

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 038**

51 Int. Cl.:

A21D 13/00 (2006.01)

A21D 13/08 (2006.01)

A23C 9/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2011 PCT/IB2011/055462**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO12077038**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2011 E 11815718 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2648528**

54 Título: **Composición y método para mejorar la estabilidad y extender la vida útil de bacterias probióticas y productos alimenticios de las mismas**

30 Prioridad:

06.12.2010 US 419885 P

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

13.01.2017

73 Titular/es:

**DEGAMA BERRIER LTD. (100.0%)
Maples Corporate Services Limited P.O.Box 309
Ugland House, KY**

72 Inventor/es:

PENHASI, ADEL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 597 038 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición y método para mejorar la estabilidad y extender la vida útil de bacterias probióticas y productos alimenticios de las mismas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se relaciona en general con los probióticos y productos alimenticios que contienen tales y, en particular, pero no exclusivamente, con composiciones que contienen probióticos estabilizados con estabilidad mejorada y vida útil extendida.

Antecedentes de la invención

- 10 Los probióticos son suplementos alimentarios microbianos vivos que afectan beneficiosamente al huésped apoyando la flora intestinal de origen natural, al competir con los microorganismos nocivos en el tracto gastrointestinal, ayudando a los procesos metabólicos útiles, y mediante el fortalecimiento de la resistencia del organismo huésped frente a sustancias tóxicas. Los efectos beneficiosos que los probióticos pueden inducir son numerosos. Algunos ejemplos no limitantes incluyen la reducción de la intolerancia a la lactosa, la inhibición de las bacterias y parásitos patógenos, la reducción de la diarrea, la actividad contra *Helicobacter pylori*, la prevención del cáncer de colon, la mejora o la
- 15 prevención de estreñimiento, la producción in situ de vitaminas, la modulación de la grasa en la sangre, y la modulación de las funciones inmunes del huésped. En los animales domesticados y acuáticos también pueden mejorar el crecimiento, la supervivencia y la resistencia al estrés asociado con enfermedades y condiciones de cultivo desfavorables. Por lo tanto, existe un considerable interés en incluir probióticos en los productos alimenticios humanos y en la alimentación animal.

- 20 Los organismos probióticos son preferiblemente vivos y capaces de actividad hasta e incluyendo durante la ingestión, con el fin de ser efectivos. Los organismos probióticos se incorporan usualmente en los productos lácteos, tales como yogures, que proveen cierta estabilidad inherente y que no requieren calor para su procesamiento. Sin embargo, es difícil incorporar los microorganismos beneficiosos en otros tipos de productos alimenticios, por ejemplo, cremas, rellenos de galletas, chocolate, salsas, mayonesa y etc., especialmente aquellas que opcionalmente se someten a
- 25 tratamiento térmico en al menos una etapa de su preparación. El tratamiento térmico se conoce para disminuir la viabilidad de organismos probióticos y, si es suficientemente alto o se aplica durante un período suficientemente largo de tiempo, matará a estos organismos.

- La actividad y estabilidad a largo plazo de las bacterias probióticas puede verse afectada por un número de factores ambientales; por ejemplo, temperatura, pH, presencia de agua/humedad y oxígeno o agentes oxidantes o reductores.
- 30 Es bien sabido que, en una fase acuosa, los probióticos instantáneamente pierden su actividad durante el almacenamiento a temperatura ambiente (TA). Generalmente, las bacterias probióticas se secan antes o durante la mezcla con otros ingredientes alimenticios. El proceso de secado puede frecuentemente dar como resultado una pérdida significativa de la actividad de tensión mecánica, química, y osmótica inducidas por el proceso de secado. La pérdida de actividad puede ocurrir en muchas etapas diferentes, incluyendo el secado durante la fabricación inicial, la
- 35 preparación de alimentos (cuando se expone a altas temperaturas, alta humedad, oxígeno y alta presión), el transporte y el almacenamiento a largo plazo (temperatura, oxígeno y exposición húmeda), y después del consumo y el paso en el tracto gastrointestinal (GI) (la exposición a pH bajo, enzimas proteolíticas y sales biliares). La fabricación de alimentos o productos de pienso con organismos de células vivas o probiótica es en particular un reto, debido a que los probióticos son muy sensibles al oxígeno, la temperatura y la humedad, todos los cuales están típicamente
- 40 presentes en el mismo producto alimenticio y/o su fabricación.

- Muchos probióticos exhiben su efecto beneficioso sobre todo cuando están vivos. Por lo tanto, necesitan sobrevivir al proceso de fabricación y vida útil de los alimentos. Del mismo modo, tras el consumo del alimento, deben sobrevivir a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal, tales como los valores de pH muy bajos presentes en el estómago, antes de alcanzar la ubicación adecuada en el intestino para la colonización. Aunque muchos productos probióticos
- 45 comerciales están disponibles para los consumos de animales y humanos, la mayoría de ellos pierden su viabilidad durante el proceso de fabricación, el transporte, el almacenamiento y en el tracto gastrointestinal del animal/humano.

Para compensar esta pérdida, una cantidad excesiva de probióticos se incluye en el producto, en previsión de que una parte va a sobrevivir y alcanzar su objetivo. Además de la viabilidad de vida útil cuestionable de estos productos, tales prácticas no son ciertamente rentables. Adicionalmente, tales prácticas también pueden dar lugar a

dosificaciones muy variables de las bacterias probióticas que realmente llegan a su destino previsto para la colonización, lo que tampoco es deseable.

Para la protección de las bacterias, se han ideado diversas formulaciones, con frecuencia la incorporación de agentes de protección, tales como proteínas, ciertos polímeros, leche desnatada, glicerol, polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos, y similares. Sin embargo, ninguna de estas formulaciones es capaz de proteger adecuadamente contra el oxígeno y la humedad, ni son capaces de proveer una protección adecuada contra altas temperaturas requeridas para el procesamiento de muchos productos alimenticios.

Por ejemplo, los microorganismos probióticos pueden ser encapsulados por técnicas de recubrimiento entérico que implica aplicar una película de sustancia de formación, usualmente por aspersión de líquidos que contienen polímero entérico y generalmente otros aditivos tales como azúcares o proteínas sobre los probióticos secos (Ko and ping WO 02/058735). Sin embargo, la película de polímeros entéricos que recubre los probióticos durante el proceso de microencapsulación usualmente no pueden funcionar como una protección de barrera contra la humedad y, en general hay que añadir varias capas, para evitar que el agua entre en las microcápsulas. Además, tales polímeros tampoco pueden proveer una protección adecuada contra el oxígeno en muy malas propiedades de oclusión de oxígeno de tales polímeros.

Giffard y Kendall (US 2005/0079244) divulgan un producto alimenticio en forma de una croqueta lista para comer seca o semihúmeda o mezcla en polvo, que contiene una combinación de un probiótico, prebiótico y un recubrimiento de calostro. Antes de la mezcla en el producto alimenticio, el probiótico se recubre o encapsula en un polisacárido, grasa, almidón, proteína o en una matriz de azúcar, usando técnicas estándar de encapsulación. De manera similar a la divulgación anterior, ni los polímeros de encapsulación ni los aditivos utilizados en las dos capas de núcleo y de recubrimiento tienen baja transmisión de vapor de agua y de oxígeno, y por lo tanto los efectos negativos del agua (humedad) y de oxígeno no se pueden evitar.

De acuerdo con lo anterior, se ha propuesto para secar los sistemas de probióticos a base de azúcar mediante la formación de espuma en una capa muy delgada (Bronshtein WO2005117962), o utilizar combinaciones de azúcares con un agente gelificante polimérico, tal como alginato, quitosano, carboximetilcelulosa o carboxietilcelulosa. Cavadini et al. (EP 0 862 863) proveen un producto de cereales que comprende una matriz de almidón gelatinizado que incluye un recubrimiento o un agente de relleno. El probiótico está incluido con el recubrimiento. De acuerdo con ese proceso, los probióticos secados por aspersión se mezclan con un sustrato portador, que puede ser agua, grasa o una proteína de digestión. La mezcla es entonces asperjada sobre el producto de cereales y todo el producto se seca de nuevo. La rehidratación de las bacterias ya secas y el proceso adicional de recubrimiento/secado es costoso y perjudicial para las bacterias.

El documento US 2005/0019417 A1 describe un método de preparación de productos que contienen microorganismos vivos sensibles a la humedad, incluyendo probióticos, que comprende al menos las etapas a través de las cuales una suspensión de probióticos y un polímero de azúcar en solvente miscible en agua se asperjan sobre partículas sólidas formadoras de gel soluble en agua. Por estos medios, el núcleo compuesto de partículas sólidas formadoras de gel soluble en agua puede absorber residuos de solventes y proveer protección a los probióticos colocados sobre dicho núcleo.

Kenneth y Liegh (EE.UU. Pat. No. 6.900.173) describen la fabricación de una barra de probióticos y proteína multivitamínica para la promoción de un estado anabólico en una persona. Las bacterias probióticas secas se mezclan en jarabe de azúcar y varios otros constituyentes, y la mezcla resultante se extruye y se corta en barras. Sin embargo, el documento no divulga ningún proceso o composición que mejorará la viabilidad o la estabilidad a largo plazo de los probióticos en las barras nutricionales y no hay ninguna indicación de que las bacterias aun sobreviven al proceso.

El documento US 2004/0175389 (Porubcan) divulga una formulación para la protección de bacterias probióticas durante su paso a través del estómago, mientras que permite su liberación en el intestino. La formulación tiene también una baja actividad de agua y correspondientemente larga vida útil. La cápsula incluye una mezcla libre de agua de bacterias probióticas con sales monovalentes de alginato, y un recubrimiento entérico (por ejemplo, encapsulación en gelatina o celulosa). Tras el contacto con el entorno ácido, la capa exterior de la cápsula se convierte en un gel, que provee una barrera de protección contra el influjo de protones en el núcleo de la cápsula. Sin embargo, esta composición es útil solamente para las tabletas y cápsulas sometidas a condiciones de almacenamiento de actividad muy baja de agua y además requieren almacenamiento en contenedores purgados con nitrógeno o sellados al vacío.

El documento WO 03/088755 (Farber y Farber) describe un sistema de suministro oral para ingredientes funcionales uniformemente dispersados en una matriz. Los componentes de la matriz incluyen un azúcar, un carbohidrato, un hidrocoloide, un alcohol polivalente y una fuente de cationes mono- o divalentes. El sistema de suministro es extrudido o moldeado en una forma final con un contenido de humedad de entre 15% y 30% en peso. Este tipo de matriz provee muy poca protección a los probióticos; la poca protección que se provee requiere condiciones de refrigeración, que no son adecuados o deseables para muchos productos alimenticios. No se provee descripción o dirección en cuanto a cómo las bacterias probióticas se estabilizan durante la fabricación o durante el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente.

McGrath y Mchale (EP 1382241) describen un método de suministro de un microorganismo a un animal. El microorganismo se suspende en una matriz de alginato entrecruzado y criopreservante (trehalosa o lactosa, o una combinación de ambos). La matriz es entonces congelada o secada al vacío para formar perlas secas que contienen probióticos vivos con una estabilidad de vida útil de hasta 6 meses, pero solamente bajo condiciones de refrigeración. Una vez más, no se proveyó ninguna descripción o dirección en cuanto a cómo las bacterias probióticas se estabilizan durante la fabricación o durante el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente y condiciones de alta humedad.

Ubbink et al. (US 2005/0153018) divulga la preservación de las bacterias del ácido láctico en alimentos húmedos. Las bacterias secadas por aspersión se añaden a una composición que comprende grasas, leche fermentada en polvo y sacáridos. Esa composición se utiliza entonces como el agente de relleno de un producto de confitería. El asunto objeto descrito en ese documento evita los efectos perjudiciales del agua embebiendo los probióticos en grasa o matriz rica en aceite. Sin embargo, el recubrimiento a base de grasa y la conservación de materiales solos no resisten el oxígeno y la exposición a largo plazo a condiciones húmedas.

Rubin et al. (WO 2011/004375) divulgan composiciones resistentes al calor y un método de preparación de estas composiciones, que se someten a tratamiento de calor en al menos una etapa de su preparación.

Baek et al. (WPI/Thomson, 1994-06-04, vol. 1996, nr.11) se refieren a la "estabilización de Lactobacillus en polvo.

Ninguna de las composiciones anteriores provee una mezcla que puede proteger eficientemente el probiótico en ambos procesos tanto de secado como almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente y grados variables de humedad. Además, ninguna de las composiciones anteriores provee una mezcla que puede proteger eficientemente los probióticos contra el oxígeno que es una causa principal para la pobre estabilidad durante largo tiempo en condiciones de almacenamiento produciendo vida útil muy limitada.

Breve resumen de la invención

Muchos probióticos pueden ser sensibles a la temperatura, al agua y/o al oxígeno y por lo tanto sufren de la carencia de una vida útil extendida. Por lo tanto, necesitan protección durante el procesamiento, transporte y almacenamiento, así como durante el suministro al tracto gastrointestinal para mantener la viabilidad.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de una composición que puede proteger eficientemente las bacterias probióticas durante la fabricación, el almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente, la humedad y el oxígeno y durante el paso gastrointestinal. También existe la necesidad de un procedimiento de preparación que sea rentable y capaz de atrapar y estabilizar los probióticos en la mezcla de protección con una mínima pérdida de viabilidad al final de toda la operación. Hay una necesidad de una mezcla protectora que provea protección en el estómago mientras que permite la liberación del probiótico a lo largo del tracto intestinal. También hay una necesidad de una mezcla protectora que contenga solamente ingredientes aprobados generalmente considerados como seguros (GRAS), y sea menos costosa que las que actualmente se está utilizando.

La presente invención, en al menos algunas realizaciones, supera estos inconvenientes de la técnica anterior y provee una solución a estas necesidades, proveyendo una composición y proceso para producir una composición para bacterias probióticas que sean estables durante el procesamiento, y durante largos períodos de tiempo a temperatura ambiente y grados variables de humedad.

En al menos algunas realizaciones, la presente invención provee un proceso de preparación rápido y rentable y la protección en los productos de alimentos (productos alimenticios). Como se describe aquí, puede entenderse que los términos "alimentos" y "productos alimenticios" abarcan cualquier tipo de producto nutricional que sea adecuado para los mamíferos, incluyendo, pero no limitado a los humanos.

La presente invención, en al menos algunas realizaciones, provee una composición que comprende bacterias probióticas que sean resistentes al calor, oxígeno y humedad y que sean adecuadas para un producto de alimento, en donde la composición está en forma de partículas, comprendiendo la composición: (a) una composición de núcleo que contiene las bacterias probióticas y un estabilizador, en donde la cantidad total de los probióticos en la mezcla es de aproximadamente 10% hasta aproximadamente 90% en peso de la composición del núcleo; (b) una capa de recubrimiento más interna, en capas en dicha composición de núcleo, que comprende al menos una grasa sólida hidrófoba o ácido graso que tiene un punto de fusión inferior a 60°C; (c) una capa de recubrimiento intermedia en capas en dicha capa de recubrimiento más interna, que cuando está presente en una solución acuosa en la cantidad de 0.1% peso/peso sobre el peso de la solución, tiene una tensión superficial inferior a 60 mN/m, cuando se mide a 25°C; y (d) una capa de recubrimiento exterior, en capas en dicha capa de recubrimiento intermedio.

El estabilizador puede comprender opcionalmente cualquier tipo de consumidor de oxígeno, incluyendo, pero no limitado a, los que contienen base de L-cisteína o clorhidrato, de los cuales se listan aquí otros ejemplos.

La composición de núcleo también puede comprender opcionalmente al menos un compuesto de azúcar incluyendo, pero no limitado a, maltodextrina, trehalosa, lactosa, galactosa, sacarosa, fructosa y similares, de los cuales se proveen aquí otros ejemplos. Disacáridos, tales como sacarosa y trehalosa, son atractivas como agentes protectores dentro del núcleo debido a que son en realidad plantas de ayuda y células microbianas para permanecer en un estado de animación suspendida durante periodos de sequía. Se ha demostrado que la trehalosa es un protector efectivo para una variedad de materiales biológicos, secados tanto por aire ambiente como secados por congelación.

La composición de núcleo también puede comprender opcionalmente uno o más de otros ingredientes de calidad alimentaria, incluyendo, pero no limitado a un agente de relleno, un surfactante y aglomerante, de los cuales se proveen aquí diversos ejemplos no limitantes.

La capa de recubrimiento más interna puede comprender opcionalmente al menos una grasa sólida hidrófoba o ácido graso que tiene un punto de fusión inferior a 50°C y preferiblemente superior a 25°C. El punto de fusión es opcionalmente de preferencia inferior a 45°C y superior a 30°C, y es opcionalmente y más preferiblemente inferior a 40°C y superior a 35°C. La capa de recubrimiento más interna puede formar opcionalmente una matriz hidrófoba estable que incorpore la composición de núcleo interior y/o forme una película alrededor de la composición de núcleo probiótico.

La capa de recubrimiento intermedia, la cual cuando está presente en una solución acuosa en la cantidad de 0.1% peso/peso sobre el peso de la solución, tiene opcionalmente una tensión superficial inferior a 50 mN/m y preferiblemente inferior a 45 mN/m cuando se mide a 25°C.

La capa de recubrimiento exterior comprende, opcionalmente un polímero que tiene una tasa de transmisión de oxígeno de menos de 1000 cc/m²/24 horas, preferiblemente de menos de 500 cc/m²/24 horas y lo más preferiblemente menos de 100 cc/m²/24 horas medida en condiciones de prueba estándar (que puede ser por ejemplo 73°F (23°C) y 0% de humedad relativa). El polímero también tiene opcionalmente una tasa de transmisión de vapor de agua de menos de 400 g/m²/día, preferiblemente menos de 350 g/m²/día y más preferiblemente menos de 300 g/m²/día.

La composición puede comprender además opcionalmente una capa adicional de recubrimiento de barrera de humedad, en capas sobre la capa de recubrimiento exterior, para impedir la penetración adicional de humedad. La composición puede comprender además opcionalmente un polímero entérico, en capas sobre la capa de recubrimiento de barrera de humedad, que puede proveer además protección contra tales características destructivas del tracto gastrointestinal como valores bajos de pH y enzimas proteolíticas.

La composición resultante es en una forma sólida que puede ser opcionalmente cualquier forma de partícula sólida como se describe aquí, incluyendo, pero no limitado a, gránulos, polvo y similares. La composición estabilizada es adecuada para mezclar/añadir a los productos alimenticios, incluyendo pero no limitado a chocolate, queso, cremas, salsas, mayonesa y relleno de galleta. Las bacterias probióticas estabilizadas dentro de la composición de protección mantienen su viabilidad durante los procesos de fabricación o de preparación que implican la exposición a alta temperatura, humedad y oxígeno. Las bacterias estabilizadas mantienen su viabilidad durante las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente, en un ambiente oxigenado húmedo, incluso después de que se añaden a un producto alimenticio. Un ejemplo de alta temperatura que va a ser resistida es una etapa de atemperado durante la preparación de chocolate, o de mezcla dentro de las composiciones de crema.

Breve descripción de los dibujos

Lo anterior y otras características y ventajas de la invención serán más fácilmente evidentes a través de los siguientes ejemplos, y con referencia a los dibujos adjunto, en donde:

5 La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de una cápsula de múltiples capas de acuerdo con una realización de la invención;

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático de una cápsula de múltiples capas de acuerdo con una realización de la invención.

Figura 3 muestra un diagrama esquemático de un ángulo (θ) de contacto que se forma cuando un líquido no se propaga completamente sobre un sustrato (usualmente un sólido).

10 Descripción detallada de realizaciones preferidas

Ahora se ha encontrado que las bacterias probióticas pueden ser sorprendentemente estabilizadas eficientemente para uso en un proceso de preparación de alimentos mediante una combinación única de capas de recubrimiento que tienen orden de disposición única. Las bacterias fueron formuladas en un núcleo recubierto con capas de recubrimiento, obteniendo de este modo composiciones probióticas que proveen organismos probióticos viables
15 incluso después de un tiempo prolongado de almacenamiento a temperatura ambiente con una humedad elevada, la composición siendo además estable en el almacenamiento y la vida útil del producto alimenticio que contiene los probióticos protegidos de acuerdo con la presente invención y capaces de administrar bacterias viables a los tractos gastrointestinales después de la administración oral.

La presente invención, en al menos algunas realizaciones, provee una composición probiótica en forma de partículas para ser utilizado como aditivos alimentarios saludables. La presente invención se dirige particularmente a un proceso para la preparación de probióticos protegidos contra el oxígeno y la humedad (vapor de agua) para la incorporación en los productos alimenticios, tales como cremas, galletas, cremas de galletas, rellenos de galletas, chocolates, salsas, queso, mayonesa y etc.
20

En una realización preferida de la invención, dichas bacterias probióticas comprenden al menos un *Bifidobacterium animalis lactis*. El gránulo de núcleo probiótico estabilizado o de mezcla de núcleo de acuerdo con la invención es un gránulo recubierto, que comprende al menos tres fases en capas, por ejemplo un núcleo y tres recubrimientos, o un núcleo y tres o más recubrimientos. Usualmente, una de las capas es grasa sólida hidrófoba que contribuye principalmente a la prevención de la penetración de agua o humedad en el núcleo durante el recubrimiento de la capa exterior o durante las etapas posteriores. Al menos otra capa es un recubrimiento exterior que es responsable de prevenir la transmisión de la humedad y oxígeno en el núcleo durante el almacenamiento y la vida útil, mientras que la capa de recubrimiento intermedia está presente entre estas dos capas de recubrimiento y es responsable de proveer la unión y adhesión de las capas anteriores una con otra en donde dicho recubrimiento intermedio puede proveer además resistencia del núcleo al oxígeno y/o la humedad. Tal recubrimiento intermedio también puede comprender opcionalmente una capa que contribuye significativamente a la resistencia al oxígeno, y también proveer
30 opcionalmente una barrera contra la penetración del agua o la humedad en el núcleo; sin embargo, el gránulo probiótico estabilizado de la invención puede comprender más capas que contribuyan al proceso de estabilidad de las bacterias, así como a su estabilidad durante el almacenamiento de dicho alimento y durante el suministro seguro de las bacterias a los intestinos.

Descripción esquemática de la composición de acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención

La figura 1 muestra un diagrama esquemático de una cápsula de múltiples capas de acuerdo con una realización ilustrativa, no limitante de la invención, para ser provista (por ejemplo) a través de los alimentos; la encapsulación está diseñada para proveer bacterias probióticas con máxima estabilidad durante el almacenamiento y la vida útil a temperatura ambiente, proveyendo protección contra el oxígeno y la humedad durante el proceso de preparación o proceso de fabricación, así como de almacenamiento. Como se muestra, las etiquetas numeradas indican los componentes de la composición. La etiqueta "1" indica el núcleo, que comprende bacterias probióticas y un sustrato tal como estabilizador y opcionalmente también un azúcar y uno o más de otros ingredientes como se indica aquí. La etiqueta "2" indica la primera capa adyacente al núcleo, que es la primera capa de sellado interior que comprende un material hidrófobo, tal como una grasa sólida, por ejemplo. La etiqueta "3" indica la capa intermedia adyacente a dicha capa interior, que une la capa externa a la capa interna. La etiqueta "4" indica la capa exterior adyacente a dicha capa
40 45

intermedia, proveyendo protección contra oxígeno y humedad (vapor de agua), y así también apoyando una estabilidad de almacenamiento y vida útil más grandes a temperatura ambiente.

La figura 2 muestra un diagrama esquemático de una cápsula de múltiples capas de acuerdo con otra realización de la invención. Como se muestra, las etiquetas numeradas indican los componentes de la composición. La etiqueta "1" indica múltiples núcleos que ofrecen las bacterias probióticas y otros excipientes posibles que se pueden incluir en los núcleos como se describe aquí. La etiqueta "2" indica una primera capa de recubrimiento de grasa, que es la capa de recubrimiento más interna que comprende al menos una grasa sólida hidrófoba o ácido graso que tiene un punto de fusión inferior a 60°C y preferiblemente superior a 25°C, formando una matriz hidrófoba estable en la que están embebidos los núcleos probióticos. La etiqueta "3" indica una capa intermedia, por la cual la solución acuosa de 0.1% tiene una tensión superficial inferior a 60 mN/m. La etiqueta "4" indica una capa exterior, que comprende un polímero que tiene una tasa de transmisión de oxígeno de menos de 1000 cc/m²/24 hr.

La figura 3 muestra un diagrama esquemático de un ángulo (θ) de contacto que se forma cuando un líquido no se propaga completamente sobre un sustrato (usualmente un sólido). Es una medida directa de interacciones que tienen lugar entre las fases participantes. El ángulo de contacto se determina trazando una tangente donde se intersectan el líquido y el sólido. El ángulo de contacto se define geométricamente como el ángulo en el lado de líquido de la línea tangencial trazada a través de la frontera de tres fases, donde un líquido, gas y un sólido se intersectan, o dos líquidos inmiscibles y sólido se cruzan intersectan.

Partículas que contienen probióticos

De acuerdo con una realización preferida de la invención, las bacterias probióticas en dicho núcleo interior se mezclan con un estabilizante, opcionalmente y preferiblemente con al menos un azúcar y/o al menos un oligosacárido o polisacáridos (como agente suplementario para las bacterias), y opcionalmente, otros aditivos de calidad alimentaria tales como agentes de relleno, aglomerantes, surfactantes, y así sucesivamente.

Ejemplos de bacterias probióticas incluyen, pero no se limitan a *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086, *Bacillus subtilis* var natto, *Bifidobacterium* LAFTI® B94, *Bifidobacterium* sp LAFTI B94, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium bifidum* Rosell-71, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium breve* Rosell-70, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium longum* Rosell-175, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, *Bifidobacterium infantis* 35624, *Escherichia coli* M-17, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI® L10, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10, *Lactobacillus casei* LAFTI® L26, *Lactobacillus casei* LAFTI L26, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* A TTC 55730 (*Lactobacillus reuteri* SD2112), *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactococcus lactis* Resell-1058, *Lactobacillus paracasei* St11 (or NCC2461) *Lactobacillus fortis* Nestlé, *Lactobacillus johnsonii* La1 (= *Lactobacillus* LC1, *Lactobacillus johnsonii* NCC533) Nestlé, *Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11, *Lactobacillus acidophilus* Rosell-52, *Streptococcus thermophilus*, *Diacetylactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, y una mezcla de las mismas.

Azúcar: De acuerdo con una realización preferida de la invención, las bacterias probióticas en la composición del núcleo se mezclan con un azúcar. El azúcar comprende preferiblemente al menos un material que es también un agente suplementario para las bacterias probióticas. Cabe señalar que, opcionalmente, el azúcar es el agente suplementario por sí mismo. Un agente complementario tal como se utiliza aquí se refiere a un agente con una función nutricional y/o de protección, por ejemplo.

El azúcar puede comprender opcionalmente uno o más de los siguientes: monosacáridos tales como triosas incluyendo cetotriosa (dihidroxiacetona) y aldotriosa (gliceraldehído), tetrasas tales como cetotetrosa (eritrosa), aldótetrosas (eritrosa, treosa) y cetopentosa (ribulosa, xilulosa), pentosas tales como aldopentosa (ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa), azúcar desoxi (desoxirribosa) y cetohexosa (psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa), hexosas tales como aldohexosa (alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa), azúcar desoxi (fucosa, fuculosa, ramnosa) y heptosa tal como (sedoheptulosa), y octosa y nonosa (ácido neuramínico). El sustrato puede comprender múltiples sacáridos tales como 1) disacáridos, tales como sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, turanosa, y celobiosa, 2) trisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa y maltotriosa, 3) tetrasacáridos tales como acarbosa y estaquiosa, 4) otros oligosacáridos tales como fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y manano-oligosacáridos (MOS), 5) polisacáridos tales como polisacáridos/glucano a base de glucosa que incluye almidón de glicógeno

(amilosa, amilopectina), celulosa, dextrina, dextrano, beta-glucano (zymosan, lentinan, sizofiran), y maltodextrina, polisacáridos/fructano a base de fructosa incluyendo inulina, levano beta 2-6, polisacáridos a base de manosa (manano), polisacáridos a base de galactosa (galactano), y polisacáridos a base de N-acetilglucosamina incluyendo quitina. Otros polisacáridos pueden ser incluidos, incluyendo, pero no limitados a, gomas tales como goma arábica (goma de acacia).

Estabilizador y antioxidante (consumidor de oxígeno): De acuerdo con una realización preferida de la invención, las bacterias probióticas en dicho núcleo interior se mezclan con un estabilizador que puede ser seleccionada del grupo que consiste de edetato de dipotasio, edetato de disodio, edetato cálcico de disodio, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, maltol, edetato de sodio, edetato trisódico. De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, el núcleo comprende además un antioxidante. Preferiblemente, el antioxidante se selecciona del grupo que consiste de clorhidrato de L-cisteína, base de L-cisteína, 4,4 (2,3 dimetil tetrametilen dipirocatecol), extracto rico en tocoferoles (vitamina E natural), α -tocoferol (vitamina E sintética), β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol, butilhidroxinona, butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de propilo, galato de octilo, galato de dodecilo, butilhidroquinona terciaria (TBHQ), ácido fumárico, ácido málico, ácido ascórbico (vitamina C), ascorbato de sodio, ascorbato de calcio, ascorbato de potasio, palmitato de ascorbilo y estearato de ascorbilo. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el núcleo comprende además tanto un estabilizador como un antioxidante. Sin desear estar limitados por una hipótesis o teoría individual, los agentes estabilizantes y antioxidantes pueden ser opcionalmente diferenciados. De acuerdo con una realización preferida, el antioxidante es clorhidrato de L-cisteína o base de L-cisteína.

Agente de relleno y aglomerante: De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el núcleo comprende además tanto agente de relleno como aglomerante. Ejemplos de agentes de relleno incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, celulosa microcristalina, un azúcar, tal como lactosa, glucosa, galactosa, fructosa o sacarosa; fosfato de dicalcio; alcoholes de azúcar tales como sorbitol, manitol, mantitol, lactitol, xilitol, isomalt, eritritol, e hidrolizados de almidón hidrogenado; almidón de maíz; y almidón de patata; y/o una mezcla de los mismos. Más preferiblemente, el agente de relleno es lactosa. Ejemplos de aglomerantes incluyen Povidona (PVP: polivinilpirrolidona), Copovidona (copolímero de vinilpirrolidona y acetato de vinilo), alcohol de polivinilo, HPC de bajo peso molecular (hidroxipropil celulosa), HPMC de bajo peso molecular (hidroxipropilmetilcelulosa), hidroximetil celulosa de bajo peso molecular (MC), carboximetilcelulosa de sodio de bajo peso molecular, hidroxietilcelulosa de bajo peso molecular, hidroximetilcelulosa de bajo peso molecular, acetato de celulosa, gelatina, gelatina hidrolizada, óxido de polietileno, acacia, dextrina, almidón, y poliacrilatos y polimetacrilatos solubles en agua, etilcelulosa de bajo peso molecular o una mezcla de los mismos. Más preferiblemente, el aglomerante es HPMC de bajo peso molecular. Cuando se usa una fusión en caliente para la fabricación de granulación uno o más de lo siguiente, que tiene un punto de fusión inferior a 60°C, se puede utilizar como aglomerante: una grasa sólida, ácido graso, una cera o polietilenglicol (PEG). Para este propósito primero el aglomerante se funde y luego se asperja sobre la mezcla seca de polvos que está a una temperatura la cual está muy por debajo del punto de fusión del aglomerante.

Surfactante: De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el núcleo comprende además un surfactante de usar probióticos, tales como surfactantes no iónicos. Ejemplos de surfactante no iónico incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, Tween 80 (polisorbato 80, polioxietileno (20) monooleato de sorbitano), Tween 20 (polisorbato 20, polioxietileno (20) monolaurato de sorbitano), Tween 85 (trioleato de polioxietileno sorbitano), glicereth-2-cocoato (Levenol® C-421), glicereth-6-cocoato (Levenol® F-200), glicereth-7-cocoato (Levenol® C-301), glicereth-17-cocoato (Levenol® C-201) o una mezcla de los mismos.

Primera capa de recubrimiento: De acuerdo con una realización preferida de la invención las partículas de dicha mezcla de núcleo se recubren con una capa de recubrimiento interna que comprende una grasa sólida hidrófoba o ácido graso o una cera que tiene un punto de fusión por debajo de 50°C, formando una película hidrófoba estable o matriz que embebe el probiótico, que previene o que reduce la penetración de agua o humedad dentro de dicho núcleo durante los procesos de recubrimiento adicionales. Como se usa aquí el término grasa consiste de un amplio grupo de compuestos hidrófobos que son generalmente solubles en solventes orgánicos y en gran medida insolubles en agua. Químicamente, las grasas son generalmente triésteres de glicerol y ácidos grasos. Las grasas pueden ser sólidas o líquidas a temperatura ambiente, dependiendo de su estructura y composición. Aunque las palabras "aceites", "grasa" y "lípidos" se usan para referirse a las grasas, "aceites" se utiliza usualmente para referirse a las grasas que son líquidas a temperatura ambiente normal, mientras que las "grasas" se utiliza generalmente para referirse a las grasas que son sólidas a temperatura ambiente normal. "Lípidos" se utiliza para referirse tanto a las grasas líquidas como sólidas, junto con otras sustancias relacionadas. La palabra "aceite" se utiliza para cualquier sustancia que no se mezcla con agua y tiene un tacto graso, tal como el petróleo (o aceite crudo) y el aceite de calefacción,

independientemente de su estructura química. Ejemplos de grasas de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a grasas como se describe más arriba, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, triésteres de ácidos grasos, sales de ácidos grasos tales como aluminio, sodio, potasio y magnesio, alcoholes grasos, fosfolípidos, sólida lípidos, ceras, y una combinación de los mismos que tiene un punto de fusión inferior a 50°C y superiores a 25°C, de preferencia inferior a 45°C y superiores a 30°C y lo más preferiblemente inferior a 40°C y superiores a 35°C formando una película hidrófoba estables o matriz que incorpora la película probiótico o formas alrededor de las partículas de núcleo probióticos. La grasa sólida es opcionalmente y preferiblemente al menos uno de ácido láurico, aceite de coco hidrogenado, manteca de cacao y una combinación de los mismos.

De acuerdo con otra realización preferida de las partículas de la invención de dicha mezcla de núcleo se granulan mediante dicha grasa sólida hidrófoba o ácido graso usando un proceso de granulación de fusión en caliente. En este caso una masa fundida de dicha grasa sólida hidrófoba o ácido graso se utiliza para la granulación de dichas partículas de núcleo, por lo tanto, dicha grasa sólida hidrófoba o ácido graso constituye una matriz en la que dichas partículas de núcleo se embeben, así dicha grasa sólida hidrófoba o ácido graso funciona tanto como aglomerante para la granulación y primera capa de recubrimiento de dichas partículas del núcleo. En otras palabras, dicha fusión en caliente de dicha grasa sólida hidrófoba o ácido graso puede constituir simultáneamente, por el proceso de granulación de fusión en caliente, tanto aglomerantes de núcleo, así como la primera capa de recubrimiento interior.

Capa de recubrimiento intermedia: De acuerdo con una realización preferida de la invención, las partículas de dicha mezcla de núcleo recubierta con dicha capa de recubrimiento interior se recubre con una capa de recubrimiento intermedia cuya solución acuosa de 0.1% tiene una tensión superficial inferior a 60 mN/m, preferiblemente inferior a 50 mN/m y más preferiblemente inferior a 45 mN/m medida a 25°C para el ajuste de la tensión superficial para recubrimiento adicional con capa de recubrimiento exterior.

La tensión superficial (ST) es una propiedad de la superficie de un líquido que le permite resistir una fuerza externa. En otras palabras, la tensión superficial es la medición de la energía de cohesión (exceso) presente en una interfaz gas/líquido. Las moléculas de un líquido se atraen entre sí. Las interacciones de una molécula en el volumen de un líquido se equilibran con una fuerza igualmente atractiva en todas las direcciones. Las moléculas en la superficie de un líquido experimentan un desequilibrio de fuerzas, como se indica a continuación. El efecto neto de esta situación es la presencia de energía libre en la superficie. El exceso de energía se llama energía libre superficial y puede cuantificarse como una medición de energía/área. También es posible describir esta situación como que tiene una tensión tensión lienal o de superficie, que se cuantifica como una medición de fuerza/longitud. Las unidades comunes para la tensión superficial son dinas/cm o mN/m. Estas unidades son equivalentes.

Líquidos polares, tales como agua, tienen fuertes interacciones intermoleculares y así altas tensiones superficiales. Cualquier factor que disminuye la fuerza de esta interacción reducirá la tensión superficial. Por lo tanto un incremento en la temperatura de este sistema reducirá la tensión superficial. Cualquier contaminación, especialmente por surfactantes, bajará la tensión superficial y bajará la energía libre de la superficie. Algunos valores de tensión superficial de los líquidos y solventes comunes se muestran en la siguiente tabla, Tabla 1.

Tabla 1 – valores de tensión superficial

Sustancia	γ (mN/m)	γ^p (mN/m)	γ^d (mN/m)
Agua	72.8	51.0	21.8
Glicerol	64	30	34
Etilen glicol	48	19	29
Sulfóxido de dimetilo	44	8	36
Alcohol bencílico	39	11.4	28.6
Tolueno	28.4	2.3	26.10
Hexano	18.4	-	18.4
Acetona	23.7	-	23.7
Cloroformo	27.15	-	27.15
Diyodometano	50.8	-	50.8

La adhesión y la uniformidad de una película también se ven influenciadas por las fuerzas que actúan entre la formulación de recubrimiento que está en una forma de solución y la superficie del núcleo de la superficie recubierta con película. Por lo tanto, las formulaciones de recubrimiento para cierta superficie del núcleo se pueden optimizar a través de la determinación del comportamiento de humectación, la medida del que es el ángulo de contacto o de humectación. Este es el ángulo que se forma entre una gotita de líquido y la superficie del cuerpo sólido al que se aplica.

Cuando un líquido no se dispersa completamente sobre un sustrato (usualmente un sólido) se forma un ángulo (θ) de contacto que se define geométricamente como el ángulo en el lado de líquido de la línea tangencial trazada a través de la frontera de tres fases, donde se intersecan un líquido, gas y sólido, o se intersecan dos líquidos inmiscibles y sólido.

Es una medida directa de las interacciones que tienen lugar entre las fases participantes. El ángulo de contacto se determina trazando una tangente en el contacto donde se intersecan el líquido y el sólido.

El ángulo de contacto es pequeño cuando la superficie del núcleo se humedece de manera uniforme mediante la difusión de gotitas. Si la gotita de líquido forma un ángulo definido, el tamaño del ángulo de contacto se describe por la ecuación de Young-Dupre;

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} = \gamma_{LG} \cdot \cos\theta$$

θ = ángulo de contacto

γ_{SG} = tensión superficial del cuerpo sólido

γ_{LG} = tensión superficial del líquido

γ_{SL} = tensión interfacial entre el líquido y el cuerpo sólido (no se puede medir directamente)

Con la ayuda de esta ecuación es posible estimar la tensión superficial de un cuerpo sólido mediante la medición de los ángulos de contacto relevantes. Si uno los midió con el líquido de la variación de la tensión superficial y representó sus cosenos como una función de la tensión superficial de los líquidos, el resultado es una línea recta. El valor de la abscisa de la intersección de la línea recta con $\cos\theta = 1$ se denomina como la tensión superficial crítica de humectación γ_C . Un líquido con una tensión superficial menor que γ_C , humedece el sólido en cuestión.

El ángulo de humectación o de contacto se puede medir con facilidad por medio de goniómetros telescópicos (por ejemplo LUW humectabilidad Tester por AB Lorentzen. Wettre, S-10028 Estocolmo 49). En muchos casos, la cantidad γ_C no es suficiente para caracterizar superficies de polímero, ya que depende entre otros factores en el carácter polar de los líquidos de prueba. Este método, sin embargo, puede ser mejorado dividiendo γ en parte γ^d no polar (causada por las fuerzas de dispersión) y una parte γ^p polar (causada por interacciones dipolares y enlaces de hidrógeno).

$$\gamma_L = \gamma_L^p + \gamma_L^d$$

$$\gamma_S = \gamma_S^p + \gamma_S^d$$

γ_L = tensión superficial del líquido de prueba

γ_S = tensión superficial del cuerpo sólido

γ_S^p y γ_S^d pueden ser determinados por medio de la siguiente ecuación:

$$1 + (\cos\theta/2)(\gamma_L/\sqrt{\gamma_L^d}) = \sqrt{\gamma_s^d} + \sqrt{\gamma_s^p} \cdot \sqrt{(\gamma_L - \gamma_L^d)/\gamma_L^d}$$

Si $1 + (\cos\theta/2)(\gamma_L/\sqrt{\gamma_L^d})$ se representa frente a $\sqrt{(\gamma_L - \gamma_L^d)/\gamma_L^d}$, se obtienen líneas rectas, desde las pendientes e intercepta las ordenadas de las cuales γ_s^p y γ_s^d puede determinarse así γ_s calculada.

- 5 γ_c y γ_s son aproximadamente, pero no exactamente, lo mismo. Dado que la medición también se ve influenciada por las irregularidades de las superficies de polímero, no se puede obtener verdadero ángulo θ de contacto sino más bien la cantidad θ' . Ambas cantidades están vinculadas por la relación;

$$\text{Factor de rugosidad } r = \cos\theta'/\cos\theta$$

- 10 Cuanto menor es la tensión superficial de la formulación de recubrimiento frente a la de la superficie del núcleo, mejor se dispersarán las gotitas en la superficie. Si se utilizan formulaciones con solventes orgánicos, las cuales mojan la superficie muy bien, el ángulo de contacto será cercano a cero. Las tensiones superficiales de tales formulaciones son entonces de 20 a 30 mN/m. La dispersión de recubrimiento acuosa de un poco de polímero como el tipo EUDRAGIT L 30 D muestra baja tensión superficial en el rango de 40 a 45 mN/m.

- 15 Las mediciones del ángulo de contacto pueden proveer opcionalmente la siguiente información, que puede ser útil para seleccionar los materiales de recubrimiento de acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención (sin querer limitarse por una lista cerrada):

1. Los ángulos de contacto más pequeños dan recubrimientos de película más suaves
2. El ángulo de contacto se hace más pequeño a medida que disminuye la porosidad y la concentración de formador de película.
3. Los solventes con alto punto de ebullición y alta constante dieléctrica reducen el ángulo de contacto.
- 20 4. Cuanto mayor es la tensión superficial crítica de núcleo, mejor será la adhesión de la película al núcleo.
5. Cuanto menor es el ángulo de contacto, mejor es la adhesión de la película al núcleo.

- 25 La tensión superficial crítica de dicho núcleo o gránulos recubiertos con una grasa sólida hidrófoba es esencialmente muy baja. Por lo tanto para proveer un mejor dispersión y así mejor adhesión de la película de capa de recubrimiento exterior al núcleo, de acuerdo con al menos algunas realizaciones es deseable reducir la energía libre superficial en la interfase entre la superficie de los núcleo/gránulos recubiertos con grasa y la solución del polímero de la capa de recubrimiento exterior.

- 30 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, las partículas de dicha mezcla de núcleo recubierto con dicha grasa sólida hidrófoba (capa de recubrimiento interior) están recubiertas con una capa de recubrimiento intermedia cuya solución acuosa de 0.1% tiene una tensión superficial inferior a 60 mN/m, preferiblemente inferior a 50 mN/m y más preferiblemente inferior a 45 mN/m medida a 25°C para reducir la energía libre superficial en la interfase entre la superficie del núcleo/gránulos recubiertos con grasa y la solución del polímero de la capa de recubrimiento exterior.

La siguiente tabla, Tabla 2, muestra, por ejemplo, la tensión superficial de la solución de algunos polímeros solubles en agua. La tensión superficial se midió a 25°C, solución acuosa de 0.1% de los polímeros.

- 35 Tabla 2 - valores de tensión superficial de polímeros seleccionados

Polímero	Tensión superficial mN/m
Carboximetilcelulosa de sodio (Na-CMC)	71.0
Hidroxietil celulosa (HEC)	66.8
Hidroxipropil celulosa (HPC)	43.6
Hidroxipropil metil celulosa (HPMC)	46-51

Hidroximetil celulosa (HMC)	50-55
-----------------------------	-------

Ejemplos no limitantes de polímeros que pueden ser usados como capa de recubrimiento intermedia incluyen hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropiletilcelulosa (HPEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropiletilcelulosa (HPEC), hidroximetilpropilcelulosa (HPMC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC) (Ethulose), hidroxietilmetilcelulosa (HEMC), hidroximetiletilcelulosa (HMEC), propilhidroxietilcelulosa (PHEC), metilhidroxietilcelulosa (MHEC), hidroxietilcelulosa modificada hidrófobamente (NEXTON), carboximetilhidroxietilcelulosa (CMHEC), metilcelulosa, etilcelulosa, copolímeros de acetato de vinilo solubles en agua, gomas, polisacáridos tales como ácido algínico y alginatos tales como alginato de amonio, alginato de sodio, alginato de potasio, polímeros sensibles al pH por ejemplo, polímeros entéricos incluyendo derivados de ftalato tales como ftalato ácido de carbohidratos, acetato ftalato de amilosa, acetato ftalato de celulosa (CAP), otros ftalatos de éster de celulosa, ftalatos de éter de celulosa, ftalato de hidroxipropilcelulosa (HPCP), ftalato de hidroxipropiletilcelulosa (HPEC), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), ftalato de metilcelulosa (MCP), acetato ftalato de polivinilo (PVAcP), hidrógeno ftalato de acetato de polivinilo, CAP de sodio, ftalato ácido de almidón, acetato de celulosa trimelitato (CAT), copolímero de estireno-ácido maleico/ftalato de dibutilo, copolímero de estireno-ácido maleico/ ftalato de polivinilacetato, copolímeros de estireno y ácido maleico, derivados del ácido poliacrílico tales como ácido acrílico y copolímeros de éster acrílico, ácido polimetacrílico y sus ésteres, copolímeros de ácido poliacrílico y metacrílico, shellac, y acetato de vinilo y copolímeros de ácido crotonico. Polímeros sensibles al pH preferidos incluyen shellac, derivados de ftalato, CAT, HPMCAS, derivados del ácido poliacrílico, particularmente copolímeros que comprenden ácido acrílico y al menos un éster de ácido acrílico, Eudragit™ S (poli(ácido metacrílico, metacrilato de metilo)1:2); Eudragit L100™ (poli(ácido metacrílico, metacrilato de metilo)1:1); Eudragit L30DTM, (poli(ácido metacrílico, acrilato de etilo)1:1); y (Eudragit L100-55) (poli(ácido metacrílico, acrilato de etilo) 1:1) (Eudragit™ L es un polímero aniónico sintetizado a partir de ácido metacrílico y metil éster del ácido metacrílico), polimetil metacrilato mezclado con ácido acrílico y copolímeros de éster acrílico, ácido algínico y alginatos tales como alginato de amonio, o alginato de sodio, potasio, magnesio o de calcio, copolímeros de acetato de vinilo, acetato de polivinilo 30D (30% de dispersión en agua), un poli(dimetilaminoetilacrilato), que es un éster metacrílico neutro disponible de Rohm Pharma (Degusa) bajo el nombre de "Eudragit E™, un copolímero de metilmetacrilato y etilacrilato con una pequeña porción de cloruro de trimetilamonioetil metacrilato (Eudragit RL, Eudragit RS), un copolímero de metilmetacrilato y etilacrilato (Eudragit NE 30D), zeína, shellac, gomas, polisacáridos y o la combinación de los mismos.

30 Capa exterior

De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, la composición comprende además una capa de recubrimiento exterior que comprende un polímero que tiene una tasa de transmisión de oxígeno que tiene menos de 1000 cc/m²/24 horas, preferiblemente de menos de 500 cc/m²/24 horas y lo más preferiblemente menos de 100 cc/m²/24 horas medidos en condiciones de prueba estándar, esto es, 73°F (23°C) y 0% de humedad relativa, y una tasa de transmisión de vapor de agua de menos de 400g/m²/día, preferiblemente menos de 350 g/m²/día y lo más preferiblemente menos de 300 g/m²/día recubre dichas partículas recubiertas selladas al agua que tienen una superficie ajustada para reducir o prevenir la transmisión de oxígeno y humedad en el núcleo obteniendo de este modo una partícula de capas múltiples que contiene probióticos que demuestran una estabilidad mejorada tanto contra la humedad, así como contra el oxígeno. Diversos ejemplos adecuados de tales polímeros se describen a continuación.

40 Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas

La permeabilidad al vapor de agua es una de las propiedades más importantes de dichas películas de recubrimiento de capa exterior, principalmente a causa de la importancia del papel del agua en reacciones de deterioro.

El agua actúa como un solvente o portador y causa la degradación de la textura, reacciones químicas enzimáticas, y por lo tanto es destructivo de los probióticos. También la actividad de agua de los alimentos es un parámetro importante en relación con la vida útil de los alimentos y los probióticos que contiene los alimentos. En los alimentos de baja humedad y los probióticos, los bajos niveles de actividad de agua deben mantenerse para minimizar las reacciones enzimáticas y químicas deteriorantes y para evitar la degradación de la textura. La composición de los materiales formadores de película (de carácter hidrofílico e hidrófobo), la temperatura y la humedad relativa del medio ambiente afecta a la permeabilidad al vapor de agua de las películas.

Cuando se considera una barrera adecuada en los probióticos que contienen los alimentos, las propiedades de barrera de las películas son parámetros importantes.

Películas y recubrimientos de polisacáridos son generalmente buenas barreras contra el oxígeno y el dióxido de carbono y tienen buenas propiedades mecánicas pero su propiedad de barrera contra el vapor de agua es pobre debido a su carácter hidrofílico.

Para añadir un componente hidrófobo adicional, por ejemplo, un lípido (ceras, ácidos grasos) en la película y producir una película de material compuesto es una forma de lograr una mejor barrera contra el vapor de agua. Aquí el componente lipídico sirve como barrera contra el vapor de agua. Mediante la adición de los lípidos, la hidrofobicidad de la película aumenta y como resultado de este caso se incrementa la propiedad de barrera de la película al vapor de agua.

La permeabilidad al vapor de agua de una película es una constante que debe ser independiente de la fuerza de conducción en la transmisión de vapor de agua. Cuando una película está bajo diferentes gradientes de presión de vapor de agua (a la misma temperatura), el flujo de vapor de agua a través de la película difiere, pero su permeabilidad calculada debe ser la misma. Este comportamiento no sucede con las películas hidrofílicas, donde las moléculas de agua interactúan con grupos polares en la estructura de película que causa la plastificación o hinchazón.

Otra suposición inherente al cálculo de la permeabilidad es su independencia del espesor de la película. Este supuesto no es cierto para películas hidrofílicas. Debido a que la permeabilidad al vapor de agua determinada experimentalmente de la mayoría de películas aplicadas solamente a los gradientes específicos de vapor de agua usados durante las pruebas y para el espesor específico de las muestras analizadas, se ha propuesto el uso de los términos "Permeabilidad Efectiva" o "Permeabilidad Aparente".

El mecanismo de transporte de la humedad a través de un compuesto depende de las condiciones ambientales y materiales. La permeabilidad tiene dos características diferentes en el caso de los materiales compuestos. Primero; en las membranas no porosas, la permeación se puede producir por la solución y la difusión; y la otra; la permeación simultánea a través de los poros abiertos es posible en la membrana porosa.

Hay diversos métodos de medición de la permeabilidad. Las mediciones de pérdida de peso son de importancia para determinar las características de permeabilidad. La permeabilidad al vapor de agua se determina usualmente por ponderación directa, ya que, a pesar de sus problemas inherentes, principalmente relacionadas con las propiedades del agua tales como alta solubilidad y la formación de agrupaciones dentro del polímero y la tendencia a plastificar la matriz de polímero, es un método simple y relativamente fiable. La principal desventaja de este método reside en su debilidad para proveer información para un perfil cinético, cuando se requiere tal respuesta.

Otro método de medición está basado en el estándar descrito en ASTM E96-80 (Procedimiento de método de prueba estándar para la permeabilidad al vapor de agua). De acuerdo con este método la permeabilidad al vapor de agua se determina gravimétricamente y, en general, los procedimientos aplicados son casi los mismos en muchos documentos de investigación que se relacionan con este propósito. En este procedimiento, en primer lugar, la película de prueba se sella a una celda de permeación de vidrio que contiene cloruro de calcio anhidro (CaCl_2) o gel de sílica (presión relativa de vapor; RVP = 0) y luego la celda se coloca en los desecadores mantenidos a una humedad relativa específica y temperatura (en general, 30°C, 22% de humedad relativa) con nitrato de magnesio o acetato de potasio. Las celdas de permeación se pesan continuamente y se registran, y el vapor de agua que se transfiere a través de la película y absorbido por el desecante se determinan midiendo el aumento de peso. Los cambios en el peso de la celda se representaron gráficamente como una función del tiempo. Cuando la relación entre la ganancia de peso (Δw) y el tiempo (Δt) es lineal, la pendiente de la gráfica se utiliza para calcular la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) y permeabilidad al vapor de agua (WVP). La pendiente se calcula por regresión lineal y el coeficiente de correlación ($r^2 > 0.99$).

La WVTR se calcula a partir de la pendiente ($\Delta w / \Delta t$) de la línea recta dividida por el área de prueba (A), ($\text{g s}^{-1} \text{m}^{-2}$)

$$\text{WVTR} = \Delta w / (\Delta t \cdot A) \text{ (g.m}^{-2}\text{.s}^{-1}\text{)}$$

donde $\Delta w / \Delta t$ = tasa de transferencia, cantidad de pérdida de humedad por unidad de tiempo (g.s^{-1});

A= área expuesta a la transferencia de humedad (m^2)

La WVP (kg Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹) se calcula como;

$$WVP = [WVTR / S (R1 - R2)] \cdot d$$

5 donde S = presión de vapor de saturación (Pa) de agua a temperatura de prueba, R1 = RVP (presión de vapor relativa) en el desecador, R2 = RVP en la celda de permeación, y d = espesor de la película (m). Al menos tres réplicas de cada película deben ser probada para WVP y todas las películas deben equilibrarse con HR específica antes de la determinación de la permeabilidad.

La permeabilidad al vapor de agua también puede calcularse a partir de la WVTR de la siguiente manera;

$$P = WVTR \cdot L / \Delta p \text{ (g/m}^2\text{.s.Pa)}$$

10 L = grosor de la película (m); Δp = gradiente de presión de vapor de agua entre los dos lados de la película (Pa); P = permeabilidad de la película (g.m⁻².s⁻¹Pa⁻¹).

La tasa de permeación se expresa generalmente por la permeabilidad (P) en lugar de por un coeficiente de difusión (D) y la solubilidad (S) del penetrante en la película. Cuando no hay interacción entre el vapor de agua y la película, estas leyes pueden aplicar para materiales homogéneos. Entonces, la permeabilidad sigue una solución - modelo de difusión como;

$$15 \quad P = D \cdot S$$

donde D es el coeficiente de difusión y la S es la pendiente de la isoterma de sorción y es constante para la isoterma de sorción lineal. El coeficiente de difusión describe el movimiento de la molécula permeante a través de un polímero, y así representa una propiedad cinética del sistema polímero-permeante.

20 Como resultado de las características hidrofílicas de las películas de polisacáridos, la permeabilidad al vapor de agua de las películas está relacionada con su espesor. Los valores de permeabilidad aumentan con el aumento del espesor de las películas.

El espesor de las películas y el peso molecular (MW) de la película de formación de polímeros también pueden afectar tanto la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y la permeabilidad al oxígeno (OP) de las películas.

Determinación de transmisión de oxígeno (OTR)

25 la tasa de transmisión de oxígeno es la tasa de estado estacionario en el que permea gas oxígeno a través de una película en condiciones especificadas de temperatura y humedad relativa. Los valores se expresan en cc/100 pulg²/24 horas en unidades estándar de EE.UU. y cc/m²/24 horas en unidades métricas (o SI).

30 Para establecer la función de protección que el recubrimiento realiza en el núcleo, se mide su permeabilidad a los gases. De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, el gas más crítico para mejorar la estabilidad de las bacterias probióticas es oxígeno. Es bien conocido que las bacterias probióticas son microorganismos anaeróbicos donde su vitalidad puede ser reducida significativamente tras la exposición al oxígeno. Por lo tanto, para proveer estabilidad a largo plazo y recibir una vida útil más larga para las bacterias probióticas la capa exterior preferiblemente provee una importante barrera al oxígeno.

35 La permeabilidad a los gases, q, (ml/m².día.atm) (DIN 53380) se define como el volumen de un gas convertido a 0 °C y 760 torr que permea 1 m² de la película que se va a probar ensayar dentro de un día a una temperatura específica y gradiente de presión. Por lo tanto, se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula;

$$q = \{T_o \cdot P_u / [P_o \cdot T \cdot A (P_b - P_u)]\} \cdot 24 \cdot Q \cdot (\Delta x / \Delta t) \cdot 10^4$$

Po = presión normal en atm

To = temperatura normal en K

T = temperatura experimental en K

A = área de la muestra en m²

T = intervalo de tiempo en horas entre dos mediciones

5 Pb = presión atmosférica en atm

Pu = presión en la cámara de prueba entre la muestra y la columna de mercurio

Q = sección transversal de los capilares en cm

$\Delta x/\Delta t$ = tasa de caída de la columna de mercurio en cm/hr

La siguiente tabla, Tabla 3, muestra OTR y WVTR de algunos polímeros solubles en agua, por ejemplo.

Polímero formador de película	Tasa de transmisión de oxígeno, Cm ³ /m ² /atm O ₂ /día	Tasa de transmisión del vapor de agua, g/m ² /día
HPC, Klucel EF	Media 776	Baja 126
CMC, Aqualon o Blanose 7L	Baja 18	Baja 228
HEC, Natrosol 250L	Baja 33	Media 360
HPMC 5cps	Alta 3180	Alta 420

10

Ejemplos no limitantes de polímero de recubrimiento de capa externa adecuados incluyen, polímeros hidrofílicos solubles en agua, tales como, por ejemplo, alcohol de polivinilo (PVA), povidona (PVP: polivinilpirrolidona), copovidona (copolímero de vinilpirrolidona y acetato de vinilo), Kollicoat Protect (BASF), que es una mezcla de Kollicoat IR (un copolímero de injerto alcohol de polivinilo (PVA) -polietilenglicol (PEG)) y alcohol polivinílico (PVA), Opadry AMB (Colorcon), que es una mezcla a base de PVA, Aquarius MG que es un polímero basado en celulosa que contiene cera natural, lecitina, goma de xantano y talco, HPC de bajo peso molecular (hidroxipropil celulosa), HEC de bajo peso molecular (hidroxietilcelulosa), carboxi metil celulosa de bajo peso molecular tales como 7LF o 7L2P, o una mezcla de los mismos. En algunos casos, la mezcla de polímeros solubles en agua con agentes insolubles, tales como ceras, grasas, ácidos grasos, y etc., pueden ser de beneficio.

15

20 Más preferiblemente, los polímeros de recubrimiento exteriores son carboxi metil celulosa tales como 7LF o 7L2P, hidroxietil celulosa de bajo peso molecular (HEC) y HPC de bajo peso molecular (hidroxipropil celulosa)

Capa de recubrimiento exterior

De acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención, la composición comprende una capa de recubrimiento exterior que comprende un polímero que tiene una tasa de transmisión de vapor de agua de menos de 400 g/m²/día, preferiblemente menos de 300 g/m²/día y más preferiblemente menos de 200 g/m²/día, que recubre dichas partículas recubiertas selladas al oxígeno y la humedad para además reducir o prevenir la transmisión de la humedad en el núcleo obteniendo de este modo una partícula de capas múltiples que contiene probióticos que demuestran una estabilidad mejorada contra la humedad también.

25

Ejemplos no limitantes de polímeros que son adecuados para la capa de recubrimiento exterior incluyen, polímeros hidrofílicos solubles en agua, tales como, no limitantes, por ejemplo, alcohol de polivinilo (PVA), povidona (PVP:

30

polivinilpirrolidona), copovidona (copolímero de vinilpirrolidona y de vinilo acetato), Kollicoat Protect (BASF), que es una mezcla de Kollicoat IR (un copolímero de injerto de alcohol de polivinilo (PVA)-polietilenglicol (PEG)) y alcohol polivinílico (PVA), Opadry AMB (Colorcon), que es una mezcla basada en PVA, Aquarius MG que es un polímero basado en celulosa que contiene cera natural, lecitina, goma de xantano y talco, HPC de bajo peso molecular (hidroxipropil celulosa), carboxi metil celulosa de bajo peso molecular tales como 7LF o 7L2P, o una mezcla de los mismos. En algunos casos una mezcla de polímeros solubles en agua con agentes insolubles, tales como ceras, grasas, ácidos grasos, y así sucesivamente, puede ser de beneficio.

Más preferiblemente, los polímeros de recubrimiento exterior son alcohol de polivinilo, Kollicoat Protect (BASF), que es una mezcla de Kollicoat IR (un copolímero de injerto de alcohol de polivinilo (PVA)-polietilenglicol (PEG)) y alcohol polivinílico (PVA), Opadry AMB (Colorcon) que es una mezcla a base de PVA, HPC de bajo peso molecular (hidroxipropil celulosa) y Aquarius MG que es un polímero basado en celulosa que contiene cera natural. Estos polímeros proveen propiedades de barrera superiores frente a la penetración del vapor de agua/humedad en el material de núcleo.

Capa de recubrimiento entérico

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, las partículas de núcleo están además opcionalmente recubiertas por un polímero entérico que puede además proveer protección contra las condiciones destructivas presentes en el tracto gastrointestinal, por ejemplo.

Ejemplos no limitantes de polímeros entéricos adecuados incluyen polímeros sensibles al pH, ftalato ácido de carbohidratos, acetato ftalato de amilosa, ftalato acetato de celulosa (CAP), otros ftalatos de éster de celulosa, ftalatos de éter de celulosa, ftalato de hidroxipropilcelulosa (HPCP), ftalato de hidroxipropiletilcelulosa (HPECP), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), ftalato de metilcelulosa (MCP), ftalato acetato de polivinilo (PVAcP), hidrógeno ftalato de polivinilacetato, CAP de sodio, ftalato ácido de almidón, acetato trimelitato de celulosa (CAT), copolímeros de estireno-ácido maleico/ftalato de dibutilo, copolímero de estireno-ácido maleico/ftalato de dibutilo, derivados del ácido poliacrílico tales como ácido acrílico y copolímeros de éster acrílico, ácido polimetacrílico y ésteres de los mismos, copolímeros de ácido poliacrílico y metacrílico, derivados del ácido poliacrílico tales como particularmente copolímeros que comprenden ácido acrílico y al menos un éster de ácido acrílico, Eudragit STM (poli (ácido metacrílico, metacrilato de metilo) 1:2); Eudragit LTM que es un polímero aniónico sintetizado a partir de ácido metacrílico y metil éster del ácido metacrílico), Eudragit L100TM (poli(ácido metacrílico, metacrilato de metilo) 1:1); Eudragit L30DTM, (poli(ácido metacrílico, acrilato de etilo)1:1); y Eudragit L100-55TM (poli(ácido metacrílico, acrilato de etilo) 1:1), polimetil metacrilato mezclado con ácido acrílico y copolímeros de éster acrílico, ácido algínico y alginatos tales como alginato de amonio, de sodio, de potasio, de magnesio o alginato de calcio.

Proceso para la preparación de una composición probiótica estabilizada de acuerdo con al menos algunas realizaciones de la presente invención

La presente invención provee un proceso para la preparación de bacterias probióticas resistentes al calor, oxígeno y humedad un producto alimenticio. En una realización de la invención, dichas partículas probióticas estabilizadas se añaden a un producto alimenticio, tal como por ejemplo, cremas, productos de panadería, cremas o de material de relleno de galletas, chocolates, salsas, queso, mayonesa y así sucesivamente.

En una realización preferida, el proceso preferido de la invención comprende la preparación de una composición de núcleo en forma de materia en partículas sólidas que contiene bacterias probióticas, seguido por capas de diversas capas de recubrimiento en la composición del núcleo de partículas. La composición del núcleo puede ser opcionalmente preparado por cualquier método adecuado para la preparación de materia de partículas, incluyendo, pero no limitado a, mezcla seca, granulación en húmedo, granulación en seco o fusión en caliente (opcionalmente en la forma de un proceso de granulación).

La composición del núcleo, preparada de acuerdo con uno de los procesos anteriores, contiene al menos las bacterias probióticas y un estabilizador, en donde la cantidad total de los probióticos en la mezcla es de aproximadamente 10% a aproximadamente 90% en peso de la composición del núcleo.

El estabilizador puede comprender opcionalmente cualquier tipo de consumidor de oxígeno, incluyendo, pero no limitado a, los que contienen base o clorhidrato de L-cisteína, de los cuales otros ejemplos se listan aquí.

La composición del núcleo también puede comprender opcionalmente al menos un compuesto de azúcar incluyendo, pero no limitado a, maltodextrina, trehalosa, lactosa, galactosa, sacarosa, fructosa y similares, de los cuales se proveen otros ejemplos aquí. Los disacáridos, tales como sacarosa y trehalosa, son atractivos como agentes protectores dentro del núcleo debido a que son en realidad las plantas de ayuda y células microbianas para permanecer en un estado de animación suspendida durante periodos de sequía. Se ha demostrado que la trehalosa es un protector efectivo para una variedad de materiales biológicos, secados tanto por aire ambiente como secados por congelación.

La composición del núcleo también puede comprender opcionalmente uno o más de otros ingredientes de calidad alimentaria, incluyendo, pero no limitado a un agente de relleno, un agente surfactante y aglomerante, de los cuales varios ejemplos no limitantes se proveen aquí.

Estos diversos ingredientes se pueden añadir opcionalmente de forma secuencial durante el proceso de preparación del núcleo o, alternativamente, se pueden añadir opcionalmente juntos en cualquier combinación adecuada.

Una vez se ha formado la composición del núcleo, se recubre con una capa de recubrimiento más interna, en capas en dicha composición de núcleo, que comprende al menos una grasa sólida hidrófoba o ácido graso que tiene un punto de fusión inferior a 60°C.

La capa de recubrimiento más interna puede comprender opcionalmente al menos una grasa sólida hidrófoba o ácido graso o que tiene un punto de fusión inferior a 50°C y preferiblemente superior a 25°C. El punto de fusión es opcionalmente de preferencia inferior a 45°C y superior a 30°C, y es opcionalmente y más preferiblemente inferior a 40°C y superior a 35°C. La capa de recubrimiento más interna puede formar opcionalmente una matriz hidrófoba estable que embebe la composición de núcleo interior y/o forma una película alrededor de la composición del núcleo probiótico.

A continuación, la capa de recubrimiento intermedia está en capas sobre la capa de recubrimiento más interna. Como se ha descrito previamente con respecto a la capa de recubrimiento intermedia, cuando está presente en una solución acuosa en la cantidad de 0.1% peso/peso sobre el peso de la solución, el material de la capa de recubrimiento tiene una tensión superficial inferior a 60 mN/m, cuando se mide a 25°C. La capa de recubrimiento intermedio, que cuando está presente en una solución acuosa en la cantidad de 0.1% peso/peso sobre el peso de la solución, opcionalmente tiene una tensión superficial inferior a 50 mN/m y preferiblemente menor de 45 mN/m cuando se mide a 25°C. La capa de recubrimiento intermedia comprende opcionalmente al menos un plastificante seleccionado del grupo que consiste de polietilenglicol (PEG), citrato de trietilo y triacetina.

A continuación, una capa de recubrimiento exterior está en capas sobre la capa de recubrimiento intermedia. La capa de recubrimiento exterior comprende opcionalmente, un polímero que tiene una tasa de transmisión de oxígeno de menos de 1000 cc/m²/24 horas, preferiblemente de menos de 500 cc/m²/24 horas y lo más preferiblemente menos de 100 cc/m²/24 horas medida en condiciones de prueba estándar (que puede ser por ejemplo 73°F (23°C) y 0% de humedad relativa). El polímero también tiene opcionalmente una tasa de transmisión de vapor de agua de menos de 400 g/m²/día, preferiblemente menos de 350 g/m²/día y más preferiblemente menos de 300 g/m²/día. La capa de recubrimiento intermedia actúa como un aglomerante o "pegamento" para unir la capa de recubrimiento exterior a la capa de recubrimiento más interna.

La composición además puede comprender opcionalmente una capa adicional de recubrimiento de barrera a la humedad, en capas en la capa de recubrimiento exterior, para prevenir la penetración adicional de humedad. Si está presente, esta capa adicional de recubrimiento de barrera a la humedad está en capas sobre la capa de recubrimiento exterior.

La composición puede comprender además opcionalmente un polímero entérico, en capas sobre la capa de recubrimiento de barrera a la humedad, que puede proveer además protección contra tales características destructivas del tracto gastrointestinal como valores bajos de pH y enzimas proteolíticas. El polímero entérico comprende opcionalmente al menos un plastificante seleccionado del grupo que consiste de polietilenglicol (PEG), citrato de trietilo y triacetina.

Cabe señalar que por "formación de capas" se quiere decir cualquier proceso adecuado para la adición de la capa de recubrimiento a la composición que incluye pero no se limita a pulverización, inmersión, aspersión y similares. Después de la adición de las capas a la composición del núcleo, las partículas se forman con tres, cuatro o más capas de recubrimiento.

Opcionalmente, la siguiente combinación de ingredientes se puede aplicar como un ejemplo no limitante: el al menos un azúcar puede comprender, lactosa, galactosa o una mezcla de los mismos, dicho al menos un oligosacárido o polisacáridos pueden comprender, galactano, maltodextrina, y trehalosa, dicho estabilizador comprende base de L-cisteína, dicho surfactante comprende tween 80 (polisorbato 80, polioxietileno (20) monooleato de sorbitano), dicho agente de relleno comprende lactosa DC y/o celulosa microcristalina, dicho aglomerante comprende hidroxipropilmetilcelulosas, dicha grasa sólida hidrófoba o ácido graso comprende ácido láurico y/o manteca de cacao, dicha capa de recubrimiento interior puede comprender ácido láurico y/o manteca de cacao, dicho polímero de capa de recubrimiento intermedio puede comprender ácido alginico o alginato de sodio, dicha capa de recubrimiento exterior comprende carboximetilcelulosa (CMC) 7LFP y/o carboximetilcelulosa (CMC) 7L2P, dicho plastificante es polietilenglicol (PEG) 400 y/o triacetina y dicha capa de recubrimiento exterior comprende hidroxipropil celulosa.

De acuerdo con otra realización no limitante de la presente invención, se provee otro proceso de fabricación de bacterias probióticas en una composición estabilizada de la siguiente manera. En primer lugar, el material del núcleo se prepara como una mezcla, con bacterias probióticas, un estabilizador, al menos un azúcar y al menos un oligosacárido, y opcionalmente otros aditivos de calidad alimentaria tales como agentes de relleno, surfactantes, aglomerantes, antioxidantes, y etc., obteniendo de esta manera una mezcla de núcleo.

La mezcla de núcleo es entonces granulada en húmedo usando una solución de aglomerante en agua purificada o agua purificada bajo bien sea aire o ambiente de nitrógeno; alternatively, la mezcla de núcleo se prepara usando una granulación de fusión en caliente mediante el uso de la masa fundida de una grasa sólida hidrófoba o ácido graso que tiene un punto de fusión por debajo de 50°C. En cualquier caso, el proceso de granulación da como resultado partículas de núcleo granuladas.

Las partículas de dicha composición de núcleo se recubren con una capa de recubrimiento interna que comprende una grasa sólida hidrófoba o ácido graso para prevenir o reducir la penetración de agua o humedad en dicho núcleo, obteniendo de esta manera partículas recubiertas selladas al agua.

Las partículas recubiertas selladas al agua se recubren con una capa de recubrimiento intermedia para ajustar la tensión superficial obteniendo de ese modo partículas recubiertas selladas al agua que tienen una tensión superficial ajustada.

Las partículas recubiertas selladas al agua que tiene una tensión superficial ajustada se recubren con una capa de recubrimiento exterior para reducir la transmisión de oxígeno y humedad en el núcleo obteniendo partículas recubiertas selladas al oxígeno y a la humedad.

Las partículas recubiertas selladas al oxígeno y la humedad se recubren con una capa de recubrimiento exterior para reducir la transmisión de humedad en el núcleo, obteniendo de este modo una partícula de capas múltiples que contiene probióticos que muestran una estabilidad superior contra el oxígeno y la humedad, y por lo tanto tienen una mayor viabilidad y vitalidad.

La granulación como se describe aquí puede realizarse opcionalmente con la tecnología de lecho fluidizado tal como Glatt o Glatt turbo jet, o un recubridor/granulador de Innojet o un recubridor/granulador Huttlin o un Granulex.

En cualquier caso, la composición probiótica resultante de acuerdo con los procesos anteriores opcionalmente se puede introducir en un producto alimenticio que también puede someterse a una etapa de calentamiento durante su proceso de preparación. Alternativamente, la composición probiótica resultante anterior se puede añadir a un producto alimenticio que no puede someterse a una etapa de calentamiento durante su proceso de preparación.

Ejemplo 1 - Preparación y prueba de una formulación de ejemplo

La preparación de una formulación ilustrativa de ejemplo, descrita aquí como Fórmula I, se realizó como se describe a continuación. Las pruebas realizadas en la Fórmula I también se describen a continuación.

Para la preparación de la Fórmula I, trehalosa dihidrato 160 g, Maltodextrina DE15 314 g, Monohidrato de L-cisteína-HCl 6 g y bacterias BB12 (Bifidobacteria-BB12) 120 g se cargaron en la máquina de Innojet ventibus para recibir una mezcla seca. Se fundió ácido láurico 270 g a 50°C utilizando una placa de calentamiento mientras se agitaba. Luego de fusión en caliente de ácido láurico se asperjó sobre la mezcla seca anterior bajo una atmósfera inerte con nitrógeno. Las temperaturas de la cabeza de la bomba, líquido y presión de aspersión se fijaron en 60°C. Por lo tanto, se formaron partículas de núcleo, con base en un proceso de granulación de fusión en caliente.

A continuación, las diversas capas se recubrieron sobre las partículas del núcleo de la siguiente manera. Para la primera capa (más interna), se fundió ácido láurico 315 g a 50°C utilizando una placa de calentamiento mientras se agitaba. Luego de fusión en caliente de ácido láurico se asperjó sobre los gránulos anteriores bajo una atmósfera inerte usando nitrógeno y tales parámetros de aspersión para obtener un recubrimiento de película como una primera
 5 capa de sellado. Luego se asperjó solución de Na- alginato (25.2 g) (2% p/p en agua purificada) sobre los gránulos resultantes anteriores (400 g) para obtener gránulos recubiertos de Na-alginato. 320 g de los gránulos recubiertos de Na-alginato resultantes anteriores se recargaron en la máquina Innojet ventilus y una porción adicional de solución de Na-alginato (58.97 g) (2% p/p en agua purificada) se asperjó para obtener finalmente 16.4% p/p de Na-alginato en la formulación. Luego, 290 g de los gránulos recubiertos de Na-alginato resultantes anteriores se recargaron en la
 10 máquina Innojet ventilus y la solución acuosa (5% p/p) de Na-carboxi metil celulosa (Na-CMC) (72.92 g) y 19.98 g de polietilenglicol (PEG 400) (PEG 400/Na-CMC, 20% p/p) se asperjó sobre los gránulos recubiertos de Na-alginato resultantes anteriores para obtener gránulos recubiertos de Na-CMC. Luego, 250 g de los gránulos recubiertos de Na-CMC resultantes anteriores se recargaron en la máquina Innojet ventilus y una porción adicional de solución acuosa (5% p/p) de Na- CMC (61.70 g) y 15.4 g de PEG 400 (PEG 400/Na-CMC, 20% p/p) se asperjó para obtener finalmente
 15 29,32% p/p de Na-CMC + PEG 400 en el producto final.

El producto final, partículas de la Fórmula I, se secó y se mantuvo en una bolsa de polietileno de doble sellado con un desecante adecuado bajo refrigeración. Cabe señalar que se tomaron diversas muestras de las etapas anteriores de preparación y se probaron como se describe a continuación.

Método de prueba de conteo total de unidades formadoras de colonias para bifidobacteria BB12 encapsulada en la
 20 Fórmula I

El siguiente método de prueba se utilizó para la determinación del conteo total de unidades formadoras de colonias (CFU) para Bifidobacteria-BB12 encapsulada, preparada en la Fórmula I como se describe más arriba. Este método se basa en la disolución de las capas de recubrimiento de los probióticos encapsulados para liberar a los probióticos antes de realizar la prueba de CFU.

En este procedimiento, tanto los procesos de hidratación como de disolución y se aplican a las partículas recubiertas, simulando el tracto gastrointestinal y por lo tanto simulando el efecto de la ingestión de las partículas recubiertas. Como resultado, se liberan células bacterianas libres. Un medio que incorpora diversos agentes selectivos se utiliza para ayudar en la recuperación de las especies específicas y de incubación en condiciones anaerobias para una mayor recuperación de los organismos. Este método utiliza agar MRS con el aditivo clorhidrato de cisteína como un
 25 consumidor de oxígeno.
 30

Las muestras se colocaron en placas en duplicados y se informan conteos promedio (CFU/g).

El equipo incluye un dispositivo de muestreo estéril; Unidad de filtración de 0.45 micrones; Contador de colonias; placas estériles de Petri; Pipetas estériles; Incubadora 37 +/- 2°C; Baño de agua de 45 +/- 2°C durante el templado de medio; Sistema anaerobio GasPak: tarro, o cámara de plástico, paquetes anaeróbicos, e indicador anaerobio;
 35 Autoclave; Mortero y pilón; Stomacher; Balance analítico; y portaobjetos para microscopio.

MEDIOS:

Se utilizaron los siguientes medios y reactivos: Caldo MRS, Difco # 288130 (500g); Agar MRS, Bacto Agar # 21401(484g); Clorhidrato de L-Cisteína, J.T.baker # G121-05; Tween-85 (trioleato de Polioxietilen sorbitano), Sigma # P4634 (500mL); Diluyente regulado con Fosfato de Butterfield (BUT) MB 101.

El caldo MRS (55g/L) se prepare como sigue. En un matraz de 1000 ml, se colocan y se mezclan los siguientes ingredientes: 500 ml de agua desionizada; 27.5 gramos de caldo MRS deshidratado; 1 ml de Tween-80 (polisorbato 80, polioxietileno (20) monooleato de sorbitano) (antes de la esterilización). El caldo se ajustó a un pH de 6.5 +/- 0.2 a 25°C

Agar MRS (70g/L) se preparó como sigue. En un matraz de 1000 ml: se colocan y se mezclan los siguientes
 45 ingredientes: 500 ml de agua desionizada; 35 gramos de caldo MRS deshidratado, seguido por ajuste del pH a 6.5 +/- 0.2 @ 25°C. La L-cisteína esterilizada por filtración se añadió al agar después de la esterilización.

MRS: Composición de Agar MRS (Adquirido listo para usar de Difco 288210 o equivalentes):

Polipeptona	10 g/l
Extracto de carne	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Dextrosa	20 g/l
Tween 80 (polisorbato 80, Polioxietileno (20)	1.0 g/l
Monooleato de sorbitano)	
Fosfato de dipotasio	2 g/l
Acetato de sodio	5 g/l
Citrato de amonio	2 g/l
Sulfato de magnesio	0.1 g/l
Sulfato de manganeso	0.05 g/l
Agar bacteriológico	15 g/l

El clorhidrato de cisteína (10% de solución) se preparó como sigue. Se añadieron 10 gramos de L-cisteína a un matraz limpio de 200 ml, añadiendo agua desionizada para alcanzar un volumen de 100 ml. La L-cisteína se disolvió y se esterilizó por filtración usando una unidad de filtración de 0.45 micrones.

- 5 El siguiente procedimiento se utilizó para probar el efecto protector de la composición de la Fórmula I, para proteger las bacterias durante el almacenamiento y la liberación simulada en el tracto gastrointestinal, y para suministrar bacterias vivas, viables en el sitio de colonización en el intestino. Tal como se usa a continuación, el término "muestras" se refiere a la composición de la Fórmula I.

- 10 Aproximadamente se trituraron 20 g de la muestra utilizando un mortero y pilón durante aproximadamente 120 segundos, hasta que la muestra fue homogénea y finamente triturada. 10 gramos de la muestra probiótica triturada preparada se colocó en una bolsa Stomacher estéril. 99 mL de regulador de fosfato caliente se añadieron a la bolsa, calentada en baño de agua a 48°C. El polvo se disolvió uniformemente y luego se colocó durante 15 minutos (tiempo de hidratación) en la incubadora (37°C). A continuación, se añadieron 2 mL de Tween 85 (trioleato de polioxietileno sorbitano) en mezcla hidratada. La bolsa se mantuvo en el baño de agua durante 2 minutos, seguido por la aplicación del stomacher a 250 rpm durante 2 minutos y la incubación de nuevo en el baño de agua durante 1 minuto. El Stomacher se aplicó de nuevo a 250 rpm durante 1 min. La solución resultante se diluyó en serie.

Se sembró 1 ml de diluciones apropiadas en placas de Petri estériles debidamente etiquetadas, seguido por el vertimiento de agar MRS a una temperatura de aproximadamente 48°C. Por cada 100 ml de agar MRS, se agregaron 0.5 ml de clorhidrato de L-cisteína al 10% esterilizado en filtro antes de verter. Las placas se prepararon por duplicado.

- 20 Las placas se incubaron anaeróbicamente a 37°C durante 48-72 horas, seguido por conteo de colonias.

Los siguientes procedimientos cuantitativos fueron seguidos para el conteo de las colonias.

- 25 Se contaron las colonias en las placas de MRS-cisteína, después de seleccionar aquellas placas que tienen 25-400 colonias y el número se registró como el conteo de células viables Probióticas por gramo (CFU/g), teniendo en cuenta el factor de dilución de la placa contadas. Los conteos de cada placa se promediaron a una dilución dada para el conteo viable total por gramo (esto es, CFU/g).

Resultados

Los resultados de la prueba a partir de diferentes etapas del proceso para la preparación de la composición de Fórmula I se muestran como CFU/g en la siguiente tabla, Tabla 4.

Tabla 4 - Viabilidad de bacterias Probióticas después de diversas etapas de preparación

Muestra	CFU/g
---------	-------

Granulado de fusión en caliente de BB12	1.42 X 10 exp 13
Granulado recubierto de Na-alginato de BB12	2.19 X 10 exp 13
Granulado recubierto de CMC de BB12	5.42 X 10 exp 12 - 1.29 X 10 exp 13

Como puede verse a partir de estos resultados, las partículas completamente recubiertas proveen la mejor protección a las bacterias, aunque con cierta variabilidad en los resultados.

5 Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proveerse en combinación en una realización individual. Por el contrario, diversas características de la invención, que son, por brevedad, descritas en el contexto de una realización individual, también pueden proveerse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

10 Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. De acuerdo con lo anterior, se pretende abarcar todas tales alternativas, modificaciones y variaciones que caen dentro del espíritu y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes mencionadas en esta especificación se incorporan aquí en su totalidad como referencia en la especificación, en la misma medida como si cada publicación individual, patente o solicitud de patente fue específica e individualmente indicada para ser incorporada aquí como referencia. Además, la citación o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se
15 interpretará como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende bacterias probióticas, comprendiendo la composición: (a) una composición de núcleo que contiene las bacterias probióticas y un estabilizador, en donde la cantidad total de probióticos en la mezcla es de aproximadamente 10% a aproximadamente 90% en peso de la composición del núcleo; (b) una capa de recubrimiento más interna, en capas en dicha composición de núcleo, que comprende al menos una grasa sólida hidrófoba, ácido graso o una cera que tiene un punto de fusión inferior a 60°C, o una combinación de los mismos; (c) una capa de recubrimiento intermedia en capas en dicha capa de recubrimiento más interna, que cuando está presente en una solución acuosa en la cantidad de 0.1% peso/peso sobre el peso de la solución, tiene una tensión superficial inferior a 60 mN/m, cuando se mide a 25°C; y (d) una capa de recubrimiento exterior, en capas en dicha capa de recubrimiento intermedio; en donde la composición está en forma de partículas.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho estabilizador comprende un consumidor de oxígeno, en donde dicho consumidor de oxígeno comprende uno o más de clorhidrato de L-cisteína, base de L-cisteína, 4,4 (2,3 dimetil tetrametilen dipirocatecol), extracto rico en tocoferoles (vitamina E natural), α -tocoferol (vitamina E sintética), β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol, butilhidroxinona, butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de propilo, galato de octilo, galato de dodecilo, butilhidroquinona terciaria (TBHQ), ácido fumárico, ácido málico, ácido ascórbico (vitamina C), ascorbato de sodio, ascorbato de calcio, ascorbato de potasio, palmitato de ascorbilo, o estearato de ascorbilo.
3. La composición de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho estabilizador comprende un material seleccionado del grupo que consiste de edetato de dipotasio, edetato de disodio, edetato de calcio disódico, ácido edético, ácido fumárico, ácido málico, maltol, edetato de sodio, y edetato de trisodio.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha composición de núcleo comprende además al menos un compuesto de azúcar, en donde dicho al menos un compuesto de azúcar comprende uno o más de un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un tetrasacárido, un oligosacárido superior, o un polisacárido, o una combinación de los mismos; en donde dicho monosacárido comprende uno o más de cetotriosa (dihidroxiacetona), aldotriosa (gliceraldehído), cetotetrosa (eritrososa), eritrosa, treosa, ribulosa, xilulosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, desoxirribosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, fucosa, fuculosa, ramnosa, sedoheptulosa, o ácido neuramínico, o una combinación de los mismos; en donde dicho disacárido comprende uno o más de sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, turanosa, o celobiosa, o una combinación de los mismos; en donde dicho trisacárido comprende uno o más de rafinosa, melecitosa o maltotriosa, o una combinación de los mismos; en donde dicho tetrasacárido comprende uno o más de acarbosa o estaquiosa, o una combinación de los mismos; en donde dicho oligosacárido superior comprende una o más de fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) o mananoligosacáridos (MOS), o una combinación de los mismos; en donde dicho polisacárido comprende uno o más de los polisacáridos a base de glucosa/celulosa glucano, dextrina, dextrano, beta-glucano, maltodextrina, polisacáridos a base de fructosa/fructano, levan beta 2-6, polisacáridos a base de manosa, polisacáridos a base de galactosa, polisacáridos a base de N-acetilglucosamina, o una goma, o una combinación de los mismos; o en donde dicho polisacárido comprende uno o más de amilosa, amilopectina, zimosan, lentinan, sizofiran, inulina, manano, galactano, quitina, goma arábica, o goma acacia, o una combinación de los mismos.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho núcleo comprende además uno o más de un agente de relleno, un surfactante o aglomerante, o una combinación de los mismos; en donde dicho agente de relleno comprende una o más de celulosa microcristalina, un azúcar; fosfato de dicalcio; alcoholes de azúcar, hidrolizados de almidón hidrogenados; almidón de maíz; y almidón de patata; y/o una mezcla de los mismos; en donde dicho aglomerante comprende una o más de povidona (PVP: polivinilpirrolidona), copovidona (copolímero de vinilpirrolidona y acetato de vinilo), alcohol de polivinilo, HPC de bajo peso molecular (hidroxipropil celulosa), HPMC de bajo peso molecular (hidroxipropil metilcelulosa), hidroximetil celulosa de bajo peso molecular (MC), carboxi metil celulosa de sodio de bajo peso molecular, hidroxietilcelulosa de bajo peso molecular, hidroximetilcelulosa de bajo peso molecular, acetato de celulosa, gelatina, gelatina hidrolizada, óxido de polietileno, goma arábica, dextrina, almidón, poliácridatos y/o polimetacrilatos solubles en agua, etilcelulosa de bajo peso molecular, grasa sólida hidrófoba o ácido graso sólido o una cera o un polietilenglicol que tiene un punto de fusión inferior a 60°C o una mezcla de los mismos; o en donde dicho surfactante comprende Tween 80 (polisorbato 80, polioxietileno (20) monooleato de sorbitano), Tween 20 (polisorbato 20, polioxietileno (20) monolaurato de sorbitano), Tween 85 (trioleato de polioxietileno sorbitanon) glicereth-2-cocoato (Levenol® C-421), glicereth-6-cocoato (Levenol® F-200), glicereth-7-cocoato (Levenol® C-301), glicereth-17-cocoato (Levenol® C-201) o una mezcla de los mismos.

6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha bacteria probiótica comprende una o más de *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086, *Bacillus subtilis* var natt, *Bifidobacterium* LAFTI® B94, *Bifidobacterium* sp LAFTI B94, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium bifidum* rosell-71, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium breve* resell-70, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium longum* Rosell-175, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019, *Bifidobacterium infantis* 35624, *Escherichia coli* M-17, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI® L10, *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10, *Lactobacillus casei* LAFTI® L26, *Lactobacillus casei* LAFTI L26, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* ATTC 55730 (*Lactobacillus reuteri* SD2112), *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp, *Lactococcus lactis* Rosell-1058, *Lactobacillus paracasei* St11 (or NCC2461) *Lactobacillus fortis* Nestlé, *Lactobacillus johnsonii* La1 (= *Lactobacillus* LC1, *Lactobacillus johnsonii* NCC533) Nestlé, *Lactobacillus rhamnosus* Rosell-11, *Lactobacillus acidophilus* Rosell-52, *Streptococcus thermophilus*, *Diacetyllactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, y una mezcla de los mismos.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha capa de recubrimiento más interna comprende al menos una grasa sólida hidrófoba o ácido graso que tiene un punto de fusión inferior a 50°C.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde dicho punto de fusión es mayor que 25°C.
9. La composición de la reivindicación 7 o 8, en donde dicha capa de recubrimiento más interna comprende ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, triésteres de ácidos grasos; sales de aluminio, sodio, potasio y magnesio de ácidos grasos; alcoholes grasos, fosfolípidos, grasas sólidas, ceras, y una combinación de los mismos.
10. La composición de la reivindicación 9, en donde la capa de recubrimiento más interna comprende una grasa sólida que comprende uno o más de ácido láurico, aceite de coco hidrogenado, manteca de cacao o una combinación de los mismos.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha capa de recubrimiento más interna forma una matriz hidrófoba estable que embebe la composición de núcleo interior y/o forma una película alrededor de la composición del núcleo probiótico; y, opcionalmente, en donde dicho núcleo comprende una pluralidad de núcleos y dicha pluralidad de núcleos está embebida en dicha matriz hidrófoba estable.
12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha capa de recubrimiento intermedia, cuando está presente en una solución acuosa en la cantidad de 0.1% peso/peso sobre el peso de la solución, tiene una tensión superficial inferior a 50 mN/m cuando se mide a 25°C.
13. La composición de la reivindicación 12, en donde dicha capa de recubrimiento intermedia comprende un polímero, que comprende uno o más de Hiroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilcelulosa (HPEC), hidroximetilpropilcelulosa (HPMC), etilhidroxietilcelulosa (EHEC) (Ethulose), hidroxietilmetilcelulosa (HEMC), hidroximetilcelulosa (HMEC), propilhidroxietilcelulosa (PHEC), metilhidroxietilcelulosa (MHEC), hidroxietilcelulosa modificada hidrófobamente (NEXTON), carboximetilhidroxietilcelulosa (CMHEC), metilcelulosa, etilcelulosa, copolímero acetato de vinilo soluble en agua, gomas, polisacáridos tales como ácido alginico y alginatos tales como alginato de amonio, alginato de sodio, alginato de potasio, ftalato ácido de carbohidratos, acetato ftalato de amilosa, ftalato acetato de celulosa (CAP), ftalatos de éster de celulosa, ftalatos de éter de celulosa, ftalato de hidroxipropilcelulosa (HPCP), ftalato de hidroxipropilcelulosa (HPECP), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), ftalato de metilcelulosa (MCP), ftalato acetato de polivinilo (PVAcP), hidrógeno ftalato de acetato de polivinilo, CAP de sodio, ftalato ácido de almidón, acetato trimetilato de celulosa (CAT), copolímero de estireno-ácido maleico/ftalato de dibutilo, copolímero estireno-ácido maleico/ ftalato de polivinilacetato, estireno y copolímeros de ácido maleico, o derivados del ácido poliacrílico o una combinación de los mismos.
14. La composición de la reivindicación 13, en donde dicho polímero comprende uno o más de shellac, derivados de ftalato, CAT, HPMCAS, derivados del ácido poliacrílico, copolímeros que comprenden ácido acrílico y al menos un éster de ácido acrílico, Eudragit™ S (poli(ácido metacrílico, metacrilato de metilo) 1:2); Eudragit L100™ (poli(ácido metacrílico, metacrilato de metilo) 1:1); Eudragit L30™ (poli(ácido metacrílico, acrilato de etilo) 1:1); y (Eudragit L100-55) (poli(ácido metacrílico, acrilato de etilo)1:1) (Eudragit™ L es un polímero aniónico sintetizado a partir de ácido metacrílico y metil éster del ácido metacrílico), polimetil metacrilato mezclado con ácido acrílico y copolímeros de ésteres acrílicos, ácido alginico, alginato de amonio, sodio, potasio, magnesio o alginato de calcio, copolímeros de

acetato de vinilo, acetato de polivinilo 30D (30% de dispersión en agua), un éster metacrílico neutro que comprende poli(dimetilaminoetilacrilato) ("Eudragit E™), un copolímero de metilmetacrilato y etilacrilato con cloruro de trimetilamonioetil metacrilato, un copolímero de metilmetacrilato y etilacrilato, zeína, shellac, gomas, o polisacáridos, o una combinación de los mismos.

- 5 15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha capa de recubrimiento exterior comprende un polímero que tiene una tasa de transmisión de oxígeno de menos de 1000 cc/m²/24horas, medida en condiciones de prueba estándar.

Figura 1:

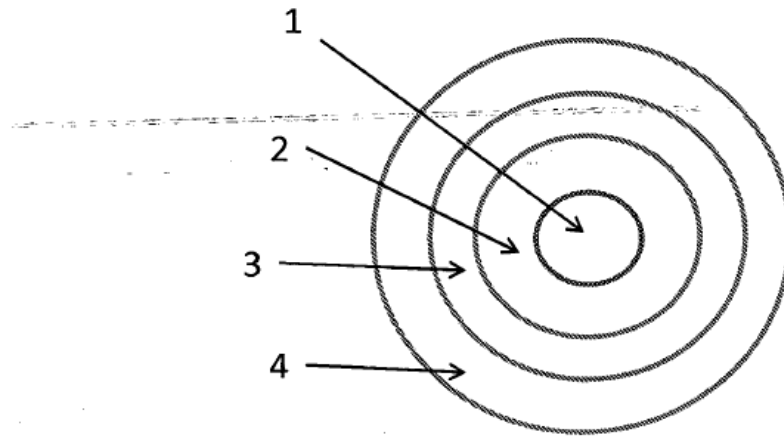


Figura 2:

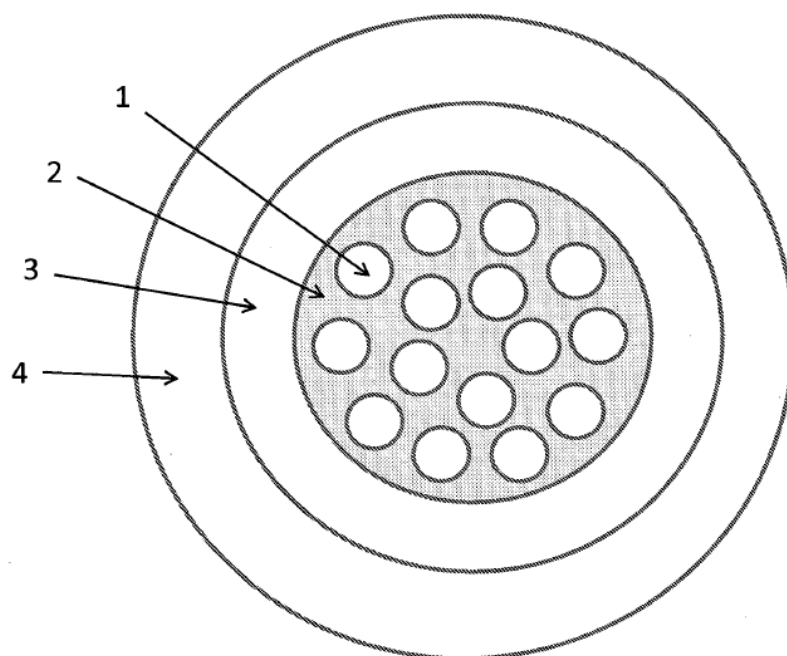


Figura 3:

