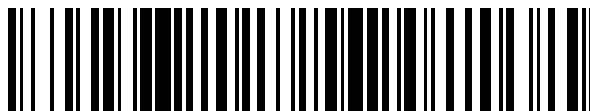


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 203**

21 Número de solicitud: 201430034

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

15.01.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.07.2015

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**LAGARÓN CABELLO, José María;
PÉREZ MASÍA, Rocío y
LÓPEZ RUBIO, Amparo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PROTECCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO Y COMPUESTOS
TERMOLÁBILES PARA POSIBLES APLICACIONES INDUSTRIALES**

57 Resumen:

Procedimiento de protección de material biológico y compuestos termolábiles para posibles aplicaciones industriales.

Procedimiento de protección de material biológico en general y sustancias termolábiles, aplicable específicamente a microorganismos y virus y cualquier otro material biológico, así como a cualquier sustancia derivada o no, que necesite protección para alargar su vida útil o ampliar su campo de aplicación, mediante procesado electrohidrodinámico o aerodinámico.

Este procesado permite alargar la vida útil del producto de una manera única ya que no conlleva la exposición a temperatura de la sustancia a proteger. Además, en función de las características o variables utilizadas durante el proceso de recubrimiento, la encapsulación permite mantener la viabilidad del producto ante condiciones de estrés como temperatura, humedad relativa o pH entre otras, proporcionándole una protección eficaz durante su posterior preparación, procesado, almacenamiento e incluso por ejemplo durante el paso a través del tracto gastrointestinal para el caso de microorganismos probióticos.

ES 2 541 203 A2

**PROCEDIMIENTO DE PROTECCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO Y
COMPUESTOS TERMOLÁBILES PARA POSIBLES APLICACIONES
INDUSTRIALES**

5

DESCRIPCIÓN

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

Sectores alimentario y farmacéutico. Materiales para estabilizar microorganismos, virus y material biológico, así como compuestos o sustancias de valor añadido termolábiles y bioactivos.

El objeto de la presente invención es un procedimiento de protección de material biológico en general y sustancias termolábiles, aplicable específicamente a microorganismos y virus y cualquier otro material biológico, así como a cualquier sustancia derivada o no, que necesite protección para alargar su vida útil o ampliar su campo de aplicación, mediante procesado electrohidrodinámico o aerodinámico. Concretamente, se obtienen micro-, submicro- y nanopartículas de distintos polímeros mediante procesado electrohidrodinámico o aerodinámico, también conocido como electroestirado y electrosprayado y estirado por soplado y sprayado por soplado, respectivamente, denominado en inglés electrospinning, electrospraying and solution blow spinning and solution blow spraying, respectivamente. Estas micro-, submicro- y nanopartículas se procesan directamente sobre preparados de microorganismos (liofilizados o preparados deshidratados por cualquier otro método de conservación), de virus, de material biológico o sustancias termolábiles, de manera que quedan adheridas por la elevada relación superficie volumen de la morfología obtenida formando un recubrimiento protector eficaz o cápsula que recubre todos los intersticios del producto, siendo por tanto más eficiente que otros métodos o procesos en la conservación de la viabilidad (contaje de microorganismos o número de unidades formadoras de colonias UFC) o estabilidad del producto. Este procesado permite alargar la vida útil del producto de una manera única ya que no conlleva la exposición a temperatura de la sustancia a proteger. Además, en función de las características o variables utilizadas durante el proceso de recubrimiento, la encapsulación permite mantener la viabilidad del producto ante condiciones de estrés como temperatura, humedad relativa o pH entre otras, proporcionándole una protección eficaz durante su

posterior preparación, procesado, almacenamiento e incluso por ejemplo durante el paso a través del tracto gastrointestinal para el caso de microorganismos probióticos.

ESTADO DE LA TECNICA

- 5 En el campo de los probióticos existe una demanda creciente de productos funcionales basados en microorganismos beneficiosos para la salud. No obstante, es necesario que estos microorganismos se encuentren en el producto en cantidades superiores a 10^7 , idealmente de 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en el momento de su consumo para que su efecto sea eficiente [Gerez, C.L., Font de Valdez, G.,
- 10 Gigante, M.L., Grosso, C.R.F. (2012). Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. *Letters in Applied Microbiology* 54 (6), pp. 552-556]. Debido a que la mayoría de estos microorganismos son sensibles a las condiciones ambientales (humedad, concentración de oxígeno, luz...), es importante desarrollar estrategias que los protejan del entorno para poder
- 15 conservarlos. Así, se están estudiando numerosos procesos para el desarrollo de estructuras capaces de proporcionar las condiciones necesarias para el óptimo metabolismo de los microorganismos, al mismo tiempo que los protegen del ambiente que los rodea. Algunas de las técnicas utilizadas para la inmovilización y protección de los microorganismos son la adsorción celular sobre soportes sólidos [Rezaee, A.,
- 20 Godini, H., Bakhtou, H. (2008). Microbial cellulose as support material for the immobilization of denitrifying bacteria. *Environmental Engineering and Management Journal*, 7 (5), pp. 589–594], [4] o la floculación [5], [D. Yin, D., Liu, C., Li, F., Ge, X., Bai, F. (2011). Development of observed kinetic model for self-flocculating yeast. *Huagong Xuebao/CIESC Journal*, 62 (11), pp. 3149–3155]. Ambas técnicas requieren
- 25 que los microorganismos sean capaces de adherirse de manera natural sobre los soportes (capacidad de formar biofilm) o de agregarse para flocular respectivamente. Además, otras estrategias como la encapsulación han sido estudiadas [Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., Heng, P.W.S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering* 116 (2), pp. 369-381]. Entre las más
- 30 comunes se hallan la encapsulación por extrusión, coacervación, sprayado por secado y emulsificación, [de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20 (4) pp. 292–302]. Sin embargo, estas tecnologías requieren de un calentamiento de las soluciones o el uso de agentes

orgánicos al menos en una de las fases de producción, lo cual podría dañar o destruir los microorganismos encapsulados. Por tanto, sería deseable disponer de nuevas tecnologías que no involucren condiciones agresivas (tanto de temperatura como de disolventes utilizados) y que den lugar a tamaños de partículas reducidos. La técnica

5 del procesado electrohidrodinámico que comprende procesos denominados electrospinning y electrospraying (electroestirado o electrosprayado por alto voltaje) es un método simple y altamente versátil para la obtención de fibras y/o cápsulas mediante la acción de un campo eléctrico externo que se aplica entre dos electrodos y al que se somete a la solución polimérica. Algunas de las propiedades de las estructuras

10 obtenidas por procesado electrohidrodinámico son su tamaño nanométrico y que no requieren del uso de temperatura, por tanto la técnica ha sido ya propuesta para la encapsulación de probióticos con buenos resultados [Lopez-Rubio, A., Sanchez, E., Sanz, Y., and Lagaron, J.M. (2009). Encapsulation of living bifidobacteria in ultrathin PVOH electrospun fibers. *Biomacromolecules* 10, 2823-2829]. Por otra parte la técnica

15 del procesado aerodinámico que comprende estirado y esprayado por soplado (solution blow spinning y spraying) consiste en la aplicación de diferencias de presión para acelerar un fluido y obtener así las diferentes estructuras poliméricas. Esta tecnología se ha empleado para la encapsulación de agentes activos [Oliveira, J.E., Medeiros, E.S., Cardozo, L., Voll, F., Madureira, E.H., Mattoso, L.H.C., Assis, O.B.G. (2013). Development of poly (lactic acid) nanostructured membranes for the controlled

20 delivery of progesterone to livestock animals. *Materials Science and Engineering C* 33 (2), pp. 844-849], así como para probióticos [solicitud de patente española P201131048]. En cualquier caso, la encapsulación directa, dispersa y confina a los microorganismos en un espacio cerrado, requiere de su disolución, estabilidad y

25 compatibilidad con los medios y disolventes, y además, requiere que los materiales empleados para formar las cápsulas se ajusten correctamente a las necesidades metabólicas de los microorganismos encapsulados (adecuadas propiedades mecánicas, disolventes y de permeabilidad a nutrientes, gases y metabolitos) y así permitan mantener su viabilidad en el tiempo. Además, todas las tecnologías de

30 encapsulación requieren que los microorganismos sean sometidos a diversas condiciones que podrían afectar a su viabilidad (temperatura, disolventes orgánicos, alto voltaje o diferencia de presión). De esta forma el microorganismo siempre queda afectado en mayor o menor medida y aunque a largo plazo la viabilidad se pueda mantener, el recuento inicial a menudo suele disminuir. En este sentido, la técnica de

protección por recubrimiento mediante procesado electrohidrodinámico o aerodinámico de la presente invención proporciona una protección muy eficiente de los preparados de microorganismos ya que se obtienen micro-, submicro- y nanoestructuras protectoras que quedan adheridas a ellos, protegiéndolos de las condiciones externas, y por tanto manteniendo la viabilidad de los mismos durante más tiempo. Además, evita cualquier tipo de procesado directo del material, por lo que la viabilidad inicial se mantiene, aspecto éste de gran relevancia industrial. Por otro lado, mediante esta técnica el microorganismo no queda confinado en una matriz rígida sino simplemente envuelto por un recubrimiento encapsulante por lo que no interfiere en el metabolismo.

10

EXPLICACION DE LA INVENCION

La presente invención consiste en una metodología para proteger microorganismos, virus, material biológico en general y cualquier sustancia termolábil que necesite protección para alargar su vida útil o ampliar su campo de aplicación mediante un recubrimiento compuesto por micro-, submicro o nanoestructuras poliméricas obtenidas mediante procesado electrohidrodinámico o aerodinámico y que quedan adheridas a los microorganismos generando un efecto protector de encapsulación. De esta forma, los compuestos termolábiles y materiales biológicos a encapsular no se someten a ningún tipo de procesado quedando así protegidos y aislados del medio ambiente. Para tal fin se obtienen por electrospinning/electrospraying, más preferentemente por electrospraying o electrosprayado, o estirado/esprayado por soplado, más preferentemente mediante sprayado por soplado, micro-, submicro o nanopartículas a partir de polímeros sintéticos o naturales (biopolímeros), preferiblemente solubles en agua y principalmente biopolímeros, ya que suelen ser más beneficiosos para los microorganismos.

25

El procedimiento de protección de material biológico y compuestos termolábiles de interés industrial comprende las siguientes etapas:

30 - preparación de disoluciones poliméricas formadoras de micro-, submicro- y nanopartículas que componen materiales de recubrimiento

- recubrimiento del material biológico o compuestos termolábiles mediante los materiales preparados en la etapa anterior, realizándose el recubrimiento del material

biológico o compuestos termolábiles por procesado electrohidrodinámico o aerodinámico.

5 El material biológico son preferentemente microorganismos o virus y particularmente los microorganismos se seleccionan entre *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Cyanobacterium*, *Rhodobacterales*, *Saccharomyces*, o cualquier otro microorganismo que necesite protección.

10 Los compuestos termolábiles son enzimas, vitaminas, elementos esenciales, o cualquier molécula o compuesto derivado.

Los materiales de recubrimiento se seleccionan entre proteínas, oligosacáridos, polisacáridos, lípidos, polímeros y combinaciones de los mismos.

15 Entre los polímeros se seleccionan más particularmente los solubles en agua, alcoholes y mezclas de estos tales como óxido de polietileno, copolímeros de etileno y alcohol vinílico, polivinil alcohol, polivinilpirrolidona y combinaciones de los mismos.

20 Entre las proteínas, se seleccionan particularmente la zeína y la proteína del suero de la leche.

Entre los polisacáridos, se seleccionan particularmente el dextrano, la maltodextrina y el almidón y cualquier combinación o preparación de los mismos tales como el preparado comercial basado en un almidón resistente denominado fibersol.

25

El disolvente que se emplea para la preparación de las disoluciones poliméricas se selecciona entre agua, mezclas de alcoholes y agua y otros disolventes orgánicos, preferentemente agua o mezclas de alcohol y agua.

30 En la etapa de preparación de las disoluciones poliméricas se pueden añadir sustancias ayudantes del procesado que facilitan la formación de las micro-, submicro- y nanopartículas y que se seleccionan entre plastificantes, tensoactivos, emulsionantes, surfactantes, antioxidantes o cualquiera de sus combinaciones, preferentemente monolaureato de sorbitan (comercialmente conocido como span-20).

También se pueden incluir tratamientos de homogenización por agitación, volteo o por ultrasonidos

5 En un modo de realización preferente, el procesado electrohidrodinámico o aerodinámico es electroesprayado o esprayado por soplado en al menos una etapa. Opcionalmente, el procesado electrohidrodinámico o aerodinámico se realiza en varias etapas con un tratamiento de homogenización y/o tamizado entre estas.

10 El procesado electrohidrodinámico o aerodinámico se puede realizar directamente sobre el material biológico o compuestos termolábiles previamente deshidratados mediante liofilización u otro proceso no electrohidrodinámico o aerodinámico o bien sin deshidratar, produciéndose la deshidratación y la aplicación del recubrimiento en procesados sucesivos por procesado electrohidrodinámico o aerodinámico.

15 En caso de que sea necesario previamente o con posterioridad a la etapa de recubrimiento se lleva a cabo un tratamiento de tamizado para controlar el tamaño de partícula, preferentemente mediante tamizado mecánico

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

20 A continuación se describe de manera detallada la metodología de obtención de recubrimientos de microorganismos mediante procesado electrohidrodinámico o aerodinámico. El objetivo de estos recubrimientos es estabilizar y mantener la viabilidad de diversos microorganismos o sustancias termolábiles con aplicación industrial para que éstos puedan, por ejemplo, mantenerse en elevadas
25 concentraciones en el momento de su aplicación (consumo, sensores, tratamiento de aguas, etc..)

30 La primera etapa consiste en la preparación de las disoluciones poliméricas formadoras de las micro- submicro y nanopartículas que compondrán los recubrimientos. En esta fase pueden agregarse otras sustancias (tales como plastificantes, tensoactivos, emulsionantes, surfactantes, antioxidantes, ayudantes del procesado en general o cualquiera de sus combinaciones) que faciliten la formación de las estructuras.

Entre los surfactantes se seleccionarán preferentemente y sin sentido limitativo distintos tipos de compuestos denominados comúnmente span, distintos tipos de tween y lecitina y más preferentemente el que comercialmente se denomina span-20, cuya composición es monolaureato de sorbitan.

5

Esta etapa también incluye un tratamiento de homogenización por agitación y/o ultrasonidos. La agitación puede ser vigorosa para favorecer la dispersión de los aditivos en la matriz polimérica.

- 10 La segunda etapa consiste en el recubrimiento de los microorganismos por procesado electrohidrodinámico o aerodinámico. Este proceso se puede realizar directamente sobre el producto comercial formulado y deshidratado por algún método tal como la liofilización o el procesado electrohidrodinámico o aerohidrodinámico o puede ser obtenido in-situ por procesado electrohidrodinámico o aerodinámico o por cualquier
- 15 otro procedimiento sin sentido limitativo previamente al recubrimiento.

- El procesado electrohidrodinámico que comprende el electroestirado (electrospinning) y el electroesprayado (electrospraying) es una tecnología basada en la aplicación de campos eléctricos elevados para producir fluidos eléctricamente cargados a partir de
- 20 disoluciones poliméricas viscoelásticas, las cuales al secarse producen micro- y nanofibras o micro- y nanocápsulas, respectivamente. El equipo de electroestirado y electroesprayado se compone de una fuente de alimentación que suministra corriente, una bomba donde se colocan los depósitos con las disoluciones y uno o varios propelentes conductores, típicamente agujas, de un material conductor. Las agujas se
- 25 conectan a los depósitos y se focalizan hacia el colector donde se recogerá el material seco. Para el caso del procesado aerodinámico que comprende el esprayado por soplado y el estirado por soplado, se utiliza una bomba donde se colocan los depósitos con las disoluciones. Estos depósitos se conectan a una boquilla a través de la cual también se hace pasar un flujo de gas presurizado. La boquilla queda focalizada hacia
- 30 el colector donde se recoge el material. Así, el preparado de microorganismos se coloca sobre el colector y las partículas protectoras con tamaño controlado se estirarán o esprayarán directamente sobre ellos formando un recubrimiento que proporcione estabilidad al producto durante su procesado, postprocesado, almacenamiento e incluso durante su uso durante la aplicación.

Dentro del procesado electrohidrodinámico se hace uso preferente en la presente invención del electroesprayado y dentro del procesado aerodinámico se hace uso preferente en la presente invención del esprayado por soplado.

- 5 En todos los casos, se puede llevar a cabo un tratamiento de tamizado por gravedad, mecánico o de cualquier otro tipo al preparado de los microorganismos previo y posterior al recubrimiento para controlar el tamaño de partícula.

- 10 El proceso del recubrimiento se puede realizar en uno o en varios pasos según las necesidades protectoras del material y con uno o varios materiales, y puede implicar procesos de volteado y homogenización del recubierto utilizando cualquier medio industrial conocido para aumentar la eficacia del proceso de recubrimiento.

- 15 Los materiales utilizados para los recubrimientos obtenidos de la manera descrita anteriormente comprenden proteínas, oligosacáridos, polisacáridos, lípidos, otros polímeros solubles en agua tales como y sin sentido limitativo polivinil alcohol, óxido de polietileno o polivinilpirrolidona y mezcla de alcohol agua tales como y sin sentido limitativo copolímeros de etileno y alcohol vinílico y cualquier preparación comercial de los mismos o mezcla de los anteriores. Preferiblemente, se utilizarán las proteínas,
20 oligosacáridos, polisacáridos y lípidos por su carácter sostenible y su mayor estabilidad y compatibilidad con los microorganismos.

- Entre las proteínas se seleccionarán preferentemente y sin sentido limitativo proteínas animales, vegetales y microbianas, como por ejemplo las del suero de la leche,
25 caseínas, polipéptidos naturales o obtenidos por modificación genética de microorganismos, colágeno, proteína de soja y zeína, y más preferentemente la zeína y la proteína del suero de la leche.

- Entre los oligosacáridos se seleccionarán preferentemente y sin sentido limitativo la
30 lactosa, la sacarosa, la maltosa y los fructooligosacáridos y más preferentemente los fructooligosacáridos.

Entre los polisacáridos se seleccionarán preferentemente y sin sentido limitativo alginato, pectinas, quitosano, gomas, carragenatos, almidón, dextrano, maltrodextrina,

celulosa, glucógeno, quitina y más preferentemente almidón, dextrano, maltrodextrina y cualquier preparación de las mismas tales como el fibersol o preparado similar.

5 Entre los lípidos se seleccionarán preferentemente y sin sentido limitativo ácidos grasos.

En cuanto a disolventes, el agua es el preferido, pero dado que la técnica elimina de manera muy eficiente el disolvente, el proceso de la invención es compatible con cualquier tipo de disolvente sea este o no compatible con el producto a proteger, 10 siendo esto una de las ventajas de este proceso. En cuanto a los microorganismos, para el caso de los probióticos, se han testado tanto bacterias aerobias facultativas pertenecientes al género *Lactobacillus*, como anaerobias estrictas del género *Bifidobacterium*. También los hongos del género *Saccharomyces* se pueden usar en esta aplicación. En el caso de las aplicaciones de tratamientos de aguas o sensores, 15 las familias preferidas son *Cyanobacterium* o *Rhodobacterales*.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la 20 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

25 **Figura 1.** Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de estructuras electroesprayadas de almidón en disolución acuosa.

Figura 2. Muestra de una imagen de microscopía óptica de los cristales de liofilizado de *Lactobacillus plantarum* recubiertos por las estructuras poliméricas (alginatos, 30 pectinas y almidón modificado) obtenidas por electrospraying.

Figura 3. Recuentos del liofilizado recubierto vs. liofilizado no recubierto a lo largo del tiempo almacenados a 37°C.

Figura 4. Recuentos de liofilizado recubierto vs. liofilizado no recubierto a lo largo del tiempo almacenados a 53% de humedad relativa (HR).

5 **Figura 5.** Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los cristales de liófilo de *Lactobacillus plantarum*.

Figura 6. Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los cristales de liófilo de *Lactobacillus plantarum* recubiertos con proteínas del suero de la leche mediante el método de la presente invención.

10

Figura 7. Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las capsulas de zeína recubriendo los cristales de liófilo de *Lactobacillus plantarum*.

MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

15 **Ejemplo 1.**

Obtención del recubrimiento nanoestructurado a partir de un polisacárido

En este ejemplo se describe un proceso típico de obtención de los recubrimientos basados en un polisacárido utilizando la técnica de electroesprayado.

20

En una primera etapa, se prepara la disolución de polisacárido (de marca comercial fibersol) en agua destilada. La concentración utilizada del polisacárido es de un 40% en peso respecto al volumen del disolvente. La disolución se agita a temperatura ambiente hasta obtener una disolución homogénea.

25

Una vez obtenida la disolución, ésta se emplea para generar las micro- y nanocápsulas mediante la técnica de electroesprayado utilizando un equipo comercial de la marca Fluidnatek de Bioinicia, S.L., Paterna (Valencia). La disolución se introduce en jeringas de 5 mL conectadas a través de tubos de teflón a una aguja de acero inoxidable de diámetro 0,9 mm. La aguja se conecta a un electrodo que a su vez está conectado a una fuente de alimentación de 0-30 KV. Se aplica un voltaje comprendido entre 15-20 KV y la disolución se bombea a través de dicha aguja con un flujo de 0,1 mL/h. El contra-electrodo se conecta a una placa (colector) de acero inoxidable donde se coloca el probiótico liofilizado. La distancia entre la aguja y el

30

colector es de unos 15 cm. El proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente. De este modo se obtienen las micro- y nanocápsulas que se muestran en la Figura 1 que quedan adheridas a las partículas del liófilo.

- 5 Los tamaños de las cápsulas obtenidas de este modo oscilan entre los 50 nm y las 3 micras (es decir, cápsulas con tamaños inferiores a los 100 nm).

Ejemplo 2.

10 **Obtención de un recubrimiento nanoestructurado a partir de una mezcla de biopolímeros (alginatos, pectinas y almidón modificado) y su aplicación sobre el liofilizado de *Lactobacillus plantarum*.**

La primera etapa consiste en la preparación de la disolución formadora del recubrimiento de nanopartículas. Para ello se disuelve la mezcla de alginato, pectina y almidón modificado en una concentración del 3,1 y 10% en peso respecto al volumen del disolvente (agua destilada) respectivamente. La mezcla se mantiene en agitación hasta que los componentes quedan completamente disueltos. La disolución final se introduce en una jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo de procesado electrohidrodinámico.

20

En segundo lugar se realiza una deposición fina y homogéneamente distribuida del liofilizado (de aprox. 5×10^{10} cfu/gramo) mediante un tamizador y se distribuye sobre el colector del equipo de procesado electrohidrodinámico. A continuación se realiza el electroesprayado de la disolución sobre el liofilizado. El equipo se compone de una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector. Para este ejemplo, las condiciones de electroestirado fueron las siguientes: caudal de disolución de 0,15 ml/h; 25 14 kV de corriente; 10 cm de distancia entre la aguja y el colector. Tras un tiempo controlado de electroesprayado el material se voltea y después se vuelve a electroesprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el liofilizado. El material recolectado bajo estas condiciones consiste en un sistema nanoestructurado 30

compuesto por cápsulas esféricas de la mezcla de alginatos, pectinas y almidón que recubren los cristales de liofilizado (tal y como se muestra en la Figura 2).

Ejemplo 3.

5 Obtención de un recubrimiento nanoestructurado a partir de óxido de polietileno (PEO) y su aplicación sobre el liofilizado de *Lactobacillus plantarum*.

10 La primera etapa consiste en la preparación de la disolución formadora del recubrimiento de nanopartículas. Para ello se disuelve el PEO en una concentración del 4% en peso respecto al volumen del disolvente (agua destilada). La disolución se mantiene en agitación hasta que el PEO queda completamente disuelto. La disolución final se introduce en una jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo de procesado electrohidrodinámico.

15 En segundo lugar se realiza la deposición del liofilizado y se distribuye de manera homogénea sobre el colector del equipo de procesado electrohidrodinámico. A continuación, se realiza el electro sprayado de la disolución sobre el liofilizado. El equipo se compone de una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector. Para este ejemplo, las condiciones de electro sprayado fueron las siguientes: caudal de disolución de 0,15 ml/h; 14 kV de corriente; 10 cm de distancia entre la aguja y el colector. Tras un tiempo controlado de electro sprayado el material se voltea y después se vuelve a electro sprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el liofilizado. El material recolectado bajo estas condiciones consiste en un sistema nanoestructurado compuesto por fibras de PEO que recubren los cristales del liofilizado.

30 Ejemplo 4.

Obtención de un recubrimiento nanoestructurado a partir de una mezcla de polivinil pirrolidona (PVP) y polivinil alcohol (PVOH) y su aplicación sobre el liofilizado de *Lactobacillus plantarum*.

La primera etapa consiste en la preparación de la disolución formadora del recubrimiento de nanopartículas. Para ello se disuelven la PVP y el PVOH en una concentración del 20% y el 4% en peso respecto al volumen del disolvente (agua destilada) respectivamente. La disolución se mantiene en agitación hasta que todos
5 los componentes quedan completamente disueltos. La disolución final se introduce en una jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo de electro sprayado.

En segundo lugar se realiza la deposición del liofilizado y se distribuye
10 homogéneamente sobre el colector del equipo de electro sprayado. A continuación, se realiza el electro sprayado de la disolución sobre el liofilo. El equipo de electro sprayado se compone de una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se
15 conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector. Para este ejemplo, las condiciones de procesado fueron las siguientes: caudal de disolución de 0,15 ml/h; 14 kV de corriente; 10 cm de distancia entre la aguja y el colector. Tras un tiempo controlado de electro sprayado el material se voltea y después se vuelve a electro sprayar para asegurar un recubrimiento
20 completo de todo el liofilizado. El material recolectado bajo estas condiciones consiste en un sistema nanoestructurado compuesto por cápsulas de PVP y PVOH que recubren los cristales del liofilizado.

Ejemplo 5.

25 **Encapsulación de probióticos (*Lactobacillus plantarum*) a partir de un concentrado de proteínas del suero de la leche utilizando diferentes procesos electrohidrodinámicos y comparación de la viabilidad inicial de los distintos materiales.**

30 La primera etapa consiste en la preparación de las disoluciones formadoras de los encapsulados y del recubrimiento. Para ello se disuelve el concentrado de proteínas del suero de la leche en una concentración del 20% en peso respecto al volumen del disolvente (leche desnatada). Además se añade un surfactante (Span-20) en una concentración de 20% respecto al peso de proteína para mejorar el procesado. La

mezcla se mantiene en agitación hasta que los componentes quedan completamente disueltos.

5 En segundo lugar se añade el microorganismo probiótico según el procesado que se vaya a llevar a cabo. Para el electroesprayado uniaxial, se añade el liofilizado a la disolución en una concentración de hasta un 50% en peso respecto al peso de polímero. Para el caso del electroesprayado coaxial se prepara una disolución de liofilizado de un 50% en peso respecto al volumen de disolvente (solución salina). Finalmente, para el caso del recubrimiento se deposita el liofilizado y se distribuye de
10 manera homogénea sobre el colector del equipo de electroestirado. A continuación se realiza el electroesprayado de las disoluciones. En el caso del recubrimiento, tras un tiempo controlado de electroesprayado el material se voltea y después se vuelve a electroesprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el liofilizado. El equipo para el proceso uniaxial y el recubrimiento se compone de una fuente de
15 alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector. Para el caso del electroesprayado coaxial el equipo se compone de los mismos elementos que anteriormente, pero
20 además tiene otra bomba digital para colocar la jeringuilla con el liofilizado y dos agujas concéntricas, por las cuales circulará la disolución polimérica (por la aguja exterior) y la disolución de liofilizado (por la aguja del interior).

Las condiciones de electroesprayado fueron las siguientes: caudal de disolución de
25 0,15 ml/h; 14 kV de corriente; 7 cm de distancia entre la aguja y el colector para el caso del procesado uniaxial y el recubrimiento. Para el caso de procesado coaxial fueron: 0.16 mL/h para la disolución de proteína, 0.08 mL/h para la disolución de liofilizado, 20 kV de corriente y 7 cm de distancia entre la aguja y el colector.

30 Finalmente, se midió la viabilidad de los microorganismos de los diferentes materiales obtenidos observando que el método de recubrimiento proporcionó recuentos más elevados y similares a los recuentos del liofílo de partida sin proteger, que el liofílo encapsulado mediante el método uniaxial y coaxial (Tabla 1). La figura 6 muestra la

imagen de microscopía electrónica del líofilo recubierto en comparación con la imagen de los cristales de líofilo sin recubrir (Figura 5).

Tabla 1

5

	Encapsulado coaxial	Encapsulado uniaxial	Recubrimiento
Recuentos (UFC/g)	2.3×10^8	2.1×10^8	8.2×10^9

10

Ejemplo 6.

Obtención de estructuras de encapsulación submicrométricas a partir de una maltodextrina utilizando la técnica de blow spinning/spraying (estirado/esprayado por soplado)

15

En este ejemplo se detalla el procedimiento de obtención de cápsulas submicrométricas mediante la técnica de estirado/esprayado por soplado. En primer lugar se prepara una disolución de la maltodextrina en agua, utilizando una concentración de polisacárido del 40% en peso respecto al volumen utilizado, agitando a temperatura ambiente hasta obtener una disolución homogénea.

20

La disolución se introdujo en una jeringa de 5 ml situada en una bomba de jeringas y conectada a través de tubos de teflón a una aguja interna de acero inoxidable de diámetro 0,9 mm. Esta aguja estaba montada en configuración coaxial, siendo la aguja exterior por la que fluye gas nitrógeno presurizado a alta velocidad (230-250 m/s). El flujo de nitrógeno bombeado coaxialmente por la aguja exterior acelera y estira la disolución polimérica que fluye por la aguja interior y ayuda a la formación de las estructuras de encapsulación. El flujo de la disolución con la maltodextrina fue de 0,5 mL/h. La presión del gas nitrógeno en la botella era de 20-30 bar. Las estructuras generadas y solidificadas se recogieron en un colector situado a una distancia de unos 18-20 cm.

25

30

Ejemplo 7.

Resultados de viabilidad de *Lactobacillus plantarum* tras la aplicación del recubrimiento nanoestructurado obtenido a partir de varias formulaciones poliméricas.

5 En este ejemplo se exponen los resultados de viabilidad de *L. plantarum* obtenidos nada más recubrirlos mediante el procesado electrohidrodinámico. En primer lugar se prepararon las distintas disoluciones poliméricas con las proporciones y aditivos correspondientes según cada material. Estas formulaciones se hicieron pasar a través del equipo de electroesprayado para obtener así el recubrimiento nanoestructurado. A

10 continuación se depositó homogéneamente una cantidad fija (0,2 g) de liofilizado sobre el colector donde se recoge el material nanoestructurado. Finalmente se realiza el electroesprayado de las disoluciones sobre el liofilizado. Tras un tiempo controlado de electroesprayado el material se voltea y después se vuelve a electroesprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el liofilizado. El equipo se compone de

15 una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector. Las condiciones de electroesprayado se ajustaron a los distintos polímeros utilizados. El material recolectado bajo estas condiciones consiste en un sistema nanoestructurado compuesto por cápsulas de polímero que recubren los cristales del liofilizado. Inmediatamente después de recogerlo, el material se sembró en el medio óptimo para el crecimiento de la bacteria y se realizaron los recuentos del microorganismo. Los resultados de viabilidad obtenidos se muestran en la Tabla 2.

25

Tabla 2.

Materiales formadores del recubrimiento	Viabilidad inicial (CFU/g)
Alginato	1.10E+10
Alginato + Pectinas + Fibersol + Span-20	5.70E+09
Alginatos + Fibersol + Span-20	4.60E+09
Almidón	2.30E+09
Almidón + Polivinil alcohol (PVOH)	1.20E+09
Almidón+ Span-20	1.20E+10
Dextrano	3.50E+09
Dextrano + Span-20	1.20E+10
Maltodextrina + PVOH	1.30E+09
Maltodextrina + Span-20	2.40E+09
Óxido de polietileno (PEO)	1.30E+10
Pululano	1.20E+10
Pululano + PVOH	1.10E+10
PVOH	2.40E+10
Polivinil pirrolidona (PVP) + PVOH	3.40E+10
PVP + Span-20	2.30E+10
Concentrado de proteínas del suero de la leche (WPC)	6.20E+09
WPC + PVOH	3.10E+09
WPC + Span-20	1.80E+09
Zeina	1.10E+10

5 Ejemplo 8.

Recubrimiento de *Lactobacillus plantarum* con almidón resistente por procesado electrohidrodinámico y estudio de la viabilidad en el tiempo en condiciones de temperatura

- 10 La primera etapa consiste en la preparación de la disolución formadora del recubrimiento de nanopartículas. Para ello se disuelve el almidón resistente en una concentración del 20% en peso respecto al volumen del disolvente (agua destilada).

Además, se añade un 2% del surfactante Span 20 para facilitar el proceso de electroesprayado. La disolución se mantiene en agitación hasta que todos los componentes quedan completamente disueltos. La disolución final se introduce en una jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo.

5

En segundo lugar se realiza la deposición del liofilizado y se distribuye homogéneamente sobre el colector del equipo de electroestirado mediante un tamizador. A continuación se realiza el electroesprayado de la disolución sobre el liofilizado. Tras un tiempo controlado de electroesprayado el material se voltea y después se vuelve a electroesprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el liofilizado. El equipo de electroesprayado se compone de una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector. Para este ejemplo, las condiciones de electroesprayado fueron las siguientes: caudal de disolución de 0,15 ml/h; 14 kV de corriente; 10 cm de distancia entre la aguja y el colector. El material recogido bajo estas condiciones consiste en un sistema nanoestructurado compuesto por cápsulas de almidón resistente que recubren los cristales de liofilizado. Este material se almacenó junto con liofilizado no recubierto a 37 °C para realizar un estudio acelerado de viabilidad de los microorganismos. La Figura 3 muestra los recuentos de las 2 muestras almacenadas (liofilizado recubierto y no recubierto). Se observa que los recuentos iniciales son similares en los dos casos. Sin embargo, al aumentar el tiempo de almacenamiento en estas condiciones, la viabilidad del liofilizado no recubierto disminuye más rápidamente que la del liofilizado protegido.

25

Ejemplo 9.

Recubrimiento de *Lactobacillus plantarum* con zeína por procesado electrohidrodinámico y estudio de la viabilidad en el tiempo en condiciones de humedad.

30

La primera etapa consiste en la preparación de la disolución formadora del recubrimiento de nanopartículas. Para ello se disuelve la zeína en una concentración del 12% en peso respecto al volumen del disolvente (una mezcla de alcohol y agua en

una proporción 15:85 respectivamente). La disolución se mantiene en agitación hasta que la zeina queda completamente disuelta. La disolución final se introduce en una jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo de electroesprayado.

5

En segundo lugar se realiza la deposición del liofilizado y se distribuye de manera homogénea sobre el colector del equipo de procesado electrohidrodinámico

A continuación, se realiza el electroesprayado de la disolución sobre el liofilizado. Tras un tiempo controlado de electroesprayado el material se voltea y después se vuelve a electroesprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el liofilizado. El equipo se compone de una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector. Para este ejemplo, las condiciones de electroesprayado fueron las siguientes: caudal de disolución de 0,30 ml/h; 12 kV de corriente; 10 cm de distancia entre la aguja y el colector. El material recolectado bajo estas condiciones consiste en un sistema nanoestructurado compuesto por cápsulas de zeina que recubren los cristales de liofilizado, tal y como se observa en la Figura 7, en comparación a la imagen de los cristales del liofilizado sin recubrir (Figura 5). Este material se almacenó junto con liofilizado no recubierto a 53% de humedad relativa para poder realizar un estudio acelerado de la viabilidad de los microorganismos. La Figura 4 muestra los recuentos de las 2 muestras almacenadas (liofilizado recubierto y no recubierto). Se observa que al principio la viabilidad del liofilizado recubierto tiene una caída mayor, sin embargo al poco tiempo éste se estabiliza, mientras que el liofilizado no protegido cae de manera exponencial.

Ejemplo 10.

30 Recubrimiento y encapsulación de β -caroteno con zeina por procesado electrohidrodinámico y estudio comparativo de la estabilidad del antioxidante bajo luz ultravioleta (UV)

La primera etapa consiste en la preparación de las disoluciones formadoras del recubrimiento de nanopartículas y los encapsulados. Para el recubrimiento se disuelve la zeina en una concentración del 12% en peso respecto al volumen del disolvente (una mezcla de alcohol y agua en una proporción 15:85 respectivamente). Para la obtención del β -caroteno encapsulado se prepara una disolución del 33% de zeina en peso respecto al volumen del disolvente (una mezcla de alcohol y agua en una proporción 15:85 respectivamente) y se añade el antioxidante en una proporción zeina: β -caroteno de 95:5 respectivamente. Las disoluciones se mantienen en agitación hasta que los componentes quedan completamente disueltos. Las disoluciones finales se introducen en una jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo.

A continuación se deposita y distribuye el antioxidante de manera homogénea sobre el colector del equipo para el caso del recubrimiento. Finalmente, se realiza el electroesprayado de las disoluciones sobre el colector. En el caso del recubrimiento, tras un tiempo controlado de electroesprayado, el material se voltea y después se vuelve a electroesprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el caroteno. El equipo se compone de una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector. Para este ejemplo, las condiciones de procesamiento fueron para ambos materiales (recubrimiento y encapsulado) las siguientes: caudal de disolución de 0,30 ml/h; 12 kV de corriente; 10 cm de distancia entre la aguja y el colector. El β -caroteno sin recubrir, el β -caroteno recubierto y los encapsulados de β -caroteno con zeina fueron expuestos a luz UV durante 10h. La Tabla 3 muestra la evolución de la absorbancia a 455 nm del β -caroteno, donde este compuesto presenta una banda característica. Se muestra la absorbancia inicial y la absorbancia después de 10h bajo luz UV del β -caroteno sin recubrir, recubierto y encapsulado. Se observa que el recubrimiento fue la tecnología que mejor protegió al antioxidante frente a la degradación UV.

Tabla 3

	β -caroteno		
	Recubrimiento	Encapsulado	
Absorbancia inicial (455 nm)	0.255	0.255	0.255
Absorbancia 10h (455 nm)	0.086	0.190	0.100

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de protección de material biológico y compuestos termolábiles de interés industrial que comprende las siguientes etapas:

5

- preparación de disoluciones poliméricas formadoras de micro-, submicro- y nanopartículas que componen materiales de recubrimiento

10 - recubrimiento del material biológico o compuestos termolábiles mediante los materiales preparados en la etapa anterior, caracterizado porque el recubrimiento del material biológico o compuestos termolábiles se realiza por procesado electrohidrodinámico o aerodinámico.

15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el material biológico son microorganismos o virus.

20 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque los microorganismos son *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Cyanobacterium*, *Rhodobacterales*, *Saccharomyces*, o cualquier otro microorganismo que necesite protección.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los compuestos termolábiles son enzimas, vitaminas, elementos esenciales, o cualquier molécula o compuesto derivado o no, que necesite protección.

25 5.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque los materiales de recubrimiento se seleccionan entre proteínas, oligosacáridos, polisacáridos, lípidos, polímeros y combinaciones de los mismos.

30 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque los materiales de recubrimiento polímeros se seleccionan entre óxido de polietileno, copolímeros de etileno y alcohol vinílico, polivinil alcohol, polivinilpirrolidona y combinaciones de los mismos.

- 7.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque las proteínas utilizadas como materiales de recubrimiento se seleccionan entre proteínas animales, vegetales y microbianas, particularmente las del suero de la leche, caseínas, polipéptidos naturales u obtenidos por modificación genética de microorganismos, colágeno, proteína de soja y zeína.
- 5
- 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque las proteínas utilizadas como materiales de recubrimiento se seleccionan entre la zeína y la proteína del suero de la leche.
- 10
- 9.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque los oligosacáridos utilizados como materiales de recubrimiento se seleccionan entre la lactosa, la sacarosa, la maltosa y los fructooligosacáridos y particularmente los fructooligosacáridos.
- 15
- 10.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque los polisacáridos utilizados como materiales de recubrimiento se seleccionan entre alginato, pectinas, quitosano, gomas, carragenatos, almidón, dextrano, maltrodextrina, celulosa, glucógeno y quitina.
- 20
- 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque los polisacáridos utilizados como materiales de recubrimiento se seleccionan entre dextrano, maltodextrina y almidón y cualquier combinación de los mismos.
- 25
- 12.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el disolvente que se emplea para la preparación de las disoluciones poliméricas se selecciona entre agua, alcoholes, mezclas de alcoholes y agua y otros disolventes orgánicos.
- 30
- 13.- Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque el disolvente es agua o mezclas de alcohol y agua.
- 14.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque en la etapa de preparación de las disoluciones poliméricas se añaden

sustancias ayudantes del procesado que facilitan la formación de las micro-, submicro- y nanopartículas y que se seleccionan entre plastificantes, tensoactivos, emulsionantes, surfactantes, antioxidantes o cualquiera de sus combinaciones.

5 **15.-** Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque la sustancia ayudante del procesado que se añade es monolaureato de sorbitan.

16.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque la etapa de preparación de las disoluciones poliméricas incluye un tratamiento
10 de homogenización por agitación.

17.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque la etapa de preparación de las disoluciones poliméricas incluye un tratamiento de homogenización por ultrasonidos.

15

18.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque el procesado electrohidrodinámico o aerodinámico es electroesprayado o
esprayado por soplado en al menos una etapa.

20 **19.-** Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque el procesado electrohidrodinámico o aerodinámico se realiza en varias etapas con un tratamiento de homogenización, volteo y/o tamizado entre estas.

20.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19,
25 caracterizado porque el recubrimiento por procesado electrohidrodinámico o aerodinámico se realiza directamente sobre el material biológico o compuestos termolábiles previamente deshidratados mediante liofilización u otro proceso no electrohidrodinámico o aerodinámico.

30 **21.-** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado porque el procesado electrohidrodinámico o aerodinámico se realiza directamente sobre el material biológico o compuestos termolábiles sin deshidratar, produciéndose la deshidratación de éstos y después el recubrimiento mediante procesado electrohidrodinámico o aerodinámico.

22.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque previamente a la etapa de recubrimiento se lleva a cabo un tratamiento de tamizado para controlar el tamaño de partícula.

5

23.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque posteriormente a la etapa de recubrimiento se lleva a cabo un tratamiento de tamizado para controlar el tamaño de partícula.

10 **24.-** Procedimiento según las reivindicaciones 22 o 23, caracterizado porque el tratamiento de tamizado es mecánico.

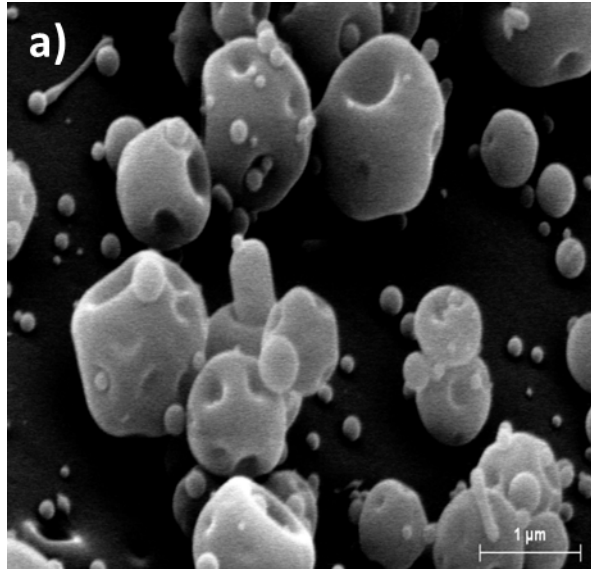


Figura 1

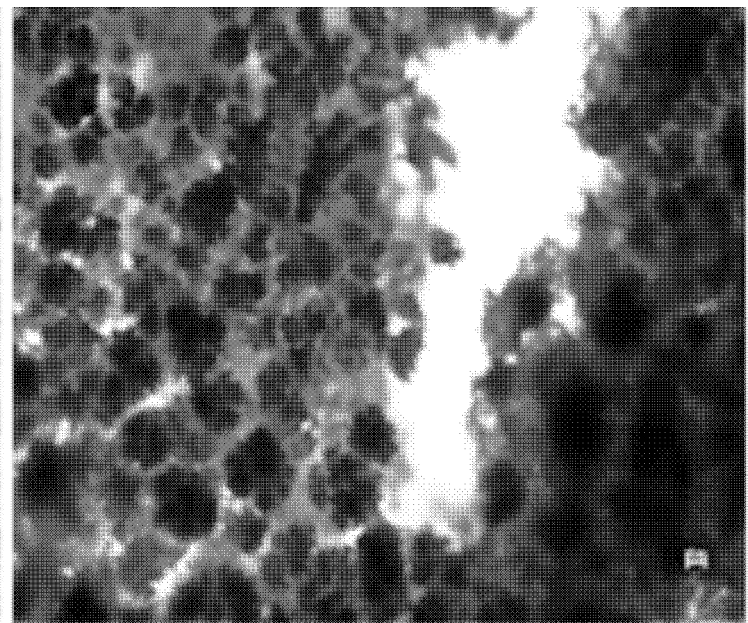


Figura 2

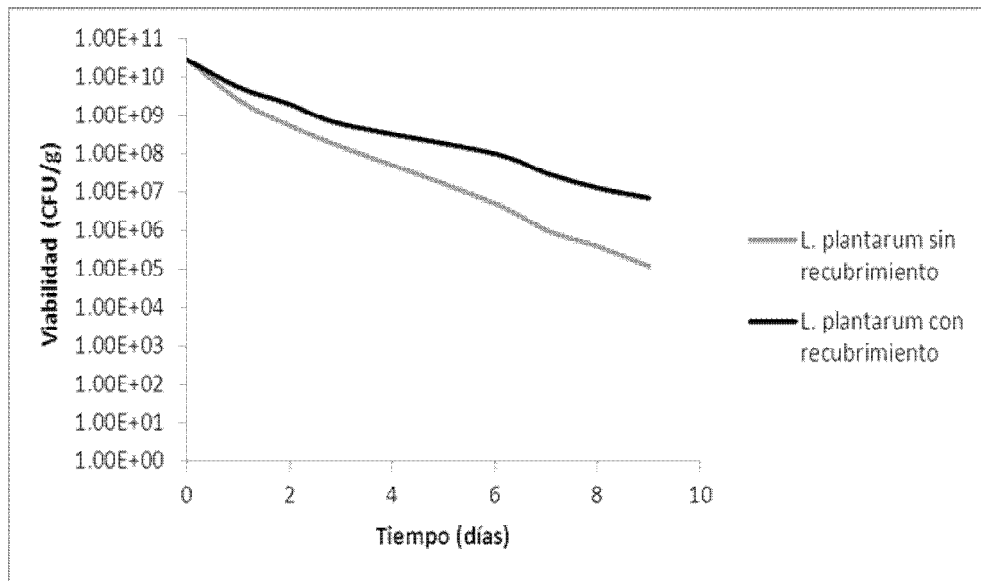


Figura 3

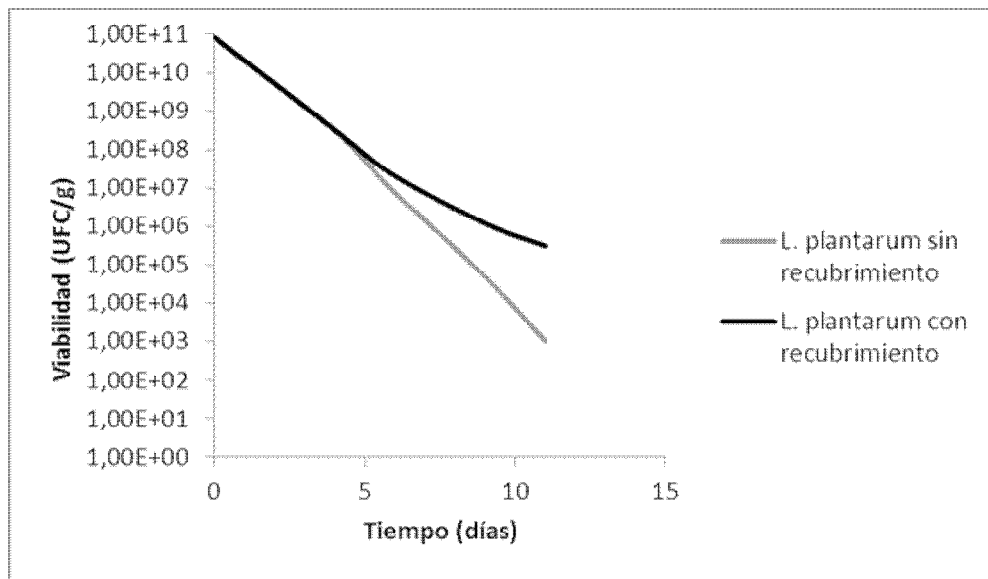


Figura 4

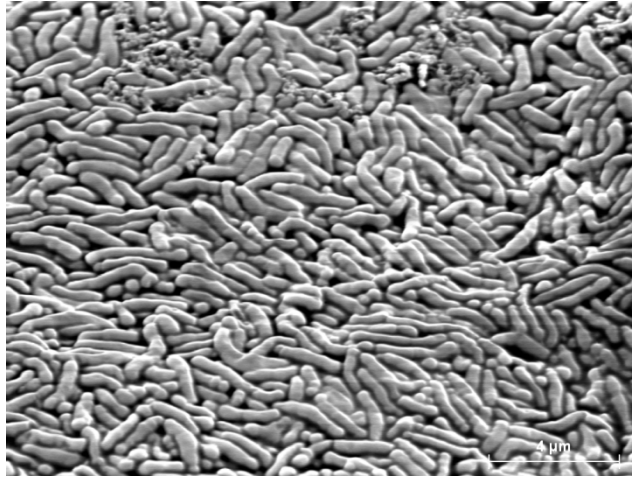


Figura 5

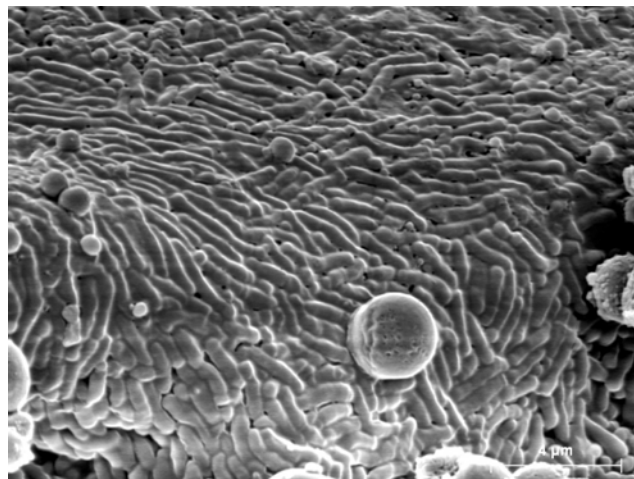


Figura 6

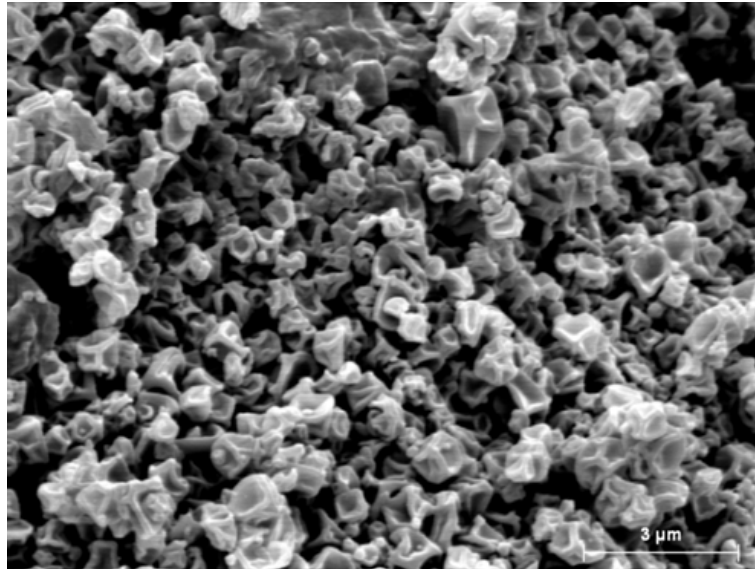


Figura 7