedades, se han ido encontrando nuevas aplicaciones a la zeína como adhesivo, plástico biodegradable, goma de mascar, recubrimiento de productos alimenticios, fibra, polvos cosméticos, microencapsulante de pesticidas y tintas, etc. (Muthuselvi y Dhathathreyan, *Collids and Surfaces B: Biointerfaces*
20 2006;51:39-43). Esta proteína también es utilizada por la industria farmacéutica para recubrir cápsulas, con el fin de proteger, liberar de forma controlada y enmascarar sabores y aromas indeseados (Shukla y Cheryan, *Industrial Crops and Products* 2001;13:171-192). Además, se ha propuesto para la microencapsulación de insulina, heparina, ivermectina y gitoxina. En general, se consiguen micropartículas/microesferas
25 estables, incluso en condiciones de alta humedad y calor, que, además, son resistentes al ataque bacteriano (US5679377).

Sin embargo, la utilización de zeína como agente encapsulante en el campo de la alimentación para el diseño de alimentos funcionales con ingredientes encapsulados es todavía incipiente. Se ha descrito la obtención de nanopartículas de zeína para
30 encapsular aceites esenciales utilizando la técnica de separación de fases (Parris y col., *J Agrie Food Chem* 2005;53:4788-4792), así como la encapsulación de ácidos grasos omega-3 en dicha proteína aplicando la técnica de lecho fluido para protegerlos de la

oxidación y enmascarar sus características organolépticas negativas al introducirlos en los alimentos de interés (MX2008003213). Además, recientemente se ha conseguido encapsular licopeno y el polifenol galato de epigallocatequina (EGCG) en fibras de zeína mediante la técnica de electrospinning (Fernández y col., *Food Hydrocolloids* 5 2009;23:1427-1432 y Li y col. *J Food Sci* 2009;74(3):C233-C240 respectivamente), lisozima mediante el proceso de SAS (del inglés "supercritical anti-solvent") (Zhong y col. *Food Chemistry* 2009;15(2):697-700) y aceite de pescado mediante el método de dispersión líquido-líquido (Zhong y col., *J Food Process Pres* 2009;33(2):255-270). Estos trabajos describen técnicas de fabricación relativamente complejas y difícilmente
10 escalables para su aplicación en la industria, o se ciñen exclusivamente a la encapsulación de compuestos lipófilos, y no resultan adecuados para la encapsulación de compuestos hidrófilos.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar sistemas versátiles de encapsulación de compuestos biológicamente activos que superen la totalidad o parte de
15 los inconvenientes previamente mencionados, que sean apropiados para vehicular tanto compuestos hidrosolubles como liposolubles, y, en particular, compuestos cuya administración por otros medios entrañe dificultades, como es el caso de los compuestos antioxidantes. Adicionalmente, sería también altamente deseable que dichos sistemas fueran obtenibles de manera sencilla y presentaran una estabilidad adecuada durante su
20 almacenamiento y tras su administración, lo que facilitaría su aplicación en distintos sectores tecnológicos, e.g., los sectores alimentario, farmacéutico y cosmético.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que el recubrimiento de
25 compuestos biológicamente activos (CBA), tanto hidrosolubles como liposolubles, con una matriz de zeína y un aminoácido básico proporciona unas nanopartículas que constituyen un nuevo sistema de encapsulación y estabilización de dichos CBA para su aplicación en alimentos, en cosmética y en farmacia.

Diversos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que la
30 adición de un aminoácido básico junto a la zeína facilita el procedimiento de producción de dichas nanopartículas que comprenden una matriz de zeína y un aminoácido básico debido a que posibilita la utilización de disoluciones hidroalcohólicas, con un porcentaje relativamente bajo de alcohol, para disolver la zeína, lo que posibilita a su

vez la encapsulación de CBA, tanto CBA liposolubles como CBA hidrosolubles. Además, se evita la utilización de aditivos o disolventes básicos que pudieran ocasionar problemas de toxicidad, por lo que se mejoran las propiedades nutricionales de las nanopartículas. Asimismo, el aminoácido básico confiere estabilidad a las nanopartículas puesto que se incrementa la carga superficial de las partículas evitando que éstas se agreguen.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con unas nanopartículas que comprenden una matriz de zeína y un aminoácido básico. Dichas nanopartículas pueden ser utilizadas para encapsular CBA hidrosolubles o liposolubles. En una realización particularmente preferida, el CBA es un compuesto antioxidante. Además, dichas nanopartículas pueden ser utilizadas como aditivos tecnológicos [el aditivo encapsulado puede ser incorporado en matrices en las que no es soluble, favoreciendo una dispersión uniforme en el medio; a modo ilustrativo, de acuerdo con la invención, un CBA liposoluble encapsulado en dichas nanopartículas puede ser dispersado en una matriz acuosa, proceso que habría sido complejo si el CBA estuviera en su forma libre (sin encapsular)].

Dichas nanopartículas son estables y capaces de proteger al CBA de su degradación por agentes externos, e.g., luz, cambios de pH, oxidación, etc., tanto durante el procesado del producto (e.g., alimento, producto farmacéutico o cosmético) como durante su almacenamiento. Además, cuando dichas nanopartículas se administran por vía oral (e.g., alimentación), protegen al CBA de las condiciones ácidas del estómago y liberan al CBA en el lugar deseado, por ejemplo, en el intestino.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas nanopartículas vacías, es decir, sin CBA.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de dichas nanopartículas cargadas con un CBA, tal como un CBA liposoluble o un CBA hidrosoluble.

Dichos procedimientos son sencillos y aplicables a escala industrial, y, ventajosamente, no incluyen el empleo de polímeros sintéticos ni reactivos que no estén aprobados como aditivos alimentarios, permiten minimizar la inclusión de tensioactivos o emulgentes, y, además, permiten obtener nanopartículas de escala nanométrica, con un tamaño de partícula controlable.

En una realización particular, dichos procedimientos comprenden, además, una etapa adicional de secado de la suspensión que contiene dichas nanopartículas con el objetivo de obtener una formulación en forma de polvo, lo que permite mantener el CBA estable en el tiempo; las formulaciones en forma de polvo son particularmente adecuadas para su empleo en alimentos sólidos. Ventajosamente, el secado de dichas nanopartículas se lleva a cabo en presencia de un agente protector de las nanopartículas. Las nanopartículas conteniendo un CBA así obtenidas se pueden resuspender con facilidad en un medio acuoso, protegiendo al CBA de su degradación en disolución. El producto final obtenido es estable y protege al CBA durante largos periodos de almacenamiento y, además, es aplicable a distintos tipos de alimentos, tanto líquidos (e.g., bebidas) como sólidos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición que comprende dichas nanopartículas para su empleo en los sectores alimentario, farmacéutico o cosmético. De hecho, dichas nanopartículas pueden incorporarse en cremas, geles e hidrogel, con el fin de obtener preparados cosméticos o farmacéuticos estables y adecuados para su empleo en esos sectores. Asimismo, dichas nanopartículas pueden formularse con excipientes adecuados para su administración por vía tópica.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un producto alimenticio, que comprende dicha composición a base de nanopartículas de zeína proporcionadas por esta invención. En una realización particular, dicho producto alimenticio se encuentra en forma líquida, semi-sólida o sólida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de zeína vacías. A) 8.000x (la barra negra situada en el margen inferior izquierdo de las imágenes corresponde a una referencia de 200 nm). B) 15.750x (la barra negra situada en el margen inferior izquierdo de las imágenes corresponde a una referencia de 100 nm).

Figura 2. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de unas nanopartículas que comprenden una matriz de zeína y lisina conteniendo resveratrol. Las imágenes corresponden a la formulación en polvo tras ser lavada para eliminar el sacárido protector.

Figura 3. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de unas nanopartículas que comprenden una matriz de zeína y lisina conteniendo quercetina. A) 25.000x (la barra negra situada en el margen inferior izquierdo de las imágenes corresponde a una referencia de 150 nm). B) 10.000x (la barra negra situada en el

5 margen inferior izquierdo de las imágenes corresponde a una referencia de 150 nm).

Figura 4. Cantidad de quercetina encapsulada en unas nanopartículas (NP) que comprenden una matriz de zeína y lisina, en función de la cantidad de quercetina incorporada inicialmente en la formulación.

Figura 5. Micrográficas de microscopía electrónica de barrido (SEM) de unas

10 nanopartículas que comprenden una matriz de zeína y lisina conteniendo quercetina. Las imágenes corresponden a la formulación en polvo tras ser lavada para eliminar el sacárido protector.

Figura 6. Concentración de ácido fólico en suero (ng/mL) en función del tiempo, tras la administración de las distintas formulaciones de la vitamina en animales

15 de laboratorio. Los resultados muestran la media \pm desviación estándar (n = 5). (A) Vía intravenosa (i.v), dosis 1 mg/kg. (B) Vía oral, dosis 1 mg/kg: ácido fólico no encapsulado disuelto en agua (■); ácido fólico encapsulado en nanopartículas de zeína dispersas en agua (·).

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona unas nanopartículas que comprenden una matriz de zeína y un aminoácido básico y unos métodos para la encapsulación de compuestos biológicamente activos (CBA), con el objetivo de preservarlos de la degradación por agentes externos (e.g., luz, pH, oxidación, etc.). Dichas nanopartículas

25 pueden ser diseñadas para permitir una liberación controlada del CBA con el fin de incrementar su biodisponibilidad; el aumento de biodisponibilidad se puede conseguir por dos vías: mediante la liberación íntegra del CBA encapsulado en el intestino (minimizada su degradación en origen, en la matriz alimentaria y/o por almacenamiento así como por la protección ofrecida frente a las condiciones ácidas del estómago) y

30 mediante un efecto de liberación del CBA controlada o sostenida en el tiempo.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se indica el significado de algunos términos y expresiones tal como se utilizan en esta descripción.

Un "aminoácido básico", tal como aquí se utiliza, se refiere a una molécula orgánica que contiene un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxílico ($-COOH$) y carga positiva; preferentemente, dicho aminoácido básico es un alfa-aminoácido básico, tal como lisina, arginina e histidina.

"Aproximadamente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un intervalo de valores próximo a un valor especificado, tal como \pm el 10% de un valor especificado. Por ejemplo, "aproximadamente 20" incluye \pm el 10% de 20, o desde 18 hasta 22. Además, con independencia de que se especifique o no el término "aproximadamente", el experto en la materia entiende que cualquier valor numérico expresado en el presente documento engloba un intervalo de valores próximo. Tales variaciones de un valor especificado pueden ser resultado de los errores experimentales durante la correspondiente medición.

Un "compuesto biológicamente activo" o "CBA", tal como aquí se utiliza, se refiere a un compuesto que presenta una actividad nutricional, terapéutica y/o cosmética; dicho compuesto puede ser liposoluble o hidrosoluble. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de CBA de acuerdo con la presente invención incluyen aminoácidos, antimicrobianos, aromatizantes, conservantes, edulcorantes, esteroides, fármacos, hormonas, lípidos, péptidos, polinucleótidos, polisacáridos, proteínas, proteoglicanos, saborizantes, vitaminas, etc.

Un "compuesto biológicamente activo hidrosoluble" o "CBA hidrosoluble", tal como aquí se utiliza, se refiere a un compuesto que presenta una actividad nutricional, terapéutica y/o cosmética y que es soluble (muy soluble, fácilmente soluble, soluble, bastante soluble o poco soluble) en una solución acuosa según los criterios definidos por la Real Farmacopea Española:

Términos descriptivos	Volúmenes aproximados de disolvente en mililitros (mL) por gramo de soluto, referido a una temperatura comprendida entre 15°C y 25°C		
Muy soluble	Inferior a	1	
Fácilmente soluble	de	1	a 10
Soluble	de	10	a 30
Bastante soluble	de	30	a 100
Poco soluble	de	100	a 1.000
Muy poco soluble	de	1.000	a 10.000
Prácticamente insoluble	mayor que		10.000

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de CBA hidrosolubles incluyen vitaminas, por ejemplo, vitaminas de las familias B o C, y sus derivados, sales o ésteres; ácido hialurónico, condroitín sulfato, ácido tióctico, sus sales o ésteres, etc. En una realización particular, dicho CBA hidrosoluble se selecciona del grupo formado por ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina, ácido pantoténico, tiamina monofosfato, tiamina pirofosfato, tiamina trifosfato, ácido ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos (derivados del ácido fólico: poliglutamatos de folato; folatos de poliglutamato), ácido folínico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico (ácido alfa-lipoico), ácido p-cumárico, ácido cafeico, sus derivados, ésteres o sales farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas.

Un "compuesto biológicamente activo liposoluble" o "CBA liposoluble", tal como aquí se utiliza, se refiere a un compuesto que presenta una actividad nutricional, terapéutica y/o cosmética y que es soluble (muy soluble, fácilmente soluble, soluble, bastante soluble o poco soluble) en grasas y aceites, según los criterios definidos por la Real Farmacopea Española. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de CBA liposolubles incluyen vitaminas, por ejemplo, vitaminas de las familias A, D, E, K y sus derivados, fosfolípidos, carotenoides (carotenos, licopeno, luteína, capsantina, zeaxantina etc.), ácidos grasos omega-3 (ácido docosahexanoico (DHA), ácido eicosapentanoico (EPA), etc.), fitostanoles y fitosteroles (sitosterol, campesterol, estigmasterol, etc.), polifenoles (quercetina, rutina, resveratrol, kaempferol, miricetina, isoramnetina, etc.) y sus derivados.

Un producto se dice que es de "grado alimentario" cuando es seguro para su empleo en alimentación, humana o animal, según el Código Alimentario (Codex Alimentarius) de un país o de una organización, por ejemplo, de la Organización de las

Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) o de la Organización Mundial de la Salud (OMS); en consecuencia, un producto de "grado alimentario" es un producto no tóxico "apto para su empleo en alimentación" por lo que ambas expresiones son sinónimas y se utilizan indistintamente en esta descripción.

5 "Medio acuoso", tal como aquí se utiliza, se refiere a un medio que comprende agua. En una realización particular, el medio acuoso consiste esencialmente en agua.

 "Medio hidroalcohólico", tal como aquí se utiliza, se refiere a un medio que comprende agua y un alcohol, en proporciones relativas variables. En una realización particular, dicho medio hidroalcohólico comprende una solución de etanol en agua, en
10 cualquier proporción relativa entre dichos compuestos.

 "Nanopartícula", tal como aquí se utiliza, se refiere a sistemas coloidales de tipo esferas o formas similares de tamaño inferior a 1 micrómetro (μm), preferentemente del orden de 10 a 900 nanómetros (nm).

 "Tamaño medio", tal como aquí se utiliza, se refiere al diámetro promedio de la
15 población de nanopartículas que se mueve conjuntamente en un medio acuoso. El tamaño medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos por el experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental (véase más adelante).

 El término "zeína", tal como aquí se utiliza, incluye cualquier proteína globular
20 perteneciente al grupo de las prolaminas; en general, dicha proteína se sintetiza durante el desarrollo del endospermo (tejido nutricional formado en el saco embrionario de las plantas con semilla y suele constituir un depósito de alimentos para el embrión de las semillas de diversas plantas angiospermas). La zeína se puede obtener a partir de cualquier fuente adecuada, aunque preferentemente se obtiene a partir del maíz. Se
25 conocen diversos métodos y técnicas para extraer zeína del endospermo del maíz; en general, la zeína comercial se extrae a partir de la harina de gluten de maíz (US 2009/0258050).

 El estudio de la zeína revela una extrema variabilidad a nivel genético, y, por tanto, una situación compleja entre las distintas proteínas que forman parte del grupo de
30 proteínas conocidas como zeínas. La zeína nativa, en realidad, es una familia numerosa y heterogénea de varios grupos de proteínas que difieren en su tamaño molecular, solubilidad y carga. Se ha calculado que existen más de veinte zeínas diferentes. Los

análisis de los extractos de zeína mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión en gel, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), isoelectroenfoque (IEF), el análisis de aminoácidos, y las técnicas de clonaje de ADN han llevado a una mejor
5 comprensión de las proteínas zeína.

El análisis de la composición de los aminoácidos de la zeína revela una gran cantidad de leucina, alanina, glutamina y fenilalanina; sin embargo, la lisina y el triptófano están ausentes o, alternativamente, están presentes en cantidades muy pequeñas. La alta proporción de residuos de aminoácidos no polares junto con la
10 notable falta de grupos iónicos son los responsables de su naturaleza hidrofóbica y de su particular solubilidad.

Los cuerpos proteicos de zeína están compuestos por tres tipos de proteínas estructuralmente distintas: alfa-zeína (α -zeína), gamma-zeína (γ -zeína) [que incluye beta-zeína (β -zeína)] y delta-zeína (δ -zeína). Dichas proteínas pueden clasificarse en
15 cuatro clases (α -zeína, β -zeína, γ -zeína y δ -zeína) en base a las diferencias en la solubilidad y secuencia.

La zeína extraída sin agentes reductores forma una gran familia multigénica de polipéptidos, denominada α -zeína. Las α -zeínas, en general la fracción más abundante de la zeína nativa, contienen unos 40 aminoácidos en el extremo amino terminal que
20 preceden a una serie de 9 ó 10 péptidos repetidos de 20 aminoácidos. Se cree que estas repeticiones son α -hélices y giran la proteína en una molécula en forma de varilla.

Las demás fracciones de la zeína (β -, γ - y δ -zeína) deben ser extraídas utilizando soluciones acuosas de alcoholes que contienen agentes reductores para romper los enlaces disulfuro. A modo ilustrativo, para la extracción en laboratorio se utiliza
25 mercaptoetanol. Las β -, γ - y δ -zeínas no muestran una homología de secuencia con la α -zeína.

La γ -zeína es soluble tanto en disolventes acuosos como alcohólicos en condiciones reductoras. Cada una de las γ -zeínas tiene una secuencia N-terminal única. A modo de ejemplo, en la γ -zeína de 50 kDa, esta región es de 136 aminoácidos de
30 longitud y es muy rica en histidina. La γ -zeína de 27 kDa tiene una serie de 8 repeticiones en tándem de un hexapéptido que se producen 11 aminoácidos después del extremo amino terminal. Los ocho primeros aminoácidos de la γ -zeína de 16 kDa son

idénticos a los de la γ -zeína de 27 kDa, pero la γ -zeína de 16 kDa tiene tres versiones degeneradas de repeticiones ricas en prolina. La γ -zeína representa normalmente entre el 10% y el 15% del total de las zeínas.

La β -zeína, que se relaciona con la γ -zeína, incluye un polipéptido de 17 kDa rico en metionina y constituye hasta un 10% de la zeína total. Aproximadamente los últimos 140 aminoácidos de las β - y γ -zeínas son idénticos en un 85%. La β -zeína no tiene péptidos repetitivos y parece consistir en su mayor parte en láminas β y conformación de giro.

La δ -zeína es una proteína de 10 kDa y es una fracción minoritaria de zeína. Las δ -zeínas son las más hidrófobas del grupo, no contienen péptidos repetitivos y son excepcionalmente ricas en metionina y cisterna.

La zeína ha sido considerada como un producto "Generalmente Reconocido como Seguro" (GRAS, del inglés "Generally Recognized as Safe") por la Food and Drug Administration (Estados Unidos) desde 1985 [número CAS (Chemical Abstract Service): 9010-66-6].

En la presente invención, la fuente o el grado de zeína no se limita a una única zeína y, de hecho, cualquier zeína puede ser utilizada en la puesta en práctica de la presente invención. A modo ilustrativo, las zeínas comerciales que pueden ser utilizadas en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la zeína suministrada por Sigma-Aldrich (número de producto Z 3625); Wako Puras Chemical Industries (números de productos 261-00015, 264-01281 y 260-01283); Spectrum Chemical (números de productos Z 1131 y ZE105); ScienceLab unidades SLZ1 150; SJZ Chem-Pharma Company (nombre del producto ZEIN (GLIDZIN)); Arco Organics (números de catálogo 17931-0000, 17931-1000, y 1793 1-5000); y Freeman Industries, zeína de grado regular F4000, zeína de grado regular F4400, zeína de grado especial F6000, etc. En una realización particular, se utiliza la zeína comercial suministrada por Sigma-Aldrich (número de producto Z 3625), obtenida a partir de maíz.

El término "zeína" tal como aquí se utiliza incluye tanto la zeína nativa como la zeína modificada. El término "zeína modificada" incluye cualquier zeína que presenta una secuencia de aminoácidos que normalmente no se produce de forma natural, pero que se comportan de manera similar a las zeínas auténticas, y que son solubles en alcohol. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos, especialmente aquellos que

no modifican sustancialmente la hidrofobicidad. A modo ilustrativo, se pueden efectuar sustituciones de aminoácidos en las secciones repetidas, o bien se puede sustituir un único aminoácido, así como sustituciones en los segmentos que conectan los dominios de las secuencias repetidas. También se pueden introducir inserciones y sustituciones tanto en el extremo carboxilo terminal como en el extremo amino terminal de la molécula de zeína. Adicionalmente, se pueden efectuar deleciones en la secuencia de aminoácidos siempre y cuando la proteína resultante sea funcionalmente equivalente a la zeína, es decir, que mantenga sus propiedades.

10 Nanopartículas de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con una nanopartícula, en adelante nanopartícula de la invención, que comprende una matriz de zeína y un aminoácido básico.

Prácticamente cualquier zeína puede constituir la matriz de la nanopartícula de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha zeína es una zeína procedente de maíz, tal como la zeína suministrada por Sigma-Aldrich (número de producto Z 3625).

En una realización particular, dicho aminoácido básico se selecciona del grupo formado por arginina, lisina, histidina, y sus mezclas.

Las nanopartículas de la invención pueden ser utilizadas para encapsular un compuesto biológicamente activo (CBA). Además, las nanopartículas de la invención pueden ser utilizadas como aditivos tecnológicos, por ejemplo, facilitando la incorporación de un CBA liposoluble en una matriz acuosa, etc.

Por tanto, en otra realización particular, la nanopartícula de la invención comprende, además, un CBA. Dicho CBA puede ser un CBA hidrosoluble o un CBA liposoluble; en este caso, la nanopartícula de la invención se identifica, en ocasiones, en esta descripción como "nanopartícula cargada de la invención" para diferenciarla de otras nanopartículas de la invención que no contienen CBA (en ocasiones identificadas como "nanopartículas vacías de la invención").

En una realización particular, dicho CBA es un CBA liposoluble. En una realización más particular, dicho CBA liposoluble se selecciona del grupo formado por:

- a) un polifenol;

- b) una vitamina de la familia de vitaminas A, D, E o K;
- c) un precursor o un derivado de una vitamina según b);
- d) un fosfolípido;
- e) un carotenoide;
- 5 f) un ácido graso;
- g) un fitoestero¹ o un fitoestero₁;
- h) una sal o un éster de cualquiera de los compuestos a)-g) anteriores; y
- i) combinaciones de los mismos.

En una realización más particular, dicho CBA liposoluble es:

- 10 i) un polifenol tal como, por ejemplo, un flavonol (e.g., una catequina, una epicatequina, isoramnetina, kaempferol, miricetina, quercetina, etc.); una antocianina (e.g., cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina, petunidina, etc.); una fitoalexina (e.g., resveratrol, etc.); hidroxitirosol, etc.;
- 15 ii) una vitamina liposoluble tal como, por ejemplo, vitamina A y sus derivados (e.g., ácido retinoico, retinal, retinol, etc.); vitamina E y sus derivados (e.g., un tocoferol, por ejemplo, alfa-tocoferol, etc., untocotrienol, etc.); vitamina D y sus derivados (e.g., vitamina D₁, vitamina D₂ (ergocalciferol), vitamina D₃ (colecalfiferol), vitamina D₄ (22-dihidroergocalciferol), vitamina D₅ (sitocalciferol), etc.); vitamina K o fitomenadiona y sus derivados (e.g.,
20 vitamina K₁ (filoquinona), vitamina K₂ (menaquinona), menadinona, etc.);
- iii) un carotenoide tal como, por ejemplo, un caroteno (e.g., alfa-caroteno, beta-caroteno, criptoxantina, licopeno, etc.); una xantófila (e.g., astaxantina, cantaxantina, capsantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina, violaxantina, zeaxantina, etc.);
- 25 iv) un ácido graso tal como, por ejemplo, un ácido graso omega-3 (e.g., ácido α -linolénico (ALA), ácido eicosopentanoico (EPA), ácido docosahexanoico (DHA), etc.); un ácido graso omega-6 (e.g., ácido γ -linoleico, etc.); o
- v) un fitoesterol o un fitoestanol (e.g., brassicasterol, campesterol, ergosterol, stigmasterol, sitostanol, sitosterol, etc.).

- 30 En una realización concreta, dicho CBA liposoluble se selecciona del grupo formado por un flavonol (e.g., quercetina, etc.), una antocianina, una fitoalexina (e.g., resveratrol, etc.), hidroxitirosol, ácido retinoico, retinal, retinol, calciferol

(ergocalciferol y colecalciferol), alfa-tocoferol, tocotrienol, fitomenadiona, alfa-caroteno, beta-caroteno, licopeno, capsantina, luteína, zeaxantina, xantofila, EPA, DHA, ácido linoleico, campesterol, estigmasterol, sitosterol, sus derivados, ésteres o sales farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas.

5 En una realización más concreta, dicho CBA liposoluble se selecciona del grupo formado por quercetina, resveratrol, sus derivados, ésteres o sales farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas.

En otra realización particular, dicho CBA es un CBA hidrosoluble. En una realización más particular, dicho CBA hidrosoluble es:

- 10 a) una vitamina de la familia de vitaminas B o C;
b) un derivado de una vitamina según a);
c) un compuesto seleccionado entre el ácido hialurónico, condroitín sulfato y el ácido tióctico;
d) una sal o un éster de cualquiera de los compuestos a)-c) anteriores; y
15 e) combinaciones de los mismos.

En una realización concreta, dicho CBA hidrosoluble se selecciona del grupo formado por ácido fólico, sus ésteres o sales farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas.

20 La utilización de las nanopartículas de la invención como sistemas de encapsulación de compuestos antioxidantes constituye una realización particular y preferida.

Procedimiento de obtención de las nanopartículas de la invención

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de nanopartículas que comprenden una matriz de zeína y un aminoácido básico (nanopartículas de la invención), en adelante "procedimiento [1] de la invención", que comprende:

- a) preparar una solución hidroalcohólica que contiene una zeína y un aminoácido básico; y
30 b) añadir agua a la solución de la etapa a).

La solución hidroalcohólica utilizada en la etapa a) del procedimiento [1] de la invención contiene agua y un alcohol, típicamente etanol; en una realización particular,

dicha solución hidroalcohólica comprende entre un 25% y un 75% (p/v) de alcohol, preferentemente entre 30% y 60%, más preferentemente, 50% aproximadamente.

La cantidad de zeína que puede contener la solución hidroalcohólica formada en la etapa a) del procedimiento [1] de la invención, puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de zeína contenida en dicha solución hidroalcohólica está comprendida entre 0,1% y 10% (p/v), preferentemente entre 0,2% y 2,5%, más preferentemente entre 0,5% y 1%.

La cantidad de aminoácido básico que puede contener dicha solución hidroalcohólica formada en la etapa a) del procedimiento [1] de la invención, puede variar dentro de un amplio intervalo. En general, dicha cantidad se suele expresar en función de la cantidad de zeína a disolver. Así, aunque la proporción en peso entre el aminoácido básico y la zeína [aminoácido básico:zeína] presentes en dicha solución hidroalcohólica depende, en general del tipo de CBA a encapsular y puede variar ampliamente, en una realización particular, dicha proporción en peso aminoácido básico:zeína está comprendida entre 1:0,01 y 1:50, típicamente entre 1:0,5 y 1:25, preferentemente, entre 1:1 y 1:20, más preferentemente, entre 1:5 y 1:15; en una realización concreta, la proporción en peso aminoácido básico:zeína es de 1:6 aproximadamente.

En la etapa b) del procedimiento [1] de la invención se añade agua en cantidad suficiente para que se formen las nanopartículas de la invención. Aunque la cantidad de agua a añadir puede variar dentro de un amplio intervalo, en una realización particular, se añade agua en cantidad suficiente para que la proporción final de alcohol en el medio esté comprendida entre 10% y 60% (p/v), preferentemente entre 15% y 30%, más preferentemente de un 25% aproximadamente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de nanopartículas que comprenden una matriz de zeína, un aminoácido básico y un CBA liposoluble (nanopartículas de la invención cargadas con un CBA liposoluble), en adelante "procedimiento [2] de la invención", que comprende:

a) preparar una solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico;

- b) preparar una solución alcohólica que comprende un CBA liposoluble y diluirla con agua para obtener una solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA liposoluble;
- c) mezclar dicha solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico con dicha solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA liposoluble; y
- d) añadir agua a la mezcla resultante de la etapa c).

La solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico utilizada en la etapa a) del procedimiento [2] de la invención contiene agua y un alcohol, típicamente etanol; en una realización particular, dicha solución hidroalcohólica comprende entre un 25% y un 75% (p/v) de alcohol, preferentemente entre un 30% y un 60%, más preferentemente, un 50% aproximadamente. Dicha solución hidroalcohólica (i) se prepara mezclando sus componentes en las cantidades adecuadas.

La cantidad de zeína que puede contener dicha solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico utilizada en la etapa a) del procedimiento [2] de la invención, puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de zeína contenida en dicha solución hidroalcohólica (i) está comprendida entre 0,1% y 10% (p/v), preferentemente entre 0,2% y 2,5%, más preferentemente entre 0,5% y 1%.

La cantidad de aminoácido básico que puede contener dicha solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico utilizada en la etapa a) del procedimiento [2] de la invención, puede variar dentro de un amplio intervalo. En general, dicha cantidad se expresará en función de la cantidad de zeína a disolver. Así, aunque la proporción en peso entre el aminoácido básico y la zeína [aminoácido básico:zeína] presentes en dicha solución hidroalcohólica (i) puede variar ampliamente, en una realización particular, dicha proporción en peso aminoácido básico:zeína está comprendida entre 1:0,01 y 1:50, típicamente entre 1:0,5 y 1:25, preferentemente, entre 1:1 y 1:20, más preferentemente, entre 1:5 y 1:15; en una realización concreta, la proporción en peso aminoácido básico:zeína es de 1:6 (cuando el CBA es resveratrol) y 1:1 (cuando el CBA es quercetina) aproximadamente.

La solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA liposoluble generada en la etapa b) del procedimiento [2] de la invención puede obtenerse disolviendo o solubilizando dicho CBA liposoluble en un alcohol (e.g., etanol) y, a continuación, diluyendo la solución alcohólica obtenida con agua. Por tanto, dicha solución

5 hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA liposoluble generada en la etapa b) del procedimiento [2] de la invención contiene agua y un alcohol, típicamente etanol; en una realización particular, dicha solución hidroalcohólica (ii) comprende entre un 25% y un 75% (p/v) de alcohol, preferentemente entre un 30% y un 65%, más preferentemente entre un 50 y un 60%.

10 La cantidad de CBA liposoluble que puede contener dicha solución hidroalcohólica (ii) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de CBA liposoluble contenida en dicha solución hidroalcohólica (ii) está comprendida entre 0,05% y 10% (p/v), preferentemente entre 0,1% y 1%, más preferentemente entre 0,2% y 0,3%.

15 Según la etapa c) del procedimiento [2] de la invención, se mezcla una solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico con una solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA liposoluble; de este modo se forma una mezcla que comprende una zeína, un aminoácido básico y un CBA liposoluble en un medio hidroalcohólico. La relación en peso CBA liposoluble:zeína presente en la

20 mezcla formada en dicha etapa c) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la proporción en peso entre el CBA liposoluble y la zeína [CBA liposoluble:zeína] está comprendida entre 1:0,5 y 1:70, preferentemente entre 1:5 y 1:50, más preferentemente entre 1:10 y 1:30.

En la etapa d) del procedimiento [2] de la invención se añade agua en cantidad

25 suficiente sobre la mezcla formada en la etapa c) para que se formen las nanopartículas de la invención. Aunque la cantidad de agua a añadir puede variar dentro de un amplio intervalo, en una realización particular, se añade agua en cantidad suficiente para que la proporción final de alcohol en el medio esté comprendida entre 10% y 60% (p/v), preferentemente entre 15% y 30%, más preferentemente de un 25% aproximadamente.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de nanopartículas que comprenden una matriz de zeína, un aminoácido básico, y un compuesto biológicamente activo hidrosoluble (nanopartículas de la

invención cargadas con un CBA hidrosoluble), en adelante "procedimiento [3] de la invención", que comprende:

- a) preparar una solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico;
- 5 b) preparar una solución acuosa que comprende un CBA hidrosoluble y, opcionalmente, un segundo aminoácido básico, y diluirla con un alcohol para obtener una solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA hidrosoluble y, opcionalmente, un segundo aminoácido básico;
- c) mezclar dicha solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un
- 10 aminoácido básico con dicha solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA hidrosoluble y, opcionalmente, un segundo aminoácido básico;
- d) opcionalmente, añadir un tensioactivo a la mezcla resultante de la etapa c); y
- e) añadir agua a la mezcla resultante de la etapa c) o de la etapa d).

15 La solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico utilizada en la etapa a) del procedimiento [3] de la invención contiene agua y un alcohol, típicamente etanol; en una realización particular, dicha solución hidroalcohólica comprende entre un 25% y un 75% (p/v) de alcohol, preferentemente entre un 30% y un 60%, más preferentemente, un 50% aproximadamente. Dicha

20 solución hidroalcohólica (i) se prepara mezclando sus componentes en las cantidades adecuadas.

La cantidad de zeína que puede contener dicha solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico utilizada en la etapa a) del procedimiento [3] de la invención, puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una

25 realización particular, la cantidad de zeína contenida en dicha solución hidroalcohólica (i) está comprendida entre 0,1 % y 10% (p/v), preferentemente entre 0,2% y 2,5%, más preferentemente entre 0,5% y 1%.

La cantidad de aminoácido básico que puede contener dicha solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico utilizada en la etapa

30 a) del procedimiento [3] de la invención, puede variar dentro de un amplio intervalo. En general, dicha cantidad se expresará en función de la cantidad de zeína a disolver. Así, aunque la proporción en peso entre el aminoácido básico y la zeína [aminoácido

básico:zeína] presentes en dicha solución hidroalcohólica (i) puede variar ampliamente, en una realización particular, dicha proporción en peso aminoácido básico :zeína está comprendida entre 1:0,01 y 1:50, típicamente entre 1:0,5 y 1:25, preferentemente, entre 1:1 y 1:20, más preferentemente, entre 1:5 y 1:15; en una realización concreta, la
5 proporción en peso aminoácido básico:zeína es de 1:6,7 aproximadamente.

La solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA hidrosoluble generada en la etapa b) del procedimiento [3] de la invención puede obtenerse disolviendo o solubilizando dicho CBA hidrosoluble en agua, opcionalmente, en presencia de un segundo aminoácido básico, y, a continuación, diluyendo la solución acuosa obtenida
10 con un alcohol (e.g., etanol). Por tanto, dicha solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA hidrosoluble y, opcionalmente, un segundo aminoácido básico, generada en la etapa b) del procedimiento [3] de la invención contiene agua y un alcohol, típicamente etanol; en una realización particular, dicha solución hidroalcohólica (ii) comprende entre un 25% y un 75% (p/v) de alcohol,
15 preferentemente entre un 30% y un 60%, más preferentemente un 50% aproximadamente.

La solución acuosa, resultante de la disolución del CBA hidrosoluble en agua y, opcionalmente, en presencia de dicho segundo aminoácido básico, contiene, en una realización particular, dicho CBA hidrosoluble y agua; y, en otra realización particular,
20 dicho CBA hidrosoluble, dicho aminoácido básico y agua. En general, dicho segundo aminoácido básico estará presente en dicha solución acuosa [y, consecuentemente en dicha solución hidroalcohólica (ii)] cuando su presencia sea necesaria para disolver el CBA hidrosoluble ya que la solubilización de algunos CBA hidrosolubles, e.g., el ácido fólico, se puede facilitar utilizando una solución acuosa basificada con dicho
25 aminoácido básico; en tales casos, la proporción en peso entre dicho CBA hidrosoluble y dicho segundo aminoácido básico en dicha solución acuosa basificada puede estar comprendida entre 1:0,25 y 1:5, preferentemente entre 1:0,5 y 1:2, más preferentemente entre 1:0,8 y 1:1,8; posteriormente, como se ha mencionado previamente, esta solución acuosa se diluye en un medio hidroalcohólico (e.g., en etanol) para obtener dicha
30 solución hidroalcohólica (ii), tal como se ha mencionado previamente, que comprende entre un 25% y un 75% (p/v) de alcohol, preferentemente entre un 30% y un 60%, más preferentemente un 50% aproximadamente.

El procedimiento [3] de la invención contempla la posibilidad de utilizar 2 aminoácidos básicos diferentes. Así, en una realización particular, el aminoácido básico utilizado en la elaboración de la solución hidroalcohólica (i) que contiene zeína y un aminoácido básico (primer aminoácido básico) y el utilizado en la elaboración de la solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA hidrosoluble y (en este caso) un segundo aminoácido básico (segundo aminoácido básico), es el mismo y se selecciona del grupo formado por arginina, lisina, histidina, y sus mezclas, preferentemente, lisina.

La cantidad de CBA hidrosoluble que puede contener dicha solución hidroalcohólica (ii) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de CBA hidrosoluble contenida en dicha solución hidroalcohólica (ii) está comprendida entre 0,01% y 10% (p/v), preferentemente entre 0,05% y 5%, más preferentemente entre 0,1% y 1%.

Según la etapa c) del procedimiento [3] de la invención, se mezcla una solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico con una solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA hidrosoluble y, opcionalmente, un segundo aminoácido básico; de este modo se forma una mezcla que comprende una zeína, un aminoácido básico, un CBA hidrosoluble y, opcionalmente, un segundo aminoácido básico (que, como se ha mencionado previamente, puede ser el mismo que el aminoácido básico contenido en dicha solución hidroalcohólica (i)). La relación en peso CBA hidrosoluble: zeína presente en la mezcla formada en la etapa c) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la proporción en peso entre el CBA hidrosoluble y la zeína [CBA hidrosoluble:zeína] en dicha mezcla formada en la etapa c) está comprendida entre 1:0,2 y 1:50, preferentemente entre 1:1 y 1:15, más preferentemente entre 1:6 y 1:12.

En la etapa opcional d) del procedimiento [3] de la invención se añade un tensioactivo a la mezcla resultante de la etapa c). Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría se cree que el tensioactivo facilita la encapsulación del CBA hidrosoluble en las nanopartículas ya que permite acercar el CBA hidrosoluble a la matriz polimérica lipófila (zeína) facilitando así su atrapamiento en el momento de inducir la coacervación. En una realización particular, dicho tensioactivo es un tensioactivo no iónico, tal como un polisorbato, por ejemplo, un éster derivado de un ácido graso (e.g., ácido oleico) y de un sorbitano polietoxilado tal como el

comercializado con el nombre Tween® 80. La relación en peso tensioactivo: CBA hidrosoluble presente, en su caso, en la mezcla formada en la etapa d) puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la proporción en peso entre el tensioactivo y el CBA hidrosoluble [tensioactivo:CBA hidrosoluble] está comprendida entre 1:10 y 1:50, preferentemente entre 1:15 y 1:45, más preferentemente entre 1:20 y 1:30.

Finalmente, en la etapa e) del procedimiento [3] de la invención se añade agua en cantidad suficiente sobre la mezcla formada en la etapa c) o en la etapa d) para que se formen las nanopartículas de la invención. Aunque la cantidad de agua a añadir puede variar dentro de un amplio intervalo, en una realización particular, se añade agua en cantidad suficiente para que la proporción final de alcohol en el medio esté comprendida entre 10% y 60% (p/v), preferentemente entre 15% y 30%, más preferentemente de un 25% aproximadamente.

Prácticamente cualquier zeína puede ser utilizada en la puesta en práctica de dichos procedimientos [1], [2] y [3] de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha zeína es una zeína procedente de maíz, tal como la zeína suministrada por Sigma-Aldrich (número de producto Z 3625).

Aunque se pueden utilizar alcoholes de muy diversa naturaleza, en una realización particular y preferida de esta invención, la solución hidroalcohólica empleada en los procedimientos [1], [2] y [3] de la invención es etanol.

Prácticamente cualquier aminoácido básico puede ser utilizado para la puesta en práctica de dichos procedimientos [1], [2] y [3] de la invención; no obstante, en una realización particular, dicho aminoácido básico se selecciona del grupo formado por arginina, lisina, histidina y sus mezclas, preferentemente, lisina. Dicho aminoácido básico, que puede estar dentro o fuera de las nanopartículas de la invención, juega un papel fundamentalmente tecnológico ya que:

- facilita la disolución de los componentes antes de la formación de las nanopartículas; en concreto, contribuye a la disolución de la zeína ya que ésta en presencia del aminoácido básico, puede disolverse en una solución hidroalcohólica con una proporción inferior de alcohol (e.g., 50%) con respecto a su disolución en ausencia de dicho aminoácido, y, además, facilita

la disolución de los CBA, en particular, de algunos CBA hidrosolubles, en concreto de CBA hidrosolubles ácidos (e.g., ácido fólico);

- mantiene el pH apropiado tras la producción de dichas nanopartículas a ambos lados de las nanopartículas (interior y exterior); y
- 5 - permite obtener nanopartículas con una carga superficial negativa y alejada de ± 10 mV, lo que dificulta su agregación.

Por tanto, el aminoácido básico desempeña un papel muy importante en la producción de las nanopartículas, tanto cargadas con CBA como no cargadas, de la invención.

- 10 Las nanopartículas de la invención se caracterizan por presentar un tamaño medio de partícula inferior a $1 \mu\text{m}$, comprendido, típicamente, entre 1 y 999 nm, preferentemente entre 10 y 900 nm, más preferentemente entre 50 y 500 nm, aún más preferentemente entre 100 y 450 nm, todavía más preferentemente entre 140 y 400 nm. Ventajosamente, las nanopartículas de la invención tienen un tamaño de partículas de
- 15 alrededor de 200 nm aproximadamente, con el fin de evitar la alteración de propiedades organolépticas (textura al paladar), lo que resulta particularmente adecuado cuando se utilizan en el campo alimentario.

- Las nanopartículas de la invención, tanto las que están cargadas con un CBA como las que no lo están (nanopartículas vacías), pueden incorporar en su formulación
- 20 un antioxidante, e.g., ácido ascórbico (vitamina C), etc., con el fin de incrementar su estabilidad frente a la temperatura y la oxidación. En este caso, dicho antioxidante podría ser introducido co-encapsulado con el CBA (en su caso) o en la cubierta de las nanopartículas de la invención; para ello, dichos procedimientos [1], [2] y [3] de la invención se adaptarán adecuadamente para incorporar el antioxidante en la formulación
- 25 de las nanopartículas, por ejemplo, añadiendo el antioxidante a la solución acuosa que contiene dicho CBA y, opcionalmente, dicho segundo aminoácido básico.

- En una realización particular, el CBA es el ácido fólico y el antioxidante es el ácido ascórbico que parece actuar protegiendo al ácido fólico de la degradación por radiación ultravioleta, cambio de pH, calor, oxígeno, etc., proporcionando, además, el
- 30 aporte nutricional del propio ácido ascórbico. Dicho antioxidante podría ser introducido co-encapsulado con el CBA o en la cubierta de las nanopartículas de la invención.

Adicionalmente, si se desea, tanto el procedimiento [1] de la invención como los procedimientos [2] y [3] de la invención, pueden incluir una o más etapas adicionales de estabilización de las nanopartículas obtenidas mediante el uso de distintos tratamientos.

En una realización particular, dicho tratamiento de estabilización comprende someter la suspensión que contiene las nanopartículas de la invención formadas, tanto las que están cargadas con un CBA como las que no lo tienen, a un tratamiento de alta presión, por ejemplo, a una presión comprendida entre 100 y 800 MPa, típicamente entre 350 y 600 MPa. En una realización particular, dicho tratamiento comprende someter la suspensión de nanopartículas a ciclos de 3 a 5 minutos, a una presión de 100 MPa a 800 MPa, típicamente entre 350 y 600 MPa; de hecho, una presión de 400 MPa proporciona buenos resultados.

En otra realización particular, dicho tratamiento de estabilización comprende someter la suspensión que contiene las nanopartículas de la invención formadas, tanto las que están cargadas con un CBA como las que no lo tienen, a un tratamiento UHT (Ultra High Temperature), por ejemplo, a una temperatura comprendida entre 130°C y 140°C durante 2 a 5 segundos, seguido de un rápido enfriamiento.

Asimismo, si se desea, tanto el procedimiento [1] de la invención como los procedimientos [2] y [3] de la invención, pueden incluir una etapa de secado de la suspensión que contiene las nanopartículas formadas, con el fin de obtener las nanopartículas de la invención, tanto las que están cargadas con un CBA como las que no lo tienen, en forma de un polvo. Esta forma de presentación de dichas nanopartículas contribuye a su estabilidad y, además, resulta particularmente útil para su eventual aplicación en alimentos sólidos, tales como harina, pan, productos de bollería, cereales, leche en polvo, etc., así como en productos cosméticos y/o farmacéuticos.

Prácticamente cualquier método o técnica convencional adecuado para secar suspensiones que contienen nanopartículas puede ser utilizado para realizar esta etapa de secado; no obstante, en una realización particular, el secado de la suspensión que contiene nanopartículas se lleva a cabo mediante secado por aspiración o pulverización ("spray drying") o mediante liofilización. En general, este tratamiento se lleva a cabo añadiendo a la suspensión de las nanopartículas un agente protector de dichas nanopartículas adecuado, tal como un sacárido, por ejemplo, lactosa, trehalosa, manitol, sacarosa, maltodextrina, glucosa, sorbitol, maltosa, etc., y sus mezclas. Dicho agente

protector protege a las nanopartículas de la invención tanto frente a la degradación térmica como frente a la oxidación durante el proceso de secado.

La relación en peso zeína:sacárido puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la relación en peso zeína:sacárido está
5 comprendida 1:1 y 1:4, preferentemente alrededor de 1:2.

Asimismo, en una realización particular, la solución que contiene el sacárido podría contener, además, un agente antioxidante, tal como ácido ascórbico (vitamina C), etc.; en este caso, la relación en peso zeína: sacárido: agente protector, por ejemplo, vitamina C, podrían ser 1:0,75-2,5:0,25-1,5, preferentemente 1:1,5:0,5.

10 Las nanopartículas de la invención obtenidas según el procedimiento [1] de la invención, es decir, las nanopartículas que comprenden una matriz de zeína y un aminoácido básico, producidas mediante el procedimiento [1], constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

Asimismo, las nanopartículas cargadas de la invención obtenidas según los
15 procedimientos [2] ó [3] de la invención, es decir, las nanopartículas que comprenden una matriz de zeína y un aminoácido básico cargadas con un CBA liposoluble o hidrosoluble, constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

Aplicaciones

20 Las nanopartículas de la invención tienen la capacidad de encapsular un CBA, e.g., un CBA hidrosoluble o un CBA liposoluble. Además, pueden ser utilizadas como aditivos tecnológicos, por ejemplo, favoreciendo una dispersión uniforme del CBA en un medio en el que no es soluble, etc.

En una realización particular, las nanopartículas de la invención posibilitan la
25 encapsulación de un CBA y su incorporación en composiciones farmacéuticas, cosméticas y alimentarias, ya que en su preparación y en el producto final (nanopartículas) no se utilizan otros ingredientes que no sean polímeros naturales (evitando toxicidad asociada a polímeros sintéticos) e ingredientes de grado alimentario. Dichas nanopartículas protegen al CBA de su degradación frente a agentes externos
30 (luz, cambios pH, oxidación, etc.).

Las nanopartículas de la invención se pueden resuspender en medio acuoso protegiendo al CBA de la degradación en disolución. Además, pueden presentarse en

forma de un polvo seco, manteniendo estable el CBA y posibilitando su almacenamiento durante largos periodos de tiempo (en particular, para su incorporación en preparaciones alimenticias sólidas).

Adicionalmente, las nanopartículas de la invención son también adecuadas para
5 la elaboración de composiciones cosméticas y farmacéuticas de uso tópico.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, en adelante "composición de la invención", que comprende, al menos, una nanopartícula de la invención y un vehículo aceptable en alimentación, farmacia o cosmética; en una realización particular, dicha composición de la invención comprende una pluralidad de
10 nanopartículas de la invención. En una realización particular, dicha nanopartícula de la invención es una nanopartícula que comprende una matriz de zeína y un aminoácido básico; en otra realización particular, dicha nanopartícula de la invención es una nanopartícula cargada de la invención, es decir, una nanopartícula que comprende una matriz de zeína y un aminoácido básico, y un CBA con actividad nutricional,
15 terapéutica y/o cosmética, y un vehículo farmacéuticamente o cosméticamente aceptable o un vehículo apto para alimentación.

Dichas nanopartículas de la invención tienen un tamaño medio de partícula inferior a $1\ \mu\text{m}$, comprendido, típicamente, entre 1 y 999 nm, preferentemente entre 10 y 900 nm, más preferentemente entre 50 y 500 nm, aún más preferentemente entre 100
20 y 450 nm, todavía más preferentemente entre 140 y 400 nm. Ventajosamente, las nanopartículas de la invención tienen un tamaño de partículas de alrededor de 200 nm aproximadamente, con el fin de evitar la alteración de propiedades organolépticas (textura al paladar), lo que resulta particularmente adecuado cuando se utilizan en el campo alimentario.

En una realización particular, dicho CBA se selecciona del grupo formado por
25 aminoácidos, antimicrobianos, aromatizantes, conservantes, edulcorantes, esteroides, fármacos, hormonas, lípidos, péptidos, polinucleótidos, polisacáridos, proteínas, proteoglicanos, saborizantes, vitaminas, y sus mezclas.

En una realización particular, dicho CBA es un CBA liposoluble. Ejemplos
30 ilustrativos, no limitativos, de CBA liposolubles incluyen vitaminas, por ejemplo de las familias A, D, E, K y sus derivados, fosfolípidos, carotenoides (carotenos, licopeno, luteína, capsantina, zeaxantina, etc.), ácidos grasos omega-3 (e.g. DHA, EPA, etc.),

aminoácidos (e.g., iso-leucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano, y valina), fitostanoles y fitosteroles (e.g. sitosterol, campesterol, estigmasterol, etc.), polifenoles (e.g. quercetina, rutina, resveratrol, kaempferol, miricetina, isoramnetina, etc.) y sus derivados.

5 En otra realización particular, dicho CBA es un CBA hidrosoluble, preferentemente, un CBA hidrosoluble ácido. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de CBA hidrosolubles incluyen vitaminas, por ejemplo, vitaminas de las familias B o C, y sus derivados, sales o ésteres; ácido hialurónico, condroitín sulfato, ácido tióctico, sus sales o ésteres, etc. En una realización particular, dicho CBA hidrosoluble se selecciona
10 del grupo formado por ácido fólico, ácido 4-aminobenzoico, niacina, ácido pantoténico, tiamina monofosfato, tiamina pirofosfato, tiamina trifosfato, ácido ascórbico, ácidos pteroilpoliglutámicos (derivados del ácido fólico: poliglutamatos de folato; folatos de poliglutamato), ácido folínico, ácido nicotínico, ácido hialurónico, ácido tióctico, ácido p-cumárico, ácido caféico, sus derivados, ésteres o sales farmacéuticamente o
15 cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas.

En una realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica adecuada para su administración por vía tópica; para ello, dicha composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más excipientes adecuados para su administración por vía tópica, por ejemplo, en
20 forma de gel, pomada, crema, etc. Información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones farmacéuticas destinadas a su administración por vía tópica así como sobre la producción de dichas composiciones farmacéuticas puede encontrarse en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones. La dosis a administrar de nanopartículas de la
25 invención puede variar dentro de un amplio intervalo, por ejemplo, entre aproximadamente 0,5 (g/cm² de zona a tratar) y aproximadamente 2 (g/cm² de zona a tratar), de una composición de la invención que contiene entre un 0,1% y un 30% de nanopartículas de la invención, preferentemente, entre 0,5 % y 5 %.

En otra realización particular, la composición de la invención es una
30 composición cosmética adecuada para su administración por vía tópica; para ello, dicha composición comprende un vehículo cosméticamente aceptable que comprende uno o más excipientes adecuados para su administración por vía tópica, por ejemplo, en forma

de gel, crema, champú, loción, etc. Información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones cosméticas destinadas a su administración por vía tópica así como sobre la producción de dichas composiciones cosméticas puede encontrarse en el libro "Manual de Cosmetología", de Octavio Diez Sales, I^a Edición, 1998, Editorial Videocinco, S.A.

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición alimenticia, tal como una preparación alimenticia sólida, líquida o semi-sólida.

En una realización particular, la composición de la invención comprende:

- 10 - zeína, entre 15% y 45% en peso;
- un aminoácido básico, entre 1% y 4 % en peso;
- quercetina o resveratrol, entre 0,5% y 5% en peso; y
- un sacárido, entre 45% y 80% en peso,

donde todas las proporciones son en peso respecto al total de la composición.

15 En otra realización particular, la composición de la invención comprende:

- zeína, entre 15% y 45% en peso;
- un aminoácido básico, entre 4% y 10% en peso;
- opcionalmente, polisorbato (e.g., tween 80), entre 0,05% y 0,5% en peso;
- ácido fólico, entre 0,5% y 5% en peso;
- 20 - un sacárido, entre 45% y 80% en peso; y

donde todas las proporciones son en peso respecto al total de la composición.

Alternativamente, la composición de la invención puede ser incorporada en un producto alimenticio. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un producto alimenticio que comprende una composición de la invención. Dicho producto alimenticio puede encontrarse en forma líquida, semi-sólida o sólida. Ventajosamente, con el fin de evitar o minimizar la disolución total o parcial de las nanopartículas de la invención y, de este modo, colaborar a su estabilidad, dicho producto alimenticio tiene un pH ácido, es decir, inferior a 7, preferentemente, igual o inferior a 6, más preferentemente, igual o inferior a 5. Ejemplos ilustrativos de productos alimenticios que puede ser enriquecidos o fortificados con la composición de la invención incluyen la leche y sus derivados (yogures, quesos, cuajadas, etc.), zumos, mermeladas, productos de panadería y bollería, cárnicos fermentados, salsas, etc. Igualmente, la

composición de la invención puede ser incorporada en un producto para alimentación animal, por ejemplo, en piensos.

EJEMPLOS

5 Los siguientes ejemplos describen la producción de nanopartículas de zeína y un aminoácido básico, tal como Usina, que pueden incorporar un compuesto biológicamente activo [CBA] en su interior, concretamente resveratrol, quercetina o ácido fólico. Dichas nanopartículas son capaces de proteger dicho CBA de las degradaciones que pueda sufrir en el alimento debido a cambios en el pH, luz,
10 oxidación, etc.

Procedimiento general de producción de nanopartículas de zeína vacías

El procedimiento general de producción de nanopartículas de zeína comprende la disolución de dicha proteína, zeína (Sigma-Aldrich - número de producto Z 3625), en
15 una solución hidroalcohólica, tal como, por ejemplo, una solución de etanol al 50% (p/v), junto con una cantidad determinada de lisina (Sigma-Aldrich), seguido de la adición, bajo agitación magnética y con flujo constante, de un volumen determinado de agua, para dar lugar a la formación de las nanopartículas bajo apariencia de una suspensión lechosa amarillenta.

20

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

Los distintos estudios necesarios para conseguir una caracterización fisicoquímica completa de las nanopartículas se describen a continuación.

Dentro de los ensayos físico-químicos, se determinó el tamaño y la carga
25 superficial de las nanopartículas. El primero de dichos parámetros (tamaño) fue obtenido por espectroscopia de correlación fotónica, utilizando un Zetasizer nano Z-S (Malvern Instruments/Optilas, España). El segundo de dichos parámetros (carga superficial) fue determinado a través de la medida del potencial zeta, utilizando un Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, New York, EEUU).

30 El rendimiento del proceso de formación de nanopartículas se calculó a través de la cuantificación de la zeína libre restante tras la obtención de las nanopartículas, recogida en los sobrenadantes obtenidos al centrifugar la formulación (17.000 x g, 20

minutos). Para la cuantificación, los sobrenadantes se diluyeron en etanol hasta obtener una concentración del alcohol del 75% (p/v), siendo éste el mismo medio en el que fueron preparados los estándares de la curva de calibrado.

La cantidad de proteína (zeína) que forma partículas en la formulación se estimó como la diferencia entre la cantidad inicial añadida y la cantidad cuantificada en los sobrenadantes recogidos durante la etapa de purificación. El rendimiento se estimó como:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{mg Zeína Totales} - \text{mg Zeína en Sobrenadante}}{\text{mg Zeína Totales}} \cdot 100 \quad [\text{Eq. 1}]$$

Por otra parte, para confirmar los resultados obtenidos por diferencia entre el total y el contenido en zeína del sobrenadante, se realizó un estudio de cuantificación del pellet obtenido tras la centrifugación. En este caso, para romper las partículas se empleó una solución hidroalcohólica de etanol al 75% (p/v), siendo éste el mismo medio empleado para la preparación de la curva de calibrado. Así pues, en este caso el rendimiento se estimó como:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{mg Zeína en pellet}}{\text{mg Zeína Totales}} \cdot 100 \quad [\text{Eq. 2}]$$

Además, para confirmar la validez del método de cuantificación y comprobar que no existe un efecto matriz se tomaron volúmenes conocidos de formulación sin centrifugar y se diluyeron hasta obtener una concentración en etanol del 75%. De este modo se pudo cuantificar el total de zeína presente en la formulación y compararlo con la cantidad de zeína añadida inicialmente, encontrando en todos los casos desviaciones inferiores al 5%.

Para la realización de los distintos cálculos se utilizó una curva de calibrado entre 90 y 1.200 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0,999$; LD = 43 $\mu\text{g/mL}$; LC = 143 $\mu\text{g/mL}$).

Todas las cuantificaciones se llevaron a cabo mediante espectrofotometría UV a 278 nm (Agilent 8453, sistema de espectroscopia UV-visible).

La morfología de las nanopartículas se observó por microscopía electrónica de barrido (Zeiss, DSM 940A Alemania). Para ello, las nanopartículas se cubrieron con una capa de oro molecular de unos 9 nm (Equipo Emitech K550, Sputter-Coater, Reino

Unido) y las fotografías se realizaron con un microscopio Zeiss DMS 940 A (Estados Unidos).

5 Procedimiento general de producción de nanopartículas de zeína conteniendo quercetina o resveratrol

El procedimiento general de producción de nanopartículas de zeína cargadas con quercetina o resveratrol comprende la disolución de la proteína (zeína) en medio hidroalcohólico (50% de etanol (p/v)) junto con una cantidad determinada de lisina seguida de la adición, bajo agitación magnética, de un volumen determinado de una dilución con agua de una solución alcohólica de dicho antioxidante (quercetina o resveratrol) previamente preparada. Tras la incubación de la mezcla durante unos minutos, el último paso consiste en la adición de un volumen determinado de agua, para dar lugar a la formación de las nanopartículas bajo apariencia de una suspensión lechosa amarillenta.

A continuación, si se desea, tras una homogeneización de 3 minutos mediante agitación, se añade, sin dejar de agitar, un volumen determinado de solución de un sacárido (lactosa, trehalosa, manitol, glucosa, sorbitol, maltodextrina, maltosa, etc.). Finalmente, la suspensión se pulveriza en un spray dryer (Büchi Mini Spray Drier B-191, Büchi Labortechnik AG, Suiza) bajo las siguientes condiciones:

- 20 - Temperatura de entrada de aire (Inlet temperature): 70-110°C
- Temperatura salida del aire (Outlet temperature): 30-90°C
- Presión de aire (Air Pressure): 2-10 bar [2×10^5 - 10×10^5 Pa]
- Velocidad de bombeo de la muestra (Pumping rate): 2-9 mL/min
- Aspiración (Aspirador): 30-100%
- 25 - Flujo de aire (Air flow): 200-900 L/h

Opcionalmente, tras la adición del sacárido, las formulaciones pueden ser secadas mediante liofilización en lugar de mediante aspiración o pulverización ("spray drying").

30 Determinación de la cantidad de quercetina o resveratrol asociado a las partículas de zeína

La cantidad de quercetina o resveratrol asociado a las nanopartículas se cuantificó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), de acuerdo con el procedimiento descrito por Lacopini (Lacopini y col., J Food Comp Anal 2008;21:589-598), aunque con algunas variaciones. El análisis se llevó a cabo en un
5 cromatógrafo modelo 1100 series LC (Agilent, Waldbornn, Germany) acoplado a un sistema de detección UV de diodo-array.

Para el análisis de las muestras frescas (antes de su secado), los sobrenadantes obtenidos tras el proceso de purificación de las nanopartículas [por filtración de un volumen determinado de la formulación a través de tubos de diálisis Vivaspin® 300,000
10 MWCO (VIVASPIN 2, Sartorius stedim Biotech, Alemania)], se diluyeron hasta la obtención de una solución hidroalcohólica con un contenido en etanol del 75% (p/v). Por su parte, el pellet se disolvió también en etanol al 75% (p/v) para romper las partículas y mantener tanto la zeína como el CBA (quercetina o resveratrol) y el aminoácido en disolución y proceder así a su cuantificación. La suma del contenido en
15 CBA encontrado en ambas fracciones (sobrenadante y pellet) coincidió en todo momento con el total añadido inicialmente. Además, también fue posible cuantificar la cantidad total de CBA disolviendo un volumen determinado de la formulación en etanol al 75% (p/v). Este estudio permitió confirmar que las diferencias entre la cantidad de CBA añadido y el obtenido por cuantificación a través del método cromato gráfico
20 descrito eran inferiores al 10% en todos los casos.

Por otra parte, para la preparación de las muestras en polvo (formulaciones secadas), se tomaron aproximadamente 15 mg de la formulación de nanopartículas y se resuspendieron en etanol. El sobrenadante obtenido tras la filtración de un volumen determinado de la suspensión a través de tubos de diálisis Vivaspin® 300,000 MWCO
25 (VIVASPIN 2, Sartorius stedim Biotech, Alemania), se diluyó con agua destilada hasta una concentración de etanol del 75% (p/v). El pellet se disolvió en un volumen determinado de etanol al 75% (p/v). Además, también se cuantificó el total del CBA contenido en los 15 mg de polvo disolviéndolos directamente en etanol al 75% (p/v).

Las muestras se analizaron empleando una columna Alltech C18 Alltima™ (5
30 µm, 150 mm x 2,1 mm) calentada a 40°C, con una precolumna compatible Gemini® C18 AJO-7596 y una mezcla de agua/metano/ácido acético glacial en gradiente (véase la Tabla 1) como fase móvil bombeada a un flujo de 0,25 mL/min.

La detección se realizó a 360 nm para la quercetina y a 306 nm para el resveratrol. El volumen de inyección de muestra fue de 10 µL. El tiempo de retención de dichos compuestos es de $24,2 \pm 0,2$ minutos en el caso de la quercetina y de $22,8 \pm 0,5$ minutos en el caso del resveratrol.

5

Tabla 1

**Condiciones de gradiente para la fase móvil
(A: agua, B: metanol, C: acético glacial)**

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	80	15	5
15	70	25	5
20	10	85	5
30	10	85	5
35	80	15	5
40	80	15	5

10 Previamente a la cuantificación de las muestras se prepararon distintas rectas de calibrado de concentraciones entre 1 y 100 µg/mL en medio hidroalcohólico (75% de etanol), obteniendo resultados de precisión y exactitud inferiores del 5%.

Finalmente, la cantidad de quercetina o resveratrol asociada a las nanopartículas [eficacia de encapsulación (E.E.)] se calculó como la diferencia entre la cantidad del
15 CBA añadido inicialmente y la cantidad del mismo cuantificada en los sobrenadantes.

$$E.E. (\%) = \frac{mgCBA_{Totales} - mg\ CBA\ en\ Sobrenadante}{mg\ CBA\ Totales} \cdot 100$$

20 **Procedimiento general de producción de nanopartículas de zeína conteniendo ácido fólico**

El procedimiento general de producción de nanopartículas de zeína cargadas con ácido fólico comprende la disolución de la proteína (zeína) en medio hidroalcohólico (50% de etanol (p/v)) junto con una cantidad determinada de lisina seguida de la adición, bajo agitación magnética, de un volumen determinado de una dilución
25 alcohólica de una solución acuosa de dicha vitamina previamente preparada. Tras la incubación de la mezcla durante unos minutos, el último paso consiste en la adición de

un volumen determinado de agua, para dar lugar a la formación de las nanopartículas bajo apariencia de una suspensión lechosa amarillenta.

A continuación, si se desea, tras una homogeneización de 3 minutos mediante agitación, se añade, sin dejar de agitar, un volumen determinado de solución de un
5 sacárido (lactosa, trehalosa, manitol, glucosa, sorbitol, maltodextrina, maltosa, etc.). Finalmente, la suspensión se pulveriza en un spray dryer (Büchi Mini Spray Drier B-191, Büchi Labortechnik AG, Suiza) bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura de entrada de aire (Inlet temperature): 70-130°C
- Temperatura salida del aire (Outlet temperature): 30-90°C
- 10 - Presión de aire (Air Pressure): 2-10 bar [2×10^5 - 10×10^5 Pa]
- Velocidad de bombeo de la muestra (Pumping rate): 2-9 mL/min
- Aspiración (Aspirador) : 30-100%
- Flujo de aire (Air flow): 200-900 L/h

Opcionalmente, tras la adición del sacárido, las formulaciones pueden ser
15 secadas mediante liofilización en lugar de mediante aspiración o pulverización ("spray drying").

Determinación de la cantidad de ácido fólico asociado a las partículas de zeína

La cantidad de ácido fólico asociado a las nanopartículas se cuantificó por
20 cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), de acuerdo con el procedimiento descrito por Faye [Faye Russell, L., Quantitative Determination of Water-Soluble Vitamins. En *Food Analysis by HPLC*, Nollet, L.M.L. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, Segunda Edición, Capítulo 10 (2000) pp. 444-445]. El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo modelo 1100 series LC (Agilent, Waldbornn, Germany) acoplado a un
25 sistema de detección UV de diodo-array. Los datos se analizaron en un ordenador Hewlett-Packard mediante el software Chem-Station G2171. Para la separación de ácido fólico se empleó una columna Alltech C18 Alltima™ (5 μm , 150 mm x 2,1 mm) calentada a 40°C, con una precolumna compatible Gemini® C18 AJO-7596. La fase
30 móvil se compuso de una mezcla de H₃PO₄ (33 mM, pH 2,3)/acetonitrilo en gradiente (Tabla 2) y fue bombeada a un flujo de 0,25 mL/min. La detección se realizó a 290 nm. El volumen de inyección de muestra fue de 10 μL . El tiempo de retención del ácido fólico es de $22,6 \pm 0,5$ minutos.

Tabla 2

Condiciones de gradiente para la fase móvil (A: H₃PO₄ 33 mM, B: Acetonitrilo).

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	95,0	5,0
8	95,0	5,0
33	82,5	17,5
45	95,0	5,0

5 Previamente a la cuantificación de las muestras se prepararon distintas rectas de calibrado de concentraciones entre 2 y 400 µg/mL, obteniendo resultados de precisión y exactitud superiores al 95%, con la confirmación de que la presencia de zeína y/o aminoácidos en la disolución no interfería en la correcta cuantificación del ácido fólico.

Para el análisis de las muestras frescas (antes de su secado), se procedió a
 10 cuantificar los sobrenadantes obtenidos tras la filtración de un volumen determinado de la formulación a través de tubos de diálisis Vivaspín® 300,000 MWCO (VIVASPIN 2, Sartorius stedim Biotech, Alemania). Por su parte, el pellet se disolvió en NaOH 0,05M para romper las partículas y mantener tanto la zeína como el ácido fólico y el aminoácido en disolución y proceder así a su cuantificación. La suma del contenido en
 15 ácido fólico encontrado en ambas fracciones (sobrenadante y pellet) coincidió en todo momento con el total añadido inicialmente. Además, también fue posible cuantificar la cantidad total de ácido fólico disolviendo 1 mL de la formulación en 1 mL de NaOH 0,05 M. Este estudio permitió confirmar que las diferencias entre la cantidad de ácido fólico añadido y el obtenido por cuantificación a través del método cromato gráfico
 20 descrito son inferiores al 10% en todos los casos.

Por otra parte, para la cuantificación de las muestras en polvo se tomaron 15 mg de nanopartículas, se resuspendieron en 2 mL de agua y se centrifugaron, procediendo entonces de igual modo que con las muestras frescas.

25 **Estudios farmacocinéticos. Biodisponibilidad de ácido fólico encapsulado en nanopartículas de zeína**

Los estudios farmacocinéticos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del comité ético de la Institución así como la legislación Europea en animales de

experimentación (86/609/EU). Para ello, 20 ratas macho Wistar, de peso medio 200 g, fueron sometidas a condiciones normales de luz-oscuridad (12 horas - 12 horas), y durante la semana previa al estudio fueron alimentadas a demanda con un pienso deficitario en ácido fólico (Folie Acid Deficient Diet. TD. 95247. Harían, USA) y agua.

- 5 Doce horas antes de la administración de las formulaciones, las ratas se aislaron en jaulas metabólicas sin acceso a comida, pero con acceso libre al agua de bebida.

Los animales fueron divididos en 4 grupos de tratamiento (5 ratas por grupo). Al primero de los grupos se le administró por vía oral únicamente 1 mL de PBS (Buffer Fosfato pH 7,4). Los dos grupos siguientes se trataron con dosis orales únicas de 1
10 mg/kg (200 µg/rata) de ácido fólico (Aditio, Panreac Química, Barcelona, España) incorporado en nanopartículas de zeína, o bien libre (no encapsulado) disuelto en agua. Se administró 1 mL de cada una de las distintas formulaciones dispersas en agua a través de una cánula gastro-esofágica. Por último, al cuarto grupo se le administró por
15 vía intravenosa en la vena safena la misma dosis de ácido fólico libre (1 mg/kg) disuelto en tampón fosfato (PBS) (0,5 mL). Antes de la administración de las formulaciones, se extrajo sangre de la vena safena de la cola con el fin de comprobar el nivel basal de la vitamina en cada rata. Tras la administración se procedió a extraer, a diferentes tiempos, un volumen de sangre de aproximadamente 500 µL utilizando tubos de separación del suero (SARSTEDT Microtube 1,1 mL Z-Gel). En todos los casos, para evitar el dolor
20 de las ratas, la extracción fue llevada a cabo tras dormir al animal con anestesia inhalatoria (isoflurano:oxígeno), comprobando en todo momento sus constantes.

Posteriormente, se repuso volemia administrando 500 µL de suero salino fisiológico vía intraperitoneal, previamente calentado a la temperatura del animal. Durante este periodo, se examinó el estado de los animales (movilidad, agresividad,
25 reacciones alérgicas y temperatura) no observándose ningún cambio significativo.

Pretratamiento y cuantificación del ácido fólico de las muestras de suero

La cuantificación de ácido fólico en las muestras de suero, obtenidas tras centrifugar los tubos con sangre (6.000 rpm, 20 min, 20°C), fue llevada a cabo mediante
30 una técnica de inmunoensayo enzimático. Para ello se empleó un Kit Elisa (Diagnostic automation, INC. Calabasas, California USA), aprobado por la FDA para la

determinación cuantitativa de ácido fólico en alimentos. La muestra de suero fue cuantificada sin tratamiento previo y siguiendo las especificaciones del fabricante.

En vista de que el kit está concebido para su empleo en alimentos, se realizó una serie de estudios previos con el fin de confirmar su capacidad de cuantificación de la
5 vitamina en muestras de suero. Dichos estudios consistieron en realizar una comparativa exhaustiva entre los resultados obtenidos mediante el kit y los obtenidos por el método de cromatografía líquida de alta resolución descrito en apartados anteriores, con el siguiente proceso previo de preparación: a 50 μ L de suero se le añadieron cantidades variables (0-300 μ L) de ácido fólico disuelto en una solución de tetraborato sódico 50
10 mM preparada en ascorbato sódico al 1% (p/v). La solución resultante se llevó a un volumen final de 350 μ L (dilución del suero 1:7) con la solución de tetraborato sódico 50 mM. Cada mezcla se llevó a ebullición durante 30 minutos y posteriormente se enfrió a 2°C y se conservó durante toda la noche a dicha temperatura.

Tras centrifugar las muestras resultantes a 20.000 rpm durante 20 minutos y
15 filtrarlas a través de un filtro de 20 μ m, su contenido en ácido fólico se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución empleando el método descrito previamente. En este caso, y debido a la baja concentración de la vitamina en suero, se empleó la técnica de adiciones estándar para minimizar los errores en la cuantificación y eliminar cualquier interferencia de la matriz. Este método de extracción y cuantificación
20 por HPLC fue validado siguiendo los criterios establecidos por la FDA.

En todos los casos estudiados las diferencias en las concentraciones de ácido fólico en suero encontradas por ambos métodos fueron inferiores al 10%. Por ello se escogió la técnica de inmunoensayo enzimático para cuantificar la totalidad de las muestras, ya que requiere menor cantidad de suero para su análisis y se trata de una
25 técnica más sencilla y rápida, cuyo límite de detección (2 ng/mL) es muy inferior al de la técnica cromatográfica.

EJEMPLO 1

Preparación y caracterización de nanopartículas de zeína vacías.

30 Rendimiento del proceso de obtención. Influencia de la cantidad de lisina incorporada en la formulación en las características físico-químicas de las nanopartículas

Se disolvieron 60 mg de zeína (Sigma-Aldrich), junto con 10 mg de lisina (Sigma-Aldrich), en 8,8 mL de una solución de etanol al 50% (p/v). Posteriormente, sobre esta disolución, se añadieron 8,8 mL de agua bajo agitación magnética y flujo constante, para formar las nanopartículas. Este procedimiento fue realizado por triplicado.

5 La Figura 1 (A y B) muestra las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de las partículas de zeína obtenidas por este método.

Con el objetivo de conocer la influencia de la lisina y el porcentaje de etanol de la disolución hidroalcohólica inicial en las características físico-químicas de las nanopartículas se prepararon 3 nuevas formulaciones variando estos parámetros: (i) una
10 de ellas sin lisina, (ii) otra con lisina y la disolución hidroalcohólica inicial preparada en etanol al 75% (p/v) en lugar del 50% (p/v), y (iii) la tercera se preparó también en etanol al 75% (p/v) y sin lisina.

La Tabla 3 resume los parámetros físico-químicos principales de las nanopartículas resultantes.

15

Tabla 3

Características físico-químicas de las nanopartículas de zeína (media \pm SD, n=6) en presencia de distintas cantidades de lisina y porcentajes de etanol en que se disuelve la zeína antes de la formación de las nanopartículas

<u>Relación en peso lisina:zeína</u>	<u>Porcentaje de etanol</u>	<u>Tamaño (nm)</u>	<u>σ DI^a</u>	<u>Potencial zeta (mV)</u>	<u>Rendimiento^b (%)</u>
0 (*)	50	150 \pm 4	0,11 \pm 0,03	- 7,2 \pm 3,6	-
1 : 6	50	142 \pm 4	0,12 \pm 0,09	- 37,8 \pm 1,6	94,7 \pm 1,1
0	75	203 \pm 2	0,09 \pm 0,01	- 8,9 \pm 7,6	94,7 \pm 2,4
<u>1 : 6</u>	<u>75</u>	<u>164 \pm 2</u>	<u>0,07 \pm 0,01</u>	<u>- 46,0 \pm 1,5</u>	<u>98,5 \pm 1,6</u>

20 (*) Parcialmente soluble

^aPDI: polidispersión

^bRendimiento: Porcentaje de zeína transformada en nanopartículas [Eq. 1]

Los estudios estadísticos realizados (test de muestras independientes no
25 paramétrico: Kruskal-Wallis) revelaron la existencia de evidencias estadísticamente significativas para afirmar que la presencia de lisina incide en un incremento de su carga superficial. Las formulaciones preparadas con elevadas cantidades iniciales de etanol (75% (p/v)), mostraron tamaños y rendimientos superiores con respecto a las

obtenidas a partir de una solución inicial de etanol al 50% (p/v), no habiendo diferencias significativas en su carga superficial.

La carga superficial encontrada en las muestras que no contenían lisina era muy próxima a cero, lo que significa que dichas partículas presentaban una mayor tendencia a la aglomeración. Sin embargo, en presencia de lisina, la carga superficial es lo
5 suficientemente elevada como para evitar dicho fenómeno.

Así pues, para la encapsulación del CBA se escogieron las formulaciones obtenidas a partir de una solución hidroalcohólica conteniendo un 50%> de etanol (p/v) y en presencia de lisina ya que esto evita la agregación de las nanopartículas, las hace
10 versátiles para la encapsulación de CBAs tanto liposolubles como hidrosolubles, y, además, se consigue un ahorro significativo en el empleo del reactivo.

EJEMPLO 2

Preparación y caracterización de nanopartículas de zeína conteniendo resveratrol.

15 **Influencia del contenido en lisina y resveratrol en la eficacia de encapsulación**

Se prepararon distintas disoluciones hidroalcohólicas, todas ellas conteniendo 60 mg de zeína y cantidades variables de lisina (0, 5, 10 ó 20 mg), en un volumen final de 8,8 mL de etanol al 50%.

Por otra parte, se disolvieron 47 mg de resveratrol en 15 mL de etanol y, a
20 continuación, se diluyeron a 24 mL con agua.

Posteriormente, se añadieron volúmenes variables de la disolución de resveratrol (1, 2 0 3 mL) sobre las distintas disoluciones de zeína preparadas. Pasados 5 minutos de incubación se añadieron sobre la mezcla 8,8 mL de agua bajo agitación magnética y flujo constante. Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada tipo de
25 formulación.

La Tabla 4 recoge las características físico-químicas de las nanopartículas obtenidas en cada caso.

Tabla 4

Características físico-químicas de las nanopartículas de zeína (disueltas inicialmente en etanol al 50% (p/v)) con cantidades variables de lisina (media \pm SD, n = 3) con resveratrol encapsulado. La relación en peso entre el resveratrol y la zeína es de 1:16

5

Relación en peso lisina: zeína	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en resveratrol (μ g R/mg NP)	Eficacia de encapsulación (%)
0	149 \pm 1	0,08 \pm 0,02	23,3 \pm 0,7	56,3 \pm 3,6	83,7 \pm 1,9
1 : 12	154 \pm 1	0,08 \pm 0,03	- 30,5 \pm 0,9	59,0 \pm 3,1	91,4 \pm 1,9
1 : 6	148 \pm 1	0,08 \pm 0,02	- 45,2 \pm 3,0	54,6 \pm 2,3	85,2 \pm 1,3
1 : 3	167 \pm 2	0,07 \pm 0,02	- 44,2 \pm 1,2	56,7 \pm 3,0	88,1 \pm 1,9

R: Resveratrol; NP: Nanopartícula

Los resultados obtenidos muestran que la presencia de lisina no influye significativamente en la eficacia de encapsulación. Así pues, teniendo en cuenta que dicho aminoácido modifica la carga superficial de las partículas y reduce la posibilidad de que se agreguen, y que, además, incrementa el rendimiento de formación de partículas, se escogió la formulación que contenía el aminoácido incorporado para continuar con el estudio.

10

La Tabla 5 recoge las características físico-químicas de las nanopartículas obtenidas variando el contenido en resveratrol cuando la cantidad de lisina es constante.

15

Tabla 5

Características físico-químicas de las nanopartículas de zeína (disueltas inicialmente en etanol al 50% p/v) con cantidades variables de resveratrol (media \pm SD, n = 3). La relación en peso entre la lisina y la zeína es de 1:6

20

Relación en peso resveratrol: zeína	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en resveratrol (μ g R/mg NP)	Eficacia de encapsulación (%)	μ g R/mg formulación
1 : 10,4	162 \pm 1	0,10 \pm 0,02	- 48,0 \pm 0,7	70,9 \pm 6,4	70,4 \pm 1,9	76,1
1 : 16	148 \pm 1	0,08 \pm 0,02	- 45,2 \pm 3,0	54,6 \pm 2,3	85,2 \pm 1,3	51,1
1 : 31,4	171 \pm 3	0,06 \pm 0,02	- 42,4 \pm 2,8	28,9 \pm 1,8	92,4 \pm 3,8	26,4

R: Resveratrol; NP: Nanopartícula

Los resultados obtenidos revelan que conforme se incrementa la cantidad de resveratrol añadida a la formulación disminuye la eficacia de encapsulación pero

incrementa la cantidad de sustancia bioactiva encapsulada en el interior de las partículas.

EJEMPLO 3

5 Preparación y caracterización de nanopartículas de zeína conteniendo resveratrol secadas por aspiración (spray drving)

Se disolvieron 126 mg de zeína junto con 21 mg de lisina en 14 mL de etanol al 50% (p/v).

10 Por otra parte, se disolvieron 60 mg de resveratrol en 10 mL de etanol y, posteriormente, se tomaron 1,4 mL de esa disolución y se llevaron a un volumen final de 2,8 mL con agua.

A continuación, se añadieron 1,1 mL de la solución de resveratrol diluida sobre la disolución de zeína y se dejó incubar la mezcla durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadieron a la mezcla 15 mL de agua bajo agitación magnética y flujo
15 constante.

Finalmente se añadieron 260 mg de maltodextrina a la mezcla antes de secarla mediante el empleo del spray dryer. Las condiciones del proceso fueron:

- Temperatura de entrada de aire (Inlet temperature): 110°C
- Temperatura salida del aire (Outlet temperature): 70°C
- 20 - Presión de aire (Air Pressure): 6 bar [6×10^5 Pa]
- Velocidad de bombeo de la muestra (Pumping rate): 4,5 mL/min
- Aspiración: 94%
- Flujo de aire (Air flow): 700 L/h

La Tabla 6 resume las características físico-químicas de la formulación resultante.

Tabla 6

5 **Características físico-químicas de las nanopartículas de zeína con lisina y resveratrol (R) (media \pm SD, n = 3), secadas mediante la técnica de spray-drying, empleando maltodextrina como adyuvante del proceso. La relación en peso entre la lisina y la zeína es de 1:6. La relación en peso entre el sacárido (maltodextrina) y la zeína es 2:1**

Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	μ g R/mg formulación
245 \pm 6	0,24 \pm 0,01	-30,3 \pm 0,3	9,4 \pm 0,8

10 La cantidad encapsulada por mg de nanopartículas y la eficacia de encapsulación no se ven modificadas por el secado por aspersion (pulverización).

La Figura 2 muestra las imágenes obtenidas por microscopía de barrido electrónico de las partículas de zeína conteniendo resveratrol.

15 Por otra parte, se llevaron a cabo los mismos experimentos aplicando la técnica de altas presiones (150 MPa en un ciclo de 5 minutos, y 400 MPa en un ciclo de 5 minutos) tras la formación de las nanopartículas, previa a su paso por el spray dryer. Los resultados de encapsulación obtenidos fueron similares a los obtenidos sin dicho tratamiento.

EJEMPLO 4

20 Preparación y caracterización de nanopartículas de zeína conteniendo quercetina.

Influencia del contenido en lisina y quercetina en la eficacia de encapsulación

Se prepararon distintas disoluciones, todas ellas conteniendo 60 mg de zeína y 10 mg de lisina, en un volumen final de 8,8 mL de etanol al 50%.

25 Por otra parte, se disolvieron 150 mg de quercetina en 50 mL de etanol y posteriormente se diluyeron tomando 31 mL de la disolución anterior y llevándolos a un volumen final de 50 mL con agua.

Posteriormente, se añadieron volúmenes variables de la disolución de quercetina (0,5-3 mL) sobre las distintas disoluciones de zeína preparadas. Pasados 5 minutos de incubación se añadieron sobre la mezcla 8,8 mL de agua bajo agitación magnética y

flujo constante. Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada tipo de formulación.

La Figura 3 muestra las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de las partículas de zeína, con quercetina encapsulada, obtenidas por este método. La Tabla 7 recoge las características físico-químicas obtenidas en cada caso.

Tabla 7

Características físico-químicas de las nanopartículas de zeína con lisina y de quercetina (Q) (media \pm SD, n = 6). La relación en peso entre la lisina y la zeína es de 1:5,5

Relación en peso quercetina: zeína	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en quercetina μ g Q/ mg NP	Eficacia de encapsulación (%)
1:64	147 \pm 1	0,22 \pm 0,01	- 60,2 \pm 1,4	16,1 \pm 1,0	93,2 \pm 8,0
1:30	161 \pm 4	0,13 \pm 0,03	- 57,1 \pm 1,2	29,1 \pm 1,8	85,6 \pm 1,3
1:20	161 \pm 1	0,05 \pm 0,01	- 48,3 \pm 3,2	38,5 \pm 1,3	76,7 \pm 2,5
1:16	165 \pm 2	0,04 \pm 0,03	- 46,8 \pm 2,4	48,7 \pm 1,1	77,9 \pm 1,8
1:11	167 \pm 2	0,06 \pm 0,01	- 45,1 \pm 2,4	59,7 \pm 2,6	64,6 \pm 2,7

NP: Nanopartícula

Los estudios estadísticos realizados (test de muestras independientes no paramétrico: Kruskal-Wallis) revelaron la existencia de evidencias estadísticamente significativas para considerar que existían diferencias en las características físico-químicas de las distintas formulaciones. A la vista de los resultados obtenidos, se puede considerar que, conforme se incrementa la cantidad de quercetina añadida a la formulación, la eficacia de encapsulación disminuye y la cantidad de CBA (quercetina) encapsulado aumenta de forma potencial (Figura 4), atendiendo a la siguiente expresión matemática:

$$y = 369,92 \cdot x^{-0,7526}, \quad R^2 = 0,9955 \quad [\text{Eq. 3}]$$

donde

y corresponde a la cantidad de quercetina encapsulada (μ g Q/mg NP), y x corresponde a la relación inicial entre quercetina y zeína (mg zeína/mg quercetina).

Con respecto a los tamaños y potenciales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas muestras analizadas.

Por otra parte, se intentó conocer la influencia de la mayor o menor presencia de lisina en la formulación en las características físico-químicas de las nanopartículas, por lo que se realizó el mismo estudio, manteniendo constante en este caso la cantidad de quercetina inicial y variando la cantidad de aminoácido añadido.

Así pues, se prepararon distintas soluciones de zeína conteniendo cantidades variables de lisina (0 a 20 mg). La cantidad de la solución de quercetina descrita anteriormente que se añadió a la formulación fue de 3 mL en todos los casos, de modo que la proporción en peso quercetina:zeína fue de 1:1.

La Tabla 8 muestra los resultados de caracterización físico-química obtenidos en cada caso.

Tabla 8

Características físico-químicas de las nanopartículas de zeína con quercetina y cantidades variables de lisina (media \pm SD, n = 6). La relación en peso entre la quercetina y la zeína es de 1:1

Relación en peso lisina:zeína	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en quercetina μ g Q/mg NP	Eficacia de encapsulación (%)
0	164 \pm 1	0,10 \pm 0,02	17,8 \pm 0,9	72,4 \pm 2,8	82,5 \pm 2,7
1:11	167 \pm 2	0,06 \pm 0,01	- 45,1 \pm 2,4	74,7 \pm 8,2	78,9 \pm 8,4
1:5,5	158 \pm 1	0,06 \pm 0,05	- 44,4 \pm 1,0	59,7 \pm 2,6	64,6 \pm 2,7
1:4	164 \pm 1	0,04 \pm 0,03	- 45,6 \pm 0,4	61,6 \pm 6,4	66,4 \pm 6,9
1:3	181 \pm 3	0,05 \pm 0,03	- 41,9 \pm 2,2	58,1 \pm 1,9	64,2 \pm 6,9

Los resultados obtenidos muestran que, en el caso de la quercetina, cuando se añaden cantidades superiores a 10 mg a la solución de zeína inicial, la eficacia de encapsulación se reduce aproximadamente un 20% con respecto a las formulaciones que contienen cantidades inferiores de lisina, probablemente debido a que dichas cantidades de aminoácido inducen una oxidación parcial del principio activo. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las eficacias de encapsulación de las muestras sin lisina y las que contenían unos 5 mg de ésta en la formulación. Así pues, ésta fue la formulación seleccionada para continuar con los estudios de secado.

EJEMPLO 5**Preparación y caracterización de nanopartículas de zeína conteniendo quercetina secadas por spray drving**

Se disolvieron 602 mg de zeína junto con 51 mg de lisina en 80 mL de etanol al
5 50% (p/v).

Por otra parte, se disolvieron 250 mg de quercetina en 50 mL de etanol y posteriormente se tomaron 20 mL de esa disolución y se llevaron a un volumen final de 32 mL con agua.

A continuación, se añadieron 20 mL de la solución de quercetina diluida sobre la
10 disolución de zeína y se dejó incubar la mezcla durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadieron a la mezcla 80 mL de agua bajo agitación magnética y flujo constante.

Finalmente se añadieron 1.209 mg de manitol a la mezcla antes de secarla mediante el empleo del spray dryer. Las condiciones del proceso fueron:

- 15
- Temperatura de entrada de aire (Inlet temperature): 90°C
 - Temperatura salida del aire (Outlet temperature): 45°C
 - Presión de aire (Air Pressure): 6 bar [6x10⁵ Pa]
 - Velocidad de bombeo de la muestra (Pumping rate): 4,5 mL/min
 - Aspiración : 100%
- 20
- Flujo de aire (Air flow): 600 L/h

La Tabla 9 resume las características físico-químicas de la formulación resultante.

Tabla 9

25 **Características físico-químicas de las nanopartículas de zeína con lisina y quercetina (Q) (media ± SD, n = 3), secadas mediante la técnica de spray-drying, empleando manitol como adyuvante del proceso. La relación en peso entre la lisina y la zeína es de 1:11. La relación en peso entre el sacárido (manitol) y la proteína es 2:1**

Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Rendimiento (% en masa)	µg Q/ mg formulación
412 ± 14	0,10 ± 0,06	- 28,9 ± 2,2	50,6	22,2 ± 2,0

30 La cantidad encapsulada por mg de nanopartículas y la eficacia de encapsulación

no se ven modificadas por el secado por aspersión.

La Figura 5 muestra las imágenes obtenidas por microscopía de barrido electrónico de las partículas de zeína conteniendo quercetina.

El mismo estudio fue realizado empleando maltodextrina en lugar de manitol
5 como adyuvante obteniendo eficacias de encapsulación superiores, ya que la maltodextrina actúa además recubriendo las nanopartículas y encapsulando parte de la quercetina que queda fuera de ellas.

Por otra parte, se llevaron a cabo los mismos experimentos aplicando la técnica de altas presiones (150 MPa en un ciclo de 5 minutos, 400 MPa en un ciclo de 5 minutos y
10 800 MPa en un ciclo de 5 minutos) tras la formación de las partículas, previa a su paso por el spray dryer. Los resultados de encapsulación obtenidos fueron similares a los obtenidos sin dicho tratamiento.

EJEMPLO 6

15 **Preparación y caracterización de nanopartículas de zeína conteniendo ácido fólico**

Se disolvieron 121 mg de zeína junto con 18 mg de lisina en 14 mL de etanol al 50% (p/v).

Por otra parte, se disolvieron 303 mg de ácido fólico junto con 402 mg de lisina en 50 mL de agua y posteriormente se diluyeron a la mitad con etanol.

20 A continuación, se añadieron 5 mL de la solución de ácido fólico diluida sobre la disolución de zeína y se dejó incubar la mezcla durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadieron a la mezcla 0,6 mL de Tween® 80 (polisorbato) y se dejó incubar la mezcla otros 5 minutos. A continuación, se añadieron 15 mL de agua bajo agitación magnética y flujo constante para formar las nanopartículas.

25 Finalmente se añadieron 253 mg de lactosa a la mezcla antes de secarla mediante el empleo del spray dryer. Las condiciones del proceso fueron:

- Temperatura de entrada de aire (Inlet temperature): 125°C
- Temperatura salida del aire (Outlet temperature): 90°C
- Presión de aire (Air Pressure): 6 bar [6x10⁵ Pa]
- 30 - Velocidad de bombeo de la muestra (Pumping rate): 4,5 mL/min
- Aspiración : 90%

- Flujo de aire (Air flow): 750 L/h

La Tabla 10 resume las características físico-químicas de la formulación resultante.

5

Tabla 10

Características físico-químicas de las nanopartículas de zeína con lisina y ácido fólico (AF) (media \pm SD, n = 3), secadas mediante la técnica de spray-drying, empleando lactosa como adyuvante del proceso. La relación final en peso entre la lisina y la zeína es de 1:3. La relación en peso entre el sacárido (lactosa) y la zeína es 2:1

10

Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Eficacia de encapsulación (%)	Contenido en ácido fólico $\mu\text{g AF/ mg NP}$	$\mu\text{g AF/ mg formulación}$
369 ± 7	$0,32 \pm 0,06$	$-49,0 \pm 2,2$	$56,6 \pm 1,5$	$70,7 \pm 1,6$	$35,4 \pm 0,1$

AF: ácido fólico; NP: Nanopartícula

Por otra parte, se preparó una nueva formulación de nanopartículas de zeína conteniendo ácido fólico, omitiendo en este caso el paso de adición de tensioactivo.

- 15 Para ello se disolvieron 1.270 mg de zeína junto con 200 mg de lisina en 140 mL de etanol al 50% (p/v). Además se preparó otra disolución que contenía 121 mg de ácido fólico y 200 mg de lisina en 25 mL de agua, que posteriormente se diluyó a la mitad con etanol.

- 20 A continuación, se añadieron 43 mL de la disolución de ácido fólico diluida sobre la disolución de zeína, dejando incubar la mezcla durante 5 minutos. Transcurrido ese tiempo se añadieron 150 mL de agua bajo agitación magnética y flujo constante para obtener las nanopartículas.

Finalmente, se añadieron 2.415 mg de manitol a la mezcla antes de secarla mediante la técnica de spray drying. Las condiciones del proceso fueron:

25

- Temperatura de entrada de aire (Inlet temperature): 120°C
- Temperatura salida del aire (Outlet temperature): 80°C
- Presión de aire (Air Pressure): 6 bar [6×10^5 Pa]
- Velocidad de bombeo de la muestra (Pumping rate): 4,5 mL/min
- Aspiración : 90%

30

- Flujo de aire (Air flow): 750 L/h

La Tabla 11 resume las características físico-químicas de la formulación resultante.

Tabla 11

5 **Características físico-químicas de las nanopartículas de zeína con lisina y ácido fólico (AF) (media \pm SD, n = 3), secadas mediante la técnica de spray-drying, empleando manitol como adyuvante del proceso. La relación final en peso entre la lisina y la zeína es de 1:3,5. La relación en peso entre el sacárido (manitol) y la zeína es 2:1**

Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en ácido fólico μ g AF/ mg NP	Eficacia de encapsulación (%)	μ g AF/ mg formulación
181 \pm 1	0,21 \pm 0,02	-55,3 \pm 2,2	41,5 \pm 2,5	50,8 \pm 3,0	24,7 \pm 1,6

AF: Ácido fólico; NP: Nanopartícula

10 Las nanopartículas resultantes se resuspenden con facilidad y presentan tamaños inferiores a las obtenidas cuando se emplea el tensioactivo.

EJEMPLO 7

Estudio farmacocinético de ácido fólico encapsulado en nanopartículas de zeína

15 La Tabla 12 resume las características físico-químicas principales de las nanopartículas ensayadas en el estudio farmacocinético. Dichas nanopartículas fueron obtenidos siguiendo el procedimiento descrito en el segundo apartado del Ejemplo 6 (sin tensioactivo).

20 **Tabla 12**

Características físico-químicas de las nanopartículas de zeína con ácido fólico (media \pm SD, n = 6) utilizadas en los estudios farmacocinéticos

Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Contenido en Ácido Fólico μ g AF/ mg NP	Eficacia de encapsulación (%)
193 \pm 3	0,16 \pm 0,02	- 29,1 \pm 3,3	53,6 \pm 6,5	57,9 \pm 6,0

AF: Ácido fólico; NP: Nanopartícula

25 El estudio farmacocinético se dividió en tres fases. La primera de ellas consistió en administrar por vía intravenosa 1 mg/kg de ácido fólico disuelto en tampón fosfato; la segunda de ellas consistió en administrar a las ratas 1 mL de tampón fosfato (PBS) por vía oral a un grupo de 5 ratas macho Wistar (en este grupo de ratas se estudiaron los niveles basales de la vitamina en el tiempo). Por último, la tercera fase consistió en

administrar por vía oral 1 mg/kg de (i) ácido fólico disuelto en agua, (ii) ácido fólico encapsulado en nanopartículas de zeína a grupos de ratas compuestos de 5 animales.

Tras la administración, se procedió a extraer a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 8 y 24 horas) un volumen de sangre de aproximadamente 500 μL y recogerla en tubos de separación del suero, recuperando posteriormente la volemia del animal con un volumen equivalente de suero salino vía intraperitoneal. El análisis farmacocinético de los datos obtenidos tras la administración de ácido fólico se realizó utilizando el procedimiento de ajuste no compartimental del programa de ajuste farmacocinético WinNonlin 1.5 (Pharsight Corporation, Mountain View, Estados Unidos).

Los resultados obtenidos (después de restar los niveles basales) quedan recogidos en la Figura 6. Como se puede observar, la administración i.v. del ácido fólico (Figura 6A) muestra un pico de concentración de fármaco en suero en la primera toma de muestra, seguido de una disminución drástica de los niveles en suero. Los perfiles obtenidos cuando se administra la vitamina por vía oral (Figura 6B) son diferentes, ya que los máximos de concentración encontrados, significativamente inferiores, aparecen a tiempos superiores y descienden de forma más gradual. Sin embargo, al comparar los niveles de vitamina encontrados tras la administración oral del ácido fólico en su forma libre (sin encapsular) o encapsulado en nanopartículas de zeína, se encontraron perfiles de concentración en el tiempo similares, pero tanto los valores máximos como las áreas bajo la curva fueron superiores cuando la vitamina se administró encapsulada.

La Tabla 13 recoge los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras realizar un análisis no compartimental de los datos experimentales del presente estudio.

25

Tabla 13

Parámetros farmacocinéticos de las diferentes formulaciones ensayadas (media \pm SD, n = 5)

Formulación	Tmax (min)	C max (ng/mL)	AUC ($\times 10^4$) (ng x min/mL)	MRT (min)	F _R (%)
AF no encapsulada	58,8 \pm 36,0	191,3 \pm 41,0	7,8 \pm 1,5	383,8 \pm 47,5	36,3 \pm 7,2
NP Zeína AF	61,8 \pm 9,2	431,5 \pm 133,8*	15,2 \pm 4,3*	543,3 \pm 48,0*	70,8 \pm 20,2*
AF vía IV	---	4227,1 \pm 1651,5**	21,5 \pm 2,8**	57,8 \pm 15,5**	100**

* $p < 0.05$ vs. Ácido fólico no encapsulado. Test U de Mann Whitney.

** $p < 0.01$ vs. Ácido fólico no encapsulado. Test U de Mann Whitney.

AUC : área bajo la curva de concentración en suero

C_{max} : concentración máxima

5 T_{max} : tiempo en el cual se alcanza la C_{max}

MRT: tiempo de residencia media

F_R : Biodisponibilidad relativa en porcentaje.

AF: Ácido fólico

NP: Nanopartícula

10 IV: Vía intravenosa

Como se puede observar, los valores de AUC experimentan variaciones significativas en función del tipo de muestra administrada. Cuando la vitamina se encuentra encapsulada en nanopartículas de zeína, los valores de AUC son significativamente superiores a los encontrados tras administrar el ácido fólico libre y además éstos se mantienen en el tiempo hasta las 24 h post administración. Además, se observó que el tiempo medio de residencia (MRT) del ácido fólico en plasma fue también significativamente superior que el obtenido al administrar la vitamina libre.

20 Según estos resultados, se calculó la biodisponibilidad oral de las nanopartículas de zeína con ácido fólico encapsulado, que fue de un 70%, un 95% superior a los valores obtenidos tras administración del ácido fólico libre por vía oral.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende una matriz de zeína y un aminoácido básico.
- 5 2. Nanopartícula según la reivindicación 1, en la que dicho aminoácido básico se selecciona del grupo formado por arginina, lisina, histidina, y sus mezclas.
3. Nanopartícula según la reivindicación 1 ó 2, que comprende, además, un compuesto biológicamente activo.
- 10 4. Nanopartícula según la reivindicación 3, en la que dicho compuesto biológicamente activo se selecciona entre un compuesto biológicamente activo liposoluble y un compuesto biológicamente activo hidrosoluble.
5. Nanopartícula según la reivindicación 4, en la que el compuesto biológicamente activo liposoluble se selecciona del grupo formado por
 - a) un polifenol;
 - 15 b) una vitamina de la familia de vitaminas A, D, E o K;
 - c) un precursor o un derivado de una vitamina según b);
 - d) un fosfolípido;
 - e) un carotenoide;
 - f) un ácido graso;
 - 20 g) un fitoestero¹ o un fitoestero¹;
 - h) una sal o un éster de cualquiera de los compuestos a)-g) anteriores; y
 - i) combinaciones de los mismos.
6. Nanopartícula según la reivindicación 5, en la que dicho compuesto biológicamente activo liposoluble se selecciona del grupo formado por un
 - 25 flavonol, una antocianina, una fitoalexina, hidroxitirosol, ácido retinoico, retinal, retinol, calciferol, alfa-tocoferol, tocotrienol, fitomenadiona, alfa-caroteno, beta-caroteno, licopeno, capsantina, luteína, zeaxantina, xantofila, EPA, DHA, ácido linoleico, campesterol, estigmasterol, sitosterol, sus derivados, ésteres o sales farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus
 - 30 mezclas.

7. Nanopartícula según la reivindicación 5, en la que dicho compuesto biológicamente activo liposoluble se selecciona entre quercetina, resveratrol, sus derivados, ésteres o sales farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas.
- 5 8. Nanopartícula según la reivindicación 4, en la que el compuesto biológicamente activo hidrosoluble se selecciona del grupo formado por:
- a) una vitamina de la familia B o C;
 - b) un derivado de una vitamina según a);
 - c) un compuesto seleccionado entre el ácido hialurónico, condroitín sulfato
10 y el ácido tióctico;
 - d) una sal o un éster de cualquiera de los compuestos a)-c) anteriores; y
 - e) combinaciones de los mismos.
9. Nanopartícula según la reivindicación 8, en la que el compuesto biológicamente activo hidrosoluble se selecciona entre ácido fólico, sus ésteres o sales
15 farmacéuticamente o cosméticamente aceptables, o de grado alimentario, y sus mezclas.
10. Un procedimiento para la producción de una nanopartícula que comprende una matriz de zeína y un aminoácido básico que comprende:
- a) preparar una solución hidroalcohólica que contiene una zeína y un
20 aminoácido básico; y
 - b) añadir agua a la solución de la etapa a).
11. Un procedimiento para producir una nanopartícula que comprende una matriz de zeína y un aminoácido básico, y un compuesto biológicamente activo liposoluble que comprende:
- a) preparar una solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un
25 aminoácido básico;
 - b) preparar una solución alcohólica que comprende un CBA liposoluble y diluirla con agua para obtener una solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA liposoluble;

- c) mezclar dicha solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico con dicha solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA liposoluble; y
- d) añadir agua a la mezcla resultante de la etapa c).
- 5 12. Un procedimiento para producir una nanopartícula que comprende una matriz de zeína y un aminoácido básico, y un compuesto biológicamente activo hidrosoluble que comprende:
- a) preparar una solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico;
- 10 b) preparar una solución acuosa que comprende un CBA hidrosoluble y, opcionalmente, un segundo aminoácido básico, y diluirla con un alcohol para obtener una solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA hidrosoluble y, opcionalmente, un segundo aminoácido básico;
- c) mezclar dicha solución hidroalcohólica (i) que contiene una zeína y un aminoácido básico con dicha solución hidroalcohólica (ii) que comprende un CBA hidrosoluble y, opcionalmente, un segundo aminoácido básico;
- 15 d) opcionalmente añadir un tensioactivo a la mezcla resultante de la etapa c); y
- e) añadir agua a la mezcla resultante de la etapa c) o de la etapa d).
- 20 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que dicha solución hidroalcohólica es una solución acuosa de etanol.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende, además:
- a) someter la suspensión que contiene las nanopartículas de zeína formadas a, al menos, un ciclo de presión hidrostática, a una presión comprendida entre
- 25 100 y 800 MPa;
- b) si se desea, desecar la suspensión que contiene las nanopartículas formadas, donde dicha desecación se lleva a cabo opcionalmente en presencia de un agente protector y/o un agente antioxidante.
- 30 15. Una nanopartícula obtenida mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14.

16. Una composición que comprende al menos una nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 ó 15, y un vehículo aceptable en alimentación, farmacia o cosmética.
- 5 17. Composición según la reivindicación 16, en la que el tamaño medio de las nanopartículas está comprendido entre 100 y 450 nm, preferentemente alrededor de 200 nm.
- 10 18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, que comprende:
- zeína, entre 15% y 45% en peso;
 - un aminoácido básico, entre 1% y 4 % en peso;
 - quercetina o resveratrol, entre 0,5% y 5% en peso; y
 - un sacárido, entre 45% y 80% en peso,
- donde todas las proporciones son en peso respecto al total de la composición.
- 15 19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 16-17, que comprende:
- zeína, entre 15% y 45% en peso;
 - un aminoácido básico, entre 4% y 10% en peso;
 - opcionalmente, un polisorbato, entre 0,05% y 0,5% en peso;
 - ácido fólico, entre 0,5% y 5% en peso;
 - un sacárido, entre 45% y 80% en peso; y
- donde todas las proporciones son en peso respecto al total de la composición.
- 20 20. Un producto alimenticio, que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

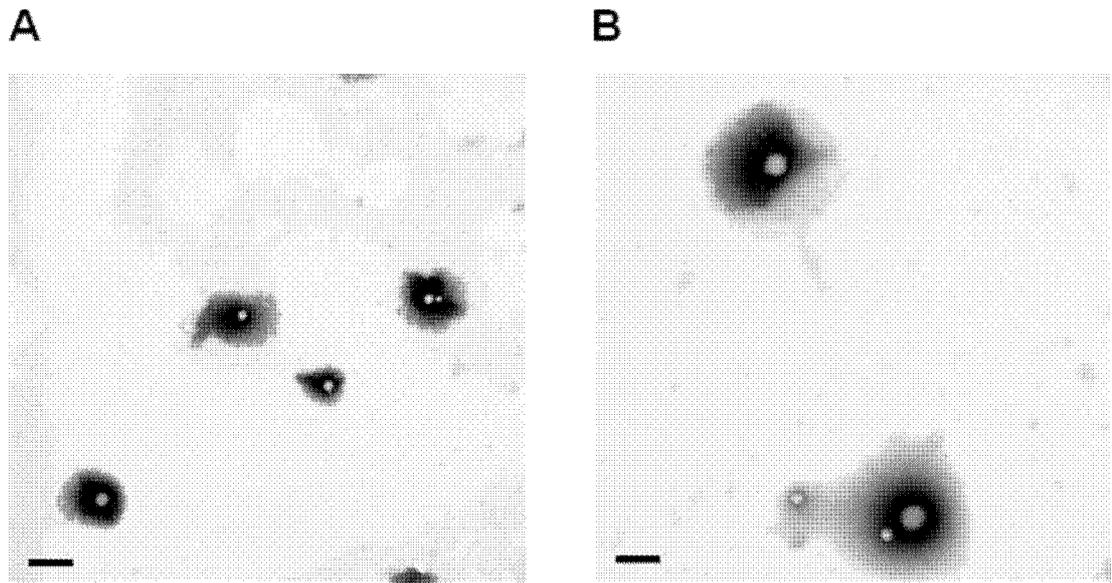


Figura 1

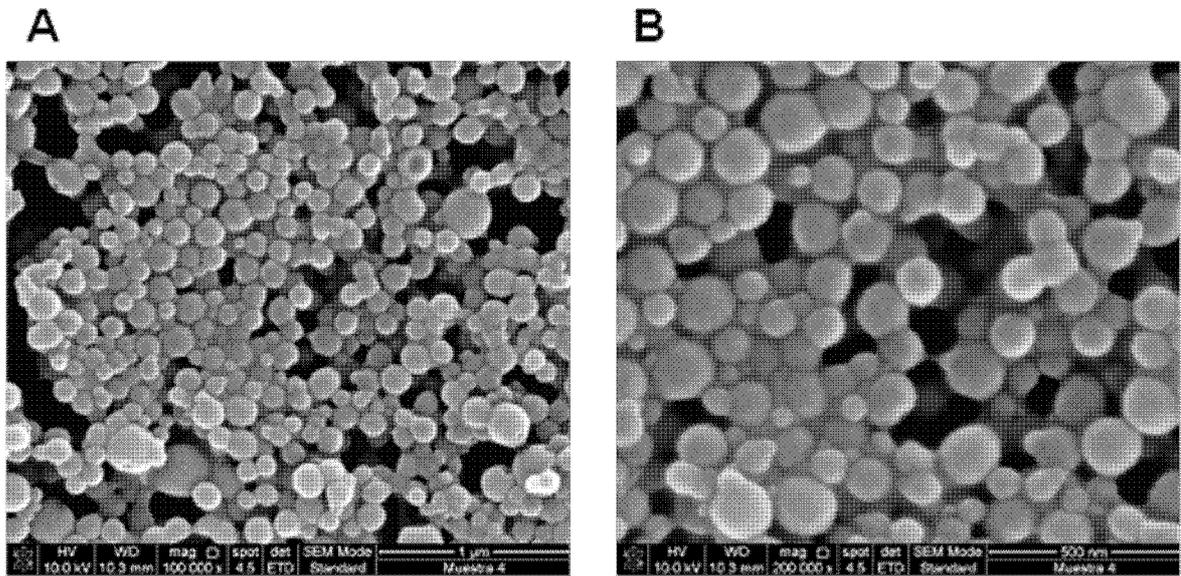


Figura 2

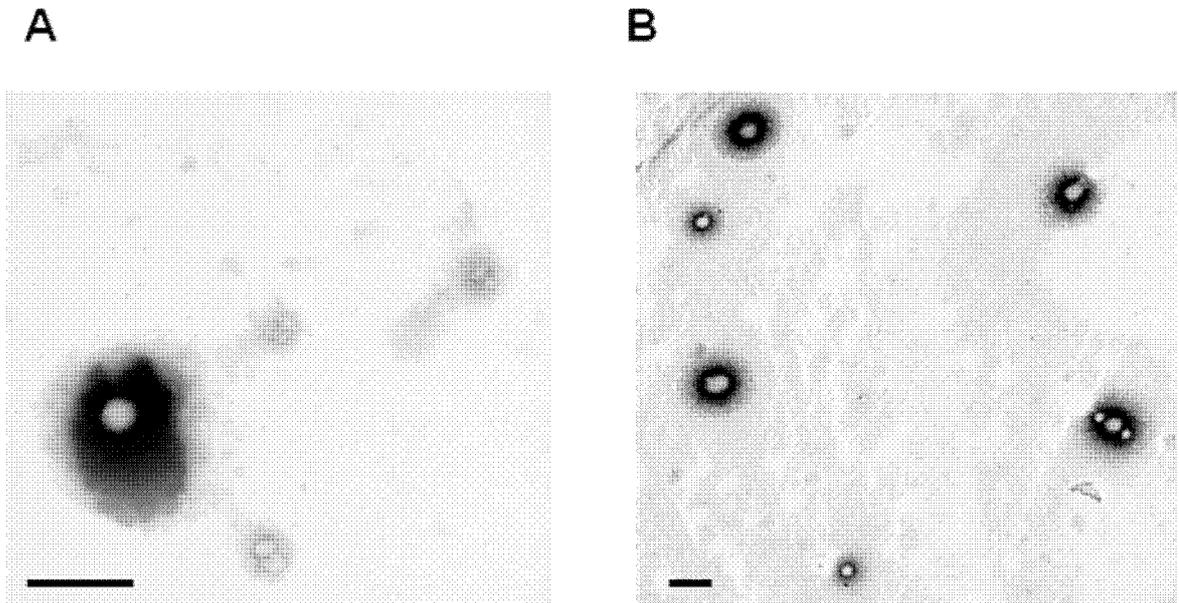


Figura 3

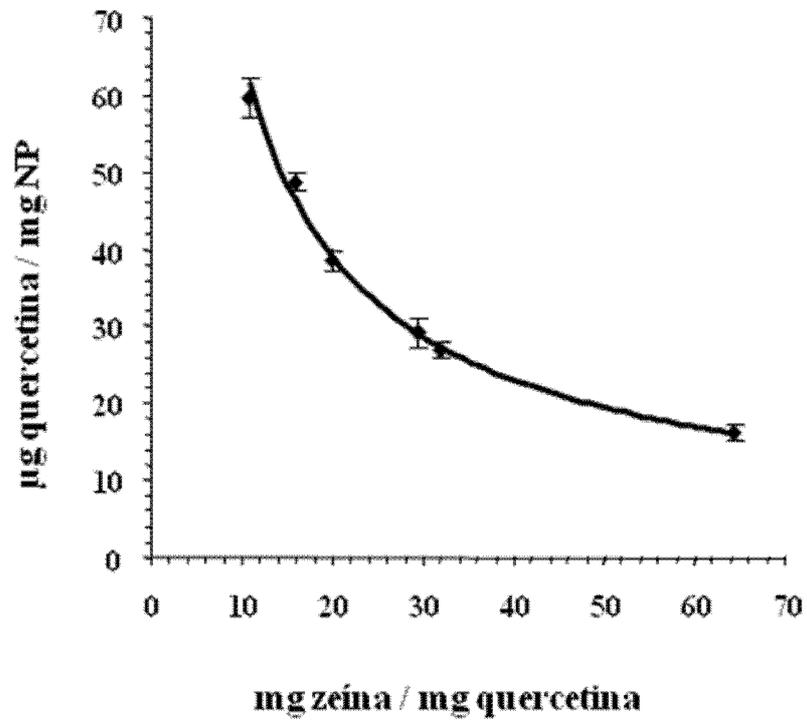
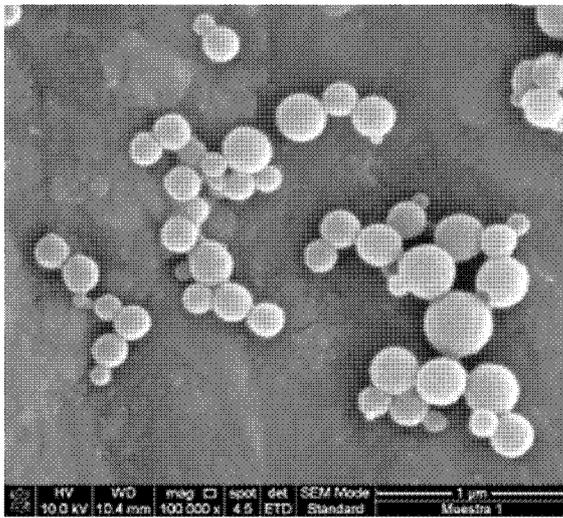


Figura 4

A



B

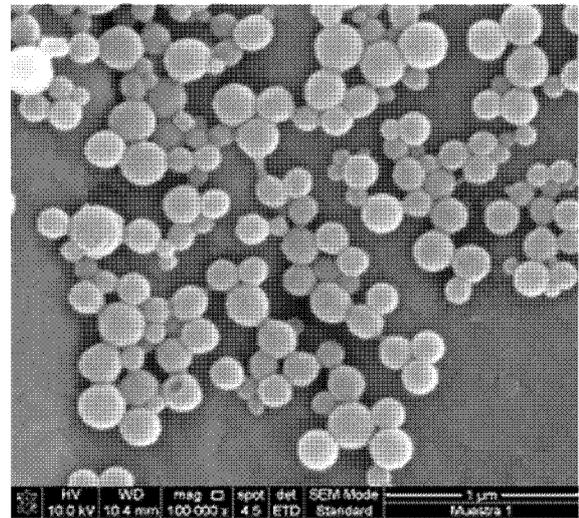


Figura 5

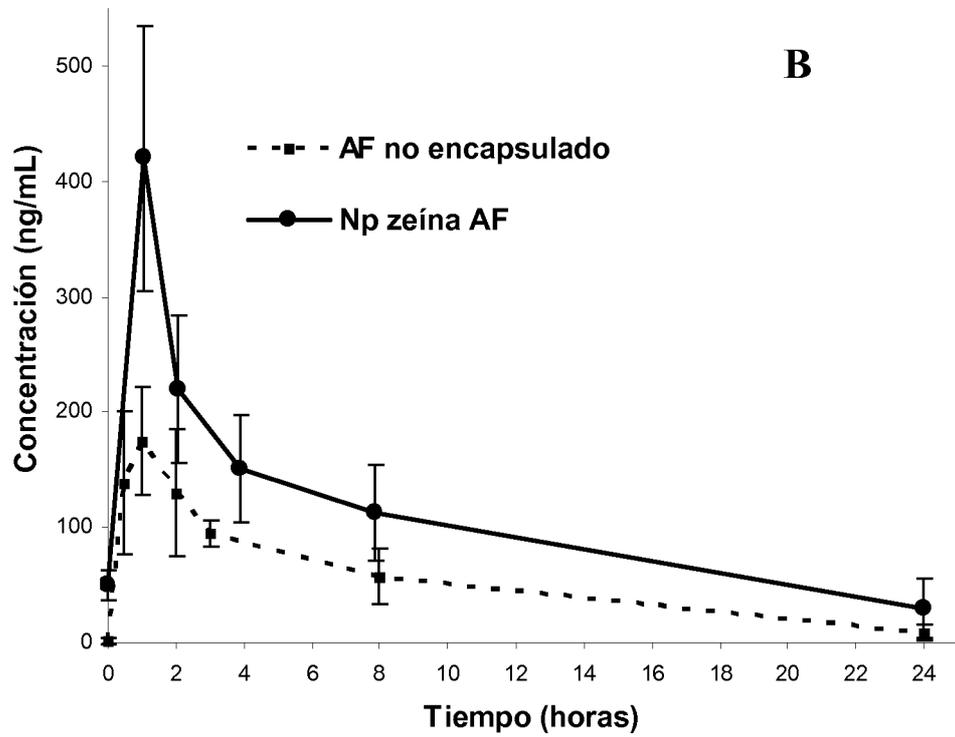
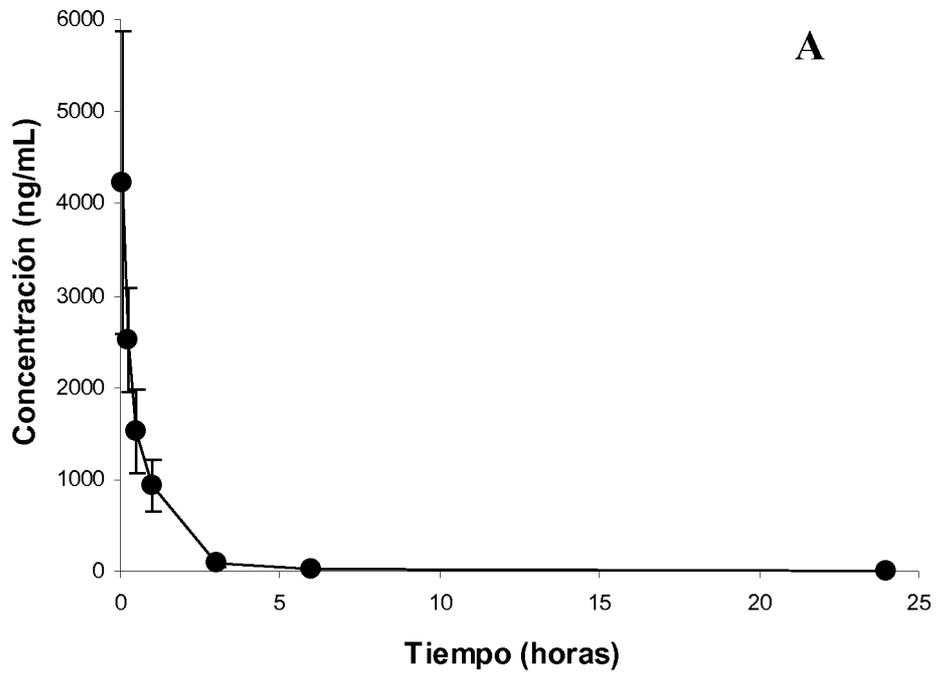


Figura 6

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES2011/070518

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. A23 L1/00 A61 K8/64

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A23 L A61 K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **EPO - Intema 1, wpI Data, FSTA, BIOSIS**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	DATABASE wpI Week 200469 Thomson Scientific, London, GB; AN 2004 - 702996 XP002662836 , & JP 2004 269384 A (FREUND IND CO LTD) 30 septiembre 2004 (2004 -09 -30) abstract	1-20
Y	<p style="text-align: center;">-----</p> wo 2008/ 157629 AI (MARTEK BIOSCIENCES CORP [US] ; wILLS TODD [US] ; CONNOLLY BRIAN J [US] ;) 24 diciembre 2008 (2008 -12 -24) * reivindicaciones 1, 3, 19, 29, 49, 50, 53, 56 y 60 * <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/- .</p>	1-20

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
---	---

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 4 / 11/20 11	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 23/ 11/20 11
---	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado <p style="text-align: center;">Georgopou los, N</p> N° de teléfono
---	---

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2011/070518

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	<p>DATABASE WP I Week 200863 Thomson Scientific, London, GB; AN 2008 - K47379 XP002662838 , & CN 101 092 514 A (UNIV ZHEJIANG) 26 diciembre 2007 (2007 - 12-26) resumen</p> <p>-----</p>	1-20

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2Q11/Q70518

JP 2004269384 A 30-09-2004 NINGUNO

W0 2008157629 A1 24-12-2008 AU 2008265715 A1 24-12-2008
CA 2689590 A1 24-12-2008
EP 2166874 A1 31-03-2010
TW 200908891 A 01-03-2009
US 2009004233 A1 01-01-2009

CN 101092514 A 26-12-2007 NINGUNO

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/ES2011/070518
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23L1/00 A61K8/64
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) onto both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A23L A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal , WPI Data, FSTA, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE WPI Week 200469 Thomson Scientific, London, GB; AN 2004-702996 XP002662836, & JP 2004 269384 A (FREUND IND CO LTD) 30 September 2004 (2004-09-30) abstract -----	1-20
Y	WO 2008/157629 AI (MARTEK BIOSCI ENCES CORP [US]; WILLS TODD [US]; CONNOLLY BRIAN J [US];) 24 December 2008 (2008-12-24) * claims 1, 3, 19, 29, 49, 50, 53, 56 and 60 * ----- -/- .	1-20

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search 4 November 2011	Date of mailing of the international search report 23/11/2011
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Georgopoulos, N
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2011/070518

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE WPI Week 200863 Thomson Scientific, London, GB; AN 2008-K47379 XP002662838, & CN 101 092 514 A (UNIV ZHEJIANG) 26 December 2007 (2007-12-26) abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2011/070518

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2004269384 A	30-09-2004	NONE	

W0 2008157629 A1	24-12-2008	AU 2008265715 A1	24-12-2008
		CA 2689590 A1	24-12-2008
		EP 2166874 A1	31-03-2010
		TW 200908891 A	01-03-2009
		US 2009004233 A1	01-01-2009

CN 101092514 A	26-12-2007	NONE	
