

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 835**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)
A61K 9/20	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61K 47/30	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)
A01N 25/10	(2006.01)
A23L 33/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014 PCT/US2014/021722**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159051**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014 E 14776545 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 2968579**

54 Título: **Sustancias bioactivas estables y métodos de fabricación**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361779449 P

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

30.11.2020

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer , NL**

72 Inventor/es:

**HAREL, MOTI;
TANG, QIONG y
DICKEY, ERIN, E.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 796 835 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

Sustancias bioactivas estables y métodos de fabricación

5 Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud se refiere y reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/779.449 titulada "STABLE BIOACTIVE SUBSTANCES AND METHODS OF MAKING" (Sustancias bioactivas estables y métodos de fabricación) presentada el 13 de marzo de 2013.

10

Campo de la invención

La presente invención se sitúa en el campo de los materiales bioactivos estables, y la fabricación y uso de los mismos.

15

Antecedentes de la invención

Un problema común asociado con el uso de materiales bioactivos es la pérdida de actividad debido a la oxidación, la descomposición química durante el almacenamiento, la preparación del producto o en el tracto digestivo del animal antes de la absorción. El entorno hostil de algunos procesos industriales, como la molienda, el mezclado y la compresión o extrusión de gránulos, destruye una parte importante de los materiales bioactivos sensibles incluso antes de que se conviertan en productos terminados. Otros problemas son el resultado de la interacción entre materiales bioactivos y otros ingredientes, tales como quelantes metálicos, tensioactivos fuertes, compuestos higroscópicos, etc. debido a la sensibilidad de los materiales bioactivos, por ejemplo, las enzimas al calor y los tensioactivos (como en la extrusión de piensos y detergentes líquidos) o ciertas vitaminas a las oxidaciones e iones metálicos normalmente agregados a los piensos, tales como hierro. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de formulaciones y métodos para proteger y estabilizar los materiales bioactivos, incluyendo fármacos, enzimas y vitaminas, contra la descomposición durante el procesamiento y conservación.

20

25

30

El documento EP 0695173 divulga un proceso para la carga de sustancias bioactivas sobre partículas de polisacáridos.

Sumario de la invención

35

La presente invención se refiere a sustancias bioactivas estables y métodos de preparación relacionados. El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones.

40

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar una sustancia bioactiva estable que comprende un material bioactivo. El método comprende (a) disolver el material bioactivo en una solución que comprende solutos, en donde los solutos son una molécula pequeña, seleccionada entre el grupo que consiste en sales inorgánicas, y azúcares, de modo que se obtiene una solución bioactiva, en donde la solución bioactiva tiene una concentración de material bioactivo de al menos 5 % y una concentración de soluto de menos de 5 % de la solución bioactiva, estando cada porcentaje basado en el peso total de la solución bioactiva; (b) adsorber la solución bioactiva sobre partículas secas de polisacárido solubles en agua, no gelificantes, en una relación de masa entre la solución bioactiva y las partículas de polisacárido entre 0,25:1 y 1:1, de modo que se forman partículas de polisacárido cargadas bioactivas; y (c) secar las partículas de polisacárido cargadas bioactivas, de modo que se obtiene la sustancia bioactiva estable.

45

50

En algunas realizaciones, el método además comprende eliminar un soluto de la solución bioactiva antes de la etapa de adsorción.

En algunas otras realizaciones, el método además comprende añadir un líquido orgánico inmiscible a la sustancia bioactiva estable, de modo que se forma una suspensión vertible estable.

55

En algunas otras realizaciones, el método además comprende recubrir la sustancia bioactiva estable con una capa de grasas o ceras sólidas fundidas.

60

En el método según la presente invención, el material bioactivo puede seleccionarse del grupo que consiste en aminoácidos y sus derivados, fármacos, péptidos, enzimas, enzimas industriales, vitaminas, derivados y complejos vitamínicos, carotenos, antioxidantes, sustancias antiinflamatorias, aceites cosméticos, principios activos antimicrobianos, peróxidos, agroquímicos y una mezcla de los mismos. El polisacárido puede seleccionarse del grupo que consiste en almidones, celulosas, gomas y sus compuestos modificados y derivados.

65

Según un segundo aspecto de la presente invención, también se proporciona una sustancia bioactiva estable preparada por el método de la presente invención. La sustancia estable comprende un material bioactivo en una cantidad que varía de 1 % a 40 % en peso y un polisacárido en una cantidad que varía de 1 % a 70 % en peso. La

sustancia bioactiva puede también comprender un emulsionante o estabilizador en una cantidad que varía de 0,5 % a 10 % en peso.

En la sustancia bioactiva de acuerdo con la presente invención, el material bioactivo puede ser una enzima seleccionada entre el grupo que consiste en proteasas, lipasas, amilasas, celulasas, fosfatasas, peroxidadas, oxidasas y una mezcla de las mismas. La sustancia bioactiva puede también comprender un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en antioxidantes naturales o sintéticos, iones de metal, silicatos de metales alcalinos, carbonatos o bicarbonatos, sulfatos, fosfatos, boratos y ácido bórico. El compuesto puede estabilizar la enzima.

Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona además un producto que comprende la sustancia bioactiva estable de la presente invención.

En dicha una realización, el material bioactivo es una enzima. El producto puede ser un producto de limpieza textil, de limpieza de alfombras o superficies.

En otra realización, el material bioactivo se selecciona del grupo que consiste en un herbicida, un insecticida, un fungicida, un regulador del crecimiento de la planta, un agente para el tratamiento de semillas y una mezcla de los mismos. El producto puede ser un producto agroquímico.

En otra realización más, el material bioactivo se selecciona del grupo que consiste en una vitamina, una proteína, una enzima, un mineral y una mezcla de los mismos. El producto puede seleccionarse del grupo que consiste en un suplemento de piensos para animales, un suplemento alimenticio, y un producto nutracéutico.

En otra realización más, el materia bioactivo se selecciona del grupo que consiste en un fármaco, un compuesto amargo o aromático, un compuesto antibiótico y una mezcla de los mismos. El producto puede ser un producto farmacéutico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de un novedoso método para preparar una sustancia bioactiva estable. En particular, se usa una solución sustancialmente exenta de solutos para disolver un material bioactivo. Una sustancia bioactiva estable preparada usando este método novedoso puede usarse para producir diversos productos tales como productos farmacéuticos, nutracéuticos, alimenticios, agroquímicos, cosméticos, productos para la higiene personal y de limpieza.

Se proporciona un método para preparar una sustancia bioactiva estable. El método comprende disolver un material bioactivo en una solución sustancialmente exenta de solutos para fabricar una solución bioactiva; adsorber la solución bioactiva sobre partículas de polisacárido secas para fabricar partículas de polisacárido cargadas bioactivas; y secar las partículas de polisacárido cargadas bioactivas. En la etapa de absorción, la relación de masa entre la solución bioactiva y las partículas de polisacárido está entre 0,25:1 y 1:1. La sustancia bioactiva estable resultante puede comprender 1-40 % en peso de un material bioactivo y 1-70 % en peso de polisacárido. Un rasgo característico de la presente invención es que la sustancia bioactiva puede prepararse sin una cantidad sustancial de solutos, por ejemplo, solutos donadores de enlaces de hidrógeno, que pueden interferir con las interacciones químicas entre un material bioactivo y un polisacárido. El componente de polisacárido está en forma de partículas fluidas no gelificantes y sobre las cuales se absorbe el material bioactivo. La presencia de solutos donadores de enlaces de hidrógeno puede evitar el desarrollo de interacciones estabilizadoras entre el material bioactivo y el polisacárido. El estado no gelificante de las partículas de polisacárido proporciona interacciones esenciales de enlace de hidrógeno que estabilizan el material bioactivo y permiten la disolución rápida del material bioactivo en agua o tras el consumo en comparación con el hidrogel de polisacárido reticulado. Las interacciones químicas pueden preservar y/o mantener el material bioactivo unido a las partículas de polisacárido. Al mismo tiempo, las partículas de polisacárido secas también pueden proporcionar el flujo de masa fundida necesario y la estabilidad física que es altamente deseable en las aplicaciones industriales. Se pueden usar varios polisacáridos para estabilizar diferentes materiales bioactivos debido a su comportamiento único de carga e interacciones químicas.

Una solución de adsorción que contiene un material bioactivo está sustancialmente exenta de solutos, por ejemplo, solutos de bajo peso molecular (p. ej., electrolitos tales como sales inorgánicas, azúcares y disolventes). Aunque algunos solutos pueden ayudar a solubilizar o mejorar la estabilidad de un material bioactivo en una solución, también pueden interferir con interacciones estabilizadoras más favorables entre el material bioactivo y el polisacárido.

La sustancia bioactiva estable se puede disolver rápidamente liberando así el material bioactivo tras su consumo o dilución en agua. En un sistema de dispersión en gel convencional, el polisacárido ya está completamente disuelto y el material bioactivo está incrustado en una gota de polímeros endurecidos o reticulados. Tales sistemas de gel se caracterizan generalmente por una estructura porosa, que puede ser insuficiente para inmovilizar y proteger el material bioactivo de temperaturas dañinas y ataques químicos.

5 El polisacárido puede ser un polímero aniónico o catiónico dependiendo del tipo de material bioactivo con el que se va a usar. Los materiales bioactivos hidrófilos, tales como los productos farmacéuticos solubles en agua, vitaminas, sustancias químicas, minerales y proteínas pueden disolverse en una solución de agua y adsorberse en partículas de polisacárido. La sustancia bioactiva se puede suspender en un líquido inmiscible como aceite o líquido hiperosmótico sin formar un gel. De forma similar, los materiales bioactivos hidrófobos, tales como las vitaminas solubles en aceite, los carotenos y los aceites esenciales también pueden adsorberse en partículas de polisacárido. Opcionalmente, las partículas de polisacárido pueden suspenderse en un líquido hiperosmótico sin formar un gel.

10 Las partículas de polisacárido que contienen la sustancia bioactiva estable pueden recubrirse adicionalmente para protección adicional con una capa de grasas sólidas fundidas, ceras, sales metálicas o una mezcla de las mismas.

15 Las partículas de polisacárido que contienen enzimas estables al calor y la humedad pueden ser útiles en aplicaciones de extrusión de piensos. Una enzima puede estabilizarse y su actividad puede preservarse mediante la adsorción sobre partículas de polisacárido sin formar un gel, de lo contrario, la enzima puede inactivarse o destruirse cuando se extruye o se mezcla con otras sustancias químicas o ingredientes alimenticios a una dosis efectiva típica.

20 Las enzimas que se adsorben sobre partículas de polisacárido pueden ser las adecuadas para su uso en alimentos, cosméticos y composiciones detergentes y son conocidas en la técnica. Las enzimas preferidas pueden ser proteasas (p. ej., subtilisina y savinasa), lipasas (p. ej., Lipex y Lipolase), fosfatasas (p. ej., fosfatasas alcalinas), fosfodiesterasas o fitasas. Se pueden incluir una o más enzimas en una sustancia bioactiva estable.

25 La sustancia bioactiva puede estar en forma seca o líquida, y puede encapsularse o mezclarse además con un estabilizador o inhibidor antes de mezclarse con un producto alimenticio, un producto de limpieza o agroquímico.

Definiciones

30 El término "polisacárido" como se usa en el presente documento se refiere a un carbohidrato hidrófilo. Puede ser de origen vegetal, animal, microbiano, algal, fúngico, de levaduras, bacteriano o sintético, y es capaz de absorber una cantidad significativa de agua sin perder su estructura granular. Los polisacáridos adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, gomas, tales como agar, alginato, arabinoxilano, carragenano, carboximetilcelulosa, celulosa, quitosano, curdlano, gelatina, gelano, gelatina, β -glucano, goma guar, goma arábica, goma de algarrobo, lignina, pectina, goma xantano, y almidones (naturales o modificados).

35 La expresión "partículas de polisacárido" como se usa en el presente documento se refiere a partículas de cualquier tamaño, preferiblemente que tienen un diámetro promedio de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 μm , que comprenden un polisacárido en una cantidad de al menos aproximadamente 80 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente 90 % en peso, más preferentemente al menos aproximadamente 99 % en peso.

40 La expresión "partículas de polisacárido cargadas bioactivas" como se usa en el presente documento se refiere a partículas de polisacárido, sobre las cuales se absorbe un material bioactivo. Las partículas de polisacárido cargadas bioactivas pueden prepararse adsorbiendo un material bioactivo en una solución sustancialmente exenta de solutos sobre partículas de polisacárido secas.

45 La expresión "material bioactivo", como se usa en el presente documento, se refiere en general a cualquier compuesto, o mezcla de los mismos, adecuado como ingrediente activo en un producto farmacéutico, nutracéuticos, cosmético, de limpieza o agroquímico y capaz de producir un resultado beneficioso en un entorno en el que se ha dispensado el compuesto o la mezcla. Puede ser soluble en agua o soluble en aceite. Los ejemplos de "materiales bioactivos" incluyen proteínas o péptidos (p. ej., enzimas, vacunas recombinantes, anticuerpos, péptidos antimicrobianos, y similares), antibióticos, agroquímicos (p. ej., plaguicidas, herbicidas, gemicidas, biocidas, algicidas, rodenticidas, fungicidas, insecticidas, y similares), antioxidantes, promotores del crecimiento vegetal y animal, inhibidores del crecimiento vegetal y animal, conservantes, productos nutracéuticos, desinfectantes, agentes esterilizantes, catalizadores, reactantes químicos, agentes de fermentación, suplementos alimenticios o de pienso animal, nutrientes, aromas, colorantes, tintes, cosméticos, fármacos, vitaminas, esterilizantes sexuales, inhibidores de la fertilidad, promotores de la fertilidad, purificadores del aire, atenuadores de microorganismos, ácidos nucleicos (p. ej., ARN, ADN, vectores, plásmidos, ribozimas, aptámeros, dendrímeros y similares) y otros agentes que proporcionan actividad mejorada en el sitio de acción.

60 El término "enzima" como se usa en el presente documento se refiere a una proteína que tiene una actividad catalítica. Puede ser de origen animal, vegetal o microbiano, o un mutante modificado química o genéticamente. Puede proporcionar un rendimiento enzimático en el medio ambiente o beneficios para la salud de un organismo consumidor. Ejemplos de enzimas incluyen proteasas, lipasas, amilasas, celulasas, fosfatasas, peroxidasas y oxidasas.

65 El término "solutos", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula pequeña capaz de disolverse en un disolvente, por ejemplo, agua o aceite, para formar una solución. Ejemplos de "solutos" incluyen

sales inorgánicas, azúcares, aminoácidos y péptidos cortos. Un péptido corto tiene menos de aproximadamente 500, 200, 100, 50, 24 o 10 aminoácidos. Una solución está sustancialmente exenta de solutos donde la concentración de soluto es menos de 5 % o 1 % en peso.

5 La expresión "donante de enlace de hidrógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un soluto que tiene un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre que está unido covalentemente a al menos un átomo de hidrógeno. Puede tener una interacción química no covalente débil con un material bioactivo en una solución o con un polisacárido.

10 La expresión "líquido hiperosmótico" como se usa en el presente documento se refiere a una solución de agua que contiene al menos aproximadamente 50 % en peso de un líquido inmiscible tal como aceite, o un poliglicol, en el que un polisacárido es insoluble.

15 El término "estable", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un material o sustancia bioactivo para retener, por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de su actividad funcional a una temperatura, por ejemplo, de aproximadamente 0-100 °C, preferentemente aproximadamente 2-40 °C, más preferentemente a temperatura ambiente, durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, al menos aproximadamente 1, 3, 12, 24 o 36 meses, preferentemente al menos aproximadamente 3 meses, más preferentemente al menos aproximadamente 12 meses.

20 El término "termoestable", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un material o sustancia bioactivo para retener, por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de su actividad funcional cuando la temperatura aumenta, por ejemplo, al menos aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 50 o 100 °C.

25 De acuerdo con la presente invención, se ha desarrollado una sustancia bioactiva estable que comprende un material bioactivo y partículas de polisacárido no gelificantes. Una solución adsorbente que contiene el material bioactivo está sustancialmente exenta de cualquier soluto y el material bioactivo en la solución se adsorbe sobre las partículas de polisacárido sin reticularse o formar matrices de gel. Una sustancia bioactiva es útil para proteger un material bioactivo del calor, humedad, agentes desestabilizadores y del daño por oxidación. Preferentemente, una sustancia bioactiva se disuelve rápidamente para liberar un material bioactivo tras la dilución en agua o tras el consumo en el tracto digestivo de un animal. Preferentemente, la sustancia bioactiva evita la liberación prematura o la desactivación del material bioactivo cuando se mezcla con otros agentes desestabilizadores.

30 La concentración de un material bioactivo en una sustancia bioactiva puede variar dentro de límites bastante amplios, dependiendo de su solubilidad, interacción con el polisacárido y el uso previsto. Por ejemplo, cuando el material bioactivo es una enzima, su concentración puede ser dictada en parte por su actividad específica deseada tras el consumo.

40 De acuerdo con la invención, la concentración de material bioactivo es al menos 5 %, basado en el peso total de la sustancia bioactiva, preferentemente al menos aproximadamente 10 %.

45 Preferentemente el polisacárido soluble en agua es capaz de absorber una cantidad significativa de agua, por ejemplo, al menos aproximadamente el 10 %, 50 %, 100 %, 500 % o 1000 % de su masa seca, sin disolverse y formar un gel o perder su estructura fluida. Los polisacáridos adecuados pueden obtenerse de fuentes naturales, semisintéticas o sintéticas. Los materiales orgánicos naturales son, por ejemplo, carragenano, goma arábiga, agar, agarosa, goma guar, pectina, maltodextrinas, ácido alginico y sus sales, p. ej., alginato de sodio o alginato de calcio, colágeno, quitosano, almidones tales como los de patata, maíz, maíz de cera o almidón con alto contenido de amilosa, trigo, raíces de arroz o tapioca y también derivados de almidón, en particular éteres y ésteres de almidón, dextranos o ciclodextrinas y celulosas químicamente modificadas, en particular, ésteres y éteres de celulosa, p. ej., acetato de celulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa,

50 Las gomas y los almidones solubles son particularmente preferidos ya que son capaces de absorber agua en más del 100 % o más de su masa seca relativa mientras conservan la fluidez y la estructura granular. Se pueden seleccionar varias gomas dependiendo de sus interacciones químicas o electrostáticas con el material bioactivo y la solubilidad en agua y con respecto a la aplicación específica con el fin de obtener la protección deseada durante los procesos industriales, el almacenamiento y la liberación tras el consumo o en un entorno. Por ejemplo, alginato, pectina, goma guar o carragenano pueden seleccionarse cuando el material bioactivo se activa a temperatura ambiente, mientras que el agar o la goma xantano puede seleccionarse cuando el material bioactivo se activa a una temperatura elevada. En general, se prefieren concentraciones de polisacárido de aproximadamente 20 % o más, basado en el peso total de la sustancia bioactiva, prefiriéndose más concentraciones de aproximadamente 40 % o más.

65 La solución adsorbente que contiene un material bioactivo puede estar sustancialmente exenta de solutos donadores de enlaces de hidrógeno. El método para eliminar solutos de una solución que contiene material bioactivo no es crítico, y se puede lograr mediante cualquier método conocido en la técnica, como precipitación del material

bioactivo, eliminación del sobrenadante con solutos que precipitan, dialización contra agua o un tampón de baja resistencia, o tamizado molecular a través de una membrana de corte molecular. Grandes cantidades de varios solutos tales como sales, azúcares y aminoácidos pueden permanecer en la solución junto con el material bioactivo. Pueden ser necesarios durante el proceso de producción de un material bioactivo, por ejemplo, durante la fermentación, purificación, concentración o estabilización. De acuerdo con la presente invención, esos solutos pueden eliminarse sustancialmente de la solución adsorbente para permitir reacciones químicas o electrostáticas favorables entre el material bioactivo y el polisacárido.

Las partículas de polisacárido cargadas bioactivas se secan para eliminar el agua libre. Generalmente, los métodos de secado adecuados incluyen secado al aire, secado al vacío o por congelación y secado en lecho fluidizado.

Opcionalmente, las partículas de polisacárido cargadas bioactivas pueden recubrirse con una capa de material repelente al agua. La sustancia bioactiva en las partículas de polisacárido cargadas bioactivas recubiertas puede ser al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 % o 500 %, preferentemente al menos aproximadamente 100 %, más preferentemente al menos aproximadamente 200 %, más activa (por ejemplo, estable) que en las partículas de polisacárido cargadas bioactivas no recubiertas correspondientes. Los materiales de revestimiento repelentes al agua preferidos pueden ser grasas y ceras sólidas formadoras de matriz, incluyendo diversos materiales termoplásticos tales como alcoholes grasos naturales o sintéticos, ácidos grasos, ésteres grasos y ceras. Las ceras naturales incluyen ceras vegetales tales como cera de carnauba, candelilla, rafia, palma, caña de azúcar y ceras de algodón; ceras animales, tales como cera de abeja y cera de lanolina y ceras minerales tales como parafina y polietilenos lineales o ramificados, y ceras microcristalinas, y una mezcla de varias grasas y ceras.

Opcionalmente, las partículas de polisacárido cargadas bioactivas pueden suspenderse en un líquido no gelificante. Los líquidos de suspensión adecuados incluyen líquidos hidrófobos, líquidos orgánicos miscibles con agua o mezclas de los mismos. Los líquidos hidrófobos adecuados incluyen hidrocarburos como aceite mineral, hidrocarburos ramificados como isoparafinas, aceites vegetales, tales como aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite de girasol. Los líquidos orgánicos miscibles con agua adecuados incluyen disolventes orgánicos tales como etilenglicol, propilenglicol, dietilenglicol y glicerol.

El tamaño de las partículas de polisacárido cargadas bioactivas puede variar, dependiendo de otras características del polisacárido y su uso. En el caso de que se necesite una liberación rápida de la sustancia bioactiva, las partículas pueden ser lo suficientemente pequeñas como para disolverse fácilmente tras la dilución en agua. Una consideración adicional puede relacionarse con la forma de un producto consumible final, que puede estar en forma de polvo, comprimido, gránulo o barra o en forma de un producto líquido o suspensión. Se pueden determinar y producir tamaños de partícula adecuados usando técnicas conocidas en la técnica. Generalmente, se puede llevar a cabo una reducción del tamaño mecánica convencional, tal como la molienda del polvo de polisacárido antes de cargar un material bioactivo, cuando sea necesario para lograr un tamaño de partícula deseado. Se puede lograr una reducción adicional del tamaño de las partículas hasta un tamaño submicrométrico sometiendo una suspensión no miscible que contiene partículas de polisacárido a una mezcla de alto cizallamiento usando un mezclador de alto cizallamiento o ultra alto cizallamiento convencional. Preferentemente, al menos aproximadamente el 90 %, idealmente todas las partículas son inferiores a aproximadamente 1000 micrómetros (diámetro). En algunas aplicaciones donde se requiere transparencia o textura suave, las partículas de aproximadamente 50 micrómetros o menos son especialmente adecuadas.

El pH de una solución adsorbente que contiene un material bioactivo puede variar, siempre que el pH no sea perjudicial para el propio material bioactivo. En general, el pH se puede ajustar, según sea necesario, agregando una cantidad efectiva de un ácido o base adecuado. Esto se puede hacer antes de cargar las partículas de polisacárido o después de la adición de un líquido estabilizador, pero preferiblemente se hace de antemano.

La sustancia bioactiva de esta invención puede comprender un componente adicional tal como un estabilizador, un conservante contra el desarrollo de mohos o bacterias de manera efectiva para prevenir la degradación o autodegradación del material bioactivo en la sustancia bioactiva. El componente adicional puede estar presente en cualquier cantidad siempre que sea suficiente para proporcionar el efecto estabilizador deseado.

Se puede producir una sustancia bioactiva estable disolviendo inicialmente un material bioactivo hidrófilo en una solución acuosa o solución tamponada débil, o un material bioactivo hidrófobo en un disolvente orgánico o aceite, donde la solución, el disolvente orgánico y el aceite están sustancialmente exentos de solutos. La solución resultante que contiene el material bioactivo se denomina en el presente documento "solución bioactiva", y está sustancialmente exenta de solutos. La concentración de solutos, incluyendo sales tamponantes, en una solución es menos de 5 %, preferentemente menos de aproximadamente 1 %, basado en el peso total de la solución bioactiva. La concentración del material bioactivo es al menos 5 %, basado en el peso total de la solución bioactiva, preferentemente al menos aproximadamente 10 %. La solución bioactiva puede verterse lentamente e impregnarse sobre polvo fino seco de partículas de polisacárido deseables, mezclando suavemente hasta que toda la solución sea absorbida por las partículas de polisacárido. La relación de masa (o peso) entre la solución bioactiva y el polisacárido seco está entre 0,25:1 a 1:11, preferentemente aproximadamente 0,5:1, y más preferentemente

aproximadamente 1:1.

En general, es deseable continuar agitando la dispersión de polisacárido mientras se absorbe el material bioactivo y se desarrollan interacciones químicas/electrostáticas con el polisacárido. Aunque puede parecer que la absorción se ha completado sustancialmente, generalmente es deseable continuar la agitación a la temperatura de reacción elegida durante al menos una hora o más, para dar la máxima oportunidad para la absorción total y el desarrollo de interacciones químicas/electrostáticas. A continuación, se puede suspender la agitación y la composición resultante húmeda pero todavía fluida puede usarse como tal para dispersarse en una suspensión líquida inmiscible o someterse a deshidratación. Opcionalmente, las partículas de polisacárido pueden agregarse con uno o más estabilizadores o conservantes y/o recubrirse ligeramente con una capa de grasa polimérica o sólida.

Las suspensiones líquidas inmiscibles adecuadas de acuerdo con la presente invención incluyen aquellas en las que el material bioactivo es sustancialmente inmiscible. Por ejemplo, se prefieren los disolventes orgánicos para una proteína bioactiva, tal como una enzima o vacuna, mientras que los líquidos hidrófilos o acuosos son más adecuados para sustancias bioactivas hidrófobas o solubles en aceite, tales como la vitamina A o carotenos o aceites esenciales (p. ej., DHA, EPA, ARA, ALA). En general, el líquido en suspensión se agrega bajo agitación continua hasta lograr la fluidez y viscosidad deseables. Preferentemente, la cantidad del líquido de suspensión en la composición final es al menos igual a la cantidad (en peso) de las partículas de polisacárido cargadas bioactivas. Sin embargo, se puede contemplar cualquier cantidad de tan solo aproximadamente 50 % a más de aproximadamente 1000 % con respecto a las partículas de polisacárido cargadas bioactivas dependiendo de la viscosidad final deseada y de la concentración de sustancia bioactiva.

La sustancia bioactiva de la presente invención puede incorporarse en una composición alimenticia seca o líquida. Ejemplos no limitativos de tales productos alimenticios incluyen bebidas no carbonatadas y carbonatadas, tales como refrescos, zumos de frutas o verduras, bebidas; bebidas deportivas, bebidas energéticas, yogur bebible, bebidas con bacterias probióticas o similares; productos lácteos; postres tales como yogur y jaleas, pudings, nata, mousse y similares, dulces fríos (p. ej., helado y dulces helados, tales como sorbetes), caramelos duros, caramelos blandos, pastas de harina, cremas batidas y similares; mermeladas y similares.

La sustancia bioactiva de la presente invención puede usarse como un fármaco en una composición farmacéutica. Ejemplos no limitantes de fármacos incluyen compuestos aromáticos amargos, analgésicos, descongestivos, antitusivos, expectorantes, antihistamínicos, mucolíticos, laxantes, vasodilatadores, antiarrítmicos, antidiarreicos, antihipertensivos, antibióticos, narcóticos, broncodilatadores, fármacos antiinflamatorios, fármacos cardiovasculares, tranquilizantes, antipsicóticos, fármacos antitumorales, sedantes, antieméticos, antinauseosos, anticonvulsivos, fármacos neuromusculares, agentes hipoglucemiantes, diuréticos, antiespasmódicos, relajantes uterinos, fármacos antiobesidad, fármacos antianginosos, y fármacos antiviricos y similares. También se pueden usar combinaciones de estos fármacos.

La sustancia bioactiva de la presente invención puede usarse como un nutracéutico en un producto nutracéutico líquido o sólido. Ejemplos no limitativos de productos nutracéuticos incluyen suplementos activos ricos en nutrientes o medicinales naturales, tales como ajo, antioxidantes, glucosamina, sulfato de condroitina; nutrientes que proporcionan beneficios para la salud, tales como aminoácidos, vitaminas, minerales, carotenoides, ácidos grasos tales como ácidos grasos omega-3 u omega-6, DHA, EPA, ARA, o ALA los cuales pueden proceder de fuentes vegetales o animales (p. ej., peces o algas), flavonoides, fenoles, polioles, polifenoles, péptidos, agentes hidratantes, agentes autoinmunitarios o agentes antiinflamatorios; o cualquier otro ingrediente funcional que pueda administrarse en forma húmeda o líquida y que sea beneficioso para la prevención de enfermedades o afecciones específicas.

La sustancia bioactiva de la presente invención puede usarse también como un principio activo agroquímico en una composición agroquímica líquida o sólida. Los ejemplos no limitantes de principios activos agroquímicos incluyen herbicidas, insecticidas, fungicidas, reguladores del crecimiento de las plantas y agentes para el tratamiento de semillas. Se prefiere que las composiciones agroquímicas sean composiciones líquidas. Las composiciones agroquímicas líquidas pueden aplicarse generalmente al objetivo por pulverización. La composición agroquímica líquida puede ser una suspensión, por ejemplo, una suspensión concentrada, que puede diluirse con agua antes de la aplicación. La sustancia bioactiva de la presente invención es fácilmente soluble en agua y generalmente compatible con agroquímicos solubles en agua, y puede ser cualquiera de los principios activos agroquímicos comerciales conocidos en la técnica o enumerados en libros de referencia estándar como el Manual de pesticidas. Un principio activo agroquímico adecuado puede ser paraquat, diquat, glifosato, fomesafeno, tiametoxam, mesotriona, o trifloxisulfurona.

La sustancia bioactiva de la presente invención también se puede usar para proteger diversos materiales activos en líquidos para textiles, alfombras o líquidos para la limpieza de superficies en general, tales como enzimas, peróxidos y composiciones de agente blanqueador, y en particular enzimas en detergente seco o líquido. Ejemplos no limitativos de composiciones de limpieza incluyen jabón para lavar platos, detergente lavavajillas, quitamanchas para tapicería, jabón para el lavado de ropa, detergente para el lavado de la ropa, quitamanchas para ropa, aditivos para la ropa, limpiador de inodoros, limpiador de fregado suave y similares.

En una realización, se produce una sustancia enzimática estable disolviendo inicialmente la enzima en una solución sustancialmente exenta de solutos, por ejemplo, una solución acuosa o una solución tamponada débil, o una solución enzimática rica en solutos dializante contra un tampón débil, para fabricar una solución enzimática sustancialmente exenta de solutos, que en lo sucesivo se denominará solución enzimática exenta de solutos. La solución enzimática exenta de solutos se agrega opcionalmente con una cantidad efectiva de un estabilizador o inhibidor enzimático. La solución de enzima exenta de solutos se adsorbe lentamente a continuación sobre partículas de polisacárido tales como polvo de goma guar, pectina o carragenano de alta pureza mezclando suavemente hasta que se obtiene la uniformidad, seguido de la eliminación del agua libre mediante secado al aire, desecación, vacío o liofilización o secado en lecho fluidizado o cualquier otro método de secado conocido. Las partículas de polisacárido cargadas bioactivas pueden recubrirse opcionalmente con una o varias capas de grasas o ceras sólidas fundidas.

Preferentemente, la sustancia bioactiva según esta invención es estable, por ejemplo, en la medida en que retiene la actividad, en al menos aproximadamente 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, en un producto consumible durante un periodo prolongado de tiempo, por ejemplo, al menos aproximadamente 1, 3, 6, 12, 24 o 36 meses, preferentemente al menos aproximadamente 3 meses, más preferentemente al menos 12, en reposo a temperaturas en el intervalo de 2 a 40 °C. Más preferentemente, la sustancia bioactiva es termoestable cuando la temperatura aumenta al menos aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 °C.

El término "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, un porcentaje, y similares, pretende abarcar variaciones de ± 20 %, ± 10 %, más preferentemente ± 5 %, aún más preferentemente ± 1 %, e incluso más preferentemente $\pm 0,1$ % del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas.

La presente invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1.

Retención de materiales bioactivos hidrófilos en partículas de polisacárido

La rodamina 6G es un compuesto químico soluble en agua. Tiene un peso molecular relativamente pequeño (479,2 g/mol) y también es fácilmente soluble en una gama de disolventes orgánicos como glicerol y propilenglicol. En el presente documento se ha usado como un tinte trazador para demostrar su retención dentro de la suspensión de partículas de polisacárido en un líquido disolvente orgánico.

Preparación de partículas de matriz de polisacárido reticulado, de acuerdo con métodos estándar bien conocidos en la técnica: Se preparó una solución que contenía rodamina 6G (Sigma) al 10 % en una mezcla 1:1 de agua y propilenglicol. Se preparó una solución de agua que contenía carragenano al 3 % en peso (Kappa goma de carragenano, FMC BioPolymer, PA, EE.UU.) y se mezcló con 30 % en peso de la solución de rodamina 6G. La mezcla que contenía la goma y el tinte se pulverizó en un baño de agua y acetato de potasio al 10 %. Se observó que una cantidad significativa del tinte ya se había filtrado en la solución de reticulación. Se recogieron las partículas gelificadas que contenían el tinte restante, se secaron sobre una toalla de papel y se mezclaron en propilenglicol en una relación 1:2 de partículas húmedas con el líquido orgánico en suspensión. Después de 1 h de agitación suave a temperatura ambiente, se observó que una cantidad significativa adicional de tinte se había filtrado en la suspensión líquida. Este experimento demuestra la dificultad de retener moléculas pequeñas en matrices de gel típicas.

Preparación de partículas de polisacárido cargadas bioactivas de acuerdo con la presente invención: Se colocaron veinticinco gramos de polvo de carragenano altamente purificado y finamente molido en un vaso de precipitados de vidrio. A esto, se añadieron lentamente veinte gramos de la solución de rodamina-6G mezclando continuamente. La mezcla continuó hasta que se obtuvo un polvo húmedo uniforme y todavía fluido. Las partículas cargadas con tinte se colocaron a continuación en un horno secador de aire y se secaron durante 1 h a 50 °C. A continuación se añadieron ciento veinte gramos de propilenglicol al vaso de precipitados y la suspensión se mezcló hasta uniformidad. Después de 1 h de agitación suave a temperatura ambiente, se observó que el líquido permanecía transparente y no se observó una filtración aparente del tinte. Este experimento demuestra que las partículas de polisacárido cargadas con tinte preparadas de acuerdo con la presente invención pueden retener efectivamente pequeñas moléculas hidrófilas en la suspensión líquida orgánica. Para demostrar la liberación del tinte tras la dilución en agua, se añadieron 100 gramos de agua a 50 gramos de la suspensión de partículas de tinte. El líquido se volvió rojo inmediatamente, confirmando así que las partículas de polisacárido cargadas con tinte liberan fácilmente las moléculas pequeñas tras la dilución en agua.

Ejemplo 2.

Retención de materiales bioactivos hidrófobos en partículas de polisacárido

Lucantin-Pink es un producto astaxantina que está disponible en el mercado fabricado por BASF, GmbH. Aunque la astaxantina es un compuesto químico soluble en aceite con un peso molecular relativamente pequeño (596,84 g/ml),

se ha hecho dispersable en agua en el producto (véase la patente de Estados Unidos n.º 7105176 [15]). En el presente documento se usó como pigmento trazador para demostrar su retención dentro de la suspensión líquida orgánica de partículas de polisacárido.

5 **Preparación de partículas de polisacárido reticuladas, de acuerdo con métodos estándar bien conocidos en la técnica:** Se preparó una solución que contenía Lucantin-Pink al 10 % en una mezcla 1:1 de polipropilenglicol y aceite mineral. Se preparó una solución que contenía alginato de sodio al 3 % (FMC BioPolymer, PA, EE.UU.) y se mezcló con 25 % en peso de la solución de Lucantin-Pink. La mezcla que contenía el polisacárido y el pigmento se pulverizó en un baño de agua de cloruro cálcico al 5 %. Se observó que una cantidad significativa del pigmento ya se había filtrado en la solución de reticulación. Se recogieron las partículas reticuladas que contenían el pigmento restante, se secaron sobre una toalla de papel y se mezclaron en una mezcla de polipropilenglicol/aceite mineral 1:1 p/p en una relación 1:2 de partículas húmedas con el líquido orgánico. Después de 1 h de agitación suave a temperatura ambiente, se observó que una cantidad significativa adicional de pigmento se había filtrado en el líquido orgánico. Este experimento demuestra la dificultad de retener pequeñas moléculas hidrófobas en matrices de gel típicas.

15 **Preparación de partículas de polisacárido cargadas bioactivas de acuerdo con la presente invención:** se colocaron cincuenta gramos de alginato de sodio finamente triturado en un vaso de precipitados. A esto, se añadieron lentamente 40 gramos de la solución de Lucantin-Pink mezclando continuamente. La mezcla continuó hasta que se obtuvo un polvo húmedo uniforme y todavía fluido. Las partículas cargadas con pigmento se colocaron a continuación en un horno secador de aire y se secaron durante 2 h a 50 °C. A continuación se añadieron ciento cincuenta gramos de una mezcla de polietilenglicol/aceite mineral 1:1 p/p al vaso de precipitados y la suspensión se mezcló hasta uniformidad. Después de 1 h de agitación suave a temperatura ambiente, el líquido orgánico permaneció sustancialmente transparente y no se observó lixiviación aparente del tinte, mientras que las partículas de polisacárido retuvieron su color oscuro y fueron fácilmente visibles en el líquido. Este experimento demuestra que las partículas de polisacárido cargadas con pigmento, preparadas de acuerdo con la presente invención, pueden retener efectivamente pequeñas moléculas hidrófobas en suspensión de disolvente orgánico o hidrófobo. Para demostrar la liberación del tinte tras la dilución en agua, se añadieron 100 gramos de agua a 50 gramos de la suspensión de pigmento. El líquido se volvió rojo inmediatamente, confirmando así que las partículas de polisacárido cargadas con pigmento liberan fácilmente las moléculas pequeñas tras la dilución en agua.

Ejemplo 3.

Preparación de una sustancia de polisacárido termoestable que contiene enzima.

La tripsina es una serina proteasa que se encuentra en el sistema digestivo de muchos vertebrados. Hidroliza proteínas y tiene especificidad de sustrato basada en las cadenas laterales de lisina y arginina cargadas positivamente. Su tamaño molecular es relativamente pequeño (24 kDa), por lo que penetra fácilmente en las matrices de gel de polisacárido.

40 **Preparación de una sustancia de polisacárido que contiene enzima estable de acuerdo con la presente invención:** Se prepara una solución que contiene 10 % en peso de polvo de tripsina pura (Sigma) en tampón Tris 0.01M. A esta solución, se añade agente estabilizador al 0,2 % (ácido 4-formilfenil borónico, Sigma). La goma guar (FMC BioPolymer, PA, EE.UU. se muele finamente en un molinillo de café de cocina y se tamiza a través de un tamiz de malla de 50 micrómetros. Se colocan veinticinco gramos de goma guar finamente triturada en un vaso de precipitados. A esto, se añade lentamente veinticinco gramos de la solución de tripsina mezclando continuamente. La mezcla continúa hasta que se obtiene un polvo húmedo uniforme y todavía fluido. Las partículas cargadas con enzima se colocan a continuación en un horno secador de aire y se secan durante 1 h a 50 °C. Se añaden cincuenta gramos de polietilenglicol al vaso de precipitados y la suspensión se homogeneiza durante 15 minutos a 10.000 RPM (Tissue-Terror, Lab Homogenizer). La suspensión de enzima estable que contiene aproximadamente 1 % de tripsina ahora está lista para su uso en diversos alimentos o piensos líquidos o productos nutracéuticos como se describió anteriormente.

55 **Prueba de estabilidad térmica de la sustancia de tripsina seca en un producto en comprimido:** Cincuenta mg de sustancia de tripsina que contiene tripsina al 10 % se mezclan con 450 mg de maltodextrina DE-1 que contiene 2 % p/p de estearato de magnesio y 2 % p/p de sílice ahumada hidrófila y se comprime en un equipo portátil de prensado de pastillas (usando una carcasa de diámetro de comprimido de 12,7 mm (1/2")). También se preparan comprimidos similares que contienen polvo seco de las enzimas en forma libre y se usan para comparar con comprimidos que contienen la sustancia enzimática termoestable.

60 La actividad restante de la proteasa después de la formación de comprimidos respecto a su actividad en la mezcla de polvo antes de la formación de comprimidos se determina de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica usando azocaseína como sustratos. Los comprimidos de tripsina protegidos y no protegidos de control se colocan en un horno a 45 °C y humedad relativa del 75 % durante 90 días. La actividad restante de la tripsina en ambas muestras se mide siguiendo los procedimientos estándar [16]. No se detecta actividad enzimática en la muestra que contiene tripsina no protegida, mientras que la actividad restante en la muestra que contiene tripsina en la sustancia

estable es del 70 %.

Ejemplo 4.

- 5 **Preparación de una sustancia de polisacárido que contiene fitasa termoestable de acuerdo con la presente invención:** La fitasa (Sigma) que contenía un 2 % en peso de enzima activa se dializó en un tampón tris 0,2 M para eliminar los azúcares y solutos de sales añadidos procedentes de la solución enzimática. Se añadieron lentamente en un vaso de precipitados veinte gramos de la solución de enzima dializada mezclando continuamente con veinticinco gramos de polvo de carragenano altamente purificado y finamente triturado, goma guar, agar, gelanol o pectina. La mezcla continuó hasta que se obtuvo un polvo húmedo uniforme y todavía fluido. Las partículas cargadas con fitasa se colocaron a continuación en un horno de secador de aire y se secaron durante 1 h a 40 °C.

- 15 **Prueba de estabilidad térmica de una sustancia fitasa seca en condiciones de extrusión de pienso simuladas:** Quinientos mg de partículas secas termoestables de las sustancias fitasa anteriores se colocaron en un tubo que tenía un fondo de malla fina. El tubo que contenía la sustancia fitasa se aseguró en la parte superior de un matraz Erlenmeyer y se sometió durante 10 segundos a un flujo constante de vapor caliente producido por el agua hirviendo en el matraz. La actividad restante de la fitasa después de dicho proceso de extrusión de pienso simulado se midió y comparó con la actividad restante de la enzima libre no protegida. La Tabla 1 muestra la actividad enzimática restante en cada tipo de vehículos de polisacáridos. Se descubrió que todos los polisacáridos probados proporcionaron una protección significativa a la enzima bajo exposición al vapor durante 10 segundos, no detectándose actividad en la muestra de enzima no protegida. Esta prueba demuestra que la fitasa termosensible protegida en una sustancia de polisacárido de acuerdo con la invención puede mezclarse con otros ingredientes de un pienso animal y extruirse para formar gránulos de pienso.

- 25 Tabla 1. Actividad fitasa en partículas en condiciones de extrusión de pienso simuladas (exposición a vapor durante 10 seg.)

Vehículo adsorbente	Actividad restante (%)
Carragenano	15 %
Goma guar	26 %
Agar	32 %
Gelano	17 %
Pectina	39 %

Ejemplo 5.

- 30 **Efecto de varias partículas vehículo sobre la estabilidad térmica de la fitasa en condiciones de extrusión de pienso simuladas.**

- 35 La solución de fitasa dializada del Ejemplo 4 (20 g) se adsorbió en 25 g de almidón de maíz, almidón con alto contenido de amilosa (Hylon V, National Starch and Chemical Co., Bridgewater, NJ), carragenano de alta pureza, carboximetilcelulosa (Hercules Inc., Wilmington, DE), Aislado de proteína de trigo (Davisco Food Int., Eden Prairie, MN), talco (Sigma) y carbonato de calcio (Sigma). La mezcla continuó hasta que se obtuvo un polvo húmedo uniforme y todavía fluido. Las partículas cargadas con fitasa se colocaron a continuación en un liofilizador y se secaron durante la noche a 40 °C de temperatura de conservación. La estabilidad térmica de la fitasa en las muestras se probó en condiciones de extrusión de pienso simuladas como se describe en el Ejemplo 4 bajo exposición al vapor durante 5 segundos). La actividad enzimática restante en las muestras se da en la Tabla 2. Estos resultados de las pruebas muestran que el carragenano es el polisacárido más adecuado para proteger a la fitasa en condiciones de extrusión simuladas. El almidón de maíz y los vehículos inorgánicos no proporcionaron ninguna protección a la enzima.

- 45 Tabla 2. Actividad fitasa en partículas en condiciones de extrusión de pienso simuladas (exposición a vapor durante 5 seg.)

Vehículo adsorbente	Actividad restante (%)
Almidón de maíz	0 %
Almidón con alto contenido de amilosa	60 %
Carragenano	100 %
CMC	50 %

(continuación)

Vehículo adsorbente	Actividad restante (%)
Aislado de proteína de trigo	60 %
Talco	0 %
CaCO ₃	0 %

Ejemplo 6.

5 **Estabilidad al calor en condiciones de extrusión de pienso simuladas de fitasa protegida en varios polisacáridos y recubrimiento adicional con una grasa sólida fundida**

10 La solución de fitasa dializada del Ejemplo 4 (20 g) se adsorbió en 25 g de carragenano de alta pureza, goma guar (ambos de Tic gums, White Marsh, MD), agar, alginato o pectina (todos de Sigma). La mezcla continuó hasta que se obtuvo un polvo húmedo uniforme y todavía fluido. Las partículas cargadas con fitasa se colocaron a continuación en un liofilizador y se secaron durante la noche a 40 °C de temperatura de conservación.

15 Las partículas de polisacárido cargadas con fitasa secas se calentaron a 65 °C y se añadieron lentamente y se mezclaron con una cantidad igual de aceite de soja hidrogenado fundido (27 Stereane, Loders Crokllan LLC., Channahon, IL). Se añadió estearato de magnesio o zinc junto con la grasa fundida para evitar la fijación.

20 La estabilidad térmica de la fitasa en las muestras recubiertas se probó en condiciones de extrusión de pienso simuladas como se describe en el Ejemplo 4. Las partículas de polisacárido recubiertas se sometieron durante 10 segundos a un flujo constante de vapor caliente producido por el agua hirviendo en el matraz. La actividad enzimática restante en las muestras se da en la Tabla 3. Estos resultados de las pruebas muestran que tanto la goma guar como la pectina son los polisacáridos más adecuados para proteger a la fitasa en condiciones de extrusión simuladas.

Tabla 3. Actividad fitasa en partículas recubiertas en condiciones de extrusión de pienso simuladas (exposición a vapor durante 10 seg.)

Polisacárido	Actividad restante (%)
Carragenano	30 %
Goma guar	70 %
Pectina	68 %
Agar	50 %
Alginato	30 %

25

Ejemplo 7.

30 **Estabilidad al calor en condiciones de granulación de pienso simuladas de fitasa protegida en goma guar y recubrimiento adicional con una grasa sólida fundida**

35 La solución de fitasa dializada del Ejemplo 4 (20 g) se adsorbió en 25 g de goma guar de alta pureza (Tic gums, White Marsh, MD). La mezcla continuó hasta que se obtuvieron unos polvos húmedos uniformes y todavía fluidos. Las partículas cargadas con enzima se colocaron a continuación en un liofilizador y se secaron durante la noche a 40 °C de temperatura de conservación.

40 Las partículas de goma guar secas cargadas con la enzima se calentaron a 65 °C y se añadieron lentamente mezclando con una cantidad igual de aceite de soja hidrogenado fundido (27 Stereane, Loders Crokllan LLC., Channahon, IL). Se añadió estearato de magnesio o zinc junto con la grasa fundida para evitar la fijación.

45 La estabilidad térmica de las partículas de enzima se probó en condiciones de granulación de pienso simuladas donde las partículas se mezclaron en pienso de pollo molido y se sometieron durante 30 min a un flujo constante de aire caliente a 85 °C en un horno. La actividad enzimática restante en muestras protegidas fue del 65 % mientras que la actividad restante en muestras no protegidas fue solo del 32 %. Estos resultados de las pruebas muestran que la fitasa protegida de acuerdo con la presente invención es estable en condiciones de granulación de pienso simuladas.

Ejemplo 8.**Efecto de varios solutos en la solución adsorbente sobre la estabilidad térmica de la fitasa en condiciones de extrusión de pienso simuladas.**

5 Se añadió solución de fitasa dializada del Ejemplo 4 (20 g) con o sin cloruro de calcio al 10 % y se adsorbió en 25 g de almidón con alto contenido de amilosa. Se prepararon muestras adicionales adsorbiendo solución dializada de fitasa del Ejemplo 4 (20 g) añadida con o sin sacarosa al 10 % y adsorbida en 25 g de carragenano de baja pureza (que contenía una cierta cantidad de maltodextrina). Las sustancias de fitasa seca se prepararon como se describe en el Ejemplo 4 y se probaron para determinar la estabilidad térmica en condiciones de extrusión de pienso simuladas como se describe en el ejemplo 4 bajo exposición al vapor durante 5 seg). La actividad enzimática restante en las muestras se da en la Tabla 4. Estos resultados de las pruebas demuestran que los solutos como las sales y los azúcares interfieren con las interacciones positivas entre los polisacáridos y la fitasa, lo cual tuvo como resultado una actividad enzimática sustancialmente más baja después de las pruebas de estabilidad térmica.

15 Tabla 4. Estabilidad térmica en condiciones de extrusión de pienso simuladas (exposición a vapor durante 5 seg.)

Soluto y tipo de vehículo	Actividad restante (%)
Sin soluto, Vehículo de almidón con alto contenido de amilosa	60 %
KCl 10 %, Vehículo de almidón con alto contenido de amilosa	30 %
Sin soluto, vehículo de carragenano de baja pureza	58 %
sacarosa 10 %, vehículo de carragenano de baja pureza	8 %

Ejemplo 9.**Preparación de una sustancia de polisacárido estable que contiene un agroquímico.**

20 El glifosato (Monsanto) es un compuesto orgánico soluble en agua y un herbicida ampliamente utilizado. Es un herbicida sistémico, no selectivo, post-emergencia, que se absorbe cuando se aplica al follaje a través de la planta hasta las raíces. En forma de suspensión, este herbicida tiende a perder rápidamente actividad, especialmente cuando se mezcla con otros agroquímicos. Este ejemplo demuestra que el glifosato protegido en la sustancia estable de polisacárido de la presente invención mantuvo un nivel significativo de actividad en suspensión líquida orgánica en presencia de otro herbicida agroquímico (RoundUp, Monsanto).

30 **Preparación de una sustancia agroquímica estable de acuerdo con la presente invención:** Se preparan soluciones que contienen glifosato o RoundUp (disponible en el mercado en Monsanto) en solución orgánica de polipropilenglicol. A estas soluciones, se añade tensioactivo 0,25 % (tensioactivo no iónico a base de silicona, Kinetic™, Helena Corp). La goma xantano (FMC BioPolymer, Pa, EE.UU. se muele finamente en un molinillo de café de cocina y se tamiza a través de un tamiz de malla de 50 micrómetros. Se colocan 100 gramos de goma xantano finamente triturada en un vaso de precipitados. A esto, se añaden lentamente 80 gramos de las soluciones de glifosato o RoundUp mezclando continuamente. La mezcla continuó hasta que se obtuvieron unos polvos húmedos uniformes y todavía fluidos. Los vasos de precipitados que contienen las partículas cargadas de herbicidas se incuban a continuación durante 1 h a 50 °C. A continuación se añaden cuatrocientos gramos de mezcla de aceite mineral/polietilenglicol en una relación 1:1 p/p a cada vaso de precipitados y las suspensiones se homogeneizan durante 30 minutos a 10.000 RPM (Tissue-Terror, Lab Homogenizer). Las suspensiones estables de concentrado de herbicida se mezclan y ahora están listas para su dilución en agua antes de la aplicación del follaje.

40 **Prueba de estabilidad de la suspensión de la mezcla de herbicidas:** Las soluciones comerciales que contienen glifosato o RoundUp se mezclan entre sí y se prueban junto con las suspensiones estables mixtas de glifosato y RoundUp de la presente invención. Los líquidos se colocan en un horno a 40 °C durante 30 días. Las actividades restantes de los herbicidas en las muestras se miden siguiendo protocolos estándar. No se detecta actividad de glifosato en las muestras que contienen herbicidas libres y solo queda aproximadamente un 15 % de actividad de residual, mientras que las actividades restantes en las muestras que contienen suspensiones mixtas de RoundUp y glifosato protegidas son 80 % y 60 %, respectivamente.

Ejemplo 10.**Preparación de una sustancia de polisacárido estable que contiene un suplemento vitamínico.**

55 La vitamina B-12, también denominada cobalamina, es una vitamina soluble en agua con un papel clave en el funcionamiento normal del cerebro y el sistema nervioso, y para generar glóbulos rojos. Una forma sintética común de la vitamina, cianocobalamina, no existe en la naturaleza, pero se usa en muchos productos farmacéuticos y suplementos, y como aditivo alimentario, debido a su estabilidad y menor costo. Sin embargo, en la formulación de

comprimido, se vuelve susceptible a la degradación en presencia de otras vitaminas (por ejemplo, ácido ascórbico) y minerales. Este ejemplo demuestra que la vitamina B-12 protegida en la sustancia estable del presente es significativamente más estable en presencia de ácido ascórbico.

- 5 **Preparación de sustancias vitamínicas estables secas de acuerdo con la presente invención:** Se preparan soluciones que contienen vitamina B-12 pura al 10 % en peso o ácido ascórbico (Sigma) en una mezcla 1:1 de polipropilenglicol y agua. A estas soluciones, se añade emulsionante al 0,25 % (Tween 80, Sigma). La carboximetilcelulosa (CMC, Sigma) se muele finamente en un molinillo de café de cocina y se tamiza a través de un tamiz de malla de 50 micrómetros. Se colocan cien gramos de CMC finamente triturada en un vaso de precipitados.
- 10 A esto, se añaden lentamente 80 gramos de la solución de vitamina B-12 o ácido ascórbico mezclando continuamente. La mezcla continúa hasta que se obtiene un polvo húmedo uniforme y todavía fluido. Las partículas cargadas con fármaco se colocan a continuación en un secador de aire y se secan durante 1 h a 40 °C. Las sustancias estables que contienen la vitamina B-12 y el ácido ascórbico se mezclan entre sí y se forman comprimidos de 500 mg en una prensa de comprimidos. Los comprimidos se colocan en desecadores a 40 °C y una HR de 75 % durante 3 meses y la actividad restante de ambas vitaminas se mide siguiendo los protocolos estándar.

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se usan varios términos relacionados con las composiciones, métodos y otros aspectos de la presente invención. A tales términos se les debe proporcionar su significado habitual en la técnica, a menos que se indique lo contrario.

20

Referencias

- 25 1. Frankel E.N, et al., Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem.*, 2002. 50: p. 2094-9.
- 30 2. Vanlerberghe, G. Handjani N.V. Compositions comprising aqueous dispersions of lipid spheres, en el documento US4897308. 1988.
- 35 3. Lykke, M. Mistry, K.K. Simonsen, O. Symes, K.C. Enzyme-containing particles and liquid detergent concentrate, en el documento US6242405. 1998.
- 40 4. Seiler, M. Klee, S. Hills, G. Lersch, P. Smirnova, I. Arlt, W. Tschernjaew, J. Kobus, A. Encapsulation and Controlled Release of Biologically Active Ingredients with Enzymatically Degradable Microparticulate, Hyperbranched Polymers, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 20080274149. 2008.
- 45 5. Maruyama, N., Y. Nishiyama, and H. Kokubo, Method of manufacturing a solid preparation coated with nonsolvent coating, en el documento US-5.789.014. 1996.
- 50 6. Kamel A, et al., Wax-encapsulated particles, en el documento US5258132. 1993.
7. Soper J and Wampler D, Aqueous liquid flavor oil capsules, method of making and using in foods, en el documento WO9319621. 1993.
8. Soper J, Pearl T, and Wampler D, Heat-stable and fractureable spray-dried free-flowing flavor oil capsules, method of making and using in foods, en el documento WO9319622. 1993.
9. Lim F and Moss R, Vitamin encapsulation, en el documento US4389419. 1983.
10. Cox, J.P., Method for forming shaped products for human and/or animal consumption or as marine bait and products produced thereby, en el documento US4362748. 1982.
11. Weidenbach, G. and Bonse, D. Preparation of water-insoluble enzyme compositions, en el documento US4230803. 1978.
- 55 12. Hawkins, J. Chadwick, P. Messenger, E.T and Lykke, M. Method for preparing stabilized enzyme dispersion, en el documento US5198353. 1991.
- 60 13. Onouchi, T. Sugai, H. Sekiguchi, K. Hosoda, Y. Yoshida, E. Water-soluble microcapsules, el documento US 4898781,1987.
14. Langley, J. Symes, K.C. Holm, P. Methods of drying biological products. En el documento US5035900. 1989.
15. Auweter, II. Bohn, H. Lüddecke, E. Hinz, W. Runge, F. Pfeiffer, A. Production of solid preparations of water-soluble, sparingly water-soluble or water-insoluble active compounds, en el documento US7105176. 2001.
- 65 16. Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., and Grassl, M. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed)

ES 2 796 835 T3

Volume I, 2nd ed., 515-516, Academic Press, Inc., New York, NY).

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una sustancia bioactiva estable que comprende un material bioactivo,
5 que comprende;
- (a) disolver el material bioactivo en una solución que comprende solutos, en donde los solutos son una molécula pequeña, seleccionada entre el grupo que consiste en sales inorgánicas, y azúcares, de modo que se obtiene una solución bioactiva, en donde la solución bioactiva tiene una concentración de material bioactivo de al menos el 5 % y una concentración de soluto de menos del 5 % de la solución bioactiva, estando cada porcentaje basado en el peso total de la solución bioactiva;
10 (b) adsorber la solución bioactiva sobre partículas secas de polisacárido solubles en agua no gelificantes en una relación de masa entre la solución bioactiva y las partículas de polisacárido de entre 0,25:1 y 1:1, de modo que se forman partículas cargadas de polisacárido bioactivas; y
15 (c) secar las partículas cargadas de polisacárido bioactivas, de modo que se obtiene la sustancia bioactiva estable.
2. El método de la reivindicación 1, que además comprende eliminar un soluto de la solución bioactiva antes de la etapa de adsorción.
20
3. El método de la reivindicación 1, que además comprende añadir un líquido orgánico inmiscible a la sustancia bioactiva estable, de modo que se forma una suspensión vertible estable.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el material bioactivo se selecciona del grupo que consiste en aminoácidos y sus derivados, fármacos, péptidos, enzimas, enzimas industriales, vitaminas, derivados y complejos vitamínicos, carotenos, antioxidantes, sustancias antiinflamatorias, aceites cosméticos, principios activos antimicrobianos, peróxidos, agroquímicos y una mezcla de los mismos.
25
5. El método de la reivindicación 1, en donde el polisacárido se selecciona entre el grupo que consiste en almidones, celulosas, gomas y sus compuestos modificados y derivados.
30
6. El método de la reivindicación 1, en donde el polisacárido es carragenano, pectina, goma guar o carboximetilcelulosa.
7. El método de la reivindicación 1, en donde la sustancia bioactiva estable comprende el material bioactivo en una cantidad de al menos el 1 % en peso y el polisacárido en una cantidad del 20 % o más en peso, estando cada porcentaje basado en el peso total de la solución bioactiva.
35
8. El método de la reivindicación 1, que además comprende recubrir la sustancia bioactiva estable con una capa de grasas o ceras sólidas fundidas.
40
9. El método de la reivindicación 1, en donde la relación de masa entre la solución bioactiva y las partículas de polisacárido es de 0,5:1.
10. Una sustancia bioactiva estable que comprende un material bioactivo en una cantidad que varía del 1 % al 40 % en peso y un polisacárido soluble en agua en una cantidad que varía del 1 % al 70 % en peso, en donde la sustancia bioactiva estable se produce mediante el método de la reivindicación 1.
45
11. La sustancia bioactiva estable de la reivindicación 10, que además comprende un emulsionante o un estabilizador en una cantidad que varía del 0,5 % al 10 % en peso basado en el peso total de la sustancia bioactiva.
50
12. La sustancia bioactiva estable de la reivindicación 10, en donde el material bioactivo es una enzima seleccionada del grupo que consiste en proteasas, lipasas, amilasas, celulasas, fosfatasas, peroxidases, oxidasas y una mezcla de las mismas.
55
13. La sustancia bioactiva estable de la reivindicación 12, que además comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en antioxidantes naturales o sintéticos, iones de metal, silicatos de metales alcalinos, carbonatos o bicarbonatos, sulfatos, fosfatos, boratos y ácido bórico.
14. La sustancia bioactiva estable de la reivindicación 13, de modo que el compuesto estabiliza la enzima.
60
15. Un producto que comprende la sustancia bioactiva estable de la reivindicación 10, en donde el material bioactivo es una enzima.