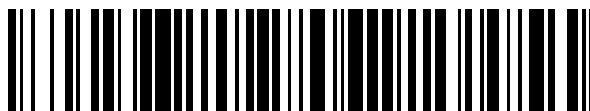


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 858**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61K 9/50** (2006.01)

**A23L 33/135** (2006.01)

**A23L 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2012 PCT/EP2012/050895**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012 WO12098239**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2012 E 12700703 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2665377**

54 Título: **Sustancia probiótica microencapsulada y proceso de fabricación**

30 Prioridad:

**21.01.2011 EP 11151686**

**21.01.2011 LU 91782**

**30.06.2011 US 201161503307 P**

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

**31.07.2017**

73 Titular/es:

**VESALE PHARMA SA (50.0%)**

**Rue Louis Allaert 9**

**5310 Noville-sur-Mehaigne, BE y**

**BRACE GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**QUINTENS, JOHAN HENRI HERMAN;**

**LIENART VAN LIDTH DE JEUDE, JEHAN;**

**BRANDAU, THORSTEN;**

**STROHM, HOLGER y**

**SCHWINN, JENS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 627 858 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

Sustancia probiótica microencapsulada y proceso de fabricación

La presente invención se refiere a una sustancia probiótica microencapsulada, en particular, a una composición en polvo secada que comprende partículas sólidas que contienen un microorganismo probiótico vivo y una fase portadora en la que dicho microorganismo probiótico vivo está encapsulado, comprendiendo dicha fase portadora una composición entérica y comprendiendo además al menos una fuente nutritiva.

Tales sustancias probióticas microencapsuladas ya son conocidas en la técnica. El documento de EE.UU. 2010/0189767 describe una sustancia probiótica microencapsulada que comprende al menos una sustancia probiótica y un primer revestimiento, que comprende por ejemplo cera, goma laca, almidón resistente, proteína zeína, etilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, acetato ftalato de amilasa, acetatoftalato de celulosa, hidroxil propil metil celulosa ftalato, un etilacrilato, y un metilmetacrilato en la forma de una matriz vítrea. La matriz vítrea se refiere en este documento a una matriz que es sólida a temperatura ambiente y que tiene una configuración rígida y presenta un alto módulo de elasticidad y resistencia. El tamaño de partícula es de al menos 20 micrómetros. Este documento describe además que la relación en peso entre las bacterias y los otros componentes secos de la matriz brillante está dentro del intervalo de 0,5 a 30%.

En el documento de EE.UU. 2005/0266069 se describen formulaciones probióticas viables y estables. Estas formulaciones comprenden un núcleo de una o más bacterias probióticas, un excipiente celulósico (por ejemplo, celulosa microcristalina) y uno o más aditivos tales como desintegrantes (almidón glicolato sódico, ácido algínico, almidón,...) y estabilizantes (glicerol, ácido ascórbico,...). El núcleo está revestido con un revestimiento no entérico (alcohol polivinílico, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa,...) y además está recubierto con un revestimiento entérico (copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo, acetato-ftalato de celulosa,...). El núcleo descrito en este documento tiene un diámetro de 100 a 1000 micras y comprende un porcentaje relativamente bajo (porcentaje en peso del peso seco total del núcleo) de bacterias probióticas de 1 a 10%, 50 a 90% de celulosa microcristalina, de 0,1 a 30% de estabilizador y de 0,1 a 5% de desintegrante.

El documento de EE.UU. 2005/0153018 se refiere a un sistema de suministro probiótico de partículas que tienen un tamaño de al menos 100 micrómetros y más particularmente a gránulos compactados que tienen un volumen de al menos 0,02 cm<sup>3</sup> y que comprenden microorganismos viables asociados con otros componentes tales como cargas, aglutinantes polisacáridos tales como hidrocoloides, plastificantes e ingredientes nutricionales. De acuerdo con este documento, la preparación bacteriana se mezcla con los otros componentes en generalmente de 0,1 a 5% del peso húmedo total.

La sustancia probiótica microencapsulada de acuerdo con el estado de la técnica tiene el inconveniente de que la viabilidad de la sustancia probiótica se limita a unos pocos días cuando se almacena a temperaturas fisiológicas. Además, a pesar de las altas tasas de supervivencia de las bacterias probióticas mencionadas en estos documentos de la técnica anterior, el número de bacterias probióticas supervivientes se reduce. Los estudios y la percepción subjetiva de los consumidores muestran que el consumo de probióticos tiene una serie de beneficios percibidos para la salud. Los productos farmacéuticos probióticos tienen que ser preparados, enviados y almacenados en condiciones refrigeradas; una interrupción en la cadena de enfriamiento no sólo reduce la actividad, sino que también conduce a enormes costos de transporte y supervisión de la cadena de enfriamiento. El objetivo de esta invención es aumentar la viabilidad durante el almacenamiento, especialmente enfocada en la estabilidad a largo plazo y en la temperatura.

Según la definición de Fuller (1989), los probióticos son suplementos alimentarios microbianos vivos que afectan de manera beneficiosa al huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal, mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) define un probiótico como microorganismos vivos (bacterias o levaduras), que cuando se ingieren o se aplican localmente en un número suficiente, confieren uno o más beneficios específicos en la salud demostrados para el huésped. Este conocimiento bien aceptado conduce a que haya un gran número de productos probióticos en el mercado, que van desde bebidas nutritivas con probióticos sobre ayudantes ingestivos, formulaciones antiacné a otras aplicaciones. Sin embargo, las formulaciones farmacéuticas tienen en conjunto el problema de que no son "atractivas para el consumidor"; al contrario que los productos alimenticios, en los que se acepta de buena gana que deben almacenarse en la nevera, las formulaciones farmacéuticas no son aceptadas en la nevera de casa, ya que es "donde se guarda la comida".

La mayoría de los desarrollos de formulaciones se concentran en la propia aplicación ya que los probióticos no son tolerantes a los ácidos fuertes del estómago humano o animal, a pesar de que ellos mismos generen ácido láctico.

Un objeto de la invención es paliar al menos algunos de estos inconvenientes proporcionando una sustancia probiótica microencapsulada que asegure una estabilidad mejorada de la sustancia probiótica microencapsulada, dando como resultado una vida útil prolongada a altas viabilidades de las sustancias probióticas encapsuladas, incluso a nivel fisiológico o a temperaturas más altas.

Para resolver este problema, la presente invención proporciona una sustancia probiótica microencapsulada tal como se menciona al comienzo, en la que dicha composición de polvo seco presenta una distribución del tamaño de

partícula entre  $n$  y  $(n + 400)$   $\mu\text{m}$ , en el que  $n$  está comprendido entre 100 y 10000  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 300 y 5000  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 400 y 1000  $\mu\text{m}$  y en la que dichas partículas sólidas son partículas esféricas que comprenden de 50 a 80% de dicho microorganismo probiótico vivo y en la que dichas composiciones en polvo secas se obtienen por moldeo por goteo de flujo laminar.

- 5 Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición de partículas sólidas de polvo seco que es estable durante la producción, el transporte, el almacenamiento y la aplicación, incluso a temperatura ambiente. Se demostró que este nuevo procedimiento de encapsulación asegura un tiempo de almacenamiento prolongado a altas viabilidades de las cepas probióticas encapsuladas. También se puede demostrar que la viabilidad se incrementa a temperaturas elevadas de hasta 55°C, incluso las cepas probióticas pueden soportar picos de  
10 temperaturas de 80°C en la configuración correcta. De hecho, se hizo evidente que el método de moldeo por goteo de flujo laminar proporciona una distribución estrecha del tamaño de las partículas sólidas, lo que ayuda a mantener la viabilidad de los microorganismos probióticos que tienen una mayor resistencia a las altas temperaturas.

Durante la producción, sin embargo, los probióticos son sensibles también, ya que a menudo se mantienen en solución durante un tiempo más largo; la manipulación y el almacenamiento puede alterarlos.

- 15 Como un método de producción muy suave se ha utilizado la generación de gotitas laminares para evitar el fuerte estrés producido durante el secado por pulverización que disminuye la viabilidad. Esta invención muestra que el moldeo por goteo de flujo laminar, preferiblemente con soporte vibratorio, produce partículas con un gran número de microorganismos viables y tasas de supervivencia mucho más altas que los procesos de secado por pulverización, así como un intervalo de tamaños muy definido de las esferas resultantes cuya superficie es perfectamente  
20 homogénea ("redondez"). Se ha demostrado que la desviación de los tamaños pequeños y la redondez de las partículas esféricas mejoran las características de liberación y, por tanto, mejoran el efecto global de los probióticos, siendo la liberación más larga con dichas partículas esféricas en comparación con las partículas esféricas que presentan tamaños mayores o tamaños ampliamente distribuidos y una superficie no homogénea.

- 25 Este efecto se alcanza por el hecho de que las partículas sólidas en polvo secas presentan una distribución uniforme del tamaño de partícula permitiendo mejores tasas de supervivencia, contrariamente a las técnicas de microencapsulación existentes que conducen a distribuciones de gran tamaño dando como resultado una protección diferente de las perlas y falsos resultados de las pruebas de supervivencia. Se ha encontrado sorprendentemente que el proceso de moldeo por goteo vibratorio permite lograr partículas monomodales y distribuidas estrechamente mostrando incluso dentro de sus propiedades una estabilidad general que es más alta que las conocidas. El proceso  
30 de moldeo por goteo vibratorio se realiza con una amplitud de vibración predeterminada y una frecuencia de vibración predeterminada a una presión predeterminada baja, dictando una velocidad predeterminada de flujo de líquido. Estos parámetros permiten la obtención de partículas esféricas con redondez homogénea. Esto es particularmente ventajoso ya que la redondez del procedimiento utilizado de acuerdo con la invención asegura que cada partícula esférica contenga exactamente las mismas cantidades de microorganismos probióticos y de la fase portadora. Además, las partículas esféricas, que son perfectamente esféricas, presentan las ventajas de ser menos sensibles a factores externos tales como la oxidación y no se agregan cuando están en contacto. Después de la producción, los probióticos son atrapados en la matriz de los materiales de encapsulación aunque, no obstante, puedan todavía degradarse y descomponerse. Por lo tanto, puede ser necesario realizar una estabilización adicional, lo que es posible, por ejemplo, por secado, liofilización, diferentes medios de almacenamiento, secado por  
40 pulverización, etc. Esta invención muestra que aunque se use el agente nutritivo adecuado, la estabilización y viabilidad de los probióticos durante la liofilización se incrementa en oposición a los no estabilizados.

Ventajosamente, las partículas sólidas en polvo secadas presentan una tal distribución de tamaños de partícula  $d_{80}$  entre  $n$  y  $(n + 200)$   $\mu\text{m}$  en la que  $n$  está comprendido entre 100 y 10000  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 300 y 5000  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 400 y 1000  $\mu\text{m}$ .

- 45 Preferiblemente, cada partícula sólida presenta una composición homogénea lo que significa que cada partícula contiene las mismas cantidades de microorganismos probióticos y de la fase portadora.

La fase portadora comprende al menos una sustancia elegida en el grupo que consiste en alginato, quitosano, pectina, pululano, gelatina, carragenano y agar.

- 50 Además de la capacidad de paso por el estómago de las partículas resultantes, las partículas también deben desintegrarse en el intestino para liberarse y cumplir su misión de salud. Por lo tanto, tiene que ser utilizada una combinación correcta de materiales de cubierta. En esta invención, los materiales han sido elegidos de tal manera que las microesferas se liberan en el intestino después de pasar el estómago y los líquidos biliares, de modo que la tasa de supervivencia es lo suficientemente alta para tener un efecto clínico.

- 55 Preferiblemente, dicha al menos una sustancia es un hidrocoloide. Las ventajas de elegir tales hidrocoloides como primer revestimiento incluyen: la no toxicidad, forman geles suaves para atrapar materiales sensibles tales como sustancias probióticas, la viabilidad de las sustancias probióticas durante la vida útil encapsulada y la reversibilidad de la inmovilización ya que los geles pueden ser solubilizados liberando las sustancias probióticas encapsuladas.

Dicha fuente nutritiva comprende al menos un compuesto elegido del grupo que consiste en un monosacárido, un polisacárido, un aminoácido, un péptido, una proteína, una vitamina, un extracto de levadura, una sal halógena de un metal alcalino o alcalinotérreo, un antioxidante, glicerol, acetato de zinc, cloruro de zinc, lactato de zinc, ácido ascórbico, ácidos cítricos o un aceite vegetal y grasa de leche.

- 5 En una realización preferida, dicha fuente nutritiva está presente en una cantidad de 0,1 a 10% en peso, preferiblemente de 1 a 5% en peso con respecto al peso total de las microesferas antes del secado.

Más preferiblemente, las partículas sólidas en polvo secadas de acuerdo con la invención comprenden además un revestimiento externo elegido entre el grupo que consiste en alginato, quitosano, pectina, pululano, gelatina, carragenano, agar, celulosa, hemicelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa y sus mezclas.

- 10 Otras realizaciones de las partículas sólidas en polvo secadas de acuerdo con la invención se describen en las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere también a una composición entérica que comprende dichas partículas sólidas en polvo secadas de acuerdo con la invención en un vehículo adecuado.

- 15 Como se ha mencionado anteriormente, el hecho de que la viabilidad se conserve durante la producción, el almacenamiento y que los probióticos estén protegidos frente a las variaciones de temperatura y los ataques del pH, hacen que las partículas sólidas en polvo secas sean adecuadas para fabricar una composición entérica con un alto rendimiento.

- 20 Ventajosamente, dicho vehículo adecuado es un revestimiento entérico elegido entre el grupo que consiste en etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, Eudragit®, haciendo de este modo que la composición entérica sea resistente a las condiciones estomacales para conseguir un efecto en la zona intestinal.

Preferiblemente, la composición entérica está en forma de una cápsula gelatinosa de gel blanda o dura, una tableta, una bolsita y similares.

Otras realizaciones de la composición entérica de acuerdo con la invención se mencionan en las reivindicaciones adjuntas.

- 25 La presente invención se refiere también a un procedimiento para la fabricación de una composición de polvo seco que comprende partículas sólidas.

El procedimiento para la fabricación de probióticos microencapsulados se conoce de la técnica anterior.

Por ejemplo, el documento de EE.UU. 2005/0266069 describe un procedimiento para preparar una formulación probiótica, incluyendo este proceso las siguientes etapas:

- 30 - mezclar en seco una celulosa microcristalina (MCC) con un desintegrante,  
 - granular la mezcla de MCC y el desintegrante con una dispersión acuosa que comprende un polvo probiótico liofilizado, estabilizadores y agua purificada para formar una pasta extruible,  
 - extruir dicha pasta extruible en forma de segmentos,  
 - esferonizar segmentos para formar el núcleo de microesferas,  
 35 - secar los núcleos hasta un nivel de humedad residual, y  
 - revestir dichos núcleos para obtener microesferas.

La fase de extrusión se lleva a cabo utilizando un extrusor de un solo husillo, un extrusor de doble husillo, una extrusora o un granulador oscilante.

- 40 El documento de EE.UU. 2010/0189767 también describe un método para preparar microcápsulas secas que comprenden microorganismos probióticos y una matriz de hidratos de carbono, comprendiendo este método:

- proporcionar una suspensión de microorganismos probióticos,  
 - proporcionar una matriz que comprenda al menos una dextrina y opcionalmente al menos un azúcar disacárido u oligosacárido,  
 - encapsular la suspensión de microorganismos probióticos con la matriz para obtener microcápsulas, y  
 45 - revestir las microcápsulas con una composición de revestimiento.

La encapsulación puede comprender la etapa de suspensión de aire/N<sub>2</sub> en lecho fluidizado y/o la etapa de secado por pulverización ultrasónica con vacío y/o la etapa de liofilización por centrifugación.

El documento de EE.UU. 2005/0153018 describe un procedimiento para obtener gránulos, que contienen microorganismos viables, que comprende las siguientes etapas:

- 5 - mezclar una preparación de microorganismos y otros componentes,
- secar la mezcla,
- compactar la mezcla a presión para obtener gránulos, y
- revestir los gránulos.

10 Por desgracia, estos procedimientos reducen fuertemente la viabilidad de los microorganismos probióticos que se estresan durante la etapa de extrusión realizada generalmente bajo alta presión. Además, según estos procedimientos, es difícil obtener microesferas que presenten la misma redondez y superficies homogéneas.

Para superar este problema, otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de una composición de polvo seco que comprende partículas sólidas bajo la forma de partículas esféricas que comprende las siguientes etapas:

- 15 - mezclar una preparación de microorganismos probióticos vivos y una fase portadora que comprende al menos una fuente nutritiva,
- extruir la mezcla de dichos microorganismos probióticos vivos y dicha fase portadora para producir microesferas, y
- recoger dichas microesferas en un baño que contiene una solución de solidificación.

20 Este proceso se caracteriza porque dicha etapa de extrusión se realiza a una velocidad predeterminada de flujo de líquido de 0,2 a 5 m/s a través de al menos una boquilla vibratoria en un moldeo por goteo de flujo laminar para obtener dichas partículas de polvo secas bajo la forma de partículas esféricas, teniendo dicha boquilla vibradora una frecuencia de vibración en un intervalo de 1 a 20000 Hz y una amplitud de vibración de al menos 0,5 µm.

25 Este proceso constituye un método de producción muy blando basado en la generación de gotitas laminares que evita el fuerte estrés durante la etapa de extrusión que disminuye la viabilidad de los microorganismos probióticos. La velocidad del flujo de líquido de 0,2 a 5 m/s corresponde a una presión de proceso en un dispositivo BRACE Spherisator de 200 a 800 mBar (20 a 80 kPa). Este proceso proporciona una distribución estrecha del tamaño de las partículas sólidas, lo que ayuda a mantener la viabilidad de los microorganismos probióticos que tienen una mayor resistencia a las altas temperaturas. Además, este proceso proporciona partículas esféricas que tienen una redondez homogénea.

30 Preferentemente, de acuerdo con la presente invención, se obtiene un moldeo por goteo de flujo laminar de al menos una boquilla vibratoria con un soporte vibratorio.

Ventajosamente, la vibración de la boquilla vibratoria está orientada en una dirección axial o lateral con respecto al flujo para generar gotitas.

35 Preferiblemente, de acuerdo con la presente invención, las partículas esféricas producidas tienen un diámetro en el intervalo de 100 a 10000 µm.

40 Ventajosamente, de acuerdo con la presente invención, se extruyen dos líquidos en un flujo laminar con uno o sistemas de boquillas dobles múltiples que comprenden una boquilla interna y una boquilla externa. En este caso, se extruyen dos líquidos en un flujo laminar con al menos un sistema de doble boquilla que consiste en una boquilla interna y una boquilla externa, teniendo dicha boquilla externa al menos el mismo diámetro que la boquilla interna. El líquido interno forma entonces el núcleo, mientras que el líquido externo forma posteriormente la envoltura. El uso de tales boquillas es ventajoso ya que permite producir una encapsulación núcleo-envoltura (o micro-granulación o encapsulación de matriz): el material del núcleo está completamente aislado del entorno circundante, dándole una protección perfecta. El material de envuelta puede tener, por ejemplo, barreras de gas, barreras de difusión o colorantes.

45 Ventajosamente, el procedimiento para la fabricación de una composición de polvo seco que comprende partículas sólidas de acuerdo con la presente invención comprende una etapa adicional de revestimiento externo.

Otros detalles y ventajas del probiótico microencapsulado de acuerdo con la invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción de las realizaciones preferidas de la invención a modo de ejemplos no limitativos.

### Ejemplo 1

Perlas de alginato-CE y pasta de probióticos

Se han realizado microesferas de *L. Rhamnosus* en una matriz hecha de alginato y con un revestimiento externo de etilcelulosa con el siguiente protocolo:

5 Se dispersaron 150 g de pasta de *L. Rhamnosus* ( $5 \times 10^{10}$  ufc) en 150 g de solución estéril de NaCl (0,85% p/p de NaCl) para preparar una suspensión de *L. Rhamnosus*.

Se añadieron 150 g de una disolución de alginato estéril al 5% p/p a 300 g de la suspensión de *L. Rhamnosus*.

Se realizó el moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 800  $\mu\text{m}$  mediante solidificación en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 4% p/p. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en solución de NaCl al 0,85% p/p.

10 Se agitaron 400 g de microesferas durante 1 minuto en 400 g de una solución de etilcelulosa al 1% p/p en etanol para producir el revestimiento de etilcelulosa (revestimiento EC). La separación y el lavado de la microesfera recubierta se realizó en solución de NaCl al 0,85% p/p. 380 g de microesferas se almacenaron en 380 g de una solución acuosa estéril de glucosa al 5% p/p antes de liofilizar en dicha solución de almacenamiento de glucosa. Se obtuvo un polvo seco suelto de microesferas de 700-900  $\mu\text{m}$  de diámetro.

### 15 Ejemplo 2

Alginato - Perlas de gelatina y pasta probiótica

Se realizaron microesferas de *L. Rhamnosus* en una matriz de alginato y con un revestimiento de gelatina siguiendo el protocolo mencionado anteriormente:

20 Se dispersaron 200 g de pasta de *L. Rhamnosus* ( $5 \times 10^{10}$  ufc) en 200 g de solución de NaCl estéril (0,85% p/p de NaCl) para preparar una suspensión de *L. Rhamnosus*.

Se añadieron 200 g de una disolución de alginato estéril al 5% p/p a 400 g de la suspensión de *L. Rhamnosus*.

Se realizó el moldeo por goteo con una unidad de ruptura de flujo laminar para producir microesferas de 500  $\mu\text{m}$  por solidificación en una solución de lactato de calcio al 5% p/p.

La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

25 Se agitaron 550 g de microesferas durante 1 h en 550 g de una solución de gelatina al 5% p/p para producir el revestimiento de gelatina reticulada.

Las microesferas se agitaron a continuación durante 2 minutos en 550 g de una solución al 10% p/p de glutaraldehído. La separación y el lavado de las microesferas revestidas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

30 Se almacenaron 550 g de microesferas en 550 g de una solución acuosa estéril de maltodextrina al 10% p/p antes de la liofilización en una solución de almacenamiento de maltodextrina:

Se obtuvo un polvo seco suelto de microesferas de 400-600  $\mu\text{m}$  de diámetro.

### Ejemplo 3

Perlas de Alginato-CMC-Gelatina con pasta probiótica

35 Se prepararon microesferas de *L. Rhamnosus* en una matriz de alginato y con un revestimiento de carboximetilcelulosa y un revestimiento reticulado de gelificación como sigue:

Se dispersaron 300 g de pasta de *L. Rhamnosus* ( $5 \times 10^{10}$  ufc) en 150 g de solución de NaCl estéril (0,85% p/p de NaCl) para preparar una suspensión de *L. Rhamnosus*.

Se añadieron 75 g de una solución de alginato estéril al 10% p/p a 450 g de la suspensión de *L. Rhamnosus*.

40 Se llevó a cabo el moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 1000  $\mu\text{m}$  por solidificación en una solución al 3% p/p de gluconato de calcio. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se agitaron 500 g de microesferas durante 10 minutos en 500 g de una solución acuosa de carboximetilcelulosa al 2%. Las microesferas revestidas se separaron además y lavaron en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

45 Se agitaron además 500 g de microesferas durante 1 h en 500 g de una solución de gelatina al 5% p/p para producir la gelatina reticulada revestida sobre las microesferas.

Las microesferas se agitaron entonces durante 2 minutos en 500 g de una solución de glutaraldehído al 10% y se separaron y se lavaron en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se almacenaron 500 g de microesferas en 500 g de una solución acuosa estéril de glicerol al 10% p/p y se liofilizaron en la solución de almacenamiento de glicerol:

- 5 Se obtuvo un polvo seco suelto de microesferas de 800-1200 µm de diámetro.

#### Ejemplo 4

Gelatina-Guar Goma-CMC-Perlas con pasta probiótica

Se prepararon microesferas de Bifidobacterium Lactis en una matriz de gelatina, revestida con goma de guar y carboximetilcelulosa como sigue:

- 10 Se dispersaron 200 g de pasta de Bifidobacterium Lactis en 100 g de solución de NaCl estéril (NaCl al 0,85% p/p) para preparar el Bifidobacterium Lactis en suspensión.

Se añadieron 150 g de una solución de gelatina estéril al 30% a 300 g de la suspensión de Bifidobacterium Lactis a 37°C.

- 15 Se llevó a cabo el moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 1000 µm mediante solidificación en triglicéridos de caprílico/cáprico a 5°C. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se agitaron 400 g de microesferas durante 10 minutos en 400 g de una solución acuosa de goma guar al 5% p/p para producir las microesferas revestidas con goma de guar. Las microesferas recubiertas se separaron después y se lavaron en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

- 20 Se agitaron 400 g de microesferas durante 10 minutos en 400 g de una solución acuosa de carboximetilcelulosa al 2% para construir el revestimiento de CMC. Las microesferas se separaron entonces y se lavaron en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se almacenaron 400 g de microesferas en 400 g de una solución acuosa estéril de glicerol al 4% p/p antes de liofilizar en esta solución de almacenamiento de glicerol:

- 25 Se obtuvo un polvo seco suelto de microesferas de 800-1200 µm de diámetro.

#### Ejemplo 5

Perlas de Alginato-Quitosán-Gelatina con pasta probiótica

Se prepararon microesferas de L. Rhamnosus en una matriz de alginato y con un revestimiento de quitosano con un revestimiento de gelatina adicional como sigue:

- 30 Se dispersaron 400 g de pasta de L. Rhamnosus ( $5 \times 10^{10}$  ufc) en 200 g de solución de NaCl estéril (0,85% p/p de NaCl) para preparar una suspensión de L. Rhamnosus.

Se añadieron 100 g de una solución de alginato estéril al 10% a 600 g de la suspensión de L. Rhamnosus.

- 35 Se realizó el moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 1000 µm mediante la solidificación en una solución de CaCl<sub>2</sub> al 2% p/p. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se agitaron 600 g de microesferas durante 10 minutos en 1200 g de una solución acuosa de quitosano al 1% p/p para fabricar microesferas revestidas con quitosano. La separación y el lavado de las microesferas revestidas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

- 40 Se agitaron 600 g de microesferas durante 1 h en 1200 g de una solución de gelatina al 5% p/p para revestir adicionalmente la microesfera con gelatina. La separación y el lavado de las microesferas revestidas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se almacenaron 600 g de microesferas en 600 g de una solución acuosa estéril de glicerol al 4% p/p antes de liofilizar en la solución de almacenamiento de glicerol:

Se obtuvo un polvo seco suelto de microesferas de 800-1200 pm de diámetro.

- 45 **Ejemplo 6**

Perlas de alginato con pasta probiótica

## ES 2 627 858 T3

Se prepararon microesferas de *L. Rhamnosus* en una matriz de alginato de la siguiente manera:

Se dispersaron 200 g de pasta de *L. Rhamnosus* ( $5 \times 10^{10}$  ufc) en 150 g de una solución estéril de 6,7% p/p de polisacárido y 0,85% p/p de NaCl para formar una suspensión de *L. Rhamnosus*.

Se añadieron 230 g de una disolución de alginato estéril al 3% p/p a 350 g de la suspensión de *L. Rhamnosus*.

- 5 Se realizó el moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 1000  $\mu\text{m}$  por solidificación en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2% p/p. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se almacenaron 550 g de microesferas en 550 g de una solución acuosa estéril de glucosa al 5% p/p y glicerol al 3% p/p antes de liofilizar en una solución de almacenamiento de glicerol:

- 10 Se obtuvo un polvo seco suelto de microesferas de 400-900  $\mu\text{m}$  de diámetro.

El recuento de las bacterias viables en microesferas se hace como sigue:

Se prepararon dos muestras con las microesferas de alginato de *L. Rhamnosus*, una del polvo seco y otra en estado húmedo:

- 15 Muestra 1: Microesferas de *Lactobacillus rhamnosus*, diámetro de 400-900 micrómetros, secadas con glucosa/glicerol.

Muestra 2: Microesferas de *Lactobacillus rhamnosus*, diámetro de 800-1200 micras, húmedo en solución de glucosa/glicerol.

Las microesferas tienen que ser disueltas antes del recuento de bacterias viables. Los procedimientos de disolución se adaptaron a las diferencias durante la etapa de secado de las microesferas:

- 20 La muestra 1 se preparó pesando asépticamente 100 mg de microesferas secas en un tubo estéril cónico de 15 ml y añadiendo 2,9 ml de citrato de Na 0,1 M. La mezcla se agitó en vórtice durante 15 minutos (dilución 30x).

- 25 La muestra 2 se preparó separando primero las microesferas de la solución de almacenamiento (solución de glucosa/glicerol) con un tamiz estéril (papel de filtro Whatman). Se añadieron 100 mg de microesferas húmedas a un tubo estéril cónico de 15 ml con 1,9 ml de citrato de Na 0,1 M. La mezcla se agitó en vórtice durante 3 minutos (dilución 20X)

La disolución de la muestra se hizo en duplicado para ambas muestras.

Se vertieron 15 ml del agar MRS aproximadamente en cada placa y se permitió la solidificación a temperatura ambiente sobre una superficie plana fría.

- 30 En tubos estériles rellenos con 9 ml de controles esterilizados de dilución de peptona al 0,1% se añade 1 ml de la dilución primaria (desde el tubo cónico) a los 9 ml de diluyente con una pipeta de 1 ml para obtener una dilución  $10^{-1}$ . Esta operación se repite hasta que se obtiene la serie de dilución deseada. Los tubos de dilución se agitan como se indica en los métodos estándar para el examen de productos lácteos. Los experimentos se realizan por triplicado. 0,1 ml de cada dilución apropiada se transfieren sobre la superficie de placas de Petri estériles marcadas vertidos con aproximadamente 15 ml de medio nutritivo MRS agar. Las placas se incubaron a 35°C durante un mínimo de 72 horas hasta 144 horas.

- 35 Se contaron las colonias en las placas de agar MRS y se registraron como recuento de células *Lactobacillus rhamnosus* viables por gramo, teniendo en cuenta el factor de dilución de las placas contadas. Sólo se contarán las placas que tenían entre 25 y 250 colonias. (Véase "Standar Methods for the examination of dairy products", edición 16, páginas 213-246).

- 40 Resultados

Peso inicial:

- Muestra 1: duplicado 1: 100 mg duplicado 2: 103 mg Promedio: 101,5 mg.

- Muestra 2: duplicado 1: 102 mg duplicado 2: 99 mg Promedio: 100,5 mg

Tasa de dilución inicial:

- 45 - Muestra 1: 101,5 mg en 2,9 ml = dilución 29,6 X.

- Muestra 2: 100,5 mg en 1,9 ml = dilución 19,9 X



Recuento ufc (unidades formadoras de colonia):

Replicación	Dilución 10 <sup>-5</sup>			Dilución 10 <sup>-4</sup>			Dilución 10 <sup>-3</sup>			Dilución 10 <sup>-2</sup>	
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2

Muestra 1											
Duplicado 1:	3	6	1	18	6	19	299	192	279	>	>
Duplicado 2:	1	1	1	17	12	16	151	114	160	>	>

Muestra 2											
Duplicado 1:	8	6	8	32	88	52	--	171	203	>	>
Duplicado 2:	-	8	6	35	85	39	--	?	123	>	>

5 Los resultados del recuento son los siguientes:

Muestra 1:  $192,10^3 \times 29,6 = 5,68 \cdot 10^6$  ufc/g microesferas (peso en seco)

Muestra 2:  $635,10^3 \times 19,9 = 1,26 \cdot 10^7$  ufc/g microesferas (peso en húmedo)

10 Como se puede ver, con una elección correcta del diámetro y del agente nutritivo, se puede alcanzar una tasa de supervivencia de 1:1000 durante todo el procesamiento. Mientras que un diámetro más grande conserva un número más alto de células vivas a través del proceso, el rendimiento de microorganismos vivos de más de  $1 \cdot 10^7$  ufc es suficiente para un efecto probiótico.

### Ejemplo 7

Perlas de Alginato-CMC-Gelatina con probióticos liofilizados

15 Se prepararon microesferas de *L. rhamnosus* en una matriz de alginato revestida con carboximetilcelulosa y gelatina de la siguiente manera:

Se dispersaron 150 g de polvo de *L. rhamnosus* liofilizado ( $8,8 \times 10^{11}$  ufc/g) en 300 g de solución estéril de NaCl (0,85% p/p de NaCl) para formar una suspensión de *L. rhamnosus*. La *L. rhamnosus* proporcionada es, por lo tanto,  $1,32 \cdot 10^{14}$  ufc en 150 g.

Se añadieron 75 g de una disolución de alginato estéril al 10% p/p a 450 g de la suspensión de *L. rhamnosus*.

20 Se realizó el moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 1000  $\mu\text{m}$  por solidificación en una solución de gluconato de calcio al 3% p/p. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

25 Se agitaron 500 g de microesferas durante 10 minutos en 500 g de una solución acuosa de carboximetilcelulosa al 2% p/p para obtener el revestimiento CMC. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Además, se agitaron 500 g de microesferas durante 1 h en 500 g de una solución de gelatina al 5% p/p, y las microesferas se agitaron a continuación durante 2 minutos en 500 g de una solución de glutaraldehído al 10% p/p para conseguir un revestimiento de gelatina reticulado. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

30 Se almacenaron 500 g de microesferas en 500 g de una solución acuosa estéril de glicerol al 10% p/p antes de liofilizar en una solución de almacenamiento. Después de un doble revestimiento y reticulación que no absorbe todo el material de revestimiento, sino sólo una pequeña cantidad de 0,1 - 1%, las esferas se secaron y se añadieron 50 g de glicerol (500 g de glicerol al 10% p/p), dando lugar a una materia seca de 203,93 g, bajo la forma de un polvo seco suelto de microesferas de 800-1200  $\mu\text{m}$  de diámetro con un recuento de células de  $2,9 \times 10^{11}$  ufc/g. Esto significa que a partir del  $1,32 \cdot 10^{14}$  comprometido desde la *L. rhamnosus* liofilizada, sigue habiendo  $0,61 \cdot 10^{14}$  ufc (203,93 g.  $2,9 \cdot 10^{11}$ ). Por consiguiente, el rendimiento de los probióticos vivos es aproximadamente un 50% drásticamente mayor que con el proceso de la técnica anterior.

**Ejemplo 8**

Esferas de alginato-EC con probióticos liofilizados

Se prepararon microesferas de *L. rhamnosus* en una matriz de alginato revestida con etilcelulosa de la siguiente manera:

5 Se dispersaron 67,5 g de polvo de *L. rhamnosus* liofilizado ( $8,8 \times 10^{11}$  ufc) en 217,5 g de solución estéril de NaCl (0,85% p/p de NaCl) para preparar una suspensión de *L. rhamnosus*.

Se añadieron 150 g de una solución de alginato estéril al 5% a 300 g de la suspensión de *L. rhamnosus*;

10 Se llevó a cabo un moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 800  $\mu\text{m}$  mediante solidificación en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 4% p/p. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Además, se agitaron 400 g de microesferas durante 1 minuto en 400 g de una solución de etilcelulosa al 1% p/p en etanol para preparar las microesferas revestidas con CE. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

15 Se almacenaron 380 g de microesferas en 380 g de una solución acuosa estéril de glucosa al 5% p/p antes de la liofilización en una solución de almacenamiento de glucosa:

Se obtuvieron 96,32 g de un polvo seco suelto de microesferas de 700-900  $\mu\text{m}$  de diámetro con un recuento de células de  $1,9 \times 10^{11}$  ufc. Esto significa que a partir de las  $5,94 \cdot 10^{13}$  ufc comprometidas en el primer paso, quedan  $1,83 \cdot 10^{13}$  ufc de ( $8,8 \times 10^{11} \times 67,5$ ) probióticos vivos ( $96,32 \times 1,9 \cdot 10^{11}$ ) correspondientes a aproximadamente el 31% de los probióticos mantenidos vivos.

20 **Ejemplo 9**

Perlas de Alginato-Gelatina con probióticos liofilizados

Se prepararon microesferas de *L. rhamnosus* en una matriz de alginato revestida con gelatina de la siguiente manera:

25 Se dispersaron 100 g de polvo de *L. rhamnosus* liofilizado ( $8,8 \times 10^{11}$  ufc) en 300 g de solución de NaCl estéril (NaCl al 0,85% p/p) para formar una suspensión de *L. rhamnosus*. Los probióticos comprometieron, por lo tanto,  $8,8 \cdot 10^{13}$  ufc para preparar las perlas de gelatina de alginato.

Se añadieron 200 g de una disolución de alginato estéril al 5% p/p a 400 g de la suspensión de *L. rhamnosus*.

30 Se llevó a cabo el moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 500  $\mu\text{m}$  mediante solidificación en una solución al 5% p/p de lactato cálcico. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se agitaron 550 g de microesferas durante 1 h, en 550 g de una solución de gelatina al 5% p/p para obtener un revestimiento de gelatina reticulado.

Las microesferas se agitaron a continuación durante 2 minutos en 550 g de una solución al 10% p/p de glutaraldehído. La separación y el lavado de las microesferas se realizó en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

35 Se almacenaron 550 g de las microesferas en 550 g de una solución acuosa estéril de maltodextrina al 10% antes de la liofilización en la solución de almacenamiento de maltodextrina:

Se obtuvieron 168,25 g de un polvo seco suelto de microesferas de 400-600  $\mu\text{m}$  de diámetro con un recuento celular de  $8,5 \times 10^{10}$  ufc, correspondiente a  $1,4310^{13}$  ufc en los 168,25 g.

40 Como conclusión, una microcápsula de alginato-gelatina con un revestimiento reticulado tiene un número sustancialmente elevado de microorganismos supervivientes, esencialmente para un proceso viable comercial ya que la relación de probióticos mantenidos vivos es de 16,25, dando lugar a un polvo que contiene  $8,9 \times 10^{10}$  ufc (bastante mayor que las  $10^7$  ufc requeridas).

**Ejemplo 10**

Perlas de Gelatina-Goma Guar-CMC - probiótico liofilizado

45 Se prepararon microesferas de *Bifido bacterium lactis* en una matriz de gelatina recubierta con goma guar y carboximetilcelulosa como sigue:

Se dispersaron 100 g de polvo de Bifidobacterium lactis liofilizado en 200 g de solución de NaCl estéril (NaCl al 0,85% p/p) para preparar una suspensión de Bifidobacterium lactis.

Se añadieron 150 g de una solución estéril de gelatina al 30% p/p a 300 g de una suspensión de Bifidobacterium lactis a 37°C.

- 5 Se realizó un moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 1000 µm por solidificación en triglicéridos de caprílico/cáprico a 5°C. La separación y el lavado de las microesferas se realizaron en una solución de NaCl al 0,85%.

10 Se agitaron 400 g de microesferas durante 10 minutos en 400 g de una solución acuosa de goma guar al 5% p/p para revestir las microesferas con goma guar y la separación y el lavado de las microesferas se llevó a cabo en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se agitaron 400 g de microesferas durante 10 minutos en 400 g de una solución acuosa de carboximetilcelulosa al 2% p/p para revestir las microesferas con CMC y la separación y el lavado de las microesferas se llevaron a cabo en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

15 Se almacenaron 400 g de microesferas en 400 g de una solución acuosa estéril de glicerol al 4% p/p antes de liofilizar en la solución de almacenamiento de glicerol:

Se obtuvo un polvo seco suelto de microesferas de 800-1200 µm de diámetro con un recuento de células de  $2,9 \times 10^{11}$  ufc siendo superior al valor de  $10^7$  requerido para dicha aplicación.

Se demostró la conclusión de que el revestimiento de carboximetilcelulosa con glicerol como fuente nutritiva durante la liofilización produce tasas de supervivencia muy altas en una microesfera entérica.

## 20 Ejemplo 11

Perlas de Alginato-Quitosano-Gelatina con probióticos liofilizados

Se prepararon microesferas de L. rhamnosus en una matriz de alginato revestida con quitosano y gelatina como sigue:

25 Se dispersaron 200 g de polvo de L. rhamnosus liofilizado ( $8,8 \times 10^{11}$  ufc) en 400 g de una solución de NaCl estéril (NaCl al 0,85% p/p) para formar una suspensión de L. rhamnosus ( $1,76 \times 10^{14}$  ufc de L. rhamnosus comprometido).

Se añadieron 100 g de una solución de alginato estéril al 10% a 600 g de la suspensión de L. rhamnosus.

Se realizó el moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 1000 µm por solidificación en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2% p/p. La separación y el lavado de las microesferas se llevó a cabo en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

30 Se agitaron 600 g de microesferas durante 10 minutos en 1200 g de una solución acuosa de 1% p/p de quitosano y la separación y el lavado de las microesferas se llevó a cabo en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se agitaron 600 g de microesferas adicionalmente durante 1 h en 1200 g de una solución de gelatina al 5% p/p y la separación y el lavado de las microesferas se llevó a cabo en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

35 Se almacenaron 600 g de microesferas en 600 g de una solución acuosa estéril de glicerol al 4% p/p antes de liofilizar en la solución de almacenamiento de glicerol:

Se obtuvieron 238,8 g de un polvo seco suelto de microesferas de 800-1200 µm de diámetro con un recuento celular de  $2,9 \times 10^{11}$  ufc, correspondiente a un total de  $0,69 \times 10^{14}$  ufc (rendimiento de probióticos vivos = 39,3%).

Como conclusión, se demostró que el revestimiento de quitosano con glicerol como fuente nutritiva durante la liofilización produce tasas de supervivencia muy altas en una microesfera entérica.

## 40 Ejemplo 12

Perlas de alginato con probióticos liofilizados

Se dispersaron 75 g de polvo de L. rhamnosus liofilizado en 250 g de una solución estéril de 3,6% p/p de polisacárido y 0,85% p/p de NaCl para formar una suspensión de L. rhamnosus.

Se añadieron 175 g de una disolución de alginato estéril al 5% p/p a 325 g de la suspensión de L. rhamnosus.

45 Se realizó el moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de 1100 µm por solidificación en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2% p/p. La separación y el lavado de las microesferas se lleva a cabo en una solución de NaCl al 0,85% p/p.

Se almacenaron 450 g de microesferas en 450 g de una solución acuosa estéril de glucosa al 5% p/p.

El recuento realizado como se ha descrito anteriormente reveló  $8,1 \cdot 10^9$  ufc/g de microesferas en peso húmedo. Un contenido de  $1,87 \cdot 10^{11}$  ufc/g estaba presente en el polvo liofilizado, en lugar de los  $45 \cdot 10^{11}$  declarados. Como el polvo liofilizado de partida representaba el 15% del peso total de las microesferas húmedas, este contenido corresponde a  $(8,1 \cdot 10^9 \times 100) / 15 = 5,4 \cdot 10^{10}$  ufc/g de polvo equivalente.

### Ejemplo 13

Perlas de alginato con Bifidobacterium lactis liofilizado

Se prepararon las siguientes mezclas:

- 7,5% de B. lactis (Bifido 300 B - polvo probiótico liofilizado Bif. Lactis)
- 10 - alginato al 1,5% a una concentración de 5% p/p
- Solución de NaCl al 89,5% a una concentración de 0,85% p/p
- 1,5% de uno de los siguientes aditivos utilizados como portadores
  - Mezcla de refuerzo = pululano
  - Almidón 1
  - 15 - Almidón 2
  - Dextrina
  - Na CML Celulosa (CMC)
  - Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)
  - Celulosa microcristalina (MC)
- 20 Se realizó el moldeo por goteo con una unidad de desprendimiento de flujo laminar para producir microesferas de  $1100 \mu\text{m}$  mediante solidificación en una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 4% p/p. La separación y el lavado de las microesferas se lleva a cabo en una solución de NaCl al 0,9% p/p.
- 25 Las microesferas se colocaron en placas directamente (perlas frescas) para el recuento de UFC o se congelaron en nitrógeno a  $-196^\circ\text{C}$  y después se liofilizaron a  $-50^\circ\text{C}$  antes de ser puestas en placas (perlas secas) para el recuento de UFC. Después de la incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 72 h, se determinó las UFC para perlas frescas y perlas secas, como se ha descrito anteriormente.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla siguiente.

Muestra	Forma	Recuento de células (promedio UFC/g)
Mezcla de refuerzo	Fresca	$3,43 \times 10^{14}$
	Seca	$3,3 \times 10^{11}$
HPMC	Fresca	$1,9 \times 10^{12}$
	Seca	$8,2 \times 10^{11}$
CMC	Fresco	$1,5 \times 10^{10}$
MC	Fresco	$3,7 \times 10^{09}$
Almidón 1	Fresco	$4,1 \times 10^{09}$
Almidón 2	Fresco	$3,8 \times 10^{09}$
Dextrina	Fresco	$2,9 \times 10^{06}$

## ES 2 627 858 T3

El recuento de UFC realizado como se ha descrito anteriormente revela que la Mezcla de Refuerzo (formas frescas y secas), HPMC (formas frescas y secas), CMC (forma fresca), MC (forma fresca), Almidón 1 (forma fresca) y Almidón 2 (forma fresca) utilizados como portadores (1,5% de la mezcla) aseguran una viabilidad de *B. lactis* (7,5% de la mezcla) de al menos  $10^{09}$  UFC/gramo.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de polvo seco que comprende partículas sólidas que contienen:

a) un microorganismo probiótico vivo,

b) una fase portadora en la que dicho microorganismo probiótico vivo está encapsulado, comprendiendo dicha fase portadora al menos una sustancia elegida entre el grupo constituido por alginato, quitosano, pectina, pululano, gelatina, carragenano, agar, comprendiendo dicha fase portadora una composición entérica y comprendiendo además al menos una fuente nutritiva que comprende al menos un compuesto elegido entre el grupo que consiste en un monosacárido, un polisacárido, un aminoácido, un péptido, una proteína, una vitamina, un extracto de levadura, una sal halógena de un metal alcalino o alcalinotérreo, un antioxidante, glicerol, acetato de cinc, cloruro de zinc, lactato de zinc, ácido ascórbico, ácidos cítricos o un aceite vegetal y grasa de leche,

caracterizado por que dicha composición de polvo seco presenta una distribución de tamaño de partícula entre  $n$  y  $(n+400)$   $\mu\text{m}$ , en donde  $n$  está comprendido entre 100 y 10000  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 300 y 5000  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 400 y 1000  $\mu\text{m}$  y por que dichas partículas sólidas son partículas esféricas que comprenden de 50 a 80% de dicho microorganismo probiótico vivo y que dicha composición en polvo secada se puede obtener mediante moldeo por goteo en flujo laminar.

2. Partículas sólidas en polvo secas según la reivindicación 1, en las que dicha distribución de tamaños de partículas  $d_{80}$  está comprendida entre  $n$  y  $(n + 200)$   $\mu\text{m}$ , en donde  $n$  está comprendido entre 100 y 10000  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 300 y 5000  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 400 y 1000  $\mu\text{m}$ .

3. Partículas sólidas en polvo secas según las reivindicaciones 1 y 2, en las que cada partícula sólida presenta una composición homogénea.

4. Partículas sólidas en polvo secas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en las que dicha al menos una sustancia comprendida en la fase portadora es un hidrocoloide.

5. Partículas sólidas en polvo secas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en las que dicha fuente nutritiva está presente en una cantidad de 0,1 a 10% en peso, preferiblemente de 1 a 5% en peso con respecto al peso total de las partículas sólidas en polvo secas.

6. Partículas sólidas en polvo secas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprenden además un revestimiento externo elegido entre el grupo que consiste en alginato, quitosano, pectina, pululano, gelatina, carragenano, agar, celulosa, hemicelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa y sus mezclas.

7. Una composición entérica que comprende dichas partículas sólidas en polvo secas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un vehículo adecuado.

8. La composición entérica según la reivindicación 7, en la que dicho vehículo adecuado es un revestimiento entérico elegido entre el grupo que consiste en etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y carboximetilcelulosa.

9. La composición entérica según la reivindicación 7 u 8, en forma de una cápsula de gelatina de gel blando o duro, tableta, bolsita y similares.

10. Un procedimiento para la fabricación de una composición en polvo seca que comprende partículas sólidas bajo la forma de partículas esféricas que comprende las siguientes etapas:

- mezclar una preparación de microorganismos probióticos vivos y una fase portadora que comprende al menos una sustancia elegida entre el grupo constituido por alginato, quitosano, pectina, pululano, gelatina, carragenano, agar, comprendiendo dicha fase portadora al menos una fuente nutritiva que comprende al menos un compuesto elegido entre el grupo que consiste en un monosacárido, un polisacárido, un aminoácido, un péptido, una proteína, una vitamina, un extracto de levadura, una sal halógena de un metal alcalino o alcalinotérreo, un antioxidante, glicerol, acetato de zinc, cloruro de zinc, lactato de zinc, ácido ascórbico, ácidos cítricos o un aceite vegetal y grasa de leche,

- extruir la mezcla de dichos microorganismos probióticos vivos y dicha fase portadora para producir microesferas, y

- recoger dichas microesferas en un baño que contiene una solución de solidificación,

y caracterizado por que dicha etapa de extrusión se realiza a una velocidad predeterminada de flujo de líquido de 0,2 a 5 m/s a través de al menos una boquilla vibradora en un moldeo por goteo de flujo laminar para obtener dichas partículas en polvo secas bajo la forma de partículas esféricas, teniendo dicha boquilla vibradora una frecuencia de vibración en el intervalo de 1 a 20000 Hz y una amplitud de vibración de al menos 0,5  $\mu\text{m}$ .

11. El procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que el moldeo por goteo de flujo laminar de al menos una boquilla vibradora se obtiene con un soporte vibratorio.

12. El procedimiento según las reivindicaciones 11 y 12, caracterizado por que la vibración de la boquilla vibratoria está orientada en una dirección axial o lateral con respecto al flujo para generar gotitas.
13. El procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que dichas partículas esféricas producidas tienen un diámetro en el intervalo de 100 a 10000  $\mu\text{m}$ .
- 5 14. El procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que dos líquidos se extruyen en un flujo laminar con uno o varios sistemas de boquillas dobles que comprenden una boquilla interior y una boquilla exterior.
15. El procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que comprende una etapa adicional de revestimiento externo.