

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 302**

51 Int. Cl.:

A61K 35/644 (2015.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61K 31/59 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2015 E 18194526 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3446695**

54 Título: **Proceso mejorado para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas viables y una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas viables que tienen un periodo de conservación largo**

30 Prioridad:

08.09.2014 GB 201415862

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

25.06.2020

73 Titular/es:

AYANDA GMBH (100.0%)

**Am Hünengrab 20
16928 Pritzwalk, DE**

72 Inventor/es:

PHILIPP, JESSICA

74 Agente/Representante:

BUENO FERRÁN , Ana María

ES 2 769 302 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

Proceso mejorado para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas viables y una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas viables que tienen un periodo de conservación largo

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas y a un proceso mejorado para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas.

Antecedentes de la invención

Para las cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas es una práctica común mencionar el número de bacterias probióticas en el momento de la fabricación o al final del periodo de almacenamiento. En la técnica anterior se han descrito diversos intentos para producir cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas viables con un período de almacenamiento largo, por ejemplo como se resume en la WO 2012/021432.

La WO 2012/021432 describe un proceso de fabricación de una cápsula de gelatina blanda que contiene bacterias probióticas microencapsuladas que son estables a temperatura ambiente durante al menos 24 meses. La solución es proporcionar las bacterias probióticas con al menos un revestimiento que comprende al menos un lípido vegetal con un punto de fusión entre 35°C y 75°C.

Los ensayos de productos disponibles actualmente en el mercado demostraron que, en general, en los productos analizados, el nivel de actividad del agua era relativamente alto, por encima de 0,3. A menudo, las propiedades barrera al agua del sistema de envasado aplicado eran bajas, por ejemplo un blíster de aluminio/PVC y que, combinado con un material desecante no activo presente, después de un cierto periodo de tiempo, tiene un efecto perjudicial sobre el número de bacterias viables en los productos.

La CA 2 675 892 describe el envasado de cápsulas de gelatina blanda en un recipiente que se puede cerrar herméticamente en cuyas paredes interiores se embebe un absorbente y al menos un formador de canales, al menos sobre parte de su superficie. Ejemplos de compuestos sensibles a la humedad presentes que preferentemente están presentes en las cápsulas de gelatina blanda son vitaminas y cultivos probióticos. Los ejemplos de la CA 2 675 892 muestran datos solo para vitaminas. La US 2012/107395 describe una cápsula de gelatina blanda que comprende una cubierta exterior que comprende gelatina y una carga que comprende un probiótico y un desecante.

Ninguno de los documentos mencionados anteriormente describe o apunta al proceso de la presente invención para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas viables ni a cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas viables.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método de acuerdo con las reivindicaciones para producir y almacenar una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas, proceso que se ha mejorado mediante la optimización del proceso de producción para minimizar la pérdida de células viables durante la producción.

Las bacterias probióticas son microorganismos vivos y esto puede ser un desafío durante la producción y formulación de formas de dosificación finales. Las bacterias probióticas son especialmente sensibles a la temperatura, al contenido de humedad y a otros ingredientes en una matriz de formulación.

El uso de una temperatura de rellenado baja y, de forma correspondiente, usando una gelatina con menor punto de gelificación y de fusión que convencionalmente garantiza la supervivencia de las bacterias probióticas durante la producción. La temperatura de la junta (para rellenar y ayudar al cierre hermético) y la temperatura de la caja del esparcidor (para conformar la gelatina en una lámina adecuada para entrar en los rodillos del troquel) se deben ajustar en consecuencia. Se debe evitar la tensión mecánica.

Además, el envase de las cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas debería optimizarse controlando cuidadosamente la actividad del agua durante el almacenamiento.

Es bien sabido por el experto en la materia que la supervivencia de las bacterias probióticas se mejora con una actividad baja del agua. Sin embargo, una cápsula de gelatina blanda se volverá quebradiza y tendrá pérdidas si la actividad del agua es demasiado baja. Por tanto, la actividad óptima del agua constituye un delicado equilibrio entre la supervivencia de las bacterias probióticas y las cápsulas de gelatina blanda intactas. Se ha encontrado que la actividad del agua debería ser preferentemente de como máximo 0,2 para el almacenamiento a temperatura ambiente, tal como 25 °C.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no revestidas, comprendiendo el método mezclar las bacterias probióticas no revestidas con al menos un aceite para obtener un material de carga a una temperatura en el intervalo de 5 a 15°C, encapsular el material de carga en una cápsula de gelatina blanda hecha de una gelatina con un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28°C; y secar la cápsula de gelatina blanda en una o más etapas a una temperatura de como máximo 25°C hasta una actividad del agua máxima de 0,25.

La actividad del agua (a_w) se define como la presión de vapor parcial del agua en una composición a una temperatura dada dividida entre la presión de vapor parcial del agua en estado estándar a la misma temperatura. Así, la actividad del agua actúa como una medida de la cantidad de agua libre (es decir, no enlazada) en una composición. Se puede calcular como:

$$a_w = p/p_0$$

donde p es la presión de vapor parcial del agua en la composición y p_0 es la presión de vapor del agua pura la misma temperatura.

Alternativamente, la actividad del agua se puede calcular como:

$$a_w = I_w x_w$$

donde I_w es el coeficiente de actividad del agua y x_w es la fracción molar de agua.

Los dos cálculos anteriores que definen a_w son equivalentes.

La actividad del agua puede medirse por métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo empleando un instrumento Hygrolab de Rotronic.

Una cápsula de gelatina blanda se define como una cubierta a base de gelatina blanda que rodea un material de carga. La expresión "material de carga" se refiere a la totalidad de los materiales encerrados dentro de la cubierta. Como tal, el material de carga puede ser, por ejemplo, una solución homogénea o una suspensión.

El uso de cápsulas de gelatina blanda en la administración de suplementos dietéticos o de productos farmacéuticos es amplio. Las cápsulas de gelatina blanda habituales se producen principalmente mediante el denominado proceso de Encapsulación con Troquel Giratorio (inventado por Robert Pauli Scherer), en el que se producen dos cintas semisólidas planas de material de cubierta a base de gelatina a partir de una solución de gelatina líquida, a continuación las dos cintas se ponen juntas en un conjunto de troqueles giratorios (rodillos de troquel), los cuales cortan la cinta de gelatina, a la vez que sellan las dos partes conjuntamente. Simultáneamente, la adición precisa de la cantidad correcta de material de carga líquido a través de la cuña de llenado expande la cinta de gelatina en los bolsillos del troquel, antes del sellado final de la cápsula de gelatina blanda. Después del sellado, la cápsula de gelatina, todavía demasiado blanda, se seca bien en un proceso en línea o sobre bandejas en atmósfera controlada para conseguir la dureza óptima de la cubierta.

El material de carga debe ser líquido a la temperatura de producción usada y también estable en las condiciones de producción, pero la flexibilidad de la composición del material de carga es grande. Los materiales de carga más comunes y fáciles de usar son puramente basados en aceites, tales como aceites de pescado o vitaminas liposolubles en un vehículo oleoso. La facilidad de encapsulación y la estabilidad del producto dependerán de cualquier interacción material de carga/cubierta, es decir, las sustancias que son solubles en agua interactuarán con el agua disuelta en la cubierta de gelatina blanda, alterando las características de la cubierta. Las suspensiones de sólidos en un vehículo oleoso también se pueden incorporar en una gelatina blanda y, además de los principios activos, se pueden añadir vehículos/agentes de suspensión para hacer una dispersión homogénea, antioxidantes para prevenir la oxidación del aceite y excipientes, si se considera apropiado. El tamaño de partícula de los sólidos en las suspensiones debería ser bajo, lo que se puede conseguir moliendo el material de carga antes de su encapsulación.

En el material de carga puede incluirse cierta cantidad de sólido, tal como bacterias probióticas secas, pero para mantener la viscosidad del material de carga en un nivel en que es posible producir la gelatina blanda, la cantidad de sólido está limitada a aproximadamente un 30% (p/p) del material de carga, preferentemente de un 10 a un 25%, por ejemplo de un 15 a un 20%. Aumentar más la cantidad de sólido significará aumentar la cantidad de material de carga, con ello el tamaño de la cápsula. Esto solo se puede hacer hasta cierto punto, de lo contrario, las dimensiones de la cápsula de gelatina blanda serán demasiado grandes como para ser tragada por una persona. Generalmente, las cápsulas de gelatina blanda tienen un peso en el intervalo de 0,05 a 2,0 g, preferentemente de

0,5 a 1,5 g, por ejemplo de 0,7 a 1,0 g. La mayoría de las veces, las cápsulas de gelatina blanda se definen como un tamaño (por ejemplo 10 oval, 12 oval, etc., u oblonga 4, 6, etc.).

Así, con el fin de obtener una cápsula de gelatina blanda que comprenda bacterias probióticas con un periodo de almacenamiento largo, se tiene que garantizar un alto grado de supervivencia de las bacterias viables durante el proceso de producción y esta alta cantidad se debe mantener mediante el control cuidadoso de la actividad del agua de las cápsulas de gelatina blanda durante el almacenamiento en estantería después de la producción y durante una o más etapas iniciales de secado.

El inventor se dio cuenta de que era necesaria una mejora sustancial del proceso de producción para minimizar la pérdida de bacterias probióticas durante el proceso de producción mediante el uso de una temperatura más baja del material de carga que la usada convencionalmente. La preparación y el almacenamiento del material de carga es la etapa operativa que más tiempo lleva, por lo que las bacterias probióticas son más vulnerables. Se observó que, cuando se usa una temperatura de relleno más baja que convencional, también son necesarios ajustes en las condiciones de proceso del resto del procesamiento para adaptar la temperatura más baja del material de carga.

Lo más importante, la gelatina usada se debe adaptar a una temperatura baja del material de carga. La gelatina debe tener un punto de gelificación más bajo y un punto de fusión más bajo que los convencionales para que la gelatina permanezca lo suficientemente blanda durante el rellenado en frío. Esta blandura es importante para conseguir un sellado adecuado mediante la actuación final del rodillo de troquelado; un mal sellado dará lugar a cápsulas que pierden.

El inventor se dio cuenta de que, generalmente, la gelatina de pescado tiene puntos de fusión inferiores a los de las gelatinas de mamífero (Karim y Bhat, 2009). En general, las distintas gelatinas de pescado conocidas tienen puntos de gelificación de entre 8 y 25°C y puntos de fusión de 11-28°C. Los valores más bajos son aquellos de las gelatinas de peces de agua fría, que rara vez tienen resistencias de Bloom suficientes para la producción de gelatina blanda. La resistencia de Bloom generalmente empleada para la producción de gel blanda suele estar entre 150-200 bloom (Podczek y Jones, 2004), pero, basándose en la experiencia de los presentes inventores, la resistencia de Bloom podría estar entre 100-300 bloom. Los puntos de gelificación típicos de las gelatinas bovinas y porcinas oscilan entre 20 y 25°C y los puntos de fusión típicos entre 28 y 31°C, presentando la gelatina porcina los puntos de gelificación y de fusión más elevados. Las gelatinas de pescado generalmente se derivan de peces de agua fría (por ejemplo bacalao, eglefino, merluza, abadejo, brosmio, lenguado, platija, rodaballo, mero, solla, lumpo, corvinón ocelado, lucio, trucha y salmón) o peces de agua caliente (por ejemplo tilapia, tiburón o carpa). Éstas se diferencian en sus puntos de gelificación y fusión, a menudo teniendo las gelatinas de peces de agua fría (CWFGs) puntos de gelificación inferiores a 15°C, generalmente de 4 a 12°C, y puntos de fusión por debajo de 22°C, generalmente de 12 a 19°C, mientras que las gelatinas de pescados de agua caliente (WWFGs) a menudo tienen puntos de gelificación superiores a 15°C, generalmente de 18 a 24°C y puntos de fusión en el intervalo de 22 a 32°C. Para los presentes fines, se debe entender que los peces de agua fría se refieren a cualquier especie de pez que vive predominantemente en agua a 18°C o por debajo.

El presente proceso usa una gelatina que tiene un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28°C. Preferentemente, el punto de fusión está en el intervalo de 19 a 27°C, incluso más preferentemente en el intervalo de 21 a 26°C, con total preferencia en el intervalo de 23 a 25°C.

El presente proceso preferentemente emplea una gelatina de pescado con una resistencia de Bloom en el intervalo de 100-300, tal como de al menos 180, al menos 190, preferentemente de 200-285 o de 200-250 bloom. Sin embargo, una gelatina bovina adecuada que cumpliera los parámetros anteriores también podría ser adecuada si se ajusta a los parámetros necesarios para su uso en el método de producción de cápsulas de gelatina blanda a baja temperatura de acuerdo con la presente invención.

Opcionalmente la gelatina con un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28°C puede ser una mezcla de gelatinas de diferente origen (por ejemplo una mezcla de gelatina de peces de agua fría y gelatina de peces de agua caliente, una mezcla de gelatina de peces y gelatina bovina, o una mezcla de gelatina de peces y gelatina porcina), siempre que la mezcla total de gelatina mantenga un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28°C, preferentemente en el intervalo de 19 a 27°C, incluso más preferentemente en el intervalo de 21 a 26°C, con total preferencia en el intervalo de 23 a 25°C, y/o una resistencia de Bloom en el intervalo de 100-300, tal como 200-285 bloom. Sin embargo, la gelatina usada preferentemente está esencialmente libre de gelatinas de mamífero, es decir, no contiene más de un 1%, preferentemente un 0% en peso con respecto al peso total de gelatina. La gelatina particularmente preferente tiene un contenido de gelatina de peces de al menos un 90% en peso, más preferentemente al menos un 95% en peso, especialmente un 100% en peso.

Como se ha indicado anteriormente, las gelatinas de peces de agua fría tienden a tener valores de Bloom bajos o inexistentes y, por tanto, no siempre son adecuadas para la producción de gelatina blanda (por ejemplo debido a una escasa resistencia mecánica y/o a una estabilidad térmica deficiente). Sin embargo, se pueden fabricar cápsulas de gelatina blanda compuestas por una cantidad significativa de gelatinas de peces de agua fría usando un equipo de encapsulación convencional si también se usa una cantidad de gelatina de peces de agua caliente. Mezclas

adecuadas de gelatinas de peces de agua fría y de agua caliente se describen en la WO 2009/095670. Así, por ejemplo, en el método y la cápsula de la presente invención, la gelatina puede ser una mezcla de gelatinas que incluye al menos un 40% en peso de gelatina de peces de agua fría (con respecto al peso total de la gelatina), por ejemplo de un 20 a un 80% en peso, de un 35 a un 70% en peso, de un 40 a un 65% en peso o al menos de un 55% en peso; o la gelatina puede comprender gelatina de peces de agua fría y de agua caliente en una proporción en peso de 99,9:0,1 a 35:65, en especial de 65:35 a 40:60, con la condición de que la mezcla total de gelatina mantenga un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28°C y/o una resistencia de Bloom en el intervalo de 100-300.

Opcionalmente, la gelatina empleada en la presente invención puede comprender además una carragenina (por ejemplo kappa-carragenano), por ejemplo en un contenido de un 0,01 a un 2% con respecto a la gelatina en base a sólidos secos, en especial de un 0,05 a un 1% en peso, en particular de un 0,06 a un 0,5 % en peso. Para mejorar la gelificación, también se puede incluir una sal de metal fisiológicamente tolerable (por ejemplo una sal de potasio tal como cloruro de potasio para el kappa-carragenano). Típicamente, ésta estará en una concentración en la gelatina de hasta 50 mM, especialmente de 10 a 30 mM.

Las gelatinas adecuadas para su uso en las cápsulas y métodos de la invención se pueden definir, por supuesto, en términos tanto de resistencia de Bloom como de punto de fusión. Así, se contemplan gelatinas que tienen cualquier combinación de las resistencias de Bloom y puntos de fusión mencionados anteriormente, por ejemplo una gelatina con un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28°C y una resistencia de Bloom de 100 a 300 bloom.

La cubierta de la cápsula de gelatina blanda puede contener, además de gelatina, ingredientes adicionales, tales como plastificante(s), agua, colorante(s), sabor(es), opacificante(s) y/o conservante(s), todos ellos ingredientes bien conocidos por los expertos en la materia (véase también Stanley, J.P., "Part Two. Soft Gelatin Capsules", en *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, Lachmann, L., *et al.*, eds. Lea & Febiger, Philadelphia, PA, pp. 398-412 (1986)).

Ejemplos de plastificantes incluyen glicerol, sorbitol y mezclas de los mismos. Cuando está presente, el plastificante puede estar presente en una cantidad de hasta un 35% en peso, por ejemplo de un 5 a un 35% en peso o de un 15 a un 30% en peso de la gelatina.

Una bacteria probiótica se define como un microorganismo vivo que, cuando se administra en cantidades adecuadas, puede beneficiar la salud del huésped (FAO/OMS 2001).

En condiciones de carencia nutritiva, ciertas bacterias como *Bacilli* y *Clostridia* son capaces de formar endoesporas, una estructura inactiva, resistente y no reproductora. Las endoesporas pueden sobrevivir sin nutrientes. Son resistentes a la radiación ultravioleta, a la desecación, a la alta temperatura, a la congelación extrema y a los desinfectantes químicos. Algunos productos probióticos contienen *Bacilli*. Como es evidente de lo anterior, el método de la presente invención, sin embargo, no es necesario para que las bacterias formadoras de esporas sobrevivan al proceso de encapsulación. Así, en una realización preferente, las bacterias usadas en las cápsulas de gelatina blanda de la invención son bacterias no formadoras de esporas.

El material de carga comprende al menos una especie de una bacteria probiótica no formadora de esporas seca no revestida. Las bacterias se pueden secar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de tales bacterias probióticas son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* y más preferiblemente al menos una especie seleccionada del grupo consistente en *Bifidobacterium* spp., *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbreuckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii* y *Streptococcus thermophilus*.

Son cepas particularmente preferentes *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, por ejemplo las cepas depositadas como DSM 15954 (comercializadas por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como BB-12®); ATCC 27536 y DSM 10140, respectivamente; *Lactobacillus acidophilus*, por ejemplo, la cepa depositada como DSM 13241 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como LA-5®), *Lactobacillus rhamnosus*, por ejemplo, la cepa depositada como ATCC 53103 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como LGG®), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, por ejemplo, las cepas depositadas como ATCC 55544, (comercializadas por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como L. casei 431®) y CCTCC M204012, respectivamente, *Lactobacillus reuteri*, por ejemplo, la cepa depositada como ATCC 55845 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como RC-14®), *Lactobacillus rhamnosus*, por ejemplo, la cepa depositada como ATCC 55826 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como GR-1®), *Lactobacillus paracasei*, por ejemplo, la cepa depositada como LMG-P-17806 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como F19®), *Streptococcus thermophilus*, por ejemplo, la cepa depositada como DSM 15957 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como TH-4®), y *Lactobacillus fermentum*, por ejemplo, la cepa depositada como NM02/31074 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como PCC®).

Se pueden usar combinaciones de varias especies o cepas de bacterias probióticas, es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o incluso más de las especies y cepas mencionadas anteriormente. En realizaciones preferentes, solo una, dos, tres, cuatro o cinco cepas diferentes están presentes en la cápsula de gelatina blanda de acuerdo con la invención.

- 5 Por el término "viable" se entiende que la célula está viva y es capaz de formar una colonia en una placa de Petri durante el vertido o la dispersión. El número de bacterias probióticas viables se determina como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante métodos de vertido o esparcido con incubación bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de la o las cepas probióticas. Con este método se contarán las células capaces de crecer y formar colonias. Cuando en la presente memoria y reivindicaciones se proporciona un número, se debería
10 entender como UFC/cápsula de gelatina blanda, a menos que el contexto lo indique de otro modo.

- La terminología usada para describir las formulaciones de micropartículas en ocasiones puede ser inconsistente y confusa para los lectores que no están familiarizados con el campo. El término "micropartícula", tal como se usa aquí, se refiere a una partícula con un diámetro de 1-1.000 µm, independientemente de la estructura interior o
15 exterior precisa y la subcategoría de "microcápsulas" se aplica a micropartículas que tienen un núcleo rodeado por un material que es claramente diferente al del núcleo. El núcleo puede ser sólido, líquido o incluso gaseoso.

- Los materiales microencapsulados tienen un ingrediente activo núcleo rodeado de un material que es claramente diferente. Una sustancia se puede microencapsular por diversas razones. Como ejemplos se pueden incluir la
20 protección del material reactivo de su entorno, la manipulación segura y conveniente de materiales que de otro modo son tóxicos o nocivos, el enmascaramiento del sabor, medios para propiedades de liberación controlada o modificada, medios para manejar líquidos tales como sólidos, la preparación de polvos de libre flujo y para modificar las propiedades físicas de un medicamento.

- 25 La WO2012/021432 describe bacterias probióticas microencapsuladas y define el término "microencapsulado" como revestido con una composición. De forma consistente con esto, la expresión "no revestido" usada en la presente descripción y en las reivindicaciones se refiere a que las bacterias probióticas no están microencapsuladas ni revestidas.

- 30 Una etapa de revestimiento puede conducir a una pérdida de células durante el proceso de revestimiento y a un perfil de liberación diferente al de las células naturales no revestidas, y también conducirá a una menor concentración de bacterias probióticas por la adición de material de revestimiento a la formulación.

- Como es evidente cuando se comparan los resultados de los ejemplos de la presente invención con los resultados de los ejemplos en la WO2012/021432, la presente invención proporciona una mejor supervivencia de las bacterias probióticas durante su almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente en comparación con los resultados descritos en la WO2012/021432 incluso sin usar un revestimiento para las bacterias probióticas. Por tanto, las bacterias usadas en la presente invención no están revestidas, es decir, no están microencapsuladas.

- 40 Se puede añadir un excipiente a las bacterias probióticas, por ejemplo con el fin de obtener una mezcla seca con una concentración estandarizada de bacterias probióticas. Las presentes realizaciones preferentes tienen una concentración final de un 40-100% (p/p) en la mezcla de uno o más ingredientes activos tales como bacterias probióticas, por ejemplo de un 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, siendo el resto excipiente(s) tales como maltodextrina. Una concentración de un 100% (es decir, solo bacterias secas) es aquí preferente para tener una concentración de
45 bacterias y reducir la cantidad de sólidos a añadir al aceite – la adición de demasiados sólidos hace que la suspensión sea demasiado viscosa.

- Para hacer una suspensión de las bacterias secas para el material de carga, se puede añadir un agente de suspensión, por ejemplo un aceite vegetal hidrogenado/parcialmente hidrogenado, un monoglicérido o una mezcla de los mismos, lecitina, cera o dióxido de silicio, en un intervalo de un 1-10% (p/p) del material de carga total, tal como un 1,5-7,5%, por ejemplo un 1,5-5% (p/p). El uso de un agente de suspensión ayuda en la preparación de un material de carga homogéneo evitando la sedimentación de las bacterias probióticas, incluso aunque las bacterias se añadan en forma de polvo seco.

- 55 Básicamente, todos los aceites comestibles pueden ser adecuados para la presente invención. El aceite puede ser considerado como un ingrediente activo o sólo como un aceite vehículo, tal como MCT (triglicéridos de cadena media), aceite de soja o aceite de girasol. Aceites particularmente preferentes para su uso de acuerdo con la presente invención son aceites que contienen ácidos grasos omega 3, tales como ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), aceite de pescado y aceite krill, y combinaciones de EPA, DHA y otros ácidos
60 grasos omega 3, y aceites vegetales que proporcionan, por ejemplo, DHA, EPA, ácido alfa-linolénico (ALA) o ácido gamma linolénico (GLA), como aceite de colza, aceite de borraja/aceite de onagra, aceite de linaza, aceite de perilla, o aceite de ajo.

- Fuentes de DHA, EPA y ALA incluyen, pero no se limitan a, aceites de pescado, levaduras, algas u otros microorganismos o fuentes monocelulares y aceites vegetales, principalmente aceite de linaza, soja y colza. Las
65 fuentes de GLA incluyen, pero no se limitan a, aceite de onagra/aceite de borraja.

Los aceites adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención también incluyen cualquier aceite modificado de origen vegetal, marino o mamífero, tales como, sin limitarse a, aceites hidrogenados, diacilgliceroles, monoacilgliceroles, triglicéridos de cadena media (MCT) y combinaciones de los mismos.

- 5 En el método de la presente invención se puede usar al menos un aceite, tal como uno, dos, tres, cuatro o más de los aceites mencionados anteriormente.

Como se indicado, el método de la presente invención implica mezclar las bacterias probióticas no revestidas con al menos un aceite para obtener un material de carga a una temperatura en el intervalo de 5 a 15°C. Por tanto, el
10 aceite (o la mezcla de aceites, donde se usan dos o más aceites) debería ser líquido a temperaturas en el intervalo de 5 a 15°C. Esto significa que el aceite (o mezcla de aceites) debería tener un punto de fusión de no más de 15°C, por ejemplo un punto de fusión en el intervalo de 5 a 15°C o, preferentemente, un punto de fusión por debajo de 5°C.

Además de las bacterias probióticas, se podrían incluir en las cápsulas de gelatina blanda uno o más ingredientes
15 activos diferentes, por ejemplo uno, dos, tres, cuatro o más ingredientes activos seleccionados del grupo consistente en vitaminas, como vitamina A, D, E, K2, C, B2, B6, B12, biotina, niacina, ácido fólico; minerales, tales como zinc, selenio, cromo, cobre, calcio, cloruro; aceites vegetales, tales como aceite de colza, aceite de borraja/aceite de onagra, aceite de linaza, aceite de perilla, aceite de ajo; y extractos vegetales, tales como extracto/zumo de arándano, jalea real.

Composiciones aquí preferentes incluyen *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* como único ingrediente activo, tales como *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* en MCT; *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* y al menos un aceite omega-3, tales como *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* y ALA, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* y DHA, y
20 *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, DHA y EPA; así como combinaciones con otros ingredientes activos, por ejemplo *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, DHA, vitamina B6, ácido fólico y vitamina D3.

La mezcla del material de carga y su encapsulación en la cápsula de gelatina blanda se debería llevar a cabo en un ambiente de baja humedad. En el contexto de la presente invención, la expresión "entorno ambiente de baja
30 humedad" se refiere a un entorno con una humedad relativa (RH) inferior a un 50%. Preferiblemente, se refiere a un entorno con una humedad relativa inferior a un 45%. Más preferentemente, la humedad relativa está en el intervalo de 10%-40%, más preferentemente en el intervalo de 20-35%. Se puede conseguir una baja humedad con cualquier método conocido por el experto en la materia para reducir la humedad relativa, e incluye el uso de aire comprimido seco, enfriamiento, aire acondicionado y purga con un gas inerte, por ejemplo nitrógeno o argón. La purga con un gas inerte también reduce el estrés oxidativo tanto de las células bacterianas como de otros componentes del
35 material de carga.

Para garantizar la buena uniformidad del contenido en las cápsulas de gelatina blanda, es importante mantener las bacterias suspendidas uniformemente en el aceite. Una agitación suave y una elevada viscosidad, obtenida por ejemplo disminuyendo la temperatura, pueden ayudar a preparar incluso una suspensión de las bacterias. Por
40 "suave" se hace referencia a una agitación suficiente para ayudar a la formación de una suspensión homogénea sin dar lugar a fuerzas mecánicas que causen una ruptura significativa de las paredes celulares bacterianas. Los métodos adecuados para una agitación/mezcla suave incluyen, pero no se limitan a, agitación o bombeo de circulación. Los expertos en la materia podrán identificar otros métodos.

- 45 La tabla 1 resume las diferencias entre las condiciones usadas en el método de la presente invención y las condiciones generalmente utilizadas en este campo.

Tabla 1

Parámetros de producción para la producción de cápsulas de gelatina blanda probióticas		
Parámetro	Valores estándar	Valores de producción probiótica
Temp. de la caja de esparcidor	50 - 68°C	40 - 68°C
Temperatura de junta	28 - 48°C	28 - 36°C
Temperatura ambiente	18 - 22°C	Máx 20°C
Temperatura de rellenado	Ambiente o superior	8 - 15°C

- 50 La reducción de la temperatura del material de carga necesita el uso de una gelatina de punto de fusión más bajo y cambios en toda la cadena de producción. Lo más importante, la temperatura de la junta (implicada en el rellenado preciso y posterior sellado de la cápsula) se debe reducir para tener un buen sellado de la cápsula (sin volver a fundir la gelatina). El esparcidor asegurará que la masa de gelatina líquida se conforma en una película fina antes del proceso de encapsulación. La temperatura del esparcidor no calentará el material de carga y el límite superior de
55 temperatura puede ser tan alto como para una producción normal, aunque preferentemente es más bajo.

Como es evidente a partir de la tabla, la diferencia principal del proceso convencional es una temperatura de rellenado más baja. El Ejemplo 1 demuestra claramente que es importante disminuir la temperatura del material de carga a partir de la temperatura ambiente usada convencionalmente. De acuerdo con el método de la presente

invención, la temperatura de rellenado debería ser de 5-15°C, preferentemente de 6 a 14°C, con mayor preferencia de 7 a 13°C. También pueden ser factible de 8 a 12°C, tal como de 9 a 11°C.

La temperatura depende de la gelatina escogida. El uso de una gelatina de pescado de punto de fusión más bajo asegura que el proceso de sellado de la cápsula sea todavía eficaz; con el material de carga más frío y la junta, la gelatina todavía debe ser lo suficientemente blanda como para proporcionar un sellado sólido después del proceso de carga. Se contempla que la temperatura del esparcidor pueda ser tan baja como de 40°C para ajustarse a temperaturas ambientales y de rellenado más bajas, preferentemente en el intervalo de 45-55°C. En los ejemplos, la temperatura del esparcidor más baja usada fue de 51°C.

El tamaño de partícula de cualquier componente sólido del material de carga, es decir, las bacterias probióticas secas y el posible excipiente(s), tal como maltodextrina, es importante para asegurar la homogeneidad del producto, y permitir el presente proceso físico. El diámetro de partícula medio del componente que comprende las bacterias probióticas debería ser inferior a 400 micras, tal como de aproximadamente 150 a 250 micras, y preferentemente inferior a 200 micras. El tamaño de partícula para la producción suave a gran escala debe optimizarse y puede conseguirse mediante una reducción cuidadosa del tamaño de partícula mediante molienda o tamizado.

Debido al hecho de que las bacterias probióticas son microorganismos vivos delicados, es importante, sin embargo, minimizar el estrés de las bacterias probióticas/entrada de energía. Por tanto, para mantener el recuento viable de bacterias, en la medida de lo posible se deberían evitar procedimientos tales como molienda de los componentes sólidos del material de carga.

Las cápsulas de gelatina blanda de acuerdo con la invención deben ser firmes, pero no quebradizas ni frágiles. La calidad de la cubierta de cápsula después del secado se mide habitualmente en Newton (dureza de la cubierta), donde un valor de 9-11 N designa una dureza de la cubierta que no producirá pérdidas en las cápsulas. La dureza se puede determinar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo empleando un aparato de ensayo de dureza como digi test II Gelomat Härtemessgerät (fabricado por Bareiss Prüf-gerätebau GmbH) y otros dispositivos similares.

A temperatura ambiente (25°C/humedad relativa (HR) 60%), las cápsulas de gelatina blanda tienen un contenido en agua de aproximadamente un 4 a un 10% en peso. Si el contenido de agua es significativamente inferior, por ejemplo debido a un almacenamiento seco o secado excesivos, el resultado es el debilitamiento de la cubierta de la cápsula, con las consecuencias de un aumento de la fragilidad de la pared de la cápsula y formación de grietas. Así, en una realización, las cápsulas de gelatina blanda tienen un contenido en agua de al menos un 4% en peso.

Como será conocido por el experto en la materia, el contenido en agua se refiere al agua total. El contenido de agua total de la cápsula de gelatina blanda (agua libre + agua unida, es decir, agua unida en células y gelatina) se encontrará principalmente en la cubierta, ya que el material de carga de la cápsula hidrófobo no absorberá agua. Como se ha indicado anteriormente, el contenido de agua total en la cápsula puede estar en el intervalo de un 4-10%, pero el porcentaje total no es relevante para la supervivencia de las bacterias. El agua que se une estrechamente por ejemplo por hidratación de la gelatina, en la cubierta no se puede ser empleada o perjudicial para las bacterias y solo es necesario medir el agua que está libre para su uso (actividad del agua, a_w). La actividad del agua es, por definición, el agua libre o la no unida químicamente a un producto y se puede medir en toda la cápsula de gelatina blanda mediante un instrumento Hygrolab de Rotronic.

Las bacterias probióticas están latentes y, para mantenerlas en esta condición, es preferente una actividad del agua no superior a 0,2. Normalmente, una cápsula de gelatina blanda almacenada bajo las condiciones convencionales para la gelatina blanda podría crear un entorno con una actividad del agua (a_w) que es demasiado elevada para que las bacterias probióticas permanezcan latentes. Por tanto, es necesario un control cuidadoso del secado de la cápsula de gelatina blanda que comprende las bacterias probióticas y un control cuidadoso del agua atmosférica que puede volver a entrar en la gelatina blanda.

Durante el proceso de secado, el contenido en agua, por tanto la actividad del agua, alcanza un equilibrio mediante un proceso donde el desecante, si está presente, elimina el agua de la cubierta y cualquier agua del material de carga es absorbida por la cubierta. El equilibrio entre la cubierta, el material de carga y el desecante asegura una correcta actividad baja del agua, sin riesgo de que la cubierta se vuelva demasiado débil.

De acuerdo con el método de la presente invención, las cápsulas de gelatina blanda se secan en una o más etapas a una temperatura máxima de 25°C hasta una actividad del agua de como máximo 0,25. Para secar las cápsulas de gelatina blanda que comprenden las bacterias se puede aplicar cualquier método de secado conocido por el experto en la materia. En una realización preferente de la invención, las cápsulas se secan primero mediante secado en secadora, por ejemplo a aproximadamente 18 a 23°C durante aproximadamente 10 a aproximadamente 40 minutos, seguido por secado en bandeja a aproximadamente 19 a 22°C a una humedad del 15 al 22 % durante al menos aproximadamente 1 o 2 días a aproximadamente 14 días, hasta que se obtiene una dureza de cubierta de 9-11 N. Alternativamente al método mencionado anteriormente, se pueden usar túneles de secado en línea.

Después del proceso de secado inicial, las cápsulas de gelatina blanda secas se clasifican y se descartan las cápsulas que no se han rellenado apropiadamente, que tienen burbujas de aire o un tamaño no uniforme. A continuación las cápsulas de gelatina blanda con una calidad comprobada se pueden envasar en el envase final con una cantidad suficiente de desecante, como es conocido por el experto en la materia.

Sin embargo, es aquí preferente añadir una etapa de secado adicional en la que las cápsulas de gelatina blanda se mantienen como una masa en un material de envasado apropiado con una cantidad suficiente de desecante con el fin de obtener una reducción lenta, adicional, del contenido de agua, con una actividad de agua (a_w) objetivo de 0,2 medida sobre la cápsula de gelatina blanda completa. En esta fase, las cápsulas se mantienen a una temperatura de como máximo 25°C, preferentemente a una temperatura baja tal como 2-8°C, con el fin de minimizar la pérdida de bacterias antes del envasado en el envasado final.

Como es evidente a partir de lo mencionado anteriormente, no es necesario alcanzar la baja actividad del agua deseada antes del envasado en el envase final, pero la actividad del agua correcta antes del envasado en el proceso de envasado final prolongará la vida del desecante en el envasado final y, por tanto, también la duración de las cápsulas de gelatina blanda. Preferentemente, la actividad del agua debería ser $\leq 0,25$ antes del envasado final.

El tiempo necesario para alcanzar esta baja a_w puede estar en un intervalo de días, semanas a meses, por ejemplo 3 meses, pero, siempre y cuando las cápsulas se mantengan a una temperatura baja, la estabilidad no está comprometida.

El material envasado más adecuado para este envasado a granel es un material de envasado a base de papel de aluminio. Se pueden usar otros materiales de envasado, tales como polímeros de HDPE u otros polímeros de alta barrera frente al agua, pero entonces es necesario aumentar la cantidad de desecante para controlar la actividad del agua. Los desecantes adecuados incluyen cualquier desecante adecuado como sílice, desecantes basados en sílice, tamices moleculares y zeolitas.

En una realización aquí preferente de la invención, las cápsulas de gelatina blanda se secan después del reenvasado final (es decir, durante el almacenamiento en estantería) hasta una actividad del agua (a_w) máxima de 0,2, tal como 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22 o 0,23.

Las cápsulas obtenidas o que se pueden obtener con los métodos aquí descritos constituyen un aspecto adicional de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una cápsula de gelatina blanda que comprende una cubierta de cápsula y un material de carga, comprendiendo dicha cubierta de cápsula al menos una gelatina con un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28°C y/o con un valor de Bloom de 100 a 300, y comprendiendo dicho material de carga al menos una cepa de bacterias probióticas no formadoras de esporas no revestidas dispersadas en un aceite, donde dicha cápsula de gelatina blanda tiene una actividad de agua de como máximo 0,25.

La presente invención proporciona una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no formadoras de esporas secas no revestidas, comprendiendo la cápsula de gelatina blanda al menos $2 \cdot 10^9$ bacterias viables después de 12 meses de almacenamiento a 25°C, más preferentemente al menos $3 \cdot 10^9$ bacterias viables, con mayor preferencia al menos $4 \cdot 10^9$ bacterias viables, incluso con mayor preferencia al menos $5 \cdot 10^9$ bacterias viables.

Dentro del alcance de la invención está una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no formadoras de esporas secas no revestidas, comprendiendo la cápsula de gelatina blanda al menos $1 \cdot 10^9$ bacterias viables después de 24 meses de almacenamiento en estantería a 25°C, preferentemente al menos $2 \cdot 10^9$ bacterias viables, más preferentemente al menos $3 \cdot 10^9$ bacterias viables, incluso más preferentemente al menos $4 \cdot 10^9$ bacterias viables, con total preferencia al menos $5 \cdot 10^9$ bacterias viables.

Además, la invención proporciona una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no formadoras de esporas secas no revestidas, comprendiendo la cápsula de gelatina blanda al menos 4 UFC/g después de 12 meses de almacenamiento en estantería a 25°C, preferentemente al menos 5 UFC/g, más preferentemente al menos 6 UFC/g, incluso más preferentemente al menos 7 UFC/g, con total preferencia al menos 8 UFC/g.

Además, la invención proporciona una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no formadoras de esporas secas no revestidas, comprendiendo la cápsula de gelatina blanda al menos 2 UFC/g después de 24 meses de almacenamiento en estantería a 25°C, preferentemente al menos 3 UFC/g, más preferentemente al menos 4 UFC/g, incluso más preferentemente al menos 5 UFC/g, con total preferencia al menos 6 UFC/g.

Como es evidente a partir de los resultados proporcionados en los ejemplos, las cápsulas de gelatina blanda preparadas con el método de la presente invención son muy estables.

El uso de los términos "un" y "uno" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones que siguen a continuación) abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique aquí de otro modo o que el contexto no contradiga claramente. Los términos "comprendiendo", "que tiene", "incluyendo" y "que contiene" se entienden como términos de extremos abiertos (es decir, que significan "que incluye, sin limitarse a"), a menos que se indique de otro modo. La mención a intervalos de valores en el presente documento pretende simplemente servir como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor individual dentro del intervalo, a menos que se indique aquí de otro modo, y cada valor individual se incorpora en la descripción como si se hubiera mencionado allí individualmente. Todos los métodos que se describen aquí se pueden desarrollar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique aquí de otro modo o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionadas en el presente documento pretende simplemente aclarar mejor la invención y no plantea una limitación en su alcance, a menos que se indique de otro modo. En la descripción no se debería interpretar ninguna expresión como indicativa de cualquier elemento no reivindicado tal como es esencial para la práctica de la invención.

Figuras

Figura 1: muestra los valores UFC de las cápsulas de gelatina blanda producidas en el ensayo 2 durante su almacenamiento a 25°C/60% HR durante hasta 18 meses. Las cápsulas de gelatina blanda se envasan en tres sistemas de envasado diferentes. (■) Lámina de aluminio + bolsa de silicato o envase de tipo blíster, (•) caja + bolsa de silicato.

Figura 2: muestra los valores UFC de las cápsulas de gelatina blanda producidas en el ensayo 2 durante su almacenamiento a 8-12°C durante hasta 18 meses. Las cápsulas de gelatina blanda se envasan en tres sistemas de envasado diferentes. (•) Lámina de aluminio + bolsa de silicato o envase de tipo blíster, (•) caja + bolsa de silicato.

Ejemplos

General:

Todos los lotes de ensayo tienen un tamaño de lote de 65.000 cápsulas.

Material de carga:

El aceite y los componentes solubles en aceite se cargan en vacío en un recipiente de mezcla de acero inoxidable. Los componentes se mezclan a 12°C y se añade dióxido de silicio. La mezcla se mezcla adicionalmente y homogeniza hasta que el dióxido de silicio se ha dispersado. Se carga *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* en vacío y la mezcla completa se mezcla (sin homogeneización). El material de carga acabado entonces se descarga a través de un tamiz con una abertura de malla entre 0,7 y 1,2 mm a un tanque de transferencia pre-enfriado (12°C). A continuación, el tanque de transferencia se conecta a una máquina de encapsulación.

Solución de gelatina

El tamaño del lote de la solución de gelatina es 100 kg. Se pesan la gelatina, glicerol y agua en un recipiente de producción de acero inoxidable equipado para calentamiento y agitación. La mezcla se calienta, se agita y se evacúa hasta que se consigue una viscosidad estable. A continuación, la gelatina se filtra (150 micras) en un recipiente de acero inoxidable pre-calentado. Entonces se añaden agentes colorantes y se mezcla lentamente hasta homogeneidad. La gelatina se mantiene a 50-68°C durante la encapsulación.

Secado

El primer secado se realiza en secadoras giratorias a 19,0 a 20,3°C, eliminándose el lubricante de las cintas de gelatina con toallas de limpieza en las secadoras. El secado final se realiza extendiendo las cápsulas en bandejas en una sola capa y colocando las bandejas en armarios con aire acondicionado con una humedad controlada de 14-23% HR y una temperatura de 21-24°C. El secado termina cuando se consigue una dureza de la cubierta de 9-11 N. El tiempo de secado típico es de 31-130 h, con un promedio de 100 horas.

Inspección y envasado

Las cápsulas de gelatina blanda se inspeccionan y se clasifican para retirar las cápsulas deformadas, las no selladas adecuadamente y otros errores y se envasan en envases a granel de 3.500 cápsulas de gelatina blanda que contienen bacterias probióticas con 30 g de desecante en una bolsa de aluminio y se sella con calor.

En la Tabla 2 se muestra la composición de los lotes producidos en cinco ensayos diferentes.

Tabla 2

Composición de cinco lotes diferentes producidos					
Nº de Ensayo	1	2	3	4	5
Ingredientes en mg por cápsula, 10 oval					
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	21.875	120.000	50.000	50.000	50.000
Tamaño de partícula, promedio, µm mediante microscopía	< 730	< 166			
Tamaño de partícula, promedio, µm mediante dispersión con láser			139	139	223 (sin filtrar) 115 (filtrado)
D90 (90% del lote), mm			291	291	465 (sin filtrar) 231 (filtrado)
D-a-Tocopherol 1000	9.000	9.000	9.000	9.000	9.000
Triglicéridos de Cadena Media			500		
Aceite de pescado total	550.000	500.000		500.000	500.000
Dióxido de silicio	25.125	25.000	9.300	31.000	31.000
Gelatina de pescado	139,20	139,20	140,00	140,00	140,00
Glicerina al 99,5%	63,86	63,86	67,49	69,96	67,49
Agua	16,94	16,94	5,75	4,82	5,75
Aceite de Limón			3,50	3,50	3,50
Agente colorante*		4,36	3,26	1,72	3,26
Peso total de la carga	606,0	654,0	568,3	590,0	590,0
Peso total de la cápsula	826,0	878,0	788,3	810,0	810,0
*Óxido de Hierro, Óxido de titanio, riboflavina					

Durante la producción de los dos primeros lotes del ensayo, la temperatura se monitoriza muy de cerca durante todo el proceso de encapsulación para identificar cuándo se produce la reducción del número de UFC.

5

Las gelatinas blandas producidas en el ensayo 1 mostraron una pérdida significativa de células viables durante todo el proceso de producción. El cambio de las condiciones de procesamiento y la repetición del ensayo proporcionó un proceso de producción significativamente más estable. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3

Comparación de las temperaturas y valores UFC durante los primeros dos ensayos					
N.º de ensayo		1		2	
Muestra	Puntos de toma de muestra	UFC/cápsula	T. Llenado/°C	UFC/cápsula	T. Llenado/°C
Recipiente de mezcla	Parte superior	$1,39 \cdot 10^9$	20	$1,90 \cdot 10^{10}$	7,5
Recipiente de mezcla	Parte inferior	$1,64 \cdot 10^9$	20	$7,20 \cdot 10^9$	7,5
Cápsulas	Al principio de la encapsulación	$1,84 \cdot 10^4$	20	$1,31 \cdot 10^8$	7,5
Cápsulas	En la parte media de la encapsulación	$5,10 \cdot 10^5$	20	$1,24 \cdot 10^8$	7,5
Cápsulas	Al final de la encapsulación	$1,70 \cdot 10^5$	20	$4,97 \cdot 10^7$	7,5
Cápsulas	Secadora giratoria, principio	$2,12 \cdot 10^5$	20	$2,62 \cdot 10^8$	20
Cápsulas	Secadora giratoria, medio	$1,64 \cdot 10^5$	20	$3,00 \cdot 10^8$	20
Cápsulas	Secadora giratoria, final	$5,64 \cdot 10^5$	20	$4,91 \cdot 10^8$	20
Cápsulas	Secado de bandeja, principio	$4,73 \cdot 10^5$	19	$2,94 \cdot 10^9$	20
Cápsulas	Secado de bandeja, medio	$1,03 \cdot 10^8$	19	$2,62 \cdot 10^9$	20
Cápsulas	Secado de bandeja, final	$7,27 \cdot 10^4$	19	$2,49 \cdot 10^9$	20

10

El impacto de la reducción en la temperatura de llenado de 20°C a 7,5°C es evidente, la supervivencia de las bacterias probióticas es significativamente mejor.

15

Haciendo más hincapié en los detalles de los resultados, la Tabla 3 muestra una reducción drástica de UFC/cápsula de gelatina blanda durante la encapsulación en el ensayo 1 y ello incluso a la temperatura de llenado baja del ensayo 2, el recuento celular se reduce durante todo el proceso de encapsulación. Durante el secado, la relación UFC/cápsula aumenta, siendo la razón que durante el secado se pierde agua, de modo que la concentración total de bacterias aumenta (más claramente para el ensayo 2).

20

Esta temperatura se usó para los ensayos posteriores, excepto por algunas variaciones en las temperaturas para el material de carga (12-14°C). En los ensayos posteriores solo se encontró una pérdida de producción mínima. Como un ejemplo, en el ensayo número 4 se añadieron bacterias probióticas que corresponderían a una cantidad calculada de $3,0 \cdot 10^{10}$ UFC/cápsula de gelatina blanda si todas las células pudieran estar disponibles después de la producción

de la cápsula de gelatina blanda. El valor UFC encontrado cuando comenzó el estudio de estabilidad fue $9 \cdot 10^9$ UFC/cápsula de gelatina blanda. Estos dos valores confirman la pérdida mínima de bacterias probióticas observada cuando se fabrican cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas aplicando el proceso mejorado.

5 El lote del ensayo 2 se distribuyó en diferentes sistemas de envasado con diferente número de medios de secado y se iniciaron estudios de disponibilidad y estabilidad a diferentes temperaturas. Los sistemas de envasado fueron a) una bolsa de papel de aluminio que contenía 100 cápsulas de gelatina blanda y una bolsa de 1 g de sílice, b) un
10 envase blíster (lámina de PVC/PVDC, 10 cápsulas de gelatina blanda por envase blíster y c) un frasco de aluminio con tapón de PE y protector de PP con revestimiento de ALU/PE con 60 cápsulas de gelatina blanda y una bolsa de sílice de 0,5 g. Las muestras se almacenaron a 8-12°C y a 25°C/65% HR hasta 18 meses. Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2.

15 Los resultados de la Figura 1 muestran la importancia de tener un desecante activo presente en el sistema de envasado para las cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas.

20 Los resultados de la Figura 2 demuestran que si la temperatura de almacenamiento es baja - en el intervalo de 8-12°C - el efecto del material desecante presente en el envase es menos importante para los valores UFC de las cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas.

Referencias

- 25 Karim A.A. y Bhat, Rajeev, "Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins", Food Hydrocolloids 23 (2009) 563-576
Lachmann, L., et al., eds. Lea & Febiger, Philadelphia, PA, pp. 398-412 (1986)
Podczec, Fridrun y Jones, Brian E., Pharmaceutical Capsules, 2004, pp. 195-204
Singh et al., "Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery", Res Pharm Sci. 2010 JulDec; 5(2): 65-77
CA 2 675 892
30 WO2012/021432
US 2012/107395

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no revestidas, comprendiendo el método:
5
a) mezclar las bacterias probióticas no revestidas con al menos un aceite para obtener un material de carga de cápsulas de gelatina blanda a una temperatura en el intervalo de 5 a 15°C,
b) encapsular el material de carga en una cápsula de gelatina blanda hecha de una gelatina con un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28°C; y
10 c) secar la cápsula de gelatina blanda en una o más etapas a una temperatura de como máximo 25°C hasta una actividad de agua máxima de 0,25.
2. Método según la reivindicación 1, donde las bacterias probióticas no revestidas son bacterias no formadoras de esporas.
15
3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde al menos un aceite se selecciona del grupo consistente en aceites omega 3, tales como ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), aceite de pescado y aceite de krill.
20
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde al menos un aceite se selecciona del grupo consistente en aceites vegetales tales como aceite de colza, aceite de borraja/aceite de onagra, aceite de linaza, aceite de perilla o aceite de ajo.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la temperatura de rellenado está en el intervalo de 6 a 14°C.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la gelatina tiene una resistencia de Bloom en el intervalo de 100 a 300 bloom.
30
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde las bacterias probióticas son *Lactobacilli*, *Lactococci*, *Pediococci*, *Streptococci* o *Bifidobacteria*, o una mezcla de las mismas.
8. Método según la reivindicación 7, donde las bacterias probióticas son de la cepa *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis*.
35
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la cápsula de gelatina blanda comprende uno, dos, tres, cuatro o más ingredientes activos seleccionados del grupo consistente en vitaminas, tales como vitamina A, D, E, K2, C, B2, B6, B12, biotina, niacina, ácido fólico; minerales, tales como zinc, selenio, cromo, cobre, calcio, cloruro; y extractos vegetales, tales como extracto/zumo de arándano o jalea real.
40
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la cápsula de gelatina blanda se seca durante el almacenamiento en estante a una a_w de como máximo 0,2.
- 45 11. Cápsula de gelatina blanda producida mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Cápsula de gelatina blanda según la reivindicación 11, para su uso como un suplemento dietético, nutracéutico o farmacéutico.

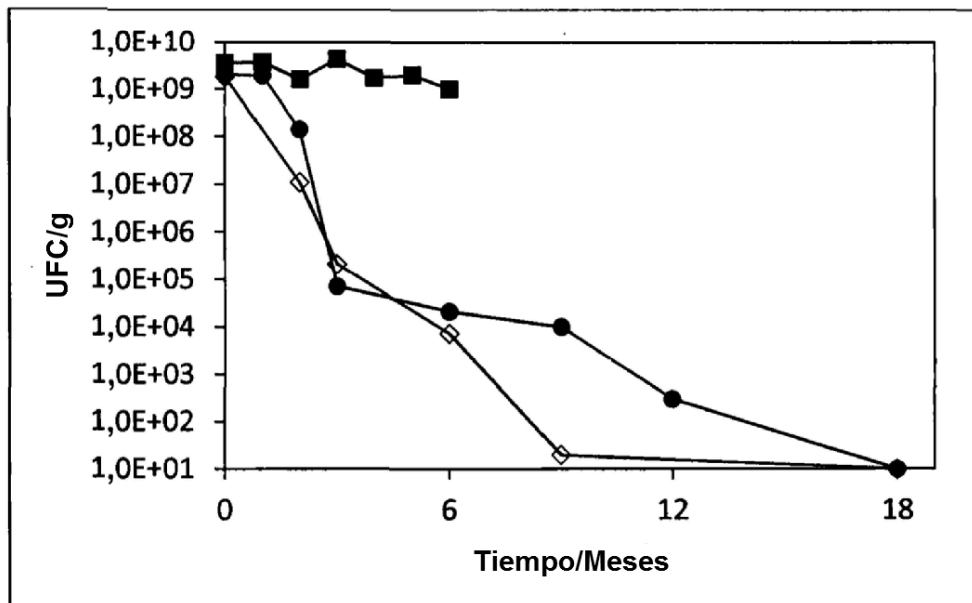


Figura 1

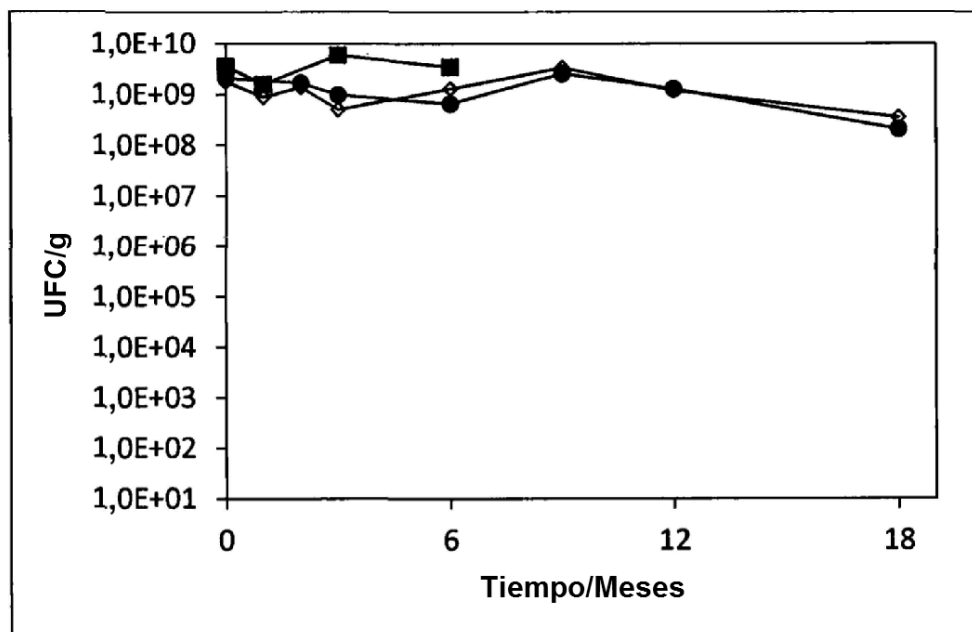


Figura 2

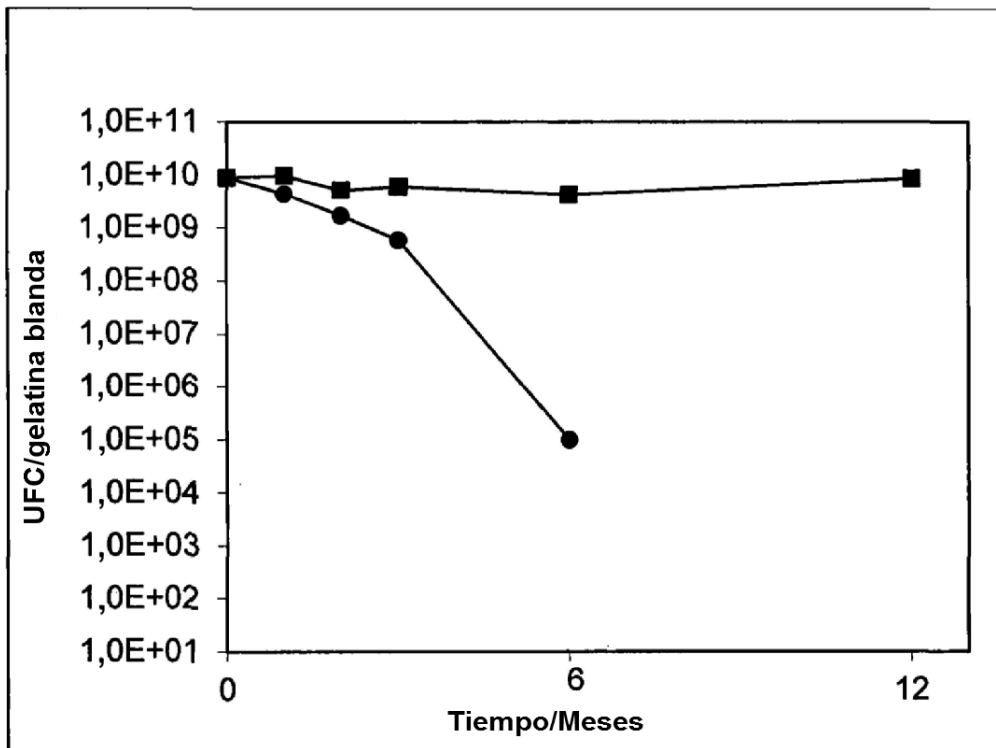


Figura 3

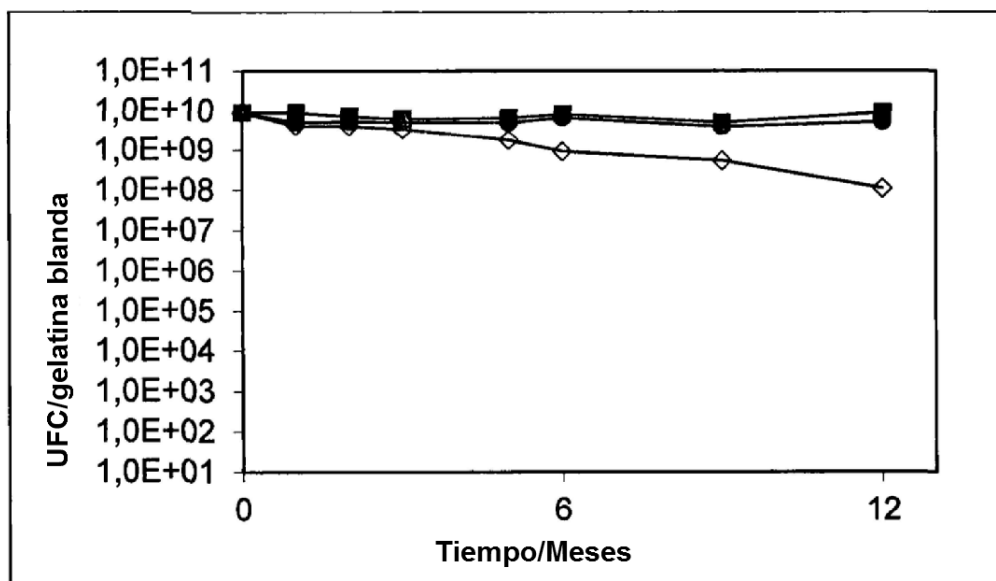


Figura 4

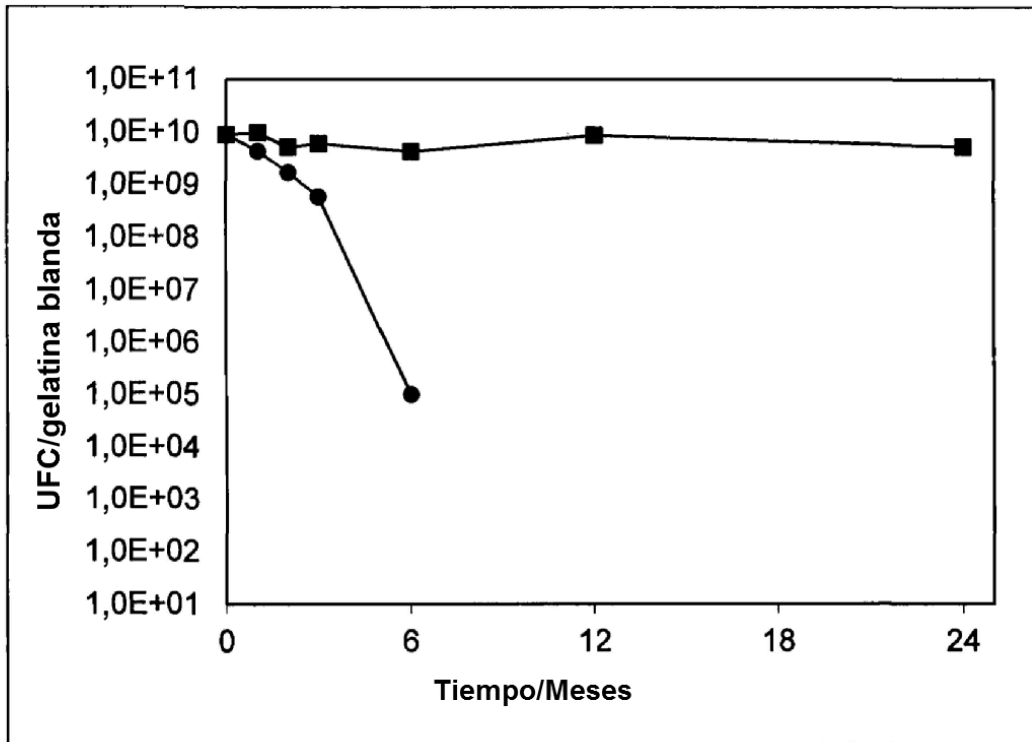


Figura 5

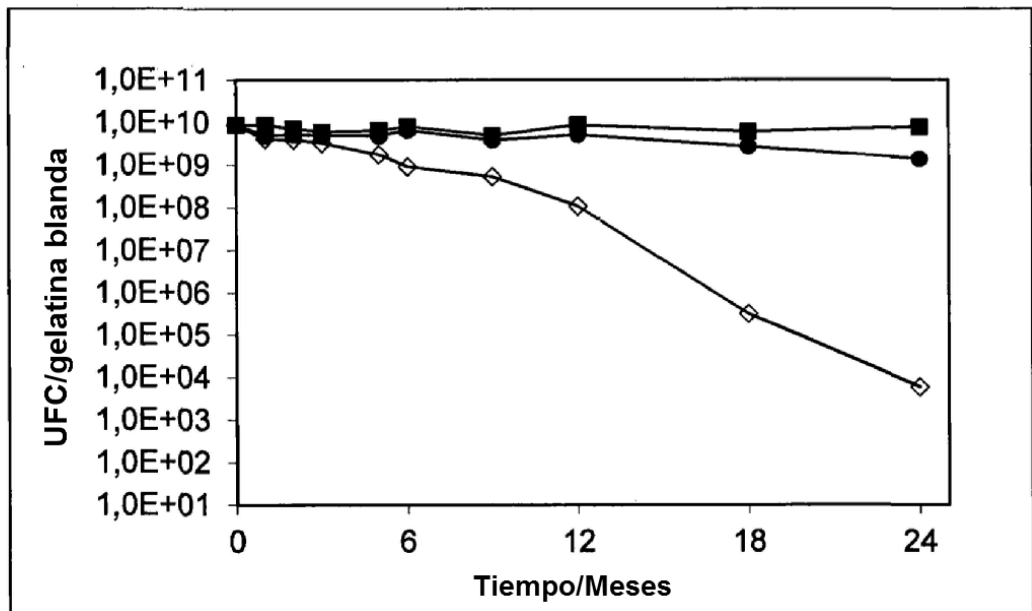


Figura 6