

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/107246 A1

(43) Fecha de publicación internacional
23 de julio de 2015 (23.07.2015) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 1/04 (2006.01) *B01J 13/02* (2006.01)
A23P 1/04 (2006.01) *B82Y 5/00* (2011.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2015/070020
- (22) Fecha de presentación internacional:
15 de enero de 2015 (15.01.2015)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201430034 15 de enero de 2014 (15.01.2014) ES
- (71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES];
C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores: **LAGARÓN CABELLO, José María**; Instituto De Agroquímica Y Tecnología De Alimentos (IATA), Avda. Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7, E-46980 Paterna (Valencia) (ES). **PÉREZ MASÍA, Rocío**; Instituto De Agroquímica Y Tecnología De Alimentos (IATA), Avda. Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7, E-46980 Paterna (Valencia) (ES). **LÓPEZ RUBIO, Amparo**; Instituto De Agroquímica Y Tecnología De Alimentos (IATA), Avda. Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7, E-46980 Paterna (Valencia) (ES).
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: METHOD FOR PROTECTING BIOLOGICAL MATERIAL AND THERMOLABILE COMPOUNDS FOR POSSIBLE INDUSTRIAL USES

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

(57) Abstract: The invention relates to a method for protecting biological material in general and thermolabile substances, particularly useful in microorganisms and viruses and any other biological material, as well as in any substance, derived or otherwise, that requires protection to extend the useful life thereof or broaden the scope of use thereof, by electrohydrodynamic or aerodynamic processing. Said processing makes it possible to extend the useful life of the product in a unique manner, since exposing the substance to be protected to a temperature is not involved. In addition, depending on the features and variables used during the coating process, encapsulation makes it possible to maintain the viability of the product against stress conditions such as temperature, relative humidity or pH among others, offering effective protection during the subsequent preparation, processing and storage thereof, and even, for example, during the passage thereof through the gastrointestinal tract in the case of probiotic microorganisms.

(57) Resumen: Procedimiento de protección de material biológico en general y sustancias termolábiles, aplicable específicamente a microorganismos y virus y cualquier otro material biológico, así como a cualquier sustancia derivada o no, que necesite protección para alargar su vida útil o ampliar su campo de aplicación, mediante procesado electrohidrodinámico o aerodinámico. Este procesado permite alargar la vida útil del producto de una manera única ya que no conlleva la exposición a temperatura de la sustancia a proteger. Además, en función de las características o variables utilizadas durante el proceso de recubrimiento, la encapsulación permite mantener la viabilidad del producto ante condiciones de estrés como temperatura, humedad relativa o pH entre otras, proporcionándole una protección eficaz durante su posterior preparación, procesado, almacenamiento e incluso por ejemplo durante el paso a través del tracto gastrointestinal para el caso de microorganismos probióticos.

WO 2015/107246 A1

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

5

DESCRIPCIÓN

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

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

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

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

ESTADO DE LA TECNICA

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

los microorganismos encapsulados. Por tanto, sería deseable disponer de nuevas tecnologías que no involucren condiciones agresivas (tanto de temperatura como de disolventes utilizados) y que den lugar a tamaños de partículas reducidos. La técnica del procesado electrohidrodinámico que comprende procesos denominados electro-

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

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

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

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

25 empleados para formar las cápsulas se ajusten correctamente a las necesidades metabólicas de los microorganismos encapsulados (adecuadas propiedades mecánicas, disolventes y de permeabilidad a nutrientes, gases y metabolitos) y así permitan mantener su viabilidad en el tiempo. Además, todas las tecnologías de encapsulación requieren que los microorganismos sean sometidos a diversas

30 condiciones que podrían afectar a su viabilidad (temperatura, disolventes orgánicos, alto voltaje o diferencia de presión). De esta forma el microorganismo siempre queda afectado en mayor o menor medida y aunque a largo plazo la viabilidad se pueda mantener, el recuento inicial a menudo suele disminuir. En este sentido, la técnica de protección por recubrimiento mediante procesado electrohidrodinámico o aerodinámico

35 de la presente invención proporciona una protección muy eficiente de los preparados

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

EXPLICACION DE LA INVENCION

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

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

- preparación de disoluciones poliméricas formadoras de micro-, submicro- y nanopartículas que componen materiales de recubrimiento
- recubrimiento del material biológico o compuestos termolábiles mediante los materiales preparados en la etapa anterior, realizándose el recubrimiento del material biológico o compuestos termolábiles por procesado electrohidrodinámico o aerodinámico.

35

5

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

5

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

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

10

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

15

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

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

20

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

25

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

30

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

5

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

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

15

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

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

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

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

35

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

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

- El procesado electrohidrodinámico que comprende el electroestirado (electrospinning) y el electroesprayado (electrospraying) es una tecnología basada en la aplicación de campos eléctricos elevados para producir fluidos eléctricamente cargados a partir de disoluciones poliméricas viscoelásticas, las cuales al secarse producen micro- y nanofibras o micro- y nanocápsulas, respectivamente. El equipo de electroestirado y electroesprayado se compone de una fuente de alimentación que suministra corriente, una bomba donde se colocan los depósitos con las disoluciones y uno o varios propulsores conductores, típicamente agujas, de un material conductor. Las agujas se conectan a los depósitos y se focalizan hacia el colector donde se recogerá el material seco. Para el caso del procesado aerodinámico que comprende el esprayado por soplado y el estirado por soplado, se utiliza una bomba donde se colocan los depósitos con las disoluciones. Estos depósitos se conectan a una boquilla a través de la cual también se hace pasar un flujo de gas presurizado. La boquilla queda focalizada hacia el colector donde se recoge el material. Así, el preparado de microorganismos se coloca sobre el colector y las partículas protectoras con tamaño controlado se estirarán o esprayarán directamente sobre ellos formando un recubrimiento que proporcione estabilidad al producto durante su procesado, postprocesado, almacenamiento e incluso durante su uso durante la aplicación.
- 15
- 20
- 25
- 30 Dentro del procesado electrohidrodinámico se hace uso preferente en la presente invención del electroesprayado y dentro del procesado aerodinámico se hace uso preferente en la presente invención del esprayado por soplado.

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

- 5 El proceso del recubrimiento se puede realizar en uno o en varios pasos según las necesidades protectoras del material y con uno o varios materiales, y puede implicar procesos de volteado y homogenización del recubierto utilizando cualquier medio industrial conocido para aumentar la eficacia del proceso de recubrimiento.
- 10 Los materiales utilizados para los recubrimientos obtenidos de la manera descrita anteriormente comprenden proteínas, oligosacáridos, polisacáridos, lípidos, otros polímeros solubles en agua tales como y sin sentido limitativo polivinil alcohol, óxido de polietileno o polivinilpirrolidona y mezcla de alcohol agua tales como y sin sentido limitativo copolímeros de etileno y alcohol vinílico y cualquier preparación comercial de
- 15 los mismos o mezcla de los anteriores. Preferiblemente, se utilizarán las proteínas, oligosacáridos, polisacáridos y lípidos por su carácter sostenible y su mayor estabilidad y compatibilidad con los microorganismos.

Entre las proteínas se seleccionarán preferentemente y sin sentido limitativo proteínas

20 animales, vegetales y microbianas, como por ejemplo las del suero de la leche, caseínas, polipéptidos naturales o obtenidos por modificación genética de microorganismos, colágeno, proteína de soja y zeína, y más preferentemente la zeína y la proteína del suero de la leche.

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

Entre los polisacáridos se seleccionarán preferentemente y sin sentido limitativo

30 alginato, pectinas, quitosano, gomas, carragenatos, almidón, dextrano, maltrodextrina, celulosa, glucógeno, quitina y más preferentemente almidón, dextrano, maltrodextrina y cualquier preparación de las mismas tales como el fibersol o preparado similar.

Entre los lípidos se seleccionarán preferentemente y sin sentido limitativo ácidos

35 grasos.

En cuanto a disolventes, el agua es el preferido, pero dado que la técnica elimina de manera muy eficiente el disolvente, el proceso de la invención es compatible con cualquier tipo de disolvente sea este o no compatible con el producto a proteger, siendo esto una de las ventajas de este proceso. En cuanto a los microorganismos, para el caso de los probióticos, se han testado tanto bacterias aerobias facultativas pertenecientes al género *Lactobacillus*, por ejemplo *Lactobacillus plantarum*, como anaerobias estrictas del género *Bifidobacterium*, por ejemplo *Bifidobacterium longum* o *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* o la cepa CECT 4552 de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. También los hongos del género *Saccharomyces* se pueden usar en esta aplicación. En el caso de las aplicaciones de tratamientos de aguas o sensores, las familias preferidas son *Cyanobacterium* o *Rhodobacterales*.

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

20 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

Figura 8. Imagen de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las capsulas de concentrado de proteínas de suero recubriendo los cristales de liofilo de
10 *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (CECT 4552).

Figura 9. Recuentos del liofilizado recubierto vs. liofilizado no recubierto a lo largo del tiempo almacenados a: (A) 37°C, (B) 53% HR y (C) 26% HR.

15 **MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION**

Ejemplo 1.

Obtención del recubrimiento nanoestructurado a partir de un polisacárido

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

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

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

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

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

Ejemplo 2.

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

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

20 En segundo lugar se realiza una deposición fina y homogéneamente distribuida del liofilizado (de aprox. 5×10^{10} cfu/gramo) mediante un tamizador y se distribuye sobre el colector del equipo de procesado electrohidrodinámico. A continuación se realiza el electroesprayado de la disolución sobre el liofilizado. El equipo se compone de una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector. Para este ejemplo, las condiciones de electroestirado fueron las siguientes: caudal de disolución de 0,15 ml/h; 25 14 kV de corriente; 10 cm de distancia entre la aguja y el colector. Tras un tiempo controlado de electroesprayado el material se voltea y después se vuelve a electroesprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el liofilizado. El material recolectado bajo estas condiciones consiste en un sistema nanoestructurado compuesto por cápsulas esféricas de la mezcla de alginatos, pectinas y almidón que 30 recubren los cristales de liofilizado (tal y como se muestra en la Figura 2).

Ejemplo 3.**Obtención de un recubrimiento nanoestructurado a partir de óxido de polietileno (PEO) y su aplicación sobre el liofilizado de *Lactobacillus plantarum*.**

5

La primera etapa consiste en la preparación de la disolución formadora del recubrimiento de nanopartículas. Para ello se disuelve el PEO en una concentración del 4% en peso respecto al volumen del disolvente (agua destilada). La disolución se mantiene en agitación hasta que el PEO queda completamente disuelto. La disolución

10 final se introduce en una jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo de procesado electrohidrodinámico.

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

15 continuación, se realiza el electro sprayado de la disolución sobre el liofilizado. El equipo se compone de una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector.

20 Para este ejemplo, las condiciones de electro sprayado fueron las siguientes: caudal de disolución de 0,15 ml/h; 14 kV de corriente; 10 cm de distancia entre la aguja y el colector. Tras un tiempo controlado de electro sprayado el material se voltea y después se vuelve a electro sprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el liofilizado. El material recolectado bajo estas condiciones consiste en un sistema

25 nanoestructurado compuesto por fibras de PEO que recubren los cristales del liofilizado.

Ejemplo 4.

Obtención de un recubrimiento nanoestructurado a partir de una mezcla de

30 **polivinil pirrolidona (PVP) y polivinil alcohol (PVOH) y su aplicación sobre el liofilizado de *Lactobacillus plantarum*.**

La primera etapa consiste en la preparación de la disolución formadora del recubrimiento de nanopartículas. Para ello se disuelven la PVP y el PVOH en una

35 concentración del 20% y el 4% en peso respecto al volumen del disolvente (agua

destilada) respectivamente. La disolución se mantiene en agitación hasta que todos los componentes quedan completamente disueltos. La disolución final se introduce en una jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo de electro sprayado.

5

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

20

Ejemplo 5.

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

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

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

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

Finalmente, se midió la viabilidad de los microorganismos de los diferentes materiales obtenidos observando que el método de recubrimiento proporcionó recuentos más elevados y similares a los recuentos del líofilo de partida sin proteger, que el líofilo encapsulado mediante el método uniaxial y coaxial (Tabla 1). La figura 6 muestra la imagen de microscopía electrónica del líofilo recubierto en comparación con la imagen de los cristales de líofilo sin recubrir (Figura 5).

Tabla 1

	Encapsulado coaxial	Encapsulado uniaxial	Recubrimiento
Recuentos (UFC/g)	2.3×10^8	2.1×10^8	5 8.2×10^9

Ejemplo 6.

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

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

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

30 **Ejemplo 7.**

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

En este ejemplo se exponen los resultados de viabilidad de *L. plantarum* obtenidos nada más recubrirlos mediante el procesado electrohidrodinámico. En primer lugar se prepararon las distintas disoluciones poliméricas con las proporciones y aditivos correspondientes según cada material. Estas formulaciones se hicieron pasar a través del equipo de electroesprayado para obtener así el recubrimiento nanoestructurado. A continuación se depositó homogéneamente una cantidad fija (0,2 g) de liofilizado sobre el colector donde se recoge el material nanoestructurado. Finalmente se realiza el electroesprayado de las disoluciones sobre el liofilizado. Tras un tiempo controlado de electroesprayado el material se voltea y después se vuelve a electroesprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el liofilizado. El equipo se compone de una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de corriente, una bomba digital donde se coloca la jeringuilla y que permite controlar el caudal de la disolución y una aguja de acero inoxidable. La aguja se conecta a la jeringuilla a través de un cable de teflón y se coloca de forma perpendicular al colector. Las condiciones de electroesprayado se ajustaron a los distintos polímeros utilizados. El material recolectado bajo estas condiciones consiste en un sistema nanoestructurado compuesto por cápsulas de polímero que recubren los cristales del liofilizado. Inmediatamente después de recogerlo, el material se sembró en el medio óptimo para el crecimiento de la bacteria y se realizaron los recuentos del microorganismo. Los resultados de viabilidad obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

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

5 Ejemplo 8.

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

- 10 La primera etapa consiste en la preparación de la disolución formadora del recubrimiento de nanopartículas. Para ello se disuelve el almidón resistente en una concentración del 20% en peso respecto al volumen del disolvente (agua destilada). Además, se añade un 2% del surfactante Span 20 para facilitar el proceso de

electrosprayado. La disolución se mantiene en agitación hasta que todos los componentes quedan completamente disueltos. La disolución final se introduce en una jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo.

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

25

Ejemplo 9.

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

30

La primera etapa consiste en la preparación de la disolución formadora del recubrimiento de nanopartículas. Para ello se disuelve la zeína en una concentración del 12% en peso respecto al volumen del disolvente (una mezcla de alcohol y agua en una proporción 15:85 respectivamente). La disolución se mantiene en agitación hasta
35 que la zeína queda completamente disuelta. La disolución final se introduce en una

jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo de electroesprayado.

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

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

Ejemplo 10.

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

La primera etapa consiste en la preparación de las disoluciones formadoras del recubrimiento de nanopartículas y los encapsulados. Para el recubrimiento se disuelve la zeina en una concentración del 12% en peso respecto al volumen del disolvente
35 (una mezcla de alcohol y agua en una proporción 15:85 respectivamente). Para la

obtención del β -caroteno encapsulado se prepara una disolución del 33% de zeina en peso respecto al volumen del disolvente (una mezcla de alcohol y agua en una proporción 15:85 respectivamente) y se añade el antioxidante en una proporción zeina: β -caroteno de 95:5 respectivamente. Las disoluciones se mantienen en agitación
5 hasta que los componentes quedan completamente disueltos. Las disoluciones finales se introducen en una jeringuilla de 5 ml para hacerla pasar a continuación a través del equipo.

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

30

35

Tabla 3

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

5 **Ejemplo 11.**

Recubrimiento en equipo de planta piloto del microorganismo *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (CECT 4552) a partir de un concentrado de proteínas del suero de la leche por procesado electrohidrodinámico y estudio de la viabilidad en el tiempo a distintas condiciones de humedad y temperatura.

10

La primera etapa consiste en la preparación de la disolución formadora del recubrimiento de nanopartículas. Para ello se disuelve el concentrado de proteínas del suero de la leche en una concentración del 20% en peso respecto al volumen del disolvente (agua destilada). Además se añade un surfactante (monolaurato de sorbitan) en una concentración de 6% en peso respecto al peso de proteína para mejorar el procesado. La disolución se mantiene en agitación hasta que los componentes quedan completamente disueltos. La disolución final se introduce en el sistema de inyección para proceder al proceso de encapsulación por electroesprayado.

20

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

25

A continuación, se realiza el electroesprayado de la disolución sobre el liofilizado utilizando un equipo Fluidnatek LE500 de la empresa Bioinicia S.L., España. Tras un tiempo controlado de electroesprayado el material se voltea y después se vuelve a electroesprayar para asegurar un recubrimiento completo de todo el liofilizado. Este último paso se puede realizar de forma alternativa sin la necesidad de voltear el producto, conduciendo a los mismos resultados, si el colector ha sido electroesprayado previamente con la misma disolución de concentrado de proteína de suero de leche. El equipo se compone de una fuente de alimentación que suministra entre 0 y 30 kV de

30

corriente en el inyector y entre 0 y -30kV en el colector, una bomba digital donde se coloca la disolución que permite controlar el caudal de ésta y un inyector multiaguja.

Para este ejemplo, las condiciones de electroesprayado fueron las siguientes: caudal
5 de la disolución de 8 ml/h; 31 kV de diferencia de potencial y 12 cm de distancia entre
el inyector y el colector. El material recolectado bajo estas condiciones consiste en un
recubrimiento compuesto por cápsulas muy finas de concentrado de proteína de suero
de leche que recubren los cristales del liofilizado, tal y como se observa en la Figura 8.
Este material se almacenó junto con el liofilizado no recubierto a 26% y 53% de
10 humedad relativa así como a 37°C para poder realizar un estudio de la viabilidad de
los microorganismos. La Figura 9 muestra los recuentos de las 2 muestras
almacenadas (liofilizado recubierto y no recubierto). Se observa que en los casos de
temperatura (37°C) y de alta humedad (53% HR) la viabilidad del liofilizado cae de
manera constante hasta hacerse cero a 10 días, mientras que la viabilidad del
15 liofilizado recubierto a partir de los 3-5 días de caída se estabiliza. A 26% HR el
microorganismo liofilizado sin encapsular sufre una pérdida de viabilidad más
pronunciada que en el caso del liofilizado encapsulado desde el primer momento del
estudio.

20

25

30

35

REIVINDICACIONES

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

5

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

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

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

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

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

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

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

35 7.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque las proteínas utilizadas como materiales de recubrimiento se seleccionan entre

proteínas animales, vegetales y microbianas, particularmente las del suero de la leche, caseínas, polipéptidos naturales u obtenidos por modificación genética de microorganismos, colágeno, proteína de soja y zeína.

5 **8.-** Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque las proteínas utilizadas como materiales de recubrimiento se seleccionan entre la zeína y la proteína del suero de la leche.

10 **9.-** Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque los oligosacáridos utilizados como materiales de recubrimiento se seleccionan entre la lactosa, la sacarosa, la maltosa y los fructooligosacáridos y particularmente los fructooligosacáridos.

15 **10.-** Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque los polisacáridos utilizados como materiales de recubrimiento se seleccionan entre alginato, pectinas, quitosano, gomas, carragenatos, almidón, dextrano, maltrodextrina, celulosa, glucógeno y quitina.

20 **11.-** Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque los polisacáridos utilizados como materiales de recubrimiento se seleccionan entre dextrano, maltodextrina y almidón y cualquier combinación de los mismos.

25 **12.-** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el disolvente que se emplea para la preparación de las disoluciones poliméricas se selecciona entre agua, alcoholes, mezclas de alcoholes y agua y otros disolventes orgánicos.

30 **13.-** Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque el disolvente es agua o mezclas de alcohol y agua.

35 **14.-** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque en la etapa de preparación de las disoluciones poliméricas se añaden sustancias ayudantes del procesado que facilitan la formación de las micro-, submicro- y nanopartículas y que se seleccionan entre plastificantes, tensoactivos, emulsionantes, surfactantes, antioxidantes o cualquiera de sus combinaciones.

- 15.- Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque la sustancia ayudante del procesado que se añade es monolaureato de sorbitan.
- 5 16.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque la etapa de preparación de las disoluciones poliméricas incluye un tratamiento de homogenización por agitación.
- 10 17.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque la etapa de preparación de las disoluciones poliméricas incluye un tratamiento de homogenización por ultrasonidos.
- 15 18.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque el procesado electrohidrodinámico o aerodinámico es electroesprayado o sprayado por soplado en al menos una etapa.
- 20 19.- Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque el procesado electrohidrodinámico o aerodinámico se realiza en varias etapas con un tratamiento de homogenización, volteo y/o tamizado entre estas.
- 25 20.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado porque el recubrimiento por procesado electrohidrodinámico o aerodinámico se realiza directamente sobre el material biológico o compuestos termolábiles previamente deshidratados mediante liofilización u otro proceso no electrohidrodinámico o aerodinámico.
- 30 21.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizado porque el procesado electrohidrodinámico o aerodinámico se realiza directamente sobre el material biológico o compuestos termolábiles sin deshidratar, produciéndose la deshidratación de éstos y después el recubrimiento mediante procesado electrohidrodinámico o aerodinámico.
- 35 22.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque previamente a la etapa de recubrimiento se lleva a cabo un tratamiento de tamizado para controlar el tamaño de partícula.

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

5

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

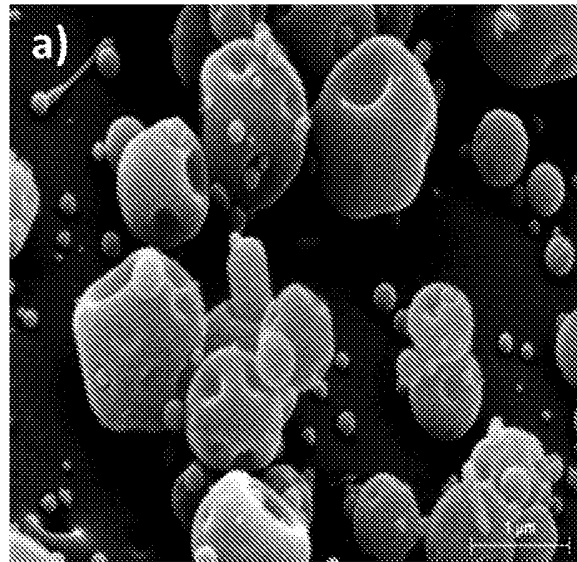


FIG 1

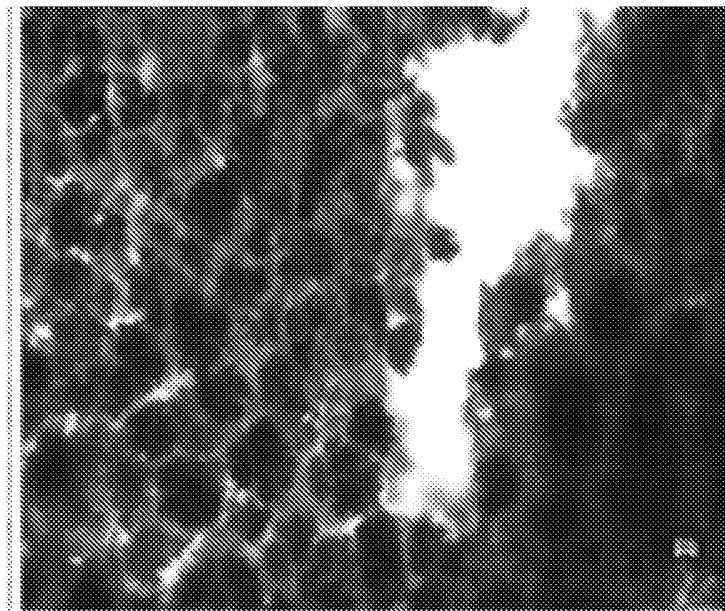


FIG 2

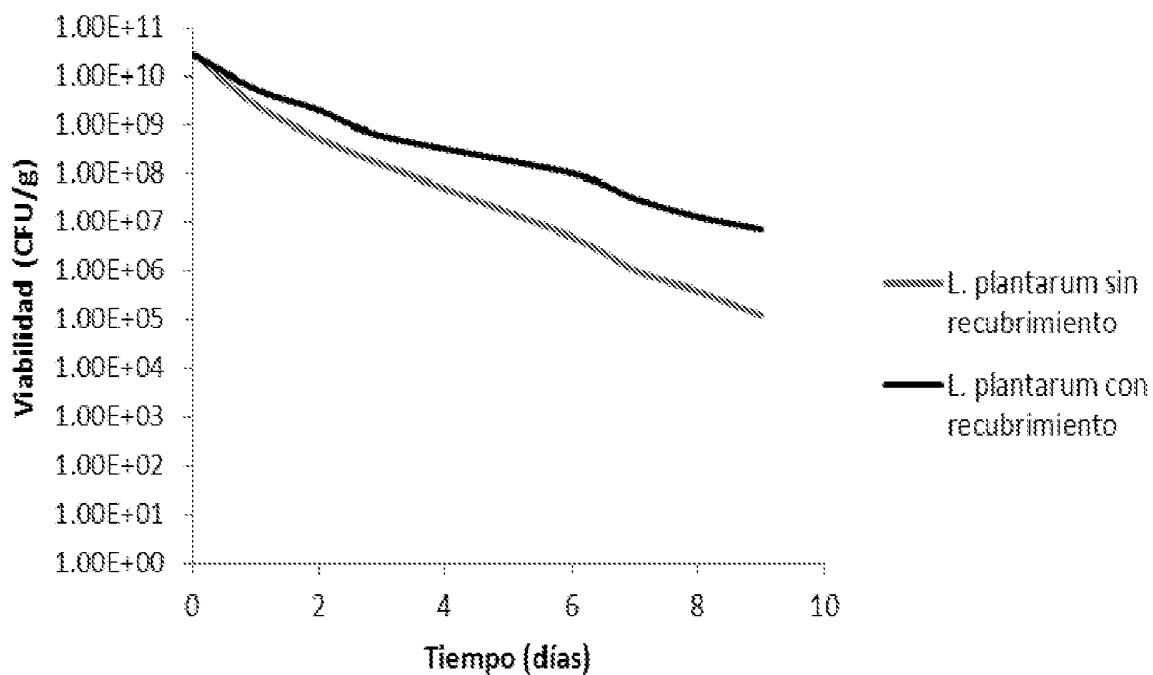


FIG 3

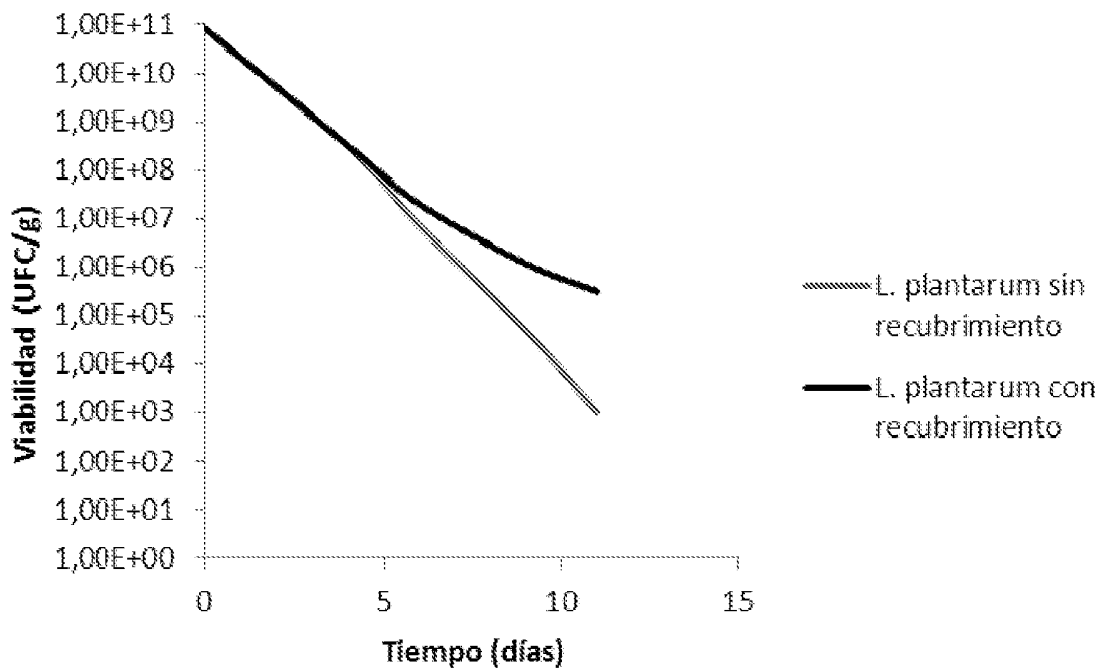


FIG 4

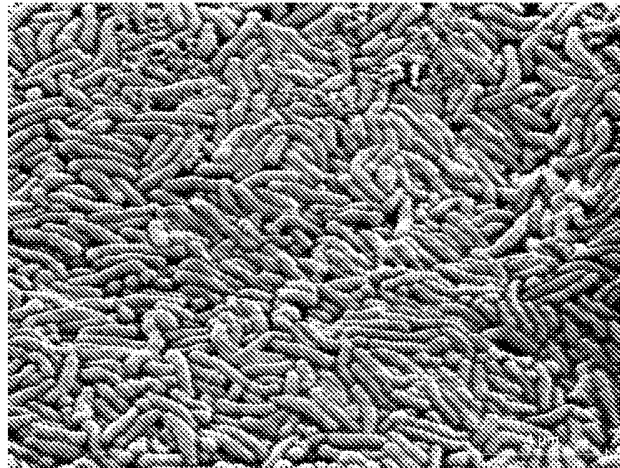


FIG 5

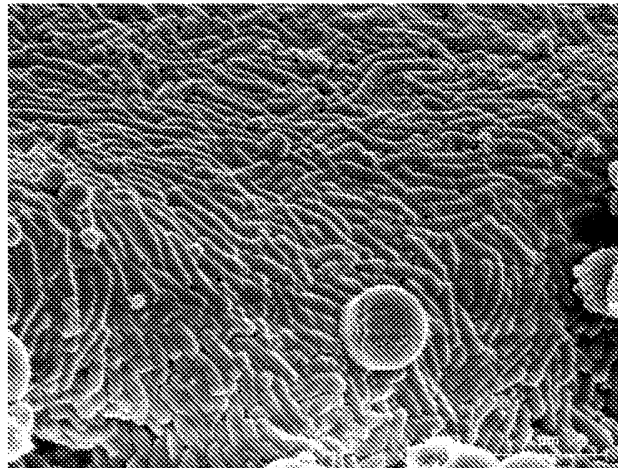


FIG 6

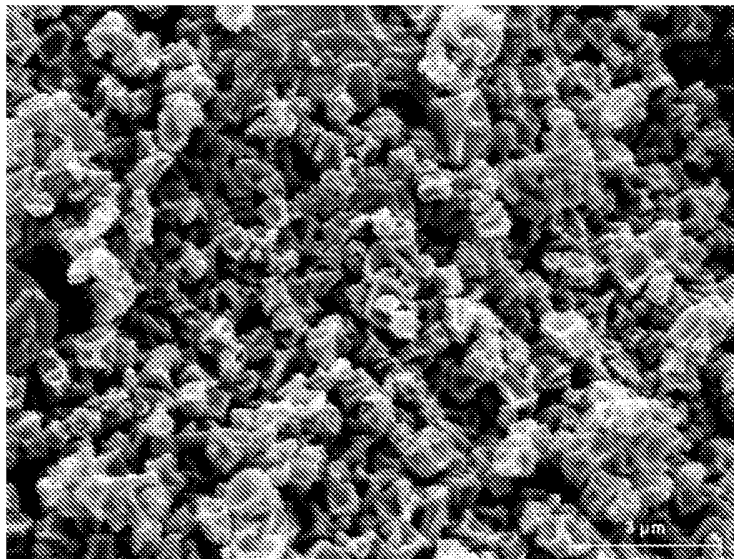


FIG 7

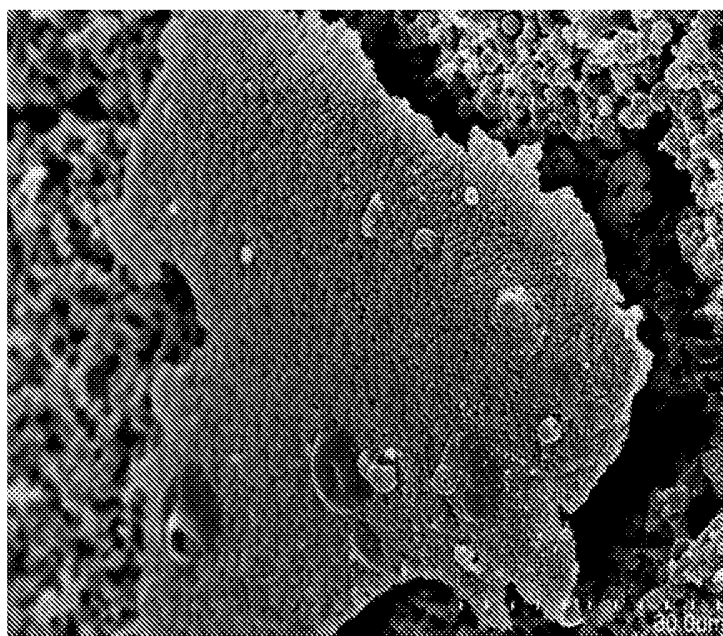
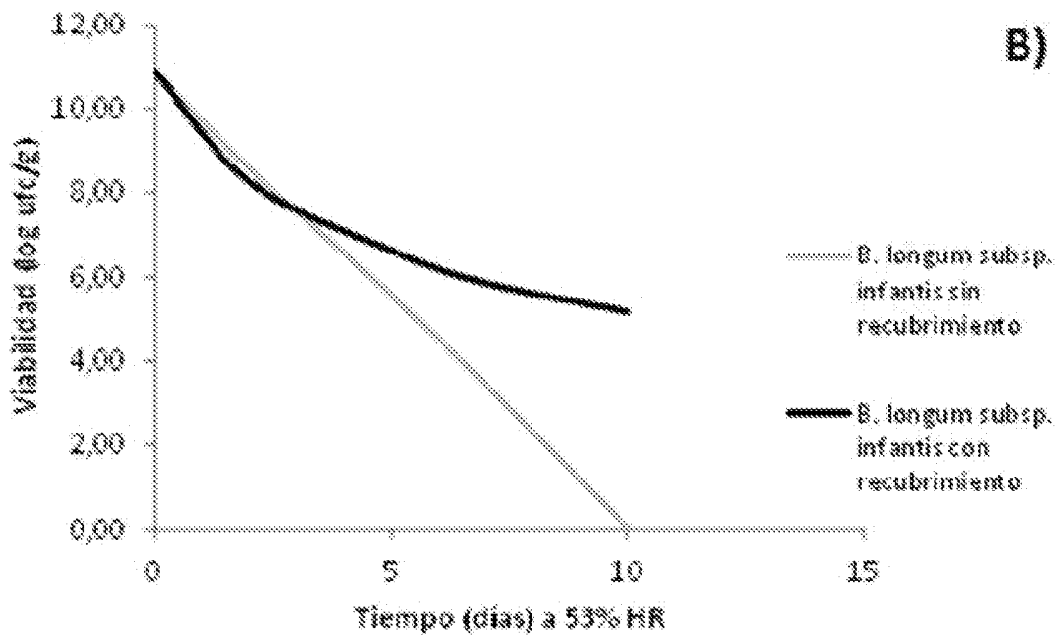
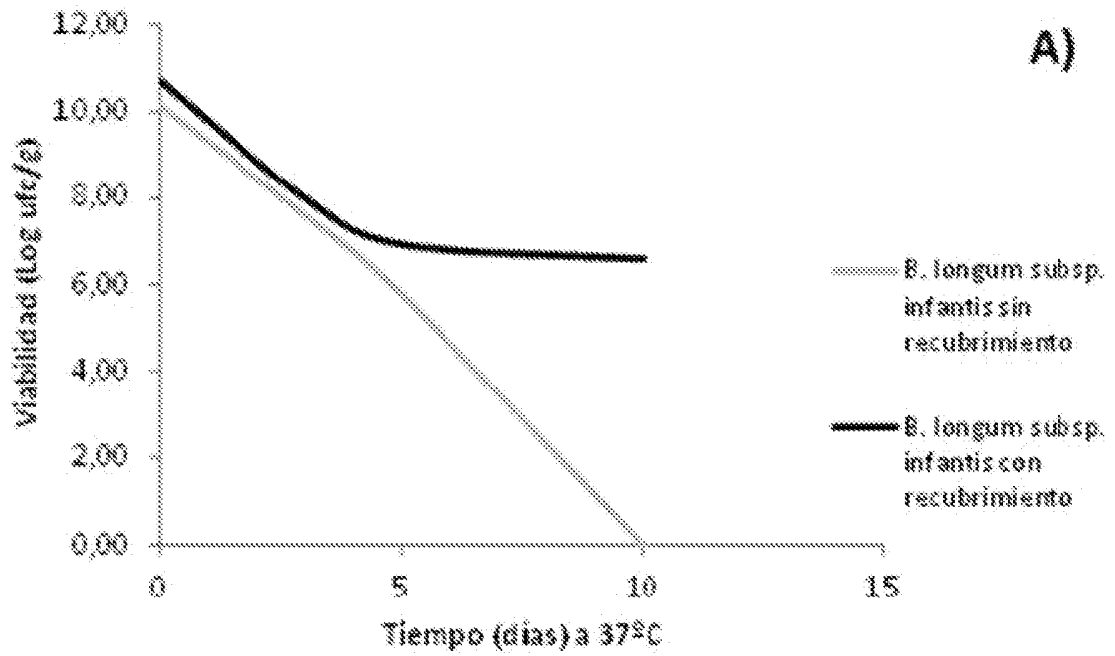


FIG 8



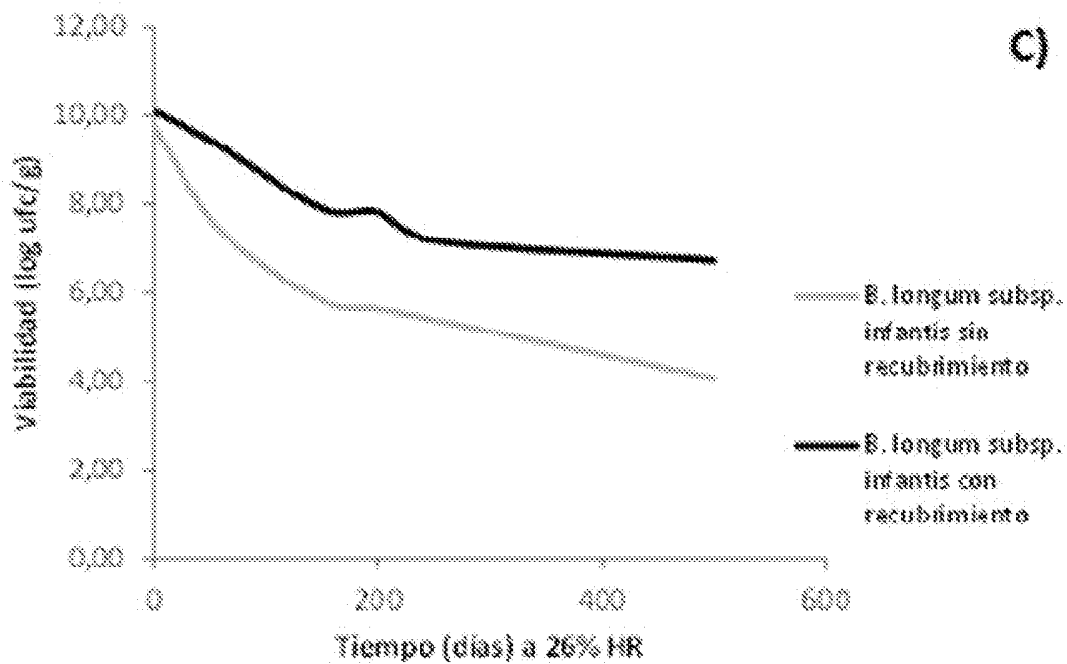


FIG. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070020

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A23P, B01J, B82Y

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, NCBI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER, y bases de datos de texto completo TXT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	PÉREZ-MASIÁ ROCIO et al. "Development and Optimization of Novel Encapsulation Structures of Interest in Functional Foods Through Electrospraying" Food and Bioprocess Technology, 20140328 Springer New York, New York, NY 28/03/2014 VOL: 7 No: 11 Pags: 3236 - 3245 ISSN 1935-5130 Doi: doi:10.1007/s11947-014-1304-z Barros Velazquez Jorge; the whole document.	1, 4-16, 18, 20-24
X	ES 2395553 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) 13/02/2013, the whole document.	1-5, 7, 8, 12-14, 16-24
X	ES 2402612 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION ET AL.) 07/05/2013, the whole document.	1, 4, 5, 7, 8, 14, 16-24

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
21/04/2015

Date of mailing of the international search report
(23/04/2015)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. García Coca

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493411

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070020

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AMPARO LPEZ-RUBIO et al." Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living <i>bifidobacteria</i> in food hydrocolloids" Food Hydrocolloids, 20111208 Elsevier BV, NL 08/12/2011 VOL: 28 No: 1 Pags: 159 - 167 ISSN 0268-005X Doi: doi:10.1016/j.foodhyd.2011.12.008; the whole document.	1-3, 5, 7-9, 16-24
X	LÓPEZ-RUBIO, A. et al "Whey protein capsules obtained throgh electrospaying for the encapsulation of bioactives" Innovative Food Science and Emerging Technologies (2012) Vol. 13, pages 200 - 206; DOI: 10.1016/j.ifset.2011.10.012; the whole document.	1, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 16-24
X	PEREZ-MASIA ROCIO et al. "Development of zein-based heat-management structures for smart food packaging" Food Hydrocolloids JAN 2013 00/01/2013 VOL: 30 No: 1 Pags: 182-191 ISSN 0268-005X(print) ISSN 1873-7137(electronic) Doi: doi:10.1016/j.foodhyd.2012.05.010; the whole the document.	1, 5, 7, 8, 12-17, 22-24
X	PÉREZ-MASIÁ ROCÍO et al. "Surfactant-aided electrospaying of low molecular weight carbohydrate polymers from aqueous solutions" CARBOHYDRATE POLYMERS APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB // VOL: 101 Pags: 249 - 255 ISSN 0144-8617 Doi: doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.032 Boeriu Dr Carmen G; Dam Dr Jan E G van; Schols Dr Henk A; the whole document.	1, 5, 10-24
X	ZAMANI MAEDEH et al. "Advances in drug delivery via electrospun and electrospayed nanomaterials" International Journal of Nanomedicine 2013 00/00/2013 VOL: 8 Pags: 2997-3017 ISSN 1178-2013(print) ISSN 1178-2013(electronic) Doi: doi:10.2147/IJN.S43575; the whole document.	1, 4-6, 22-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2015/070020

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2402612 A1	07.05.2013	US2015010641 A1 WO2013060913 A1	08.01.2015 02.05.2013
-----	-----	-----	-----
ES2395553 A1	13.02.2013	WO2012175776 A1 EP2724775 A1 EP2724775 A4	27.12.2012 30.04.2014 08.04.2015
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070020

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/04 (2006.01)

A23P1/04 (2006.01)

B01J13/02 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070020

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A23P, B01J, B82Y

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, NCBI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER, y bases de datos de texto completo TXT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	PÉREZ-MASIÁ ROCIO et al. "Development and Optimization of Novel Encapsulation Structures of Interest in Functional Foods Through Electrospraying" Food and Bioprocess Technology, 20140328 Springer New York, New York, NY 28/03/2014 VOL: 7 No: 11 Pags: 3236 - 3245 ISSN 1935-5130 Doi: doi:10.1007/s11947-014-1304-z Barros Velazquez Jorge; todo el documento.	1, 4-16, 18, 20-24
X	ES 2395553 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) 13/02/2013, todo el documento.	1-5, 7, 8, 12-14, 16-24
X	ES 2402612 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION ET AL.) 07/05/2013, todo el documento.	1, 4, 5, 7, 8, 14, 16-24

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
21/04/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
23 de abril de 2015 (23/04/2015)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. García Coca
Nº de teléfono 91 3493411

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070020

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	<p>AMPARO LPEZ-RUBIO et al." Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living <i>bifidobacteria</i> in food hydrocolloids" Food Hydrocolloids, 20111208 Elsevier BV, NL 08/12/2011 VOL: 28 No: 1 Pags: 159 - 167 ISSN 0268-005X Doi: doi:10.1016/j.foodhyd.2011.12.008; todo el documento.</p>	1-3, 5, 7-9, 16-24
X	<p>LÓPEZ-RUBIO, A. et al "Whey protein capsules obtained through electro spraying for the encapsulation of bioactives" Innovative Food Science and Emerging Technologies (2012) Vol. 13, páginas 200 - 206; DOI: 10.1016/j.ifset.2011.10.012; todo el documento.</p>	1, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 16-24
X	<p>PEREZ-MASIA ROCIO et al. "Development of zein-based heat-management structures for smart food packaging" Food Hydrocolloids JAN 2013 00/01/2013 VOL: 30 No: 1 Pags: 182-191 ISSN 0268-005X(print) ISSN 1873-7137(electronic) Doi: doi:10.1016/j.foodhyd.2012.05.010; todo el documento.</p>	1, 5, 7, 8, 12-17, 22-24
X	<p>PÉREZ-MASIÁ ROCÍO et al. "Surfactant-aided electro spraying of low molecular weight carbohydrate polymers from aqueous solutions" CARBOHYDRATE POLYMERS APPLIED SCIENCE PUBLISHERS, LTD. BARKING, GB // VOL: 101 Pags: 249 - 255 ISSN 0144-8617 Doi: doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.032 Boeriu Dr Carmen G; Dam Dr Jan E G van; Schols Dr Henk A; todo el documento.</p>	1, 5, 10-24
X	<p>ZAMANI MAEDEH et al. "Advances in drug delivery via electro spun and electro sprayed nanomaterials" International Journal of Nanomedicine 2013 00/00/2013 VOL: 8 Pags: 2997-3017 ISSN 1178-2013(print) ISSN 1178-2013(electronic) Doi: doi:10.2147/IJN.S43575; todo el documento.</p>	1, 4-6, 22-24

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2015/070020

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2402612 A1	07.05.2013	US2015010641 A1 WO2013060913 A1	08.01.2015 02.05.2013
-----	-----	-----	-----
ES2395553 A1	13.02.2013	WO2012175776 A1 EP2724775 A1 EP2724775 A4	27.12.2012 30.04.2014 08.04.2015
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12N1/04 (2006.01)

A23P1/04 (2006.01)

B01J13/02 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)