

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual Oficina internacional



WIPO | PCT



(10) Número de Publicación Internacional

WO 2014/006261 A2

(43) Fecha de publicación internacional  
9 de enero de 2014 (09.01.2014)(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
A61K 9/16 (2006.01)Navarra (ES). **VIRTO RESANO, Raquel**; CNTA, Carretera NA -134, Km 50, E-31570 San Adrián - Navarra (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070477

(22) Fecha de presentación internacional:

5 de julio de 2013 (05.07.2013)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201231058 5 de julio de 2012 (05.07.2012) ES

(71) Solicitantes: **CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGÍA Y SEGURIDAD ALIMENTARIA, LABORATORIO DEL EBRO** [ES/ES]; Ctra. NA - 134, Km 50, E-31570 San Adrián - Navarra (ES). **UNIVERSIDAD DE NAVARRA** [ES/ES]; Campus Universitario s/n, E-31009 Pamplona - Navarra (ES).(72) Inventores: **AGÜEROS BAZO, Maite**; S.G.I (D.P.I), Avenida Pio XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **ESPARZA CATALÁN, Irene**; S.G.I (D.P.I), Avenida Pio XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **GAMAZO DE LA RASILLA, Carlos**; S.G.I (D.P.I), Avenida Pio XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **GONZÁLEZ FERRERO, Carolina**; CNTA, Carretera NA -134, Km 50, E-31570 San Adrián - Navarra (ES). **GONZÁLEZ NAVARRO, Carlos Javier**; CNTA, Carretera NA -134, Km 50, E-31570 San Adrián - Navarra (ES). **IRACHE GARRETA, Juan Manuel**; S.G.I (D.P.I), Avenida Pio XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **PEÑALBA SOBRÓN, Rebeca**; S.G.I (D.P.I), Avenida Pio XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **ROMO HUALDE, Ana**; CNTA, Carretera NA -134, Km 50, E-31570 San Adrián -(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 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, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

(54) Title: MICROPARTICLES FOR ENCAPSULATING PROBIOTICS, PRODUCTION AND USES THEREOF

(54) Título : MICROPARTÍCULAS PARA ENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS, SU OBTENCIÓN Y USOS

(57) Abstract: The invention relates to microparticles comprising a matrix consisting of casein and chitosan, and probiotic bacteria. Said matrix protects said probiotic bacteria during (i) the processing thereof, (ii) the storage thereof, and (iii) the transit thereof through the gastrointestinal tract, extending the useful life thereof. The invention also relates to the method for producing the microparticles, and to the products and compositions containing same.

(57) Resumen: La invención se dirige a unas micropartículas que comprenden una matriz constituida por caseína y quitosano, y unas bacterias probióticas; dicha matriz protege a dichas bacterias probióticas durante su (i) procesamiento, (ii) almacenamiento y (iii) tránsito a través del tracto gastrointestinal, prolongando su vida útil. La presente invención también está dirigida al método de obtención de las micropartículas y a los productos y composiciones que las incorporan.

## MICROPARTÍCULAS PARA ENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS, SU OBTENCIÓN Y USOS

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se adscribe en el ámbito de la tecnología alimentaria, nutracéutica, cosmecéutica y farmacéutica. En particular, se refiere a unas micropartículas que comprenden una matriz de caseína y quitosano y unas bacterias probióticas, a un método para su obtención y a sus aplicaciones.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

#### Generalidades

La microbiota intestinal de un adulto sano es relativamente estable y contiene diversas poblaciones bacterianas beneficiosas, constituidas principalmente por especies de lactobacilos y bifidobacterias, que desempeñan un rol importante en la salud del huésped. El desequilibrio de la microbiota colónica beneficiosa puede contribuir al desarrollo de diferentes trastornos, como infecciones del tracto gastrointestinal, constipación, síndrome de colon irritable, enfermedad inflamatoria del colon, alergias, enfermedades cardíacas y cáncer de colon. Para prevenir estos riesgos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado explotar el potencial terapéutico y profiláctico de microorganismos beneficiosos o probióticos.

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, administrados en cantidades suficientes, proveen efectos fisiológicos beneficiosos sobre el huésped (Pérez-Luyo, 2008). En este sentido, se les atribuye: ayuda en la digestión de la lactosa, prevención de infecciones intestinales, acción inmunomoduladora, prevención de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente, se está investigando el posible papel de los probióticos en la prevención de las caries dentales.

Existen cuatro formas básicas de consumo de los probióticos: como un cultivo concentrado agregado a alguna bebida (e.g., jugo de frutas, etc.), inoculado dentro de fibras prebióticas, como suplemento dietético en formas farmacéuticas de células liofilizadas (e.g., polvo, cápsulas, comprimidos, etc.) e inoculado en alimentos lácteos.

Las bacterias probióticas han sido incorporadas en una amplia gama de alimentos, fundamentalmente en productos lácteos (yogur, queso, helados, postres lácteos, etc.), pero también en otros alimentos tales como cereales, zumos, chocolate, etc.

Sin embargo, la tasa de supervivencia de los probióticos en estos productos durante su procesado y/o conservación es muy baja (de Vos et al., 2010), y para que estos microorganismos produzcan los mencionados efectos beneficiosos deben permanecer viables y en la concentración adecuada en el momento de su consumo. Existen varios factores responsables de la reducción de viabilidad de cultivos probióticos, tales como, por ejemplo, acidez al final del procesado/fabricación del alimento, acidez producida a lo largo de la vida útil de éste o post-acidificación, inhibición por metabolitos de fermentación, falta de nutrientes, permeabilidad del envase, presión osmótica, temperatura de almacenamiento, interacción con otras especies microbianas, etc. En general, cuanto más ácido es el producto a lo largo de su vida útil, más baja es la viabilidad de bacterias probióticas como *Bifidobacteria* y *L. acidophilus*.

Las estrategias para mejorar la viabilidad de los probióticos incluyen la selección de cepas ácido-resistentes, el incremento de la concentración inicial de microorganismos probióticos, o la adición de un prebiótico adecuado que mantenga un metabolismo activo en vida de éstos, un bajo nivel de post-acidificación, y evitar la formación de metabolitos de fermentación no deseados. Teniendo en cuenta que a menudo los concentrados de probióticos son almacenados durante períodos largos de tiempo antes de su utilización y después de su incorporación en productos alimenticios y/o nutracéuticos, resulta de gran relevancia encontrar un sistema que permita mantener la viabilidad bacteriana a lo largo de todo este tiempo y alargar así la vida útil del producto, a ser posible, sin necesidad de emplear condiciones de temperatura y humedad específicas para evitar costes económicos adicionales.

Un aspecto relevante a considerar cuando se emplean probióticos es que para que éstos produzcan los mencionados efectos beneficiosos para la salud humana, deben alcanzar de forma viable el colon, por lo que necesitan superar la barrera del tracto gastrointestinal superior, es decir, la acidez y las enzimas digestivas del estómago y las sales biliares del intestino delgado.

Además, las bacterias probióticas se encuentran expuestas a diversos factores de estrés durante su producción a nivel industrial tales como congelación, secado, exposición a oxígeno, temperaturas, grandes concentraciones de ácido láctico en el medio de cultivo, etc.

A la vista de todo ello, actualmente está cobrando gran interés la posibilidad de encapsular los probióticos vivos como alternativa para mantener su viabilidad ante las condiciones ambientales adversas descritas (Borgogna et al., 2010; Ding and Shah, 2008). Estas técnicas se vienen usando desde hace algunos años, aunque los beneficios obtenidos a través de ellas son todavía mejorables.

La gran mayoría de las metodologías de microencapsulación de probióticos diseñadas hasta el momento se engloban en tres grandes grupos: extrusión, emulsión y spray-drying escalable a nivel industrial (Heidebach et al., 2011). El método de extrusión es un procedimiento sencillo y económico que no daña las bacterias aunque no es una técnica fácilmente escalable, lo que dificulta la obtención de elevadas cantidades de producto. La emulsificación aunque es la técnica más comúnmente descrita en literatura para la encapsulación de bacterias probióticas es una técnica más compleja, que requiere el uso de tensioactivos y aceites por lo que resulta económicamente poco viable, puede afectar a la textura y características organolépticas del producto en el que se incorporen y no es adecuada para el desarrollo de productos alimenticios bajos en grasa. La microencapsulación mediante spray-drying (“pulverización”) es un proceso sencillo y económico aunque da lugar a una elevada tasa de mortalidad bacteriana como consecuencia del proceso simultáneo de deshidratación e inactivación térmica de los microorganismos.

En términos generales, las microcápsulas más adecuadas para la encapsulación de probióticos deberían cumplir los siguientes requisitos (Heidebach et al., 2011):

- Ser obtenidas mediante un proceso sencillo y económico que no comprometa la viabilidad de las bacterias.
- Presentar un tamaño y características adecuados para evitar alterar las características organolépticas del alimento en el que se incorporen (partículas con tamaños superiores a 100 µm pueden ser percibidas por el consumidor).
- Proteger a los probióticos de las condiciones ambientales adversas (matriz, procesado, almacenamiento, etc.).

- Estabilizar a los probióticos y protegerlos del estrés derivado de las condiciones del tracto gastrointestinal superior.
- Liberar las bacterias vivas en el intestino.

Hasta el momento no se ha desarrollado ninguna formulación que cumpla todos los requisitos deseados, o al menos los más relevantes.

Uno de los materiales utilizados para encapsular bacterias probióticas es la caseína, una proteína conjugada que constituye aproximadamente el 80% del total de proteínas de la leche. Se han desarrollado estudios utilizando esta proteína, sola o en combinación con otros polímeros, incluidos polisacáridos, para encapsular bacterias probióticas (Heidebach et al., 2009, Heidebach et al., 2010, Oliveira et al., 2007), obteniéndose buenos resultados de eficacia de encapsulación sin comprometer la viabilidad bacteriana. De los tres trabajos mencionados, los dos primeros se basan en un sistema de emulsificación poco escalable, que da lugar a unas microcápsulas de tamaños excesivamente elevados (superiores a 100 µm). Por otra parte, los estudios de resistencia a pH ácido realizados en los tres trabajos identificados ponen de manifiesto que las microcápsulas protegen a las bacterias de la acidez. Sin embargo, en ninguno de dichos trabajos se realiza el estudio empleando pepsina para reproducir las condiciones gástricas reales, más agresivas que el mero pH ácido (la enzima podría degradar la proteína e incrementar la exposición de las bacterias al medio). Asimismo, en esos trabajos se realizan estudios de viabilidad a lo largo del tiempo, observándose que a los 60 – 120 días de almacenamiento (en distintas condiciones) hay una pérdida muy significativa de los recuentos bacterianos tanto en las formulaciones de bacterias encapsuladas como en las de bacterias libres, siendo menor en el caso de las encapsuladas.

*Lactobacillus plantarum* es una de las bacterias ácido lácticas más empleadas; esta bacteria es considerada un organismo GRAS (del inglés “Generally Recognized as Safe”) capaz de colonizar de forma saludable el tracto gastrointestinal humano. Muchas cepas de *L. plantarum* se comercializan en la actualidad como probióticos. Sin embargo, se trata de una bacteria muy sensible a las condiciones del medio gastrointestinal, que puede mantenerse un tiempo muy reducido en almacenamiento, incluso en refrigeración, ya que en unos pocos días se produce una reducción muy significativa de sus recuentos (Ayub and Brinques, 2011).

Recientemente se han publicado dos trabajos que tratan sobre la encapsulación de estas bacterias para protegerlas tanto durante su almacenamiento como durante su paso a través de la barrera gastrointestinal. En el primero de ellos (Ayub and Brinques, 2011), los autores emplean distintos tipos de formulaciones, todas ellas a base de alginato y/o pectina y/o quitosano, para encapsular este tipo de bacterias. Sin embargo, no consiguen mejorar la resistencia gastrointestinal, y, aunque consiguen mejorar el número de células viables durante el almacenamiento a 4°C, sigue habiendo una reducción significativa de ellas tras 38 días de estudio. En otro de los trabajos (Gbassi et al., 2009), se consigue incrementar significativamente la resistencia de las bacterias tras inmovilizarlas en una matriz de alginato recubierta con proteínas de lactosuero. Sin embargo, no se trata de micropartículas sino de partículas macroscópicas, cuyas características organolépticas podrían resultar poco deseables y que, además, requieren liofilización para su conservación.

Otra de las bacterias ácido lácticas más empleadas es *Lactobacillus casei*, cuyo potencial beneficioso para la salud ha sido ampliamente reportado. Se puede encontrar en diversos productos distribuidos mundialmente, incluyendo las tradicionales leches fermentadas tales como yakult, kefier, actimel, gefilus y vifit, y en quesos tales como el parmesano y manchego entre otros. No obstante, esta bacteria presenta las mismas limitaciones que la anterior (*L. plantarum*), es decir, es sensible a las condiciones del tracto gastrointestinal superior y su estabilidad durante los períodos de almacenamiento es muy limitada.

Adicionalmente, se han descrito sistemas de encapsulación de bacterias probióticas basados en el empleo de alginato como polímero encapsulante y en muchos de esos casos se obtienen cápsulas con un tamaño muy grande (entre 700 µm y 2 mm), o se emplean métodos de emulsificación poco escalables. Aunque se consigue, en algunos casos, incrementar la resistencia de las bacterias a pH ácido cuando se encuentran encapsuladas, la mayoría de esos trabajos no realizan los estudios en presencia de enzimas, por lo que no se reproducen fielmente las condiciones gastrointestinales, contemplándose únicamente la resistencia a la acidez. Por otra parte, estos sistemas de encapsulación también consiguen reducir el descenso en los recuentos de bacterias durante el almacenamiento en distintas condiciones, pero a pesar de ello, continúa habiendo descensos significativos en plazos cortos de tiempo.

Sigue existiendo, por tanto, la necesidad de desarrollar sistemas que permitan proteger las bacterias probióticas durante su procesamiento, almacenamiento y/o tránsito a través del tracto gastrointestinal; ventajosamente dichos sistemas serán unas micropartículas que contienen las bacterias probióticas, con un tamaño uniforme y que no interfiera con las características organolépticas del producto en el que eventualmente se incorporen, y capaces de proteger las bacterias probióticas tanto durante su procesamiento y almacenamiento en condiciones controladas o ambientales como durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal.

## COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Los inventores de la presente invención han descubierto unas micropartículas que solucionan los problemas anteriormente mencionados, es decir, unas micropartículas que tienen la capacidad de encapsular bacterias probióticas para su incorporación en alimentos y productos nutracéuticos, cosmecéuticos y farmacéuticos. Estas micropartículas protegen a las bacterias probióticas de su inactivación por agentes externos, tanto durante el procesado del alimento o producto nutracéutico, cosmecéutico o farmacéutico en el que se incorporan, como durante su almacenamiento a lo largo de períodos prolongados en condiciones ambientales o controladas, incrementando el tiempo de vida útil de estos alimentos o nutracéuticos. Además, tras ser ingeridas, facilitan la liberación de las bacterias probióticas en el lugar deseado, protegiéndolas de las condiciones “ácido-pépticas” del tracto gastrointestinal superior, en particular del estómago.

Estas micropartículas son estables e inertes en el alimento o en la formulación nutracéutica, cosmecéutica o farmacéutica en la que se incorporan, evitando que la matriz alimentaria, nutracéutica, cosmecéutica o farmacéutica comprometa la viabilidad de la bacteria.

Además, los inventores han desarrollado un método de obtención sencillo de estas micropartículas que es aplicable a escala industrial. Este método no incluye el empleo de tensioactivos o emulgentes, polímeros sintéticos, ni ningún reactivo que no esté aprobado como aditivo alimentario. Este método, además, permite controlar que el tamaño de las micropartículas obtenidas sea inferior a 100  $\mu\text{m}$  para evitar que sea

percibido por el consumidor o que incida de forma negativa en las características organolépticas del producto en el que se incorporen.

Las micropartículas se pueden resuspender, que no disolver, con facilidad en medio acuoso, protegiendo del medio a la bacteria probiótica que contienen. Las micropartículas de la invención permanecen estables en el producto en el que se incorporan, con lo que se evita un descenso significativo en el recuento de las bacterias viables tras largos periodos de almacenamiento en condiciones ambientales y/o controladas. Además, estas micropartículas son aplicables a distintos tipos de alimentos, desde bebidas y lácteos hasta alimentos sólidos, y en productos nutracéuticos. Asimismo, dichas micropartículas pueden ser formuladas en formulaciones cosmecéuticas y farmacéuticas.

Adicionalmente, se ha observado que dichas micropartículas tienen un potente efecto inmunomodulador y favorecen la inducción de una respuesta T helper 1 (Th1) y/o desplazan la respuesta inmunitaria hacia Th1, por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de una composición moduladora del sistema inmune (inmunomoduladora) para la prevención y/o tratamiento de una alteración del sistema inmune, por ejemplo, en la prevención y/o tratamiento de rechazo a un trasplante mediado por Th2, alergias y enfermedades asociadas a las alergias, inmunodeficiencias y patologías derivadas de dichas inmunodeficiencias, infecciones causadas por patógenos intracelulares y/o infecciones de mucosas.

Las micropartículas de la invención proporcionan un nuevo sistema de encapsulación y estabilización de microorganismos probióticos. De acuerdo con la presente invención, se aprovecha la caseína, en combinación con el quitosano, como vehículo para proteger las bacterias probióticas de las condiciones ambientales durante largos periodos de almacenamiento y de las condiciones gástricas, incrementando así su tiempo de vida útil y facilitando su liberación en el intestino, mejorando así su efecto probiótico. Además, la caseína *per se* posee demostradas propiedades nutricionales que complementan los efectos beneficiosos de la propia bacteria probiótica encapsulada.

En resumen, las micropartículas de la invención tienen la capacidad de proteger a las bacterias probióticas durante su (i) procesamiento, (ii) almacenamiento y (iii) tránsito a través del tracto gastrointestinal.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con unas micropartículas que comprenden una matriz y una bacteria probiótica, en donde dicha matriz está constituida por caseína y quitosano.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de obtención de las micropartículas proporcionadas por esta invención, que comprende mezclar una caseína o una fuente de caseína, bacterias probióticas y quitosano.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición constituida por una pluralidad de micropartículas proporcionadas por esta invención, o que comprende al menos una micropartícula proporcionada por esta invención y un vehículo aceptable en alimentación, nutracéutica, cosmeceutica o farmacia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un producto alimenticio, nutracéutico, cosmeceutico o farmacéutico que comprende las micropartículas proporcionadas por esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de dicha micropartícula, composición o producto proporcionados por esta invención en la elaboración de una composición moduladora del sistema inmune, o, expresado de otra manera, la invención se relaciona con dicha micropartícula, composición o producto proporcionados por esta invención para su empleo en una composición moduladora del sistema inmune. Dicha composición inmunomoduladora favorece la inducción de una respuesta Th1 y/o desplaza la respuesta inmunitaria hacia Th1, preferentemente de Th2 hacia Th1, y puede ser utilizada para la prevención y/o tratamiento de alteraciones del sistema inmune, por ejemplo, en la prevención y/o tratamiento de (i) rechazo a un trasplante mediado por Th2, (ii) alergias y enfermedades asociadas a las alergias, (iii) inmunodeficiencias y patologías derivadas de dichas inmunodeficiencias, (iv) infecciones causadas por patógenos intracelulares y/o infecciones de mucosas.

La invención también se relaciona con una micropartícula, composición o producto proporcionados por esta invención para su empleo en la prevención y/o el tratamiento de una alteración del sistema inmune por vía oral; así como con una micropartícula, composición o producto proporcionados por esta invención para su empleo en la prevención y/o el tratamiento por vía oral de rechazo a un trasplante mediado por Th2; alergias y enfermedades asociadas a la alergia; inmunodeficiencias y patologías derivadas de dichas inmunodeficiencias; infecciones causadas por patógenos intracelulares, o infecciones de mucosas.

Otros aspectos más detallados de la presente invención quedarán aclarados en los siguientes apartados, en los que se incluyen ejemplos específicos que muestran los resultados más relevantes, tanto a través de ilustraciones como de explicaciones más exhaustivas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Imágenes de microscopía óptica de micropartículas de caseína modificadas con quitosano obtenidas mediante *spray-drying*: A) vacías (x 20); B) con *L. plantarum* encapsulado (x 20). La línea horizontal en la parte inferior derecha representa 100 µm.

**Figura 2:** Imágenes de microscopía óptica de fluorescencia de: A) *L. plantarum* teñido con marcador fluorescente (x 20); B) micropartículas de caseína modificadas con quitosano obtenidas mediante *spray-drying* con *L. plantarum* (teñido con marcador fluorescente) encapsulado (x 20). La línea horizontal en la parte inferior derecha representa 100 µm.

**Figura 3:** Imagen de microscopía óptica de fluorescencia de micropartículas de caseína modificadas con quitosano y en presencia de sales cárnicas obtenidas mediante *spray-drying* con *L. plantarum* (teñido con marcador fluorescente) encapsulado (x 20). La línea horizontal en la parte inferior derecha representa 100 µm.

**Figura 4:** Gráfica que muestra la supervivencia de *L. plantarum* en condiciones ambientales (25°C) a lo largo del tiempo: suspensión fresca de *L. plantarum*; *L. plantarum* liofilizado sin encapsular; *L. plantarum* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano (formulación Ap); *L. plantarum* encapsulado en

micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de vainillina (formulación Bp); *L. plantarum* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de TPP (formulación Cp); y *L. plantarum* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de sales cárnicas (formulación Dp).

**Figura 5:** Gráfica que muestra la supervivencia de *L. plantarum* en medio gastrointestinal simulado (0 a 2 horas: medio gástrico simulado; 2,1 a 8 horas: medio intestinal simulado): suspensión fresca de *L. plantarum*; *L. plantarum* liofilizado sin encapsular; *L. plantarum* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano (formulación Ap); *L. plantarum* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de vainillina (formulación Bp); *L. plantarum* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de TPP (formulación Cp); y *L. plantarum* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de sales cárnicas (formulación Dp). \* Indica diferencias significativas en los recuentos de las micropartículas con respecto al liófilo ( $p<0,05$ ).

**Figura 6:** Imágenes de microscopía de barrido electrónico que muestran micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de vainillina (formulación Bp), en proceso de degradación, con *L. plantarum* encapsulado, tras ser sometidas al tratamiento en medio gastrointestinal simulado.

**Figura 7:** Gráfica que muestra la supervivencia de *L. casei* en condiciones ambientales (25°C) a lo largo del tiempo: suspensión fresca de *L. casei*; *L. casei* liofilizado sin encapsular; *L. casei* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano (formulación Ac); *L. casei* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de vainillina (formulación Cc); y *L. casei* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de tripolifosfato (TPP) (formulación Dc).

**Figura 8:** Gráfica que muestra la supervivencia de *L. casei* en medio gastrointestinal simulado (0 a 2 horas: medio gástrico simulado; 2,1 a 8 horas: medio intestinal simulado): *L. casei* liofilizado sin encapsular; *L. casei* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano (formulación Ac); *L. casei* encapsulado en

micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de vainillina (formulación Cc); y *L. casei* encapsulado en micropartículas de caseína modificadas con quitosano en presencia de tripolifosfato (TPP) (formulación Dc). \* Indica diferencias significativas en los recuentos de las micropartículas con respecto al liófilo ( $p<0,05$ ).

**Figura 9:** Diagrama de barras que muestra los resultados del análisis inmunofenotípico de linfocitos periféricos obtenidos de ratones tratados con *L. plantarum* en su forma no encapsulada (LP libre), *L. plantarum* encasulados (Bp) o bien con la mezcla física de bacterias (*L. plantarum*) y partículas (Mezcla Física). La línea punteada muestra la ratio obtenida en el grupo control no tratado.

**Figura 10:** Diagrama de barras que muestra los resultados del índice de la ratio Th1/Th2 tras estimular *in vitro* linfocitos periféricos obtenidos de ratones tratados con *L. plantarum* en su forma no encapsulada (LP libre), *L. plantarum* encasulados (Bp) o bien con la mezcla física de bacterias y partículas (Mezcla Física).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con la fabricación de micropartículas para la encapsulación de bacterias probióticas, con el objetivo de evitar su inactivación tras su incorporación en matrices alimentarias, nutracéuticas, farmacéuticas o cosmecéuticas o, protegerlas durante su procesamiento y almacenamiento a lo largo de prolongados períodos de almacenamiento en condiciones controladas o ambientales y, además, protegerlas de las condiciones “ácido-pépticas” durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal una vez ingeridas.

### Micropartículas de la invención

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con unas micropartículas, en adelante “micropartículas de la invención”, que comprenden una matriz y una bacteria probiótica, en donde dicha matriz está constituida por caseína y quitosano.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “micropartículas” se utiliza para designar sistemas coloidales de tipo esferas o formas similares de tamaño inferior a 1

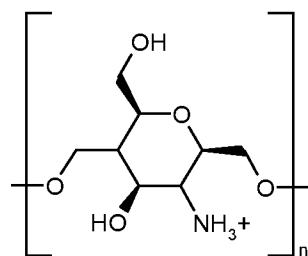
milímetro (mm), generalmente del orden de 0,5 a 999 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), típicamente del orden de 1 a 900  $\mu\text{m}$ . En una realización particular, las micropartículas de la invención tienen un tamaño inferior a 1 mm, generalmente comprendido entre 0,1 y 999  $\mu\text{m}$ , típicamente entre 0,2 y 900  $\mu\text{m}$ , ventajosamente entre 0,3 y 500  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 0,4 y 250  $\mu\text{m}$ , más preferentemente entre 0,5 y 125  $\mu\text{m}$ , aún más preferentemente entre 0,7 y 50  $\mu\text{m}$ , todavía más preferentemente entre 1 y 40  $\mu\text{m}$ , todavía aún más preferentemente entre 2 y 12  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

El término “matriz” en el ámbito de la presente invención se refiere a la composición o agente(s) de recubrimiento. De acuerdo con la presente invención, dicha matriz está constituida por caseína y quitosano y recubre, total o parcialmente, a las bacterias probióticas.

El término “probiótico” se define como un microorganismo vivo que, al ser administrado en cantidades adecuadas, ejerce una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del hospedador (FAO/WHO 2002. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*, London). Los probióticos empleados en la presente invención son “bacterias probióticas”, es decir, bacterias vivas que, al ser administradas en cantidades adecuadas, ejercen una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del hospedador. En una realización particular, dicha bacteria probiótica es una bacteria del género *Bifidobacterium* o *Lactobacillus*. En una realización más particular, dicha bacteria probiótica se selecciona entre *L. plantarum* y *L. casei*. En una realización concreta, las bacterias probióticas son *L. plantarum* CECT 220 y *L. casei* CECT 475 T aisladas de forraje de maíz y queso, respectivamente. En otra realización particular, dicha bacteria probiótica es una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, tal como la comercializada con la marca BB-12®.

El término “caseína”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una proteína conjugada que constituye aproximadamente el 80% del total de proteínas de la leche. Se trata de una proteína de tipo fosfoproteína que entra dentro de la definición de las globulinas; es soluble; posee una gran capacidad de retención de agua y precipita a un pH aproximado de 4,6 a 20°C. Está constituida por cuatro fracciones fundamentales (αs1-caseína, αs2-caseína, β-caseína y κ-caseína) diferenciadas entre sí por su composición en aminoácidos, su distribución de cargas y su tendencia a formar agregados en presencia de calcio. En la leche, las caseínas se encuentran formando

micelas coloidales, estables, de entre 50 y 600 nm de diámetro (aproximadamente 150 nm en promedio). El “quitosano” es un polímero de origen natural derivado de la N-desacetilación de la quitina (poli-N-acetyl-D-glucosamina). El proceso de desacetilación implica la eliminación de grupos acetilo de la cadena molecular de la quitina, dejando tras de sí un grupo completo amino (-NH<sub>2</sub>). El grado de desacetilación en una muestra de quitosano se refiere por tanto al contenido de grupos amino libres en las subunidades del polisacárido y se puede determinar por ejemplo, según el método descrito por Hidalgo *et al.* o el estándar ASTM F2260-03(2008) (*Standard Test Method for Determining Degree of Deacetylation in Chitosan Salts by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) entre otros. Generalmente, el grado de desacetilación del quitosano comercial es igual o superior al 40%, preferentemente igual o mayor del 60%. En una realización particular, el grado de desacetilación del quitosano está comprendido entre 60% y 100%, típicamente entre 75% y 95%, o superior. El quitosano presenta una estructura aminopolisacárida basada en la repetición de unidades monoméricas de fórmula (I):



(I)

donde “n” es un número entero, y, además, un número “m” de unidades donde el grupo amino está acetilado. La suma de “n+m” representa el grado de polimerización, es decir, el número de unidades monoméricas en la cadena de quitosano.

El quitosano a pH ácido se encuentra mayoritariamente protonado, por lo que a pH ácido es un polisacárido cargado positivamente.

El peso molecular del quitosano puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, el peso molecular del quitosano empleado para la obtención de las micropartículas de la invención está comprendido entre 5 y 850 kDa, típicamente entre 25 y 300, preferentemente entre 40 y 200 kDa, más preferentemente entre 50 y 150 kDa.

En el ámbito de la presente invención se entiende que como alternativa al quitosano se puede utilizar un derivado del mismo, entendiéndose como tal un quitosano en el que se ha modificado uno o más grupos hidroxilos y/o uno o más grupos amino. Estos derivados incluyen, entre otros, quitosanos acetilados, alquilados o sulfonatados, así como derivados tiolados, tal como se describe en Roberts, *Chitin Chemistry*, Macmillan, 1992, 166. De forma preferente cuando se utiliza un derivado se selecciona entre O-alquiletéres de quitosano, O-acilésteres de quitosano, trimetilquitosano, quitosanos modificados con polietilenglicol, etc. Otros derivados posibles incluyen las sales, tales como citrato, nitrato, lactato, fosfato, glutamato, etc. de quitosano. En cualquier caso, el experto en la materia puede identificar las modificaciones que se pueden realizar sobre el quitosano sin afectar a la estabilidad y viabilidad comercial de la formulación final. En una realización particular, el derivado de quitosano es un quitosano hidrofílicamente modificado; tal como aquí se utiliza un "quitosano hidrofílicamente modificado" es un quitosano modificado con un grupo hidrófilo, tal como un grupo que aumenta la solubilidad del quitosano en un medio acuoso, por ejemplo, un quitosano alquilado (e.g., trimetilquitosano, etc.), un quitosano sulfonado, un quitosano tiolado, una sal de quitosano (e.g., glutamato, cloruro, lactato, acetato, etc.), un quito-oligosacárido, etc. En otra realización particular, el derivado de quitosano no es un quitosano hidrofóbicamente modificado; tal como aquí se utiliza, un "quitosano hidrofóbicamente modificado"; es un quitosano modificado con un grupo hidrófobo, es decir, con un grupo que reduce la solubilidad del quitosano en un medio acuoso, por ejemplo, un grupo alquilo o arilo con un tamaño suficiente como para conferir una hidrofobicidad aumentada al quitosano, por ejemplo, restos de aldehídos o ácidos grasos, preferentemente ácidos grasos de a 3 a 18 átomos de carbono, saturados o insaturados, tales como, por ejemplo, ácido palmítico, láurico, oleico, linoleico, linolénico, caproico, caprílico, esteárico, propiónico o butírico. En otra realización particular, cuando la matriz de la micropartícula de la invención está constituida por caseína y un derivado de quitosano, tal como un quitosano hidrofóbicamente modificado, la micropartícula de la invención carece de un recubrimiento externo de alginato o alginato hidrofóbicamente modificado (alginato modificado con un grupo hidrófobo, tal como se ha definido previamente en relación con el quitosano hidrofóbicamente modificado).

El quitosano y la caseína, tal como se ha mencionado previamente, constituyen la matriz que forma parte de las micropartículas de la invención. La relación quitosano:caseína, en peso, puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicha relación quitosano:caseína, en peso, es de 1:1-150, preferentemente de 1:5-100, más preferentemente de 1:14-40 aproximadamente.

La cantidad de bacterias probióticas por unidad de peso de la matriz que puede estar presentes en las micropartículas de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, las micropartículas de la invención comprenden al menos  $10^6$  unidades formadoras de colonia por miligramo (UFC/mg) de matriz, generalmente entre  $10^6$  UFC/mg y  $5 \times 10^{13}$  UFC/mg, preferentemente, entre  $10^8$  UFC/mg y  $10^{12}$  UFC/mg.

En una realización particular, las micropartículas de la invención comprenden, además, un agente reticulante. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos agentes reticulantes incluyen cationes metálicos divalentes farmacéutica o cosméticamente aceptables, o aptos para su empleo en alimentación, humana o animal; tripolifosfatos; y, en general, cualquier sustancia capaz de establecer una interacción química con la caseína y/o el quitosano.

En el sentido utilizado en esta descripción, un "catión metálico divalente farmacéutica o cosméticamente aceptable, o apto para su empleo en alimentación, humana o animal", es un catión procedente de cualquier elemento metálico cuya valencia es 2, tal como un metal alcalinotérreo, por ejemplo, calcio, magnesio, zinc, etc., o, si tiene varias valencias, una de ellas es 2, por ejemplo, hierro, etc., con la condición de que sea farmacéutica o cosméticamente aceptable, o apto para su empleo en alimentación; en una realización particular, dicho catión metálico divalente se selecciona del grupo formado por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y combinaciones de los mismos. Como el experto en la materia entenderá, el catión metálico divalente útil como agente reticulante puede ser proporcionado por una fuente de dicho catión metálico apropiada, tal como un compuesto que en disolución acuosa origine dicho catión metálico divalente, por ejemplo, cloruro cálcico, acetato cálcico, gluconato cálcico, lactato cálcico, sorbato cálcico, ascorbato cálcico, citrato cálcico, propionato cálcico, sulfato cálcico, etc., o mezclas de dichos compuestos.

En el sentido utilizado en esta descripción, un “tripolifosfato”, es un compuesto que comprende el pentanión polifosfato, que es la base conjugada del ácido trifosfórico, por ejemplo, tripolifosfato sódico, habitualmente identificado como STPP (del inglés “sodium tripolyphosphate”) o simplemente como “TPP”.

Ejemplos adicionales de sustancias capaces de establecer una interacción química con la caseína y/o el quitosano, que pueden ser utilizados como agentes reticulantes dentro de la presente invención incluyen vainillina [3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído], genipina [(1R,2R,6S)-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabiciclo[4.3.0]nona-4,8-dieno-5-carboxilato de metilo], etc.

En una realización particular, el agente reticulante es un catión metálico divalente seleccionado del grupo formado por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y combinaciones de los mismos; un tripolifosfato; vainillina; genipina; o cualquier combinación de los mismos. En una realización más particular, el agente reticulante es el catión cálcico ( $\text{Ca}^{2+}$ ), TPP o vainillina. En otra realización particular, el agente reticulante es  $\text{Ca}^{2+}$  y la reticulación comprende, además, someter la mezcla que contiene la matriz de caseína y quitosano, las bacterias probióticas y el agente reticulante a un tratamiento a presión, tal como a un ciclo de presión hidrostática, a una presión comprendida entre 100 y 800 MPa.

En una realización particular, las micropartículas de la invención comprenden dos o más agentes reticulantes, preferentemente dos agentes reticulantes diferentes; ejemplos ilustrativos de dichas combinaciones de dos agentes reticulantes diferentes eventualmente presentes en las micropartículas de la invención incluyen las combinaciones binarias de:

- un tripolifosfato, por ejemplo, TPP, y vainillina;
- un tripolifosfato, por ejemplo, TPP, y genipina;
- un tripolifosfato, por ejemplo, TPP, y un catión metálico divalente farmacéutica o cosméticamente aceptable, o apto para su empleo en alimentación, humana o animal, tal como, por ejemplo, un metálico divalente seleccionado del grupo formado por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y combinaciones de los mismos;
- vainillina y genipina;

- vainillina y un catión metálico divalente farmacéutica o cosméticamente aceptable, o apto para su empleo en alimentación, humana o animal, tal como, por ejemplo, un metálico divalente seleccionado del grupo formado por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y combinaciones de los mismos;
- genipina y un catión metálico divalente farmacéutica o cosméticamente aceptable, o apto para su empleo en alimentación, humana o animal, tal como, por ejemplo, un metálico divalente seleccionado del grupo formado por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y combinaciones de los mismos.

En caso de que las micropartículas de la invención incluyan al menos, un agente reticulante, la relación en peso entre el agente reticulante y la matriz de caseína y quitosano puede variar dentro de un amplio intervalo, dependiendo del tipo de agente reticulante. En una realización particular, cuando el agente reticulante es TPP, la relación agente reticulante (TPP):matriz (caseína y quitosano) es de 1:0,1-800, ventajosamente de 1:1-500, preferentemente de alrededor de 1:100-300 aproximadamente. En otra realización particular, cuando el agente reticulante es vainillina, la relación agente reticulante (vainillina):matriz (caseína y quitosano) es de 1:0,1-500, ventajosamente de 1:1-250, preferentemente de alrededor de 1:50-100 aproximadamente. En otra realización particular, cuando el agente reticulante es  $\text{Ca}^{2+}$ , la relación agente reticulante ( $\text{Ca}^{2+}$  o fuente de  $\text{Ca}^{2+}$ ):matriz (caseína y quitosano) es de 1:0,1-50, ventajosamente de 1:1-25, preferentemente de alrededor de 1:6-16 aproximadamente.

En otra realización particular y opcional, las micropartículas de la invención comprenden, además, un compuesto que protege a la matriz y a las bacterias probióticas durante el proceso de secado de las mismas, o de desecación de la suspensión que contiene las micropartículas de la invención, mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante secado por pulverización (“spray-drying”), en adelante, “agente protector”. Prácticamente cualquier compuesto que cumpla esas características puede ser utilizado como agente protector. En una realización particular, dicho agente protector es un sacárido o, en general, un aditivo alimentario adecuado, que, además del papel protector, actúa como un prebiótico. El término “prebiótico”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un ingrediente alimentario no digestible que estimula el crecimiento y/o la actividad de los probióticos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de agentes protectores que pueden ser utilizados dentro del

contexto de la presente invención incluyen lactosa, manitol, sacarosa, maltodextrina, glucosa, sorbitol, etc., así como sustancias con características prebióticas, tales como, por ejemplo, oligofructosa, pectina, inulina, galacto-oligosacáridos, lactulosa, oligosacáridos de la leche materna, fibra alimentaria, etc., y cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, el agente protector es manitol o sacarosa. En caso de que las micropartículas de la invención incluyan un agente protector, la relación en peso entre la matriz de caseína y quitosano y el agente protector puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la relación en peso entre la matriz (caseína y quitosano):agente protector es de 1:0,1-5, típicamente de 1:0,5-4, preferentemente alrededor de 1:1.

#### Método de obtención de las micropartículas de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a un método, en adelante “método de la invención”, de obtención de micropartículas que comprenden una matriz y una bacteria probiótica, en donde dicha matriz está constituida por caseína y quitosano (micropartículas de la invención), que comprende mezclar caseína o una fuente de caseína, bacterias probióticas y quitosano.

La caseína puede incorporarse tal cual o puede ser aportada por una fuente de caseína. Por razones de simplicidad, los términos “caseína” y “fuente de caseína” se utilizan indistintamente en esta descripción. Prácticamente cualquier fuente de caseína puede ser utilizada en la puesta en práctica del método de la invención. El origen de la fuente de caseína puede ser muy diverso, por ejemplo, leche, judías, etc. En una realización particular, la fuente de caseína se encuentra en forma de solución o suspensión acuosa; en este caso, la caseína puede encontrarse en forma de ácido caseínico o caseinato, por ejemplo, caseinato sódico, etc., o cualquier otra forma soluble de caseína. Aunque pueden utilizarse otros caseinatos, por ejemplo, caseinato cálcico o fosfocalcico, en la práctica resulta más ventajoso utilizar caseinato sódico. La solución o suspensión acuosa que contiene la fuente de caseína puede ser obtenida por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, mediante la adición de la fuente de caseína a un medio acuoso. Tal como aquí se utiliza, un “medio acuoso”, es un medio que comprende agua, preferentemente, un medio que contiene mayoritariamente agua, más preferentemente, el medio acuoso consiste esencialmente en agua. La cantidad de caseína que puede contener dicha

solución acuosa puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de caseína contenida en dicha solución acuosa está comprendida entre 0,1% y 10% (p/v), preferentemente entre 0,5% y 5%, más preferentemente entre 1% y 2%. Preferentemente, dicha solución acuosa de caseína no contiene ningún disolvente orgánico.

Para la puesta en práctica del método de la invención se prepara, ventajosamente, una suspensión de bacterias probióticas. Aunque prácticamente cualquier bacteria probiótica puede ser utilizada, en una realización particular, dicha bacteria probiótica es una bacteria del género *Bifidobacterium* o *Lactobacillus*. En una realización más particular, dicha bacteria probiótica es *L. plantarum* o *L. casei*. En una realización concreta, las bacterias probióticas son *L. plantarum* CECT 220 y *L. casei* CECT 475 T. En otra realización particular, dicha bacteria probiótica es una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, tal como la comercializada con la marca BB-12®. La suspensión bacteriana comprende, además de las bacterias probióticas, un medio adecuado para las bacterias probióticas correspondientes. Dichos medios son conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, cuando dichas probióticas son bacterias del género *Lactobacillus*, por ejemplo, *L. plantarum* o *L. casei*, dicho medio comprende caldo para *Lactobacillus* según De Man, Rogosa y Sharpe, tal como el identificado como 110661 Caldo MRS (Merck) [caldo MRS]; dicho medio posibilita un buen crecimiento de lactobacilos y de otras bacterias ácido lácticas y se utiliza habitualmente para el cultivo y enriquecimiento de lactobacilos a partir de muestras clínicas y alimentos, especialmente lácteos. En general, el medio MRS comprende (en g/L): polipeptona, 10 g; extracto de carne, 10 g; extracto de levadura, 5 g; glucosa, 20 g; Tween® 80 (monololelato de sorbitán polietoxilado o polisorbato 80), 1,08 ml; fosfato de potasio, 2 g; acetato de sodio, 5 g; citrato de amonio, 2 g; sulfato de magnesio, 0,2 g; sulfato de manganeso, 0,05 g. El pH del medio a una temperatura de 25°C es de 6,4± 0,2. Este medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y la glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán polietoxilado, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

La cantidad de bacterias probióticas que puede estar presente en la suspensión bacteriana puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de bacterias probióticas presente en la suspensión bacteriana es de, al menos,  $10^6$  UFC/ml, generalmente entre  $10^6$  y  $5 \times 10^{12}$  UFC/ml, preferentemente entre  $10^8$  y  $10^{12}$  UFC/ml. En una realización particular y opcional, la suspensión bacteriana contiene, además, un sacárido, tal como sacarosa u otro disacárido apropiado tal como, por ejemplo, maltosa o trehalosa; estos compuestos juegan, en general, un importante papel durante el proceso de secado de las micropartículas ya que protegen tanto la membrana celular como las proteínas. Los disacáridos forman enlaces de hidrógeno con las proteínas cuando se produce la deshidratación, lo que permite mantener la estructura de la proteína y evitar su desnaturización. Por otra parte, parece que los azúcares podrían actuar como sustitutos de las moléculas de agua durante la deshidratación, rodeando los grupos polares tanto de las bicapas fosfolipídicas como de las membranas, manteniendo la integridad estructural de la membrana y de las proteínas. En caso de que dicha suspensión bacteriana contenga un disacárido para los fines indicados, por ejemplo, sacarosa, la cantidad de disacárido (e.g., sacarosa) presente en dicha suspensión bacteriana estará comprendida entre 0,1% y 10% (p/v) de disacárido (e.g., sacarosa), preferiblemente entre 1% y 3% (p/v). En cuanto al quitosano, prácticamente cualquier quitosano, o derivado del mismo apropiado, puede ser utilizado en la puesta en práctica del método de la invención; no obstante, en una realización particular, dicho quitosano tiene un grado de desacetilación comprendido entre 60 y 100%, preferentemente entre 75% y 95%, y un peso molecular comprendido entre 5 y 850 kDa, típicamente entre 25 y 300 kDa, preferentemente entre 40 y 200 kDa, más preferentemente entre 50 y 150 kDa. En una realización particular, el quitosano se encuentra en forma de solución o suspensión acuosa. La solución o suspensión acuosa que contiene quitosano puede ser obtenida por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, por ejemplo, mediante la adición de quitosano a un medio acuoso, por ejemplo, agua o un medio que contiene mayoritariamente agua. La cantidad de quitosano que puede contener dicha solución o suspensión acuosa puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, la cantidad de quitosano contenida en dicha solución o suspensión acuosa está comprendida entre 0,05% y 1% (p/v), preferentemente entre 0,1% y 0,3%, más preferentemente entre 1% y 2%. Preferentemente, dicha solución o suspensión acuosa de quitosano no contiene ningún disolvente orgánico.

El orden en que se mezclan la caseína, las bacterias probióticas y el quitosano en la etapa de mezcla del método de la invención, es indiferente. En una realización particular, se mezclan primero la caseína y las bacterias probióticas, y luego se añade el quitosano; en otra realización particular, se mezclan primero la caseína y el quitosano, y, posteriormente, se añaden las bacterias probióticas; en otra realización particular, se mezclan primero las bacterias probióticas y el quitosano, y, posteriormente, se añade la caseína; y, en otra realización particular, se añaden la caseína, las bacterias probióticas y el quitosano y se mezclan. En una realización particular, dichos componentes se añaden, como se ha mencionado previamente, en forma de una solución acuosa de caseína, una suspensión de bacterias probióticas y una solución acuosa de quitosano.

La mezcla de caseína, bacterias probióticas y quitosano se lleva a cabo, preferentemente a temperatura ambiente, es decir, a una temperatura comprendida entre 18°C y 25°C, preferentemente, entre 20°C y 22°C, con el fin de no afectar a la viabilidad de las bacterias probióticas, ventajosamente con agitación.

La relación, en peso, entre la caseína y el quitosano presente en la mezcla previa a la formación de las micropartículas de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicha relación caseína:quitosano, en peso, es de 1:0,01-0,5, preferentemente de 1:0,01-0,1, más preferentemente de alrededor de 1:0,02-0,07, o, expresado de otra manera, la relación quitosano:caseína, en peso, presente en la mezcla previa a la formación de las micropartículas de la invención es de 1:1-150, preferentemente de 1:5-100, más preferentemente de alrededor de 1:14-40.

La relación entre bacterias probióticas y los componentes de la matriz (caseína y quitosano) presente en la mezcla previa a la formación de las micropartículas de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo; no obstante, en una realización particular, dicha relación bacterias probióticas/matriz es de, al menos,  $10^6$  UFC por mg de matriz, generalmente comprendida entre  $10^6$  UFC/mg y  $10^{13}$  UFC/mg, preferentemente entre  $10^9$  UFC/mg y  $10^{12}$  UFC/mg.

Como se ha mencionado previamente, en una realización particular, las micropartículas de la invención comprenden, además, un agente reticulante, tal como por ejemplo, un tripolifosfato (e.g., tripolifosfato sódico (TPP)); vainillina; genipina; un catión metálico divalente farmacéutica o cosméticamente aceptable, o apto para su empleo en alimentación, humana o animal, tal como, por ejemplo, un metálico divalente seleccionado del grupo formado por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y combinaciones de los mismos; o cualquier combinación de los mismos, o cualquier otra sustancia capaz de establecer una interacción química con la caseína y/o el quitosano. En otra realización particular, las micropartículas de la invención comprenden dos o más agentes reticulantes, preferentemente las combinaciones de dos agentes reticulantes diferentes previamente mencionadas en relación con las micropartículas de la invención.

En caso de que las micropartículas de la invención comprendan al menos un agente reticulante, el método de la invención comprende la adición de dicho al menos un agente reticulante a la mezcla de caseína, bacterias probióticas y quitosano. El agente (o agentes) reticulante, en una realización particular, puede añadirse a dicha mezcla en forma de una solución acuosa. Cuando el agente reticulante es el catión cálcico ( $\text{Ca}^{2+}$ ), este puede ser proporcionado por una fuente de dicho catión apropiada, tal como un compuesto que en disolución acuosa origine dicho catión divalente, por ejemplo, cloruro cálcico, acetato cálcico, gluconato cálcico, lactato cálcico, sorbato cálcico, ascorbato cálcico, citrato cálcico, propionato cálcico, sulfato cálcico, etc., o mezclas de dichos compuestos. En caso de que las micropartículas de la invención incluyan un agente reticulante, la cantidad de agente reticulante a añadir depende de la naturaleza del agente reticulante, tal como se ha mencionado previamente en relación con las micropartículas de la invención. En cualquier caso, dicho agente reticulante se añadirá en cantidad suficiente como para que, cuando el agente reticulante es TPP, la relación agente reticulante (TPP):matriz (caseína y quitosano) es de 1:0,1-800, ventajosamente de 1:1-500, preferentemente de alrededor de 1:100-300 aproximadamente; cuando el agente reticulante es vainillina, la relación agente reticulante (vainillina):matriz (caseína y quitosano) es de 1:0,1-500, ventajosamente de 1:1-250, preferentemente de alrededor de 1:50-100 aproximadamente; y cuando el agente reticulante es  $\text{Ca}^{2+}$ , la relación agente reticulante ( $\text{Ca}^{2+}$  o fuente de calcio):matriz (caseína y quitosano) es de 1:0,1-50, ventajosamente de 1:1-25, preferentemente de alrededor de 1:6-16 aproximadamente.

Tras la mezcla de la caseína, las bacterias probióticas y el quitosano, en las condiciones mencionadas previamente, es decir, a temperatura ambiente y con agitación, se forman las micropartículas de la invención, que comprenden una matriz constituida por caseína y quitosano, y una bacteria probiótica. Dichas micropartículas de la invención se encuentran, en una realización particular, en suspensión en el medio en el que se han formado.

A continuación, si se desea, la suspensión resultante de la mezcla de caseína, bacterias probióticas y quitosano, que contiene las micropartículas de la invención, se somete a un tratamiento de secado por métodos convencionales, ventajosamente mediante secado por pulverización (*“spray-drying”*) o mediante liofilización, con el fin de desecar las micropartículas de la invención; este tratamiento de secado permite obtener las micropartículas de la invención en forma de un polvo, lo que contribuye a aumentar la estabilidad de las mismas. En una realización particular, este tratamiento de secado, en particular, cuando se realiza mediante secado por pulverización (*“spray-drying”*) o mediante liofilización, comprende la adición de un agente protector, tal como se ha mencionado previamente en relación con las micropartículas de la invención, que protege a la matriz y a las bacterias probióticas durante el proceso de secado de las mismas, tal como por ejemplo, un sacárido o, en general, un aditivo alimentario adecuado, que, además del papel protector, actúa como un prebiótico. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de sacáridos que pueden ser utilizados como agentes protectores dentro del contexto de la presente invención incluyen lactosa, manitol, sacarosa, maltodextrina, glucosa, sorbitol, etc., así como polisacáridos con características prebióticas, tales como, por ejemplo, oligofructosa, pectina, inulina, galacto-oligosacáridos, lactulosa, oligosacáridos de leche materna, fibra alimentaria, etc. En una realización particular, el agente protector es manitol. En caso de que las micropartículas de la invención incluyan un agente protector, se adiciona este en la cantidad apropiada; aunque la relación en peso entre la matriz de caseína y quitosano y el agente protector puede variar dentro de un amplio intervalo, en una realización particular, la relación en peso entre la matriz (caseína y quitosano):agente protector es de 1:0,1-5, típicamente de 1:0,5-4, preferentemente alrededor de 1:1.

En una realización particular, en la que el método de la invención comprende desecar la suspensión de micropartículas de la invención, la desecación de dicha suspensión y

el secado de las micropartículas de la invención se realiza mediante secado por pulverización (“*spray-drying*”); para ello, la suspensión conteniendo las micropartículas de la invención y/o la mezcla de caseína, bacterias probióticas y quitosano, y, opcionalmente, un agente reticulante y/o un agente protector, se introduce en un spray-dryer y se controlan las condiciones de procesado [temperatura de entrada de aire (*inlet temperature*); temperatura salida del aire (*outlet temperature*); presión de aire (*air pressure*); velocidad de bombeo de la muestra (*pumping rate*); aspiración; y flujo de aire (*air flow*)]. El experto en la materia puede fijar las condiciones de procesado más apropiadas para cada caso.

El método de la invención, si se desea, puede incluir alguna etapa adicional para estabilizar las micropartículas de la invención. En una realización particular, cuando la reticulación de las micropartículas de la invención se realiza mediante adición de un agente reticulante, por ejemplo, un catión metálico divalente, tal como  $\text{Ca}^{2+}$ , y tratamiento a presión elevada, el método de la invención comprende introducir la suspensión que contiene las micropartículas de la invención que comprenden, además, un agente reticulante, y/o la mezcla que comprende caseína, bacterias probióticas, quitosano y agente reticulante, en un contenedor adecuado, por ejemplo, una bolsa de plástico, que se sella y se somete a, al menos, un ciclo de presión hidrostática, a una presión comprendida entre 100 y 800 MPa, preferentemente entre 100 y 400 MPa, durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 30 min, preferentemente entre 2 y 10 min. En una realización particular, dicho tratamiento a presión hidrostática elevada comprende la aplicación sobre dicha mezcla que comprende caseína, bacterias probióticas, quitosano y agente reticulante, de 1 ciclo de 5 minutos a 100 MPa, o de 1 ciclo de 2 minutos a 300 MPa. En una realización concreta, la mezcla que comprende caseína, bacterias probióticas, quitosano y agente reticulante ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se somete a 1 ciclo de 5 minutos a 100 MPa. Este tratamiento a presión elevada se aplica sobre la mezcla que comprende caseína, bacterias probióticas, quitosano y agente reticulante antes de someterla al proceso de secado mediante *spray-drying*. Alternativamente, como el experto en la materia conoce, el tratamiento a presión elevada es un tratamiento que permite reticular las micropartículas *per se sin* que sea necesaria la incorporación de un agente reticulante, por lo que, las micropartículas de la invención podrían ser reticuladas sometiéndolas a un tratamiento con altas presiones, en ausencia de agente reticulante.

El método de la invención permite obtener las micropartículas de la invención en forma de un polvo seco, lo que contribuye a la estabilidad de las micropartículas de la invención durante largos períodos de almacenamiento en condiciones controladas o ambientales y, además, puede ser incorporado fácilmente en los distintos productos (e.g., alimentos, etc.) a los que va destinado, tanto sólidos como líquidos.

Las micropartículas obtenibles mediante el método de la invención, presentan las características de las micropartículas de la invención, y constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

### Aplicaciones

Las micropartículas de la invención tienen la capacidad de encapsular bacterias probióticas y protegerlas durante su procesamiento (obtención de micropartículas que comprenden una matriz constituida por caseína y quitosano, cargadas con dichas bacterias probióticas) y almacenamiento a lo largo de prolongados períodos de almacenamiento en condiciones controladas o ambientales y, además, protegerlas de las condiciones “ácido-pépticas” durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal una vez ingeridas; de este modo se evita, o se reduce sustancialmente, la inactivación de las bacterias probióticas tras su incorporación en los diferentes productos (e.g., alimenticios, etc.) a los que van destinadas.

Adicionalmente, las micropartículas de la invención tienen un potente efecto inmunomodulador por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de una composición moduladora del sistema inmune para la prevención y/o tratamiento de alteraciones del sistema inmune.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, en adelante “composición de la invención”, seleccionada entre:

- (i) una composición constituida por una pluralidad de micropartículas de la invención, o por una pluralidad de micropartículas obtenibles mediante el método de la invención, o por una pluralidad de micropartículas de la invención y de micropartículas obtenibles mediante el método de la invención; y

- (ii) una composición que comprende, al menos, una micropartícula de la invención, y/o una micropartícula obtenible mediante el método de la invención, y un vehículo aceptable en alimentación, nutracéutica, cosmecéutica o farmacia.

Las características de las micropartículas de la invención ya han sido definidas previamente y se incorporan aquí por referencia. En una realización particular, el tamaño medio de las micropartículas de la invención está comprendido entre 0,5 y 125  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre 1 y 40  $\mu\text{m}$ , más preferentemente, entre 2 y 12  $\mu\text{m}$ . Por “tamaño medio” se entiende el diámetro promedio de la población de micropartículas, que se mueve conjuntamente en un medio acuoso. El tamaño medio de estos sistemas se puede medir por procedimientos estándar conocidos del experto en la materia, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental descrita más adelante. En otra realización particular, las bacterias probióticas presentes en las micropartículas de la invención se seleccionan entre bacterias del género de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*; en una realización más particular, dicha bacteria probiótica se selecciona entre *L. plantarum* y *L. casei*. En una realización concreta, las bacterias probióticas son *L. plantarum* CECT 220 y *L. casei* CECT 475 T. En otra realización particular, dicha bacteria probiótica es una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, tal como la comercializada con la marca BB-12®.

En otra realización particular, las micropartículas de la invención comprenden un agente reticulante, tal como se ha mencionado previamente, por ejemplo, TPP, vainillina o un catión metálico divalente, por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ . En otra realización particular, las micropartículas de la invención comprenden dos o más agentes reticulantes, preferentemente las combinaciones de dos agentes reticulantes diferentes previamente mencionadas en relación con las micropartículas de la invención. En otra realización particular, las micropartículas de la invención comprenden un agente protector, tal como un sacárido, por ejemplo, manitol. En otra realización particular, las micropartículas de la invención se encuentran en forma de polvo seco.

En el primer caso, la composición de la invención (i) está constituida única y exclusivamente por micropartículas de la invención y/o por micropartículas obtenibles

mediante el método de la invención. En una realización particular, dicha composición de la invención (i) se selecciona entre:

una composición A, que comprende:

caseína, entre 40% y 60% en peso,  
quitosano, entre 0,1% y 3,5% en peso,  
bacterias probióticas, entre  $10^9$  UFC/g y  $5 \times 10^{12}$  UFC/g,  
tripolifosfato sódico, entre 0% y 0,15% en peso, y  
agente protector entre 0% y 60% en peso;  
donde las proporciones en peso se refieren al total de la composición;

una composición B, que comprende:

caseína, entre 40% y 60% en peso,  
quitosano, entre 0,1% y 3,5% en peso,  
bacterias probióticas, entre  $10^9$  UFC/g y  $5 \times 10^{12}$  UFC/g,  
vainillina, entre 0% y 0,6% en peso, y  
agente protector entre 0% y 60% en peso;  
donde las proporciones en peso se refieren al total de la composición; y

una composición C, que comprende:

caseína, entre 40% y 60% en peso,  
quitosano, entre 0,1% y 3,5% en peso,  
bacterias probióticas, entre  $10^9$  UFC/g y  $5 \times 10^{12}$  UFC/g,  
 $\text{Ca}^{2+}$ , entre 0% y 10% en peso, y  
agente protector entre 0% y 60% en peso,  
donde las proporciones en peso se refieren al total de la composición.

En el segundo caso, la composición de la invención (ii) comprende, al menos, una micropartícula de la invención y/o una micropartícula obtenible mediante el método de la invención, y un vehículo aceptable en alimentación, nutracéutica, cosmecéutica o farmacia.

En una realización particular, la composición de la invención es un alimento o pienso que comprende, al menos, una micropartícula de la invención y/o una micropartícula obtenible mediante el método de la invención, o una composición que comprende una pluralidad de micropartículas de la invención y/o de micropartículas obtenibles mediante el método de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción, el término "alimento" es cualquier sustancia o producto de cualquier naturaleza, sólido o líquido, natural o transformado, que por sus características, aplicaciones, componentes, preparación y estado de conservación, sea susceptible de ser habitual o idóneamente utilizados en alguno de los fines siguientes: a) para la normal nutrición humana o animal o como frutivos; o b) como productos dietéticos, en casos especiales de alimentación humana o animal. El término "pienso" incluye todas las materias naturales y productos elaborados, de cualquier origen, que, por separado o convenientemente mezclados entre sí, resulten aptos para la alimentación animal. Un alimento listo para consumir es aquel que no necesita ser diluido mediante, por ejemplo, una solución acuosa adecuada para el consumo. En principio, los ingredientes presentes en un alimento listo para consumir están equilibrados y no se necesita añadir ingredientes adicionales al alimento para volverlo listo para el consumo, tal como es considerado por un experto en la materia. Un alimento concentrado es aquel en el que uno o más ingredientes están presentes en mayor concentración que en un alimento listo para consumir, por lo que para su empleo, es necesario diluirlo mediante, por ejemplo, una solución acuosa adecuada para el consumo. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de alimentos proporcionados por esta invención incluyen tanto productos lácteos y derivados, por ejemplo, leches fermentadas, yogur, kéfir, cuajada, quesos, mantequillas, helados, postres lácteos, etc., como productos no lácteos, tales como productos de panadería, bollería y repostería, cereales, chocolates, mermeladas, zumos, otros derivados de frutas, aceites y margarinas, platos preparados, etc.

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición nutracéutica que comprende, al menos, una micropartícula de la invención y/o una micropartícula obtenible mediante el método de la invención, o una composición que comprende una pluralidad de micropartículas de la invención y/o de micropartículas obtenibles mediante el método de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción, el término "composición nutracéutica" hace referencia a una composición adecuada para su empleo en seres humanos o animales, que comprende uno o más

productos naturales con acción terapéutica o que proporcionan un beneficio para la salud o que han sido asociados con la prevención o disminución de enfermedades, por ejemplo, bacterias probióticas, etc., e incluye suplementos dietéticos presentados en una matriz no alimenticia (e.g., cápsulas, polvo, etc.) de un producto natural bioactivo concentrado presente usualmente (o no) en los alimentos y que, tomado en dosis superior a la existente en esos alimentos ejerce un efecto favorable sobre la salud, mayor que el que podría tener el alimento normal. El término "composición nutracéutica" incluye, por tanto, productos aislados o purificados de alimentos así como aditivos o complementos alimentarios, que, en general, se presentan en unas formas farmacéuticas normalmente empleadas por vía oral, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, sobres, ampollas bebibles, etc.; tales productos proporcionan un beneficio fisiológico o protección frente a enfermedades, generalmente, frente a enfermedades crónicas. Si se desea, la composición nutracéutica proporcionada por la invención puede contener, además de las bacterias probióticas, uno o más nutracéuticos (productos o sustancias asociados con la prevención o disminución de enfermedades), por ejemplo, flavonoides, ácidos grasos omega-3, etc., y/o uno o más prebióticos (ingredientes alimentarios no digestibles que estimulan el crecimiento y/o la actividad de los probióticos), por ejemplo, oligofructosa, pectina, inulina, galacto-oligosacáridos, lactulosa, oligosacáridos de leche materna, fibra alimentaria, etc.

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica que comprende, al menos, una micropartícula de la invención y/o una micropartícula obtenible mediante el método de la invención, o una composición que comprende una pluralidad de micropartículas de la invención y/o de micropartículas obtenibles mediante el método de la invención, adecuada para su administración por vía oral, tópica, rectal o vaginal; para ello, dicha composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más excipientes adecuados para su administración por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsula, polvo, granulado, comprimido (recubierto o no), sobre, matriz, suspensión, etc., o un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más excipientes adecuados para su administración por vía tópica, por ejemplo, en forma de crema, pomada, ungüento, etc., o un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más excipientes adecuados para su administración por vía rectal, por ejemplo, en forma de suppositorio, etc., o un vehículo farmacéuticamente aceptable que comprende uno o más excipientes adecuados para su administración por vía vaginal, por ejemplo, en

forma de bolo, suppositorio, etc. Información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones farmacéuticas destinadas a su administración por vía oral, tópica, rectal o vaginal, así como sobre la producción de dichas composiciones farmacéuticas puede encontrarse en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición cosmética que comprende, al menos, una micropartícula de la invención y/o una micropartícula obtenible mediante el método de la invención, o una composición que comprende una pluralidad de micropartículas de la invención y/o de micropartículas obtenibles mediante el método de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “composición cosmética” hace referencia a una composición adecuada para su empleo en la higiene corporal de seres humanos o animales, o con el fin de mejorar la belleza, o alterar la apariencia corporal sin afectar a la estructura o funciones del cuerpo humano o animal, que comprende uno o más productos que proporcionan tales efectos. Si se desea, la composición cosmética proporcionada por la invención puede contener, además de las bacterias probióticas, uno o más productos cosméticos, es decir, sustancias o mezclas destinada a ser puestas en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano o animal (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales. Ejemplos ilustrativos de productos cosméticos incluyen los productos contenidos en el listado INCI (del inglés “International Nomenclature of Cosmetic Ingredients”).

En otra realización particular, la composición de la invención es una composición cosmeceutica que comprende, al menos, una micropartícula de la invención y/o una micropartícula obtenible mediante el método de la invención, o una composición que comprende una pluralidad de micropartículas de la invención y/o de micropartículas obtenibles mediante el método de la invención. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “composición cosmeceutica” hace referencia a una composición adecuada para su empleo en el cuerpo humano o animal que comprende uno o más productos cosmeceuticos (“functional cosmetics”, “dermoceuticals” o “active cosmetics”), es decir, productos tópicos híbridos con características cosmético-farmacéuticas que contienen ingredientes activos con efecto sobre la piel, el cabello

y/o las uñas del usuario, en concentraciones más altas y efectivas, por lo que se sitúan en un nivel intermedio entre el cosmético y el fármaco. Ejemplos ilustrativos de productos cosmecéuticos incluyen aceites esenciales, ceramidas, enzimas, minerales, péptidos, vitaminas, etc. El experto en la materia entenderá que las micropartículas de la invención, o las composiciones que las contienen, pueden formar parte de un alimento o pienso, o de un producto nutracéutico, farmacéutico, o cosmecéutico, los cuales constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Dichos productos pueden estar en forma líquida, semi-sólida o sólida.

Adicionalmente, las micropartículas de la invención tienen un potente efecto inmunomodulador y favorecen la inducción de una respuesta Th1 y/o desplazan la respuesta inmunitaria hacia Th1, preferentemente de Th2 hacia Th1 (Ejemplo 7), por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de una composición moduladora del sistema inmune para la prevención y/o tratamiento de una alteración del sistema inmune, por ejemplo, en la prevención y/o tratamiento de rechazo a un trasplante mediado por Th2, alergias y enfermedades asociadas a las alergias, inmunodeficiencias y patologías derivadas de dichas inmunodeficiencias, infecciones causadas por patógenos intracelulares y/o infecciones de mucosas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una micropartícula de la invención, o de una composición de la invención, o de un producto alimenticio, farmacéutico, cosmecéutico o nutracéutico que comprende al menos una micropartícula de la invención o dicha composición de la invención, en adelante “producto de la invención”, en la elaboración de una composición moduladora del sistema inmune. Expresado de otra manera, según este aspecto inventivo, la invención se relaciona con una micropartícula de la invención, o una composición de la invención, o un producto de la invención para su empleo en una composición moduladora del sistema inmune.

En el sentido utilizado en esta descripción, una “composición moduladora del sistema inmune”, en adelante “composición inmunomoduladora de la invención”, es una composición que es capaz de estimular ciertas respuestas del sistema inmune haciéndolo más reactivo, por ejemplo, interviniendo, a través de la producción de citoquinas específicas, en el desarrollo de las células implicadas en la respuesta inmune. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “composición” incluye

cualquier composición farmacéutica, alimentaria (alimento o pienso), nutracéutica, etc., que comprende las micropartícula de la invención, la composición de la invención, o el producto de la invención, anteriormente descritos.

Los resultados mostrados en el Ejemplo 7 ponen de manifiesto que la administración oral de micropartículas de la invención conteniendo *L. plantarum* a ratones CD1, por una parte, induce un ligero aumento del número de linfocitos citotóxicos (puesta de manifiesto por una disminución de la relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) (Figura 9), y, por otra parte, provoca un incremento en la síntesis de interferón-gamma (IFN-g), frente a la producción de interleuquina 6 (IL-6), desplazando de ese modo la respuesta inmunitaria hacia un perfil Th1. Estos resultados parecen indicar, aunque no se desea estar vinculado a ello, una posible interacción entre las micropartículas de la invención y el sistema inmune, modificando el tipo de respuesta inmunitaria y desplazándola hacia una respuesta Th1.

Por tanto, en una realización particular, la composición inmunomoduladora de la invención es una composición que induce preferentemente una respuesta Th1 y/o desplaza la respuesta inmunitaria hacia Th1, preferentemente de Th2 hacia Th1. De acuerdo con esta realización particular, la composición inmunomoduladora de la invención estimula o induce mayoritaria o preferentemente la respuesta Th1 del sistema inmune haciéndolo más reactivo, a través de la producción de citoquinas específicas, tales como, por ejemplo, IFN-g, interferón alfa (IFN-a), interleuquina 12 (IL-12), interleuquina 18 (IL-18), etc., en el desarrollo de las células implicadas en la respuesta inmune Th1. El experto en la materia puede determinar fácilmente si la administración de unas micropartículas de la invención induce preferentemente una respuesta Th1 y/o desplaza la respuesta inmunitaria de Th2 hacia Th1, mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante métodos basados en la cuantificación de citoquinas específicas de la respuesta Th1 y, opcionalmente, Th2, tales como, por ejemplo, el ensayo descrito en el Ejemplo 7.

En una realización particular y preferida, la composición inmunomoduladora de la invención es una composición adecuada para su administración por vía oral (en ocasiones referida en esta descripción, por simplicidad, como "composición oral") y se presentará en una forma de administración sólida, líquida o semi-sólida. Para ello, dicha composición inmunomoduladora de la invención incluirá, junto con las

micropartículas de la invención, o la composición de la invención, o el producto de la invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable; dicho vehículo farmacéuticamente aceptable comprende uno o más excipientes adecuados para su administración por vía oral, por ejemplo, en forma de cápsula, polvo, granulado, suspensión, etc. El experto en la materia conoce los excipientes adecuados para la formulación de composiciones farmacéuticas destinadas a su administración por vía oral así como los procedimientos para la producción de dichas composiciones. A modo ilustrativo, puede encontrarse información sobre excipientes adecuados para la formulación de composiciones destinadas a su administración por vía oral, así como sobre su producción en el libro "Tratado de Farmacia Galénica", de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

En otra realización particular, la composición inmunomoduladora de la invención es una composición oral para la prevención y/o el tratamiento de una alteración del sistema inmune; dicha alteración del sistema inmune puede ser una alteración natural (genética) o bien una alteración inducida, tal como una alteración inducida por un proceso infeccioso, estrés, etc.

En otra realización particular, la composición inmunomoduladora de la invención es una composición oral para la prevención y/o el tratamiento de:

- rechazo a un trasplante mediado por una respuesta Th2,
- alergias y enfermedades asociadas a la alergia,
- inmunodeficiencias y patologías derivadas de dichas inmunodeficiencias,
- infecciones causadas por patógenos intracelulares, o
- infecciones de mucosa.

El rechazo a un trasplante es un proceso en el cual el sistema inmunitario del receptor de un trasplante ataca al órgano o tejido transplantado. Por sus características, la composición inmunomoduladora de la invención puede ser particularmente útil en la prevención y/o tratamiento del rechazo al trasplante (e.g., un órgano, tejido, etc.) mediado por una respuesta Th2.

Una alergia es un trastorno de hipersensibilidad del sistema inmunitario. Las reacciones alérgicas se producen cuando el sistema inmune de una persona reacciona

a sustancias normalmente inofensivas en el medio ambiente. Una sustancia que provoca una reacción inmunitaria (alérgica) en un sujeto sensible a dicha sustancia se conoce como “alérgeno”. Cuando un alérgeno penetra en el organismo de un sujeto que es alérgico a él, su sistema inmunitario responde produciendo una gran cantidad de anticuerpos (IgE); la sucesiva exposición al mismo alérgeno produce la liberación de mediadores químicos, en particular la histamina, que producirán los síntomas típicos de la reacción alérgica. Existen multitud de alérgenos; a modo ilustrativo, no limitativo, dichos alérgenos pueden ser extractos alergénicos de pólenes, extractos alergénicos de animales, incluyendo animales domésticos, insectos, ácaros, etc., extractos alergénicos de alimentos o productos alimenticios, metales, componentes presentes en saliva, pinzas o aguijones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, componentes presentes en plantas que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto, etc.

Entre las alergias más habituales presentes en la población se encuentran:

- alergias a pólenes de plantas, por ejemplo, alergias al polen de gramíneas (e.g., *Lolium perenne*, *Poa pratense*, *Phleum pratense*, *Cynodon dactylon*, *Festuca pratensis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Avena sativa*, *Triticum sativa*, etc.), alergias al polen de otras hierbas (e.g., *Artemisia vulgaris*, *Chenopodium album*, *Plantago lanceolata*, *Taraxacum vulgare*, *Parietaria judaica*, *Salsola kali*, *Urtica dioica*, etc., alergias al polen de árboles (e.g., *Olea europea*, *Platanus sp.*, *Cupressus sp.*, etc.);
- alergias a animales, incluyendo, alergias a epitelio, caspa o plumas de animales (e.g., perro, gato, caballo, aves, etc.), alergias a insectos, por ejemplo, alergia a componentes presentes en saliva, pinzas o aguijones de insectos que inducen una reacción de sensibilidad en un sujeto (e.g., abejas, avispas, mosquitos, tábanos, etc.), alergias a ácaros, por ejemplo, ácaros del polvo (e.g., *Dermatophagoides pteronyssimus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acaros Siro*, *Blomia tropicalis*, *Euroglyphus maynei*, *Glyciphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, etc.);
- alergias a hongos (e.g., *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, etc.);
- alergias a alimentos o componentes alimenticios presentes en alimentos, por ejemplo, pescado, frutas (piña, kiwi, etc.);
- alergias a metales (e.g., níquel, etc.).

En general, es bastante habitual que un sujeto que es sensible a un determinado alérgeno sea también sensible a otros alérgenos diferentes.

La composición inmunomoduladora de la invención puede ser utilizada para la prevención y/o el tratamiento por vía oral de las alergias en general; en una realización particular, dicha alergia se selecciona del grupo de alergias arriba indicado, es decir, del grupo de alergias formado por alergias a pólenes de plantas, alergias a insectos, alergias a ácaros, alergias a hongos; alergias a animales, alergias a componentes alimenticios presentes en alimentos, alergias a metales, alergias al polvo, etc., y sus combinaciones.

Aunque no parece ser estrictamente necesario, en una realización particular, la prevención y/o el tratamiento de las alergias mediante el empleo de la composición inmunomoduladora de la invención puede verse favorecida por la administración del alérgeno causante de la alergia. Para ello, dicho alérgeno puede ser administrado al sujeto junto con la composición inmunomoduladora de la invención (administración simultánea de la composición inmunomoduladora de la invención y el alérgeno) incluyendo el alérgeno en la propia formulación de la composición inmunomoduladora de la invención o bien administrando el alérgeno en una formulación independiente pero simultáneamente con la administración de la composición inmunomoduladora de la invención. Alternativamente, el alérgeno puede ser administrado al sujeto en un periodo de tiempo anterior a, o posterior a, la administración de la composición inmunomoduladora de la invención (administración secuencial de la composición inmunomoduladora de la invención y el alérgeno); en este caso, el alérgeno estaría formulado en su propia formulación. Aunque prácticamente cualquier alérgeno puede ser administrado en esta realización particular, en una realización concreta, dicho alérgeno es un alérgeno causante de las alergias a las que se hecho referencia en los párrafos anteriores. Dichos alérgenos pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia o bien pueden ser adquiridos comercialmente.

La composición inmunomoduladora de la invención puede ser utilizada para la prevención y/o el tratamiento por vía oral de enfermedades asociadas con las alergias. El experto en la materia conoce las enfermedades generalmente asociadas con las

alergias. A modo ilustrativo, no limitativo, las enfermedades asociadas con las alergias más habituales se seleccionan entre asma y dermatitis atópica.

La inmunodeficiencia es un estado patológico en el que la capacidad del sistema inmune para luchar contra enfermedades infecciosas está comprometida o ausente; bajo esas condiciones, el sistema inmune no cumple con el papel de protección que le corresponde dejando al organismo vulnerable a la infección. De hecho, las inmunodeficiencias causan a las personas afectadas una gran susceptibilidad a padecer infecciones. En general, la mayoría de las inmunodeficiencias son adquiridas ("inmunodeficiencia secundaria"); no obstante, algunas personas nacen con defectos en su sistema inmunológico ("inmunodeficiencia primaria"). Entre los sujetos que pueden presentar alguna inmunodeficiencia se encuentran los pacientes trasplantados que toman medicamentos para suprimir su sistema inmune como medida anti-rechazo al trasplante, al igual que algunos pacientes que sufren de un sistema inmune demasiado activo. En general, las personas con inmunodeficiencia suelen ser particularmente vulnerables a las infecciones oportunistas, además de a las infecciones normales que puedan afectar a todo el mundo.

La inmunodeficiencia puede ser fisiológica, congénita, o adquirida. En general, en una situación de inmunodeficiencia, las defensas del organismo contra los patógenos se reducen con la consiguiente alteración del equilibrio Th1/Th2 como, por ejemplo, en inmunodeficiencias fisiológicas (e.g., en bebés recién nacidos, durante el embarazo, etc.), inmunodeficiencias primarias o congénitas (e.g., enfermedades genéticas, por ejemplo, tales como agammaglobulinemia en el síndrome de Di George, etc.), o en inmunodeficiencias adquiridas o secundarias (e.g., inmunodeficiencias adquiridas como consecuencia de una desnutrición, envejecimiento, el tratamiento con ciertos medicamentos, tales como agentes quimioterapéuticos, antirreumáticos, inmunosupresores (administrados después del trasplante de órganos), glucocorticoides, etc.; síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedades autoinmunes, etc.).

La composición inmunomoduladora de la invención es útil para apoyar las defensas inmunológicas naturales del organismo, por ejemplo en determinados estados de estrés tales como el estrés psicofísico que, si es excesivamente intenso o prolongado,

puede conducir a una situación de inmunodeficiencia, clínicamente manifestada por vulnerabilidad a infecciones de intensidad variable.

La composición inmunomoduladora de la invención, al modular el sistema inmune, por ejemplo, induciendo preferentemente una respuesta Th1 y/o desplazando la respuesta inmunitaria hacia Th1 (por ejemplo de Th2 hacia Th1), también puede ser utilizada para la prevención y/o el tratamiento por vía oral de patologías derivadas o resultantes de las inmunodeficiencias. El experto en la materia conoce las patologías derivadas de inmunodeficiencias, por ejemplo, infecciones, etc.

Por tanto, la composición inmunomoduladora de la invención puede ser útil en la prevención y/o el tratamiento de las inmunodeficiencias de cualquier origen y patologías resultantes, por ejemplo, en la prevención y/o el tratamiento por vía oral de infecciones causadas por patógenos intracelulares (e.g., bacterias, protozoos, virus, etc.) así como infecciones de las mucosas (e.g., infecciones de la cavidad oral, infecciones del aparato respiratorio, infecciones del tracto gastrointestinal, infecciones del aparato genitourinario, infecciones de las membranas de las mucosas, infecciones de la piel, etc.) y, en general, de todas las infecciones que se derivan de los estados de inmunodeficiencia.

En otra realización particular, la composición inmunomoduladora de la invención puede ser utilizada en el tratamiento y/o prevención de infecciones causadas por patógenos intracelulares. En una realización particular, dicho patógeno intracelular es un patógeno eucariota, tal como, por ejemplo, un protozoo (e.g., *Plasmodium vivax* (que causa malaria), *Leishmania* sp. (asociado con Leishmaniasis), *Entamoeba* sp., *Cryptosporidium* sp., etc. o un hongo, un patógeno procariota, tal como una bacteria (e.g., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Vibrio* sp., *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Listeria* sp., *Brucella* sp., clamidias, etc.,), o un virus (e.g., virus ADN bicatenario (dsDNA), por ejemplo, adenovirus, herpesvirus, poxvirus, etc.); virus ADN monocatenario (ssDNA), por ejemplo, parvovirus, etc.; virus ARN bicatenario (dsRNA), por ejemplo, reovirus, etc.; virus ARN monocatenario positivo ((+)ssRNA), por ejemplo, picornavirus, togavirus, etc.; virus ARN monocatenario negativo [(-)ssRNA], por ejemplo, ortomixovirus, rhabdovirus, etc.; virus ARN monocatenario retrotranscrito (ssRNA-RT), por ejemplo, retrovirus, etc.; o virus ARN bicatenario retrotranscrito (dsRNA-RT), por ejemplo, hepadnavirus, etc.).

En otra realización particular, la composición inmunomoduladora de la invención puede ser utilizada en el tratamiento y/o prevención de infecciones de mucosas; a modo ilustrativo, no limitativo, dicha mucosa puede ser la mucosa de la cavidad oral, la mucosa del tracto gastrointestinal, la mucosa del aparato genitourinario y la mucosa del aparato respiratorio, etc. En general, estas infecciones pueden ser causadas por patógenos intracelulares. En una realización particular, las infecciones de la mucosa son causadas por enterobacterias (e.g., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia* sp., *Vibrio* sp., etc.), enterovirus (e.g., calicivirus, rotavirus, adenovirus, astrovirus, etc.) o protozoos (e.g., *Entamoeba* sp., *Cryptosporidium* sp., *Leishmania* sp., etc.).

La composición inmunomoduladora de la invención, adecuada preferentemente para su administración por vía oral, puede prepararse por métodos conocidos por los técnicos en la materia teniendo en cuenta la naturaleza particular de los ingredientes activos presentes en la misma, los cuales incluyen material vivo, concretamente, bacterias probióticas, y, preferentemente, por el método proporcionado por esta invención ya que las micropartículas así producidas protegen a dichas bacterias probióticas durante su procesamiento, almacenamiento y administración, en particular, durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal (administración por vía oral). Adicionalmente, tras ser ingeridas, facilitan la liberación de las bacterias probióticas en el lugar deseado, protegiéndolas de las condiciones “ácido-pépticas” del tracto gastrointestinal superior, en particular del estómago.

En una realización particular, la composición inmunomoduladora de la invención se encuentra en la forma de dosificación unitaria para su administración una vez o varias veces al día, de acuerdo con el tipo y la gravedad de la patología a tratar y la edad y el peso del sujeto.

En una realización particular, las micropartículas de la invención presentes en la composición inmunomoduladora de la invención se encuentran en forma de un polvo seco o de un liofilizado, opcionalmente presente en un vehículo apropiado para su administración a un sujeto. En general, los ingredientes activos (micropartículas, composición o producto de la invención) están incluidos en las composiciones adecuadas.

Por tanto, en una realización particular, la composición inmunomoduladora de la invención comprende un vehículo aceptable en alimentación, farmacia o nutracéutica. En una realización concreta, las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o productos alimenticios proporcionados por esta invención proporcionan un vehículo apropiado para las bacterias probióticas. Así, en una realización concreta, la composición inmunomoduladora de la invención comprende una composición farmacéutica, nutracéutica o está comprendida en un producto alimenticio. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, incluyen medicamentos, productos dietéticos, productos derivados de la leche, tales como yogur, queso, crema, artículos de confitería, zumos de frutas, etc., y pueden incluir, si se desea, tal como se ha mencionado previamente, otras sustancias beneficiosas para el organismo, tales como, por ejemplo, vitaminas, sales minerales, otros ingredientes activos compatibles, como por ejemplo, agentes prebióticos, fibras, etc.

Como se ha mencionado previamente, este aspecto inventivo puede ser expresado de forma alternativa como una micropartícula de la invención, o una composición de la invención, o un producto de la invención para su empleo en una composición moduladora del sistema inmune (composición inmunomoduladora de la invención). Las características de la composición inmunomoduladora a las que se ha hecho referencia previamente, son aquí aplicables *mutatis mutandi*. En una realización particular y preferida dicha composición moduladora del sistema inmune induce preferentemente una respuesta Th1 y/o desplaza la respuesta inmunitaria hacia Th1; preferentemente de Th2 hacia Th1. Asimismo, en una realización particular, dicha composición moduladora del sistema inmune comprende, además de la micropartícula de la invención, composición de la invención, o producto de la invención, un vehículo aceptable en alimentación, farmacia o nutracéutica. En otra realización particular, dicha composición moduladora del sistema inmune, que comprende micropartículas de la invención, una composición de la invención, o un producto de la invención, se encuentra en la forma de una composición farmacéutica, nutracéutica o, alternativamente, está comprendida en un producto alimenticio. En otra realización particular, las micropartículas presentes en dicha composición moduladora del sistema inmune se encuentran en forma de un polvo seco.

La invención también se relaciona con una micropartícula de la invención, o una composición de la invención, o un producto de la invención para su empleo en la prevención y/o el tratamiento de una alteración del sistema inmune (e.g., una alteración natural o inducida del sistema inmune) por vía oral. En una realización particular, dicha micropartícula de la invención se encuentra en una composición farmacéutica formulada para su administración por vía oral. En otra realización particular, dicha composición de la invención es una composición farmacéutica formulada para su administración por vía oral. En otra realización particular, dicho producto de la invención es un producto farmacéutico adecuado para su administración por vía oral.

Asimismo, la invención también se relaciona con una micropartícula de la invención, composición de la invención, o producto de la invención para su empleo en la prevención y/o el tratamiento por vía oral de rechazo a un trasplante mediado por Th2; alergias y enfermedades asociadas a la alergia; inmunodeficiencias y patologías derivadas de dichas inmunodeficiencias; infecciones causadas por patógenos intracelulares, o infecciones de mucosas [las características del rechazo a trasplante mediado por Th2, alergias y enfermedades asociadas a la alergia; inmunodeficiencias y patologías derivadas de dichas inmunodeficiencias; infecciones causadas por patógenos intracelulares, o infecciones de mucosas ya han sido mencionadas previamente y se incorporan por referencia]. En una realización particular, dicha micropartícula de la invención se encuentra en una composición farmacéutica formulada para su administración por vía oral. En otra realización particular, dicha composición de la invención es una composición farmacéutica formulada para su administración por vía oral. En otra realización particular, dicho producto de la invención es un producto farmacéutico adecuado para su administración por vía oral.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y el tratamiento de una alteración o patología del sistema inmune de un sujeto, que comprende administrar por vía oral a un sujeto en necesidad de tratamiento, una cantidad efectiva de una composición inmunomoduladora de la invención, o de micropartículas de la invención, o de una composición de la invención, o de un producto de la invención.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “alteración o patología del sistema inmune” de un sujeto comprende las alteraciones del sistema inmune, tanto naturales como inducidas del sistema inmune, como enfermedades en las que un tratamiento basado en una respuesta Th1 puede resultar beneficiosa, por ejemplo, rechazo a un trasplante mediado por Th2; alergias y enfermedades asociadas a la alergia; inmunodeficiencias y patologías derivadas de dichas inmunodeficiencias; infecciones causadas por patógenos intracelulares, o infecciones de mucosas. Las características del rechazo a trasplante mediado por Th2, alergias y enfermedades asociadas a la alergia; inmunodeficiencias y patologías derivadas de dichas inmunodeficiencias; infecciones causadas por patógenos intracelulares, o infecciones de mucosas ya han sido mencionadas previamente y se incorporan por referencia.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “sujeto” incluye cualquier animal mamífero, incluido el ser humano.

Las características de la composición inmunomoduladora de la invención, las micropartículas de la invención, la composición de la invención, o el producto de la invención ya han sido definidas previamente y se incorporan aquí por referencia.

Las características de la forma de presentación y administración de la composición inmunomoduladora de la invención, las micropartículas de la invención, la composición de la invención, o el producto de la invención ya han sido mencionadas previamente y se incorporan por referencia.

Para su administración al sujeto en necesidad de tratamiento, la composición inmunomoduladora de la invención, las micropartículas de la invención, la composición de la invención, o el producto de la invención puede encontrarse en un vehículo aceptable en alimentación, farmacia o nutracéutica, o puede estar presente en una composición farmacéutica, nutracéutica o comprendida en un producto alimenticio.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos describen la producción de micropartículas de caseína y quitosano que pueden incorporar bacterias probióticas y que son capaces de proteger dichos microorganismos de los factores anteriormente mencionados (procesamiento, almacenamiento y/o tránsito a través del tracto gastrointestinal). A continuación se describen los métodos generales empleados, salvo indicación en sentido contrario, en la realización de estos ejemplos.

### Métodos generales

#### **I. Método general de producción de micropartículas de caseína y quitosano vacías**

El método de producción de micropartículas de caseína y quitosano comprende la disolución de caseinato sódico (ANVISA, Madrid, España) en medio acuoso seguido de la adición, bajo agitación magnética y con flujo constante, de un volumen determinado de una disolución de quitosano y opcionalmente una cantidad determinada de un agente reticulante. Las micropartículas formadas se desecan tras el paso de la suspensión que las contiene a través de un *spray-dryer* previa adición de un agente protector, tal como manitol.

El quitosano utilizado en estos ejemplos, salvo indicación contraria, fue Quitosano Caracterizado, con un grado de desacetilación del 90,2% y un peso molecular de 105  $\pm$  0,01 kDa, de Guinama (Valencia, España).

El *spray-dryer* utilizado en estos ejemplos, salvo indicación contraria, fue el *spray dryer* Büchi Mini Spray Dryer B-290 con accesorios Büchi Inert Loop B-295 y Dehumidifier B-296. Büchi Switzerland, Flawil (Suiza).

El manitol utilizado en estos ejemplos fue D-manitol, E-421, riqueza 99,4%, de Guinama (Valencia, España), aunque en ocasiones también su utilizó D-manitol de Sigma-Aldrich.

#### **II. Caracterización de las micropartículas**

El tamaño de las micropartículas fue determinado mediante microscopía óptica

utilizando un microscopio Olympus CH40 con Cámara Color view-soft imaging Systems.

La morfología de las micropartículas se observó además por microscopía electrónica de barrido (Zeiss, DSM 940A Alemania). Para ello, las micropartículas se cubrieron con una capa de oro molecular de unos 9 nm (Equipo Emitech K550, Sputter-Coater, Reino Unido) y las fotografías se realizaron con un microscopio Zeiss DMS 940 A (Estados Unidos).

### **III. Método general de preparación de las suspensiones de bacterias probióticas**

Las bacterias probióticas empleadas en la realización de estos ejemplos fueron *Lactobacillus plantarum* CECT 220 y *Lactobacillus casei* CECT 475 T aisladas de forraje de maíz y queso, respectivamente. Los liófilos de ambos microorganismos se revitalizaron en caldo MRS (Merck, Barcelona) a 37°C en atmósfera anaerobia (85% nitrógeno, 10% hidrógeno, 5% dióxido de carbono) en cabina de anaerobiosis (MACS 500 AIRLOCK, AES Chemunex, España). A partir de estos cultivos revitalizados se prepararon las alícuotas de 500 µL de suspensiones stock que se mantuvieron en congelación a -85°C hasta su momento de uso.

Las suspensiones de trabajo se prepararon de la siguiente forma. 100 µL de la alícuota del microorganismo correspondiente se transfirieron a 10 mL de caldo MRS. Tras incubación durante 12 horas/37°C en condiciones de anaerobiosis se realizó el recuento microscópico en cámara de Thoma con objeto de calcular el volumen de muestra que era necesario transferir a un matraz de 50 mL de caldo MRS para alcanzar un recuento de  $10^6$  UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro). Tras inoculación de ese volumen, los matraces se incubaron en las condiciones anteriormente descritas durante 24 h hasta alcanzar la fase estacionaria temprana de crecimiento. El seguimiento y recuento de la población bacteriana se realizó mediante siembra en agar MRS (Merck, Barcelona) de las correspondientes diluciones decimales (caldo BPW 0,1% (Merck, Barcelona)) a cada uno de los tiempos de muestreo.

### **IV. Método general de producción de micropartículas de caseína y quitosano conteniendo bacterias probióticas encapsuladas**

El método general de producción de micropartículas de caseína y quitosano conteniendo bacterias probióticas encapsuladas comprende la disolución de caseinato sódico (ANVISA, Madrid, España) en medio acuoso seguido de la adición, bajo agitación y con flujo constante de un volumen determinado de suspensión bacteriana, obtenida según el método descrito en el apartado III anterior y después de ser centrifugada y resuspendida en un volumen determinado de solución de sacarosa al 2% (p/v). Posteriormente se adiciona un volumen determinado de una disolución de quitosano, y opcionalmente un volumen determinado de un agente reticulante.

#### **V. Procedimiento general de tinción de bacterias probióticas y encapsulación de las mismas**

Este procedimiento fue llevado a cabo para confirmar de forma cualitativa, a través de microscopía óptica de fluorescencia, que las bacterias quedan atrapadas en el interior de las micropartículas, es decir, que la matriz de caseína y quitosano recubre las bacterias probióticas.

El procedimiento de tinción de las bacterias comprende la preparación de una solución saturada de rodamina B isotiocianato en tampón fosfato (pH 7,4), su filtración a través de una membrana de 0,2 µm y su adición sobre un volumen determinado de suspensión bacteriana, obtenida según el método descrito en apartados anteriores. Una vez centrifugada la mezcla a 3.000 rpm durante 15 minutos para eliminar el exceso de rodamina en el sobrenadante, las bacterias teñidas se resuspenden en un volumen determinado de solución de sacarosa al 2% (p/v). La encapsulación de las bacterias teñidas se realiza según el método descrito en el apartado anterior.

#### **VI. Procedimiento general de cuantificación de bacterias viables presentes en la formulación, y determinación de los ciclos de muerte bacteriana a lo largo del proceso**

Para llevar a cabo el recuento de las bacterias encapsuladas, a un peso conocido de microcápsulas (500 µg aproximadamente) se le adicionó 1 mL de una solución de NaOH 1% (pH 10), y tras agitación con vórtex durante 5 minutos se realizaron las diluciones decimales correspondientes en caldo BPW al 0,1% (Merck, Barcelona,

España) y la siembra en placa en agar MRS. Tras incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis (cabina MACS 500 Airlock, AES Chemunex, España) durante 24-48 horas se realizaron los recuentos de colonias.

Teniendo en cuenta la cantidad de bacterias inicialmente incluidas en la formulación antes de su paso por el *spray-dryer* por cada gramo de formulación, y los recuentos obtenidos al final del proceso, se determinan los ciclos de muerte bacteriana mediante la siguiente ecuación:

Ciclos de muerte bacteriana:  $\log (\text{UFC/g iniciales}) - \log (\text{UFC/g recuperados})$

## **VII. Procedimiento de evaluación de la resistencia de las bacterias lácticas microencapsuladas en medio gastrointestinal simulado**

La resistencia gastrointestinal de *L. plantarum* y *L. casei* fue evaluada de acuerdo con el procedimiento descrito por Vinderola et al., 2003.

Para llevar a cabo el estudio, 10  $\mu\text{L}$  del cultivo bacteriano líquido ó 500  $\mu\text{g}$  de formulación de micropartículas en forma de polvo se adicionaron a tubos de PVC con 0,99 mL de simulante gástrico a pH 2,5. Se utilizaron tantos tubos como tiempos de tratamiento se planificaron evaluar, concretamente, 5 tubos con simulante gástrico correspondientes a los tiempos: 0 y 2 horas (resistencia a simulante gástrico) y 0, 3 y 6 horas (resistencia a simulante intestinal).

El simulante gástrico se preparó según farmacopea y tenía la siguiente composición para 1 litro de solución:

- NaCl 2 g
- Pepsina 3,2 g (Sigma, Barcelona, España)
- HCl 37% (v/v) 7 mL

La pepsina se disolvía en HCl y posteriormente la mezcla se añadía en 1 litro de agua tipo I. El pH final se ajustó a 1,2 ó 2,5 en función de la prueba a realizar con HCl 37% (v/v).

El simulante intestinal, preparado también a partir de receta de farmacopea, estaba compuesto por:

- Fosfato potásico monobásico (Panreac, Madrid, España) 6,8 g disuelto en 250 mL de agua tipo I y al que se añadían 77 mL de NaOH 0,2 N
- Agua 500 mL
- Pancreatina 10 g (Sigma, Barcelona, España)

El pH se ajustó a 6,8 con NaOH 0,2 N o con HCl 0,2 N.

Los 5 tubos se mantuvieron a 37°C en agitador orbital (150 rpm) hasta el momento de extracción de la muestra y evaluación de supervivientes. Transcurrido el tiempo de tratamiento en simulante gástrico (2 horas), los tubos de PVC se centrifugaron (13.000 rpm/10 minutos) y se descartó el sobrenadante. Para evaluar el tiempo 2 horas, el pellet de uno de los tubos se sometió al tratamiento de ruptura de las microcápsulas con NaOH al 1% (pH 10) anteriormente descrito. Los pellets de los tubos restantes se resuspendieron en 0,99 mL de simulante intestinal para evaluar la resistencia en este medio a tiempo 0, 3 y 6 horas (2, 5 y 8 horas desde el inicio del estudio). Transcurridos esos tiempos, los tubos se centrifugaron, los sobrenadantes fueron descartados y los pellets se trataron con NaOH al 1% (tratamiento de ruptura de las microcápsulas) para proceder a evaluar los supervivientes restantes.

El recuento de bacterias viables se realizó por el método de conteo en placa en agar MRS anteriormente descrito. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 a 48 h en condiciones de anaerobiosis determinando el número de unidades formadoras de colonias. La fracción de bacterias supervivientes se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Log Fracción Supervivientes} = \text{Log} \left( \frac{N_t}{N_0} \right)$$

donde  $N_t$  representa el total de bacterias ácido lácticas viables después de cada tiempo de tratamiento, y  $N_0$  representa el número inicial de Bacterias Acido Lácticas (BAL) inoculadas (Bao et al., 2010).

### **VIII. Procedimiento de evaluación de la estabilidad de las bacterias lácticas microencapsuladas a lo largo del tiempo de almacenamiento en condiciones ambientales**

El estudio de estabilidad de las bacterias microencapsuladas se realizó mediante la evaluación de la viabilidad bacteriana a lo largo del tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C).

Para ello, a partir de las formulaciones de microcápsulas almacenadas en envase de vidrio cerrado herméticamente, se tomaron muestras de 500 µg que se sometían al procedimiento de ruptura y evaluación de supervivientes que anteriormente ha sido descrito. A modo de control, el estudio fue realizado del mismo modo tanto en suspensiones frescas como en liófilos de ambos microorganismos.

#### **EJEMPLO 1**

#### **Preparación y caracterización de micropartículas de caseína y quitosano conteniendo bacterias probióticas del género *Lactobacillus plantarum* encapsuladas**

Se prepararon distintos tipos de micropartículas conteniendo bacterias, todas ellas con caseína como polímero base modificado con quitosano. El método de preparación de dichas micropartículas dependió de la presencia o ausencia de reticulante y del tipo de reticulante empleado.

##### **(Ap) Micropartículas de caseína modificadas con quitosano, en ausencia de reticulante**

Sobre 25 mL de una disolución acuosa de 10 mg/mL de caseinato sódico se añadieron 1,5 mL de la suspensión bacteriana ( $1,2 \times 10^{12}$  UFC/mL) descrita en el apartado III de los "Métodos Generales", después de ser centrifugada y resuspendida en una solución de sacarosa al 2% (p/v). Posteriormente, sobre la mezcla, se añadieron 10 mL de una solución de quitosano de concentración 1,6 mg/mL preparada en medio acuoso con pH 5,5-6, mediante la adición de 400 mg de quitosano a 250 ml de agua purificada bajo agitación y ajuste del pH con HCl 0,1 N.

Tras cinco minutos de incubación, se añadieron 100 mg de manitol sobre la mezcla

anterior, y se procedió a secar la formulación empleando la técnica de *spray-drying*. Las condiciones de procesado fueron:

- Temperatura de entrada de aire (*Inlet temperature*): 85°C
- Temperatura salida del aire (*Outlet temperature*): 40-45°C
- Presión de aire (*Air Pressure*): 6 bar ( $6 \times 10^5$  Pa)
- Velocidad de bombeo de la muestra (*Pumping rate*): 3,5 mL/min
- Aspiración: 100%
- Flujo de aire (*Air flow*): 600 L/h

Las micropartículas obtenidas en forma de polvo fueron recolectadas para su caracterización y cuantificación. Este mismo estudio fue realizado en ausencia de bacterias para comprobar cómo afecta la presencia de estos probióticos a las características fisicoquímicas de las partículas. La Figura 1 muestra las imágenes de microscopía óptica obtenidas para las partículas, tanto en presencia como en ausencia de los probióticos. En ellas se puede comprobar que el tamaño de las partículas no se ve afectado por la presencia de bacterias encapsuladas.

Por otra parte, con el fin de confirmar que las bacterias se encuentran encapsuladas en las micropartículas de caseína y quitosano, se repitió el mismo estudio empleando bacterias teñidas con marcador fluorescente según el método descrito en el apartado V de los “Métodos Generales”. La Figura 2 muestra las imágenes de microscopía óptica de fluorescencia tanto de las bacterias teñidas libres (A), como las encapsuladas (B). La fluorescencia observada en las micropartículas (A) es debida exclusivamente a las bacterias. Al no observarse prácticamente presencia de bacterias fuera de las micropartículas, se confirma que éstas se encuentran encapsuladas.

#### (Bp) Micropartículas de caseína y quitosano, en presencia de vainillina

Sobre 25 mL una disolución acuosa de 10 mg/mL de caseinato sódico se añadieron 0,5 mL de una solución acuosa de vainillina (5 mg/mL). Tras 15 minutos (mínimo) de incubación, se añadieron a la mezcla 0,3 mL de la suspensión bacteriana ( $4,7 \times 10^{11}$  UFC/mL) descrita en el apartado III de los “Métodos Generales”, después de ser centrifugada y resuspendida en una solución de sacarosa al 2% (p/v). Posteriormente, sobre la mezcla, se añadieron 10 mL de una solución de quitosano de concentración 1,6 mg/mL preparada en medio acuoso con pH 5,5-6.

Tras cinco minutos de incubación, se añadieron 250 mg de manitol sobre la mezcla anterior, y se procedió a secar la formulación empleando la técnica de *spray-drying*. Las condiciones de procesado fueron similares a las descritas en el apartado Ap.

Las micropartículas obtenidas en forma de polvo fueron recolectadas para su caracterización y cuantificación.

(Cp) Micropartículas de caseína y quitosano, en presencia de TPP

Sobre 25 mL una disolución acuosa de 10 mg/ mL de caseinato sódico se añadieron 1,5 mL de la suspensión bacteriana ( $4,7 \times 10^{11}$  UFC/mL) descrita en el apartado III de los “Métodos Generales”, después de ser centrifugada y resuspendida en una solución de sacarosa al 2% (p/v). Posteriormente, sobre la mezcla, se añadieron 10 mL de una solución de quitosano de concentración 1,6 mg/mL preparada en medio acuoso con pH 5,5-6. Pasados cinco minutos de incubación, se añadieron 0,8 mL de una solución de TPP 1 mg/mL.

Cinco minutos más tarde, se añadieron 250 mg de manitol sobre la mezcla anterior, y se procedió a secar la formulación empleando la técnica de *spray-drying*. Las condiciones de procesado fueron similares a las descritas en el apartado Ap.

Las micropartículas obtenidas en forma de polvo fueron recolectadas para su caracterización y cuantificación.

(Dp) Micropartículas de caseína y quitosano, en presencia de sales cárnicas

Sobre 25 mL una disolución acuosa de 10 mg/mL de caseinato sódico se añadieron 4 mL de la suspensión bacteriana ( $1,2 \times 10^{12}$  UFC/mL) descrita en el apartado III de los “Métodos Generales”, después de ser centrifugada y resuspendida en una solución de sacarosa al 2% (p/v). Posteriormente, sobre la mezcla, se añadieron 2 mL de una solución de quitosano de concentración 1,6 mg/mL preparada en medio acuoso con pH 5,5-6. Pasados cinco minutos de incubación, se añadieron 2 mL de una solución de acetato cárneo al 2% (p/v) y 2 mL de una solución de cloruro cárneo al 2% (p/v).

Cinco minutos más tarde, se añadieron 100 mg de manitol sobre la mezcla anterior, y se procedió a secar la formulación empleando la técnica de *spray-drying*. Las condiciones de procesado fueron similares a las descritas en el apartado Ap.

Las micropartículas obtenidas en forma de polvo fueron recolectadas para su caracterización y cuantificación.

La Figura 3 muestra la imagen de microscopía óptica de fluorescencia obtenida para las micropartículas, en la que no se observa presencia de bacterias libres.

La Tabla 1 resume los ciclos de muerte de *L. plantarum* derivados del proceso de encapsulación en las micropartículas de caseína y quitosano.

**Tabla 1.** Influencia del método de fabricación de micropartículas de caseína en la supervivencia de *Lactobacillus plantarum*

| Tipo de Formulación | Recuento de bacterias antes del secado por SD (UFC/g) | Recuento de bacterias después del secado por SD (UFC/g) | Ciclos de muerte bacteriana debidos al proceso de obtención de las micropartículas (log UFC) |
|---------------------|---|---|--|
| Ap                  | $3,67 \times 10^{12}$                                 | $2,50 \times 10^{10}$                                   | 2,17   |
| Bp                  | $2,42 \times 10^{11}$                                 | $2,50 \times 10^{10}$                                   | 0,99   |
| Cp                  | $1,21 \times 10^{12}$                                 | $7,50 \times 10^{10}$                                   | 1,21   |
| Dp                  | $9,28 \times 10^{12}$                                 | $1,70 \times 10^{10}$                                   | 2,74   |

SD: *spray-drying*.

Los tamaños de las micropartículas obtenidas son similares en todas las formulaciones y oscilan en torno a  $7 \pm 4 \mu\text{m}$ . Sin embargo, los ciclos de muerte bacteriana son inferiores cuando se emplea vainillina o TPP como agentes reticulante.

Según los resultados obtenidos, las formulaciones Bp y Cp son las que ofrecen mayor protección a los probióticos durante el proceso de obtención. Así pues se escogieron

ambas formulaciones para proceder a realizar los estudios de resistencia gastrointestinal y viabilidad durante el almacenamiento.

### **EJEMPLO 2**

#### **Evaluación de la estabilidad de *Lactobacillus plantarum* encapsulado a lo largo del tiempo de almacenamiento en condiciones ambientales**

Las formulaciones Ap, Bp, Cp y Dp descritas en el Ejemplo 1 fueron empleadas para evaluar la supervivencia de las bacterias en condiciones ambientales (25°C) a lo largo del tiempo, utilizando tanto suspensiones frescas como liófilos a modo de control comparativo. La Figura 4 recoge los resultados obtenidos.

Los resultados muestran claramente que en el primer mes de estudio hay una pérdida de 7 unidades logarítmicas en los recuentos de las bacterias frescas en suspensión, y en el tercer mes se observaron pérdidas de 4,5 unidades logarítmicas en el caso de las bacterias en su forma liofilizada. Sin embargo, cuando estos probióticos se encontraban encapsulados en cualquiera de las micropartículas de caseína y quitosano descritas en el Ejemplo 1, sus recuentos se mantenían constantes, no observándose pérdidas significativas durante los 8 meses de estudio. Estos resultados confirman que las formulaciones descritas en la presente invención permiten al menos duplicar la viabilidad de las bacterias en condiciones ambientales con respecto a las bacterias liofilizadas.

### **EJEMPLO 3**

#### **Evaluación de la resistencia a medio gastrointestinal simulado de las bacterias probióticas del género *Lactobacillus plantarum* encapsuladas**

Las formulaciones Ap, Bp, Cp y Dp descritas en el Ejemplo 1 fueron empleadas para evaluar la resistencia de las bacterias encapsuladas en medio gastrointestinal simulado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado VII de los "Métodos Generales". La Figura 5 muestra los resultados obtenidos a lo largo del proceso para ambas formulaciones, así como la resistencia obtenida para las bacterias libres, sin encapsular. En el caso de las bacterias en su forma libre (liofilizadas, no encapsuladas), el número de recuentos viables fue descendiendo gradualmente a lo largo del estudio, que finalizó con una pérdida media de 4 unidades logarítmicas. En el

caso de las formulaciones Ap y Dp, los recuentos se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo de todo el ensayo, siendo significativamente superiores al liófilo tanto al final del ensayo en simulante gástrico (2 horas) como al final del ensayo en simulante intestinal (8 horas). En las formulaciones Bp y Cp se observó un descenso en la concentración durante la permanencia en simulante gástrico, siendo los recuentos a tiempo 2 horas significativamente similares al liófilo. Sin embargo, una vez transferidas las micropartículas a simulante intestinal, se observó un aumento de los recuentos siendo significativamente superiores al liófilo al final del ensayo (8 horas). Este incremento en los recuentos finales ha sido descrito previamente por otros autores en estudios realizados con bifidobacterias, en los que concluyen que el fenómeno es debido a que el daño que han sufrido las bacterias durante el estrés a pH bajo es sólo de carácter temporal, y no llega a matar definitivamente a las bacterias, lo que permite que éstas se recuperen al pasar a medio intestinal (Lacroix and Picot, 2004).

En resumen, tras el estudio en medio simulante gástrico (2 horas) se observaron mayores supervivencias cuando las bacterias se encontraban encapsuladas en las formulaciones Ap y Dp que cuando se encontraban en su forma libre, siendo dichas diferencias significativas. En cambio, estas diferencias no se observaron en las formulaciones Bp y Cp. Sin embargo, tras la finalización del estudio (a las 8 horas, después de su paso por el medio simulante gástrico y posteriormente medio intestinal simulado), las diferencias encontradas fueron superiores y significativas para todas las formulaciones de micropartículas (Ap, Bp, Cp y Dp), llegando a una diferencia de hasta tres ciclos con respecto el liófilo.

Estos resultados demuestran que las micropartículas descritas incrementan de forma significativa la tolerancia de las bacterias estudiadas a las condiciones gastrointestinales simuladas.

Por otra parte, las micropartículas fueron caracterizadas para evaluar su estado durante el proceso de degradación en el tiempo. La Figura 6 permite observar que las bacterias se encuentran alojadas en el interior de las micropartículas y son liberadas al medio cuando dichas micropartículas se degradan en el tiempo.

#### EJEMPLO 4

**Preparación y caracterización de micropartículas de caseína o de caseína y  
quitosano contenido bacterias probióticas del género *Lactobacillus casei*  
encapsuladas**

Se prepararon distintos tipos de micropartículas contenido bacterias, todas ellas con caseína como polímero base y quitosano. El método de preparación de dichas micropartículas dependió del tipo de reticulante empleado.

**(Ac) Micropartículas de caseína modificadas con quitosano, en ausencia de reticulante**

Sobre 25 mL de una disolución acuosa de 10 mg/mL de caseinato sódico se añadieron 2 mL de la suspensión bacteriana ( $2,2 \times 10^{10}$  UFC/mL) descrita en el apartado III de los “Métodos Generales”, después de ser centrifugada y resuspendida en una solución de sacarosa al 2% (p/v). Posteriormente, sobre la mezcla, se añadieron 10 mL de una solución de quitosano de concentración 1,6 mg/mL preparada en medio acuoso con pH 5,5-6, mediante la adición de 400 mg de quitosano a 250 ml de agua purificada bajo agitación y ajuste del pH con HCl 0,1 N. Tras cinco minutos de incubación, se añadieron 100 mg de manitol sobre la mezcla anterior, y se procedió a secar la formulación empleando la técnica de spray-drying. Las condiciones de procesado fueron:

- Temperatura de entrada de aire (*Inlet temperature*): 85°C
- Temperatura salida del aire (*Outlet temperature*): 40-45°C
- Presión de aire (*Air Pressure*): 6 bar ( $6 \times 10^5$  Pa)
- Velocidad de bombeo de la muestra (*Pumping rate*): 3,5 mL/min
- Aspiración: 100%
- Flujo de aire (*Air flow*): 600 L/h

Las micropartículas obtenidas en forma de polvo fueron recolectadas para su caracterización y cuantificación. Este mismo estudio fue realizado en ausencia de bacterias para comprobar cómo afecta la presencia de estos probióticos a las características fisicoquímicas de las partículas.

**(Bc) Micropartículas de caseína y quitosano, en presencia de sales cárnicas**

Sobre 150 ml de una disolución acuosa de 10 mg/mL de caseinato sódico se

añadieron 1,8 mL de la suspensión bacteriana ( $9,4 \times 10^{10}$  UFC/mL) descrita en el apartado III de los "Métodos Generales", después de ser centrifugada y resuspendida en una solución de sacarosa al 2% (p/v). Posteriormente, sobre la mezcla, se añadieron 25,5 mL de una solución de quitosano de concentración 1,6 mg/mL preparada en medio acuoso con pH 5,5-6. Sobre esta solución se añadió una mezcla de sales cárnicas (12 ml de acetato de calcio 2% p/v y 12 ml de cloruro cárlico 0,9% p/v).

Tras cinco minutos de incubación, se añadieron 1.500 mg de manitol sobre la mezcla anterior, y se procedió a secar la formulación empleando la técnica de *spray-drying*.

Las condiciones de procesado fueron las siguientes:

- Temperatura de entrada de aire (*Inlet temperature*): 75°C
- Temperatura salida del aire (*Outlet temperature*): 38°C
- Presión de aire (*Air Pressure*): 6 bar ( $6 \times 10^5$  Pa)
- Velocidad de bombeo de la muestra (*Pumping rate*): 3,5 mL/min
- Aspiración: 100%
- Flujo de aire (*Air flow*): 600 L/h

Las micropartículas obtenidas en forma de polvo fueron recolectadas para su caracterización y cuantificación.

#### (Cc) Micropartículas de caseína y quitosano reticuladas con vainillina

Sobre 25 ml de una disolución acuosa de 10 mg/mL de caseinato sódico se añadieron 0,5 mL de una solución acuosa de vainillina (5 mg/mL). Tras 15 minutos (mínimo) de incubación, se añadieron a la mezcla 3 mL de la suspensión bacteriana ( $1,2 \times 10^9$  UFC/mL) descrita en el apartado III de los "Métodos Generales", después de ser centrifugada y resuspendida en una solución de sacarosa al 2% (p/v). Posteriormente, sobre la mezcla, se añadieron 10 mL de una solución de quitosano de concentración 1,6 mg/mL preparada en medio acuoso con pH 5,5-6.

Tras cinco minutos de incubación, se añadieron 200 mg de manitol sobre la mezcla anterior, y se procedió a secar la formulación empleando la técnica de *spray-drying*. Las condiciones de procesado fueron similares a las descritas en el apartado Bc.

Las micropartículas obtenidas en forma de polvo fueron recolectadas para su

caracterización y cuantificación.

(Dc) Micropartículas de caseína y quitosano reticuladas con tripolifosfato

Sobre 100 ml de una disolución acuosa de 10 mg/mL de caseinato se añadieron 1,2 mL de la suspensión bacteriana ( $9,4 \times 10^{10}$  UFC/mL) descrita en el apartado III de los “Métodos Generales”, después de ser centrifugada y resuspendida en una solución de sacarosa al 2% (p/v). Posteriormente, sobre la mezcla, se añadieron 20 mL de una solución de quitosano de concentración 1,6 mg/mL preparada en medio acuoso con pH 5,5-6. Sobre ello se añadieron 1,6 mL de TPP (1mg/ml).

Tras cinco minutos de incubación, se añadieron 1.000 mg de manitol sobre la mezcla anterior, y se procedió a secar la formulación empleando la técnica de *spray-drying*. Las condiciones de procesado fueron similares a las descritas en el apartado Bc.

Las micropartículas obtenidas en forma de polvo fueron recolectadas para su caracterización y cuantificación.

La Tabla 2 resume las características fisicoquímicas de las micropartículas de caseína y quitosano conteniendo *L. casei* encapsulado, así como los ciclos de muerte bacteriana derivados del proceso de fabricación de las partículas.

**Tabla 2.** Características físico-químicas de las micropartículas de caseína y quitosano con *Lactobacillus casei* encapsulado.

| Tipo de formulación | Recuento de bacterias antes del secado por SD (UFC/g) | Recuento de bacterias después del secado por SD (UFC/g) | Ciclos de muerte bacteriana debidos al proceso de obtención de las micropartículas (log UFC) |
|---------------------|---|---|--|
|                     | SD (UFC/g)  | (UFC/g)   | micropartículas (log UFC)  |
| Bc                  | $4,49 \times 10^{10}$                                 | $3,80 \times 10^9$                                      | 1,07   |
| Cc                  | $6,82 \times 10^9$                                    | $7,80 \times 10^9$                                      | 0,00   |
| Dc                  | $4,89 \times 10^{10}$                                 | $1,30 \times 10^{10}$                                   | 0,58   |

SD: *spray-drying*.

Los tamaños de las micropartículas obtenidas son similares en todos los casos y

oscilan en torno a  $7 \pm 4 \mu\text{m}$ . En cuanto al proceso de fabricación, los datos revelan que, en términos generales, las formulaciones desarrolladas protegen mejor a *L. casei* que a *L. plantarum* a lo largo del proceso, y, además, las formulaciones Cc y Dc, son las que más protección confieren.

Aunque no existe acuerdo sobre el recuento mínimo de probióticos viables por gramo o mililitro de producto, concentraciones del orden de  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL (UFC/g) se han aceptado, en general, como el nivel mínimo y satisfactorio al fin de su vida útil. También se ha establecido que los productos probióticos se deberían consumir de forma regular en cantidades de aproximadamente 100 g/día para que se liberasen recuentos de  $10^9$  UFC en el intestino (Karimi et al., 2011; Mohammadi et al., 2011; Vinderola et al., 2000a). Por tanto, el método proporcionado por la presente invención puede ser considerado como un método adecuado ya que mantiene recuentos bacterianos del orden de  $10^9$  UFC/g (Tabla 2), lo que permite, por ejemplo, su formulación en alimentos en proporciones del orden del 1% manteniendo la necesaria concentración de bacterias probióticas de  $10^7$ UFC/g.

Con el fin de conocer la resistencia gastrointestinal y viabilidad durante el almacenamiento de las bacterias encapsuladas, se escogieron las formulaciones Cc y Dc, ya que se encuentran entre las que mejores resultados de protección han aportado y no requieren el empleo de altas presiones, simplificando el proceso de fabricación.

#### EJEMPLO 5

##### **Evaluación de la estabilidad de *Lactobacillus casei* encapsulado a lo largo del tiempo de almacenamiento en condiciones ambientales**

Las formulaciones Ac, Cc y Dc descritas en el Ejemplo 4 fueron empleadas para evaluar la supervivencia de las bacterias en condiciones ambientales a lo largo del tiempo, utilizando tanto suspensiones frescas como liófilos a modo de control comparativo. La Figura 7 resume los resultados obtenidos.

Los resultados muestran que en el primer mes de estudio hay una pérdida de 5 unidades logarítmicas en los recuentos de las bacterias frescas en suspensión, y, en el tercer mes, se observaron pérdidas de 3 unidades logarítmicas en el caso de las bacterias en su forma liofilizada, llegando a una pérdida de 5 unidades logarítmicas al

quinto mes. En el caso de las bacterias encapsuladas en las micropartículas de caseína y quitosano según las formulaciones Ac, Cc y Dc, las pérdidas encontradas a los 3 meses son de aproximadamente 0,5 unidades logarítmicas, y a los 6 meses son de 3 unidades logarítmicas para la formulación Ac, 2 unidades logarítmicas para la formulación Dc y de 1 unidad logarítmica para la formulación Cc.

Estos resultados confirman que las formulaciones descritas en la presente invención permiten incrementar la viabilidad de las bacterias en condiciones ambientales con respecto a las bacterias liofilizadas, de forma similar a lo observado en el caso de *L. plantarum*.

#### EJEMPLO 6

##### Evaluación de la resistencia a medio gastrointestinal simulado de las bacterias probióticas del género *Lactobacillus casei* encapsuladas

Las formulaciones Ac, Cc y Dc descritas en el Ejemplo 4 fueron empleadas para evaluar la resistencia de las bacterias encapsuladas en medio gastrointestinal simulado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado VII de los “Métodos Generales”. La Figura 8 muestra los resultados obtenidos a lo largo del estudio para las micropartículas, así como la resistencia obtenida para las bacterias liofilizadas sin encapsular.

En el caso de las bacterias en su forma libre (liofilizadas, no encapsuladas), el número de recuentos viables descendió significativamente (4 unidades logarítmicas) en las dos primeras horas de estudio en medio gástrico, y, a partir de entonces, se mantuvo constante. Sin embargo, los datos revelan que las bacterias encapsuladas son significativamente más resistentes al tratamiento en medio gástrico, llegando al final del tratamiento a unas pérdidas promedio de aproximadamente 1,5 unidades logarítmicas. Además, tras su paso por el medio intestinal, la resistencia de las bacterias fue descendiendo, aunque continuó siendo significativamente superior al control liofilizado en el caso de las formulaciones Ac y Cc, efecto que no se observó para la formulación Dc.

Estos resultados demuestran que las micropartículas descritas incrementan la tolerancia de las bacterias estudiadas a las condiciones gastrointestinales simuladas.

## EJEMPLO 7

### Estudio inmunológico de biocápsulas de caseína asociadas a *L. plantarum*

Para la realización de este ejemplo se utilizaron las micropartículas de caseína modificadas con quitosano, en presencia de vainillina descritas en el Ejemplo 1 (referencia Bp). Para ello, sobre 25 mL una disolución acuosa de 10 mg/mL de caseinato sódico se añadieron 0,5 mL de vainillina (5 mg/mL). Tras 15 minutos (mínimo) de incubación, se añadieron a la mezcla 1 mL de la suspensión bacteriana ( $4,6 \times 10^{10}$  UFC/mL) descrita en el apartado III de los "Métodos Generales", después de ser centrifugada y resuspendida en una solución de sacarosa al 2% (p/v). Posteriormente, sobre la mezcla, se añadieron 2 mL de una solución de quitosano de concentración 1,6 mg/mL preparada en medio acuoso con pH 5,5-6.

Cinco minutos más tarde, se añadieron 100 mg de manitol sobre la mezcla anterior, y se procedió a secar la formulación empleando la técnica de spray-drying. Las condiciones de procesado fueron las siguientes:

- Temperatura de entrada de aire (*Inlet temperature*): 85°C
- Temperatura salida del aire (*Outlet temperature*): 40-45°C
- Presión de aire (*Air Pressure*): 6 bar (6 x 105 Pa)
- Velocidad de bombeo de la muestra (*Pumping rate*): 3,5 mL/min
- Aspiración: 100%
- Flujo de aire (*Air flow*): 600 L/h.

Las micropartículas obtenidas en forma de polvo fueron recolectadas para su caracterización y cuantificación. El tamaño medio de las micropartículas obtenidas fue de  $7 \pm 4 \mu\text{m}$ . Por otra parte el recuento de bacterias dio un título de  $5,1 \times 10^{10}$  UFC por gramo de micropartículas

Los estudios inmunológicos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del comité ético de la Institución así como con la legislación europea en animales de experimentación (86/609/EU). Para ello se utilizaron 24 ratones macho CD1 (Charles River), de peso medio 20 g, que fueron sometidos a condiciones normales de luz-oscuridad (12 horas - 12 horas). Los animales fueron divididos en 4 grupos diferentes

(6 ratones por grupo) y cada grupo recibió un tratamiento diario diferenciado durante 21 días seguidos.

Al primer grupo se le administró por vía oral 0,1 mL de PBS (búfer fosfato salino pH 7,4) (control). Un segundo grupo fue tratado con una suspensión de *Lactobacillus plantarum* en sacarosa al 2% con una dosis de  $10^7$  UFC/ratón (LP libres). El tercer grupo se trató con una mezcla física en forma de suspensión formada por *L. plantarum* en sacarosa al 2% ( $10^7$  UFC/ratón) mezclado con micropartículas vacías de caseína modificadas con quitosano y reticuladas con vainillina (100 µg/ratón) (mezcla física, MF). Finalmente, el cuarto grupo recibió la formulación descrita anteriormente de *L. plantarum* incorporada en micropartículas de caseína modificadas con quitosano y reticuladas con vainillina ( $10^7$  UFC/ratón) (Bp).

El día 22 se procedió a extraer un volumen de sangre de aproximadamente 250 µL utilizando tubos de separación del suero (SARSTEDT Microtube 1,1 mL Z-Gel). Posteriormente los animales fueron sacrificados y se trajeron los bazo, cuyas células se disgregaron en medio RPMI 1640 con glicina a 4°C. Los eritrocitos, se lisaron efectuándose el recuento de los esplenocitos, cuya concentración fue ajustada en medio RPMI completo. Sobre réplicas de 100 µL de la suspensión celular se adicionó como estímulo *L. plantarum* (proporción 10:1 respecto a los esplenocitos). Tras 48 h de incubación a 37°C se centrifugaron las suspensiones celulares y se conservó el sobrenadante contenido las citoquinas a -80°C. Las citoquinas se capturaron mediante el kit "BD cytometric bead array Th1/Th2/Th17 CBA" (BD, EEUU) y se determinaron empleando un citómetro de flujo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer).

La Figura 9 muestra cómo la administración oral de *L. plantarum* (en forma libre, encapsulada o con mezcla física) induce un ligero aumento del número de linfocitos citotóxicos que se manifiesta por una disminución de la relación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Este efecto es concordante con los datos previos descritos en la bibliografía que correlacionan dicho aumento con un efecto colonizador del intestino por las bacterias [Herias *et al.*, 1999; Smelt *et al.*, 2012]. Por otra parte, se observa que la encapsulación no afectó a la capacidad de las bacterias de alterar la ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

La Figura 10 muestra la relación interferón-gamma/interleuquina 6 (IL-6) en función del tratamiento recibido. En todos los casos, la administración de *L. plantarum* incrementó la síntesis de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). Sin embargo, los animales tratados con la bacteria encapsulada en las micropartículas mostraron una relación significativamente mayor que la obtenida con el resto de los tratamientos ( $p < 0,001$ ; ANOVA, *post hoc* Tukey). Este desplazamiento de la respuesta inmunitaria hacia un perfil Th1 tras la administración de *L. plantarum* es concordante con los resultados obtenidos por otros autores [Smelt *et al.*, 2012; Wiese *et al.*, 2012].

## REFERENCIAS

- AYUB, M. A. Z. & BRINQUES, G. B. 2011. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103, 123-128.
- BAO Y, ZHANG Y, ZHANG Y, LIU Y, WANGA Y, DONG X, WANG Y, ZHANG H. 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21 (5): 695-701.
- BORGOGNA, M., BELLICH, B., ZORZIN, L., LAPASIN, R. & CESARO, A. 2010. Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122, 416-423.
- BURGAIN, J., GAIANI, C., LINDER, M. & SCHER, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467-483.
- 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, 292-302.
- DING, W. K. & SHAH, N. P. 2008. Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. *International Food Research Journal*, 15, 219-232.
- FERRANDINI, E., CASTILLO, M., LÓPEZ, M. B. & LAENCINA, J. 2006. Modelos estructurales de la micela de caseína. *An. Vet. (Murcia)*, 22, 5-18.

- GBASSI, G. K., VANDAMME, T., ENNAHAR, S. & MARCHIONI, E. 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 103-105.
- HEIDEBACH, T., FORST, P. & KULOZIK, U. 2009. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19, 77-84.
- HEIDEBACH, T., FORST, P. & KULOZIK, U. 2010. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*, 98, 309-316.
- HEIDEBACH, T., LEEB, E., FOERST, P. & KULOZIK, U. 2011. Microencapsulation of probiotic cells. In: MONZER FANUN, C.-P. (ed.) *Colloids in Biotechnology*.
- HERIAS M.V., HESSLE C., TELEMO E., MIDTVEDT T., HANSON L.A., WOLD A.E., Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clin Exp Immunol*. 1999 May; 116(2): 283–290.
- HIDALGO et al. *Ars Pharm* 2008; 49 (3):245-257.
- KARIMI, R., A. M. MORTAZAVIAN AND A. G. DA CRUZ. 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Sci Technol* 91:283–308
- LACROIX, C. & PICOT, A. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14, 505-515.
- MATTILA-SANDHOLM, T. & SAARELA, M. (eds.) 2003. *Functional Dairy Products*. , Boca Raton: Woodhead Publishing Limited Abington Cambridge England CRC. Press LLC.
- MOHAMMADI R., A. M. MORTAZAVIAN, R. KHOSROKHAVAR AND A.G. CRUZ. 2011. Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Ann Microbiol* 61:411 424.
- MOHAMMADI, R. AND MORTAZAVIAN A. M. 2011. Review Article: Technological Aspects of Prebiotics in Probiotic Fermented Milks. *Food Rev Int* 27:192–212.
- MORTAZAVIAN, A., RAZAVI, S. H., EHSANI, M. R. & SOHRABVANDI, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY*, 5, 1-18.
- OLIVEIRA, A. C., MORETTI, T. S., BOSCHINI, C., BALIERO, J. C., FREITAS, O. & FAVARO-TRINDADE, C. S. 2007. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BL 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24, 673-81.

- PÉREZ-LUYO, A. 2008. Probióticos: Una alternativa en la prevención de la caries dental? . *Rev Estomatol Herediana*, 18, 65-68.
- SANDERS, M. E. 1999. Probiotics. *Food Technology*, 53, 67-77.
- SHAH, N. P., DONKOR, O. N., NILMINI, S. L. I., STOLIC, P. & VASILJEVIC, T. 2007. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17, 657-665.
- SHAH, N. P. & LANKAPUTHRA, W. E. V. 1997. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. *International Dairy Journal*, 7, 349-356.
- SMELT MJ, DE HAAN BJ, BRON PA, VAN SWAM I, MEIJERINK M, et al. (2012) *L. plantarum*, *L. salivarius*, and *L. lactis* Attenuate Th2 Responses and Increase Treg Frequencies in Healthy Mice in a Strain Dependent Manner. PLoS ONE 7(10): e47244. doi:10.1371/journal.pone.0047244.
- VINDEROLA, C. G., W. PROSELLO, T. D. GHIBERTO AND J. A. REINHEIMER (2000a). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinean fresco cheese. *J Dairy Sci* 83:1905–1911.
- VINDEROLA, C. G., & REINHEIMER, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895–904.
- Wiese M., Eljaszewicz A., Andryszczyk M., Gronek S., Gackowska L., Kubiszewska I., Kaszewski W., Helmin-Basa A., Januszewska M., Motyl I., Wieczynska J., Micchalkiewicz, Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* and *Helicobacter pylori* CagA+ on the expression of selected superficial molecules on monocyte and lymphocyte and the synthesis of cytokines in whole blood culture. *J Physiol. Pharmacol.*, 2012, 63, 3 217-224.

## REIVINDICACIONES

1. Una micropartícula que comprende una matriz y una bacteria probiótica, en donde dicha matriz está constituida por caseína y quitosano.
2. Micropartícula según la reivindicación 1, que comprende, además, un agente reticulante.
3. Micropartícula según la reivindicación 2, en la que dicho agente reticulante es un catión metálico divalente seleccionado del grupo formado por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y combinaciones de los mismos; un tripolifosfato; vainillina; genipina; y combinaciones de los mismos.
4. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en la que dicho agente reticulante se selecciona del grupo formado por  $\text{Ca}^{2+}$ , tripolifosfato sódico y vainillina.
5. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la relación quitosano:caseína, en peso, es de 1:1-150, preferentemente de 1:5-100, más preferentemente de alrededor de 1:14-40.
6. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la bacteria probiótica es una bacteria del género *Bifidobacterium* o *Lactobacillus*.
7. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la bacteria probiótica se selecciona entre *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*.
8. Micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que su tamaño está comprendido entre 1 y 40  $\mu\text{m}$ , preferiblemente alrededor de 2 a 12  $\mu\text{m}$ .
9. Un método de obtención de las micropartículas definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende mezclar caseína o una fuente de caseína, bacterias probióticas y quitosano.

10. Método según la reivindicación 9, en el que se mezcla (i) una solución acuosa de caseína o una fuente de caseína, (ii) una suspensión de bacterias probióticas, y (iii) una solución acuosa de quitosano.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que dicha fuente de caseína es caseinato sódico.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende, además, la adición de un agente reticulante.
13. Método según la reivindicación 12, en el que dicho agente reticulante se adiciona en forma de una solución acuosa.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, que comprende someter la mezcla de caseína o una fuente de caseína, bacterias probióticas y quitosano, y, opcionalmente, un agente reticulante, a, al menos, un ciclo de presión hidrostática, a una presión comprendida entre 100 y 800 MPa.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, que comprende, además, desecar la suspensión que contiene las micropartículas formadas.
16. Método según la reivindicación 15, en el que la desecación de dicha suspensión que contiene las micropartículas se realiza mediante secado por pulverización.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que la desecación de dicha suspensión que contiene las micropartículas se lleva a cabo en presencia de un agente protector.
18. Método según la reivindicación 17, en el que dicho agente protector es un sacárido.
19. Método según la reivindicación 18, en el que dicho agente protector es manitol.

20. Método según la reivindicación 17, en el que dicho agente protector es una sustancia prebiótica.
21. Método según la reivindicación 20, en el que dicha sustancia prebiótica se selecciona del grupo formado por oligofructosa, pectina, inulina, galactooligosacáridos, lactulosa, oligosacáridos de leche materna, fibra alimentaria y combinaciones de los mismos.
22. Una micropartícula obtenible mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 21.
23. Una composición que comprende una pluralidad de micropartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, ó 22.
24. Composición según la reivindicación 23, en la que el tamaño medio de las micropartículas está comprendido entre 1 y 40  $\mu\text{m}$ , preferiblemente entre 2 y 12  $\mu\text{m}$ .
25. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 23 ó 24, seleccionada entre:
  - una composición A, que comprende:
    - caseína, entre 40% y 60% en peso,
    - quitosano, entre 0,1% y 3,5% en peso,
    - bacterias probióticas, entre  $10^9$  UFC/g y  $5 \times 10^{12}$  UFC/g,
    - tripolifosfato sódico, entre 0% y 0,15% en peso, y
    - agente protector entre 0% y 60% en peso;
  - donde las proporciones en peso se refieren al total de la composición;
- una composición B, que comprende:
  - caseína, entre 40% y 60% en peso,
  - quitosano, entre 0,1% y 3,5% en peso,
  - bacterias probióticas, entre  $10^9$  UFC/g y  $5 \times 10^{12}$  UFC/g,

vainillina, entre 0% y 0,6% en peso, y agente protector entre 0% y 60% en peso; donde las proporciones en peso se refieren al total de la composición; y

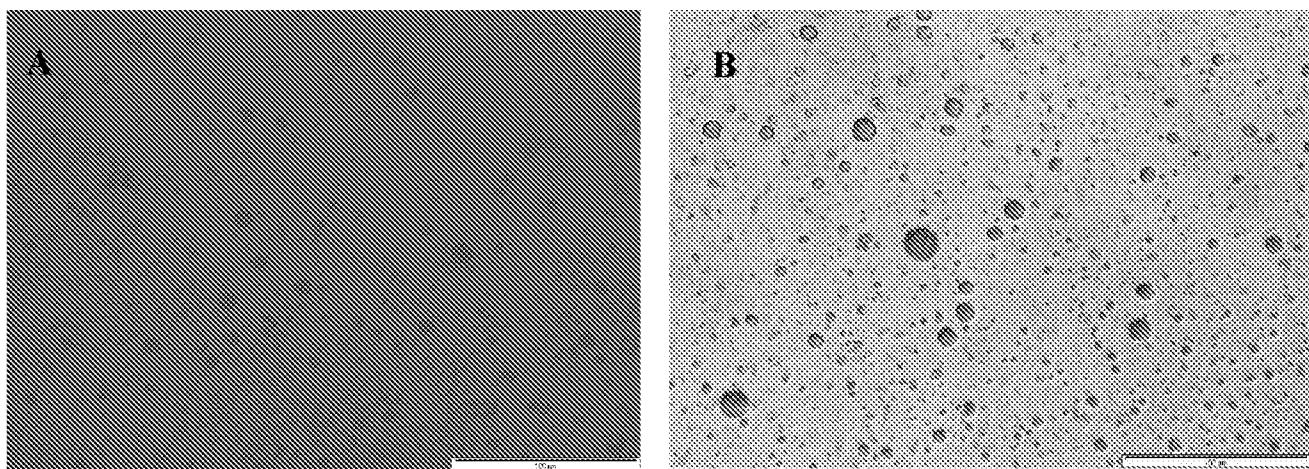
una composición C, que comprende:

caseína, entre 40% y 60% en peso, quitosano, entre 0,1% y 3,5% en peso, bacterias probióticas, entre  $10^9$  UFC/g y  $5 \times 10^{12}$  UFC/g,  $\text{Ca}^{2+}$ , entre 0% y 10% en peso, y agente protector entre 0% y 60% en peso, donde las proporciones en peso se refieren al total de la composición.

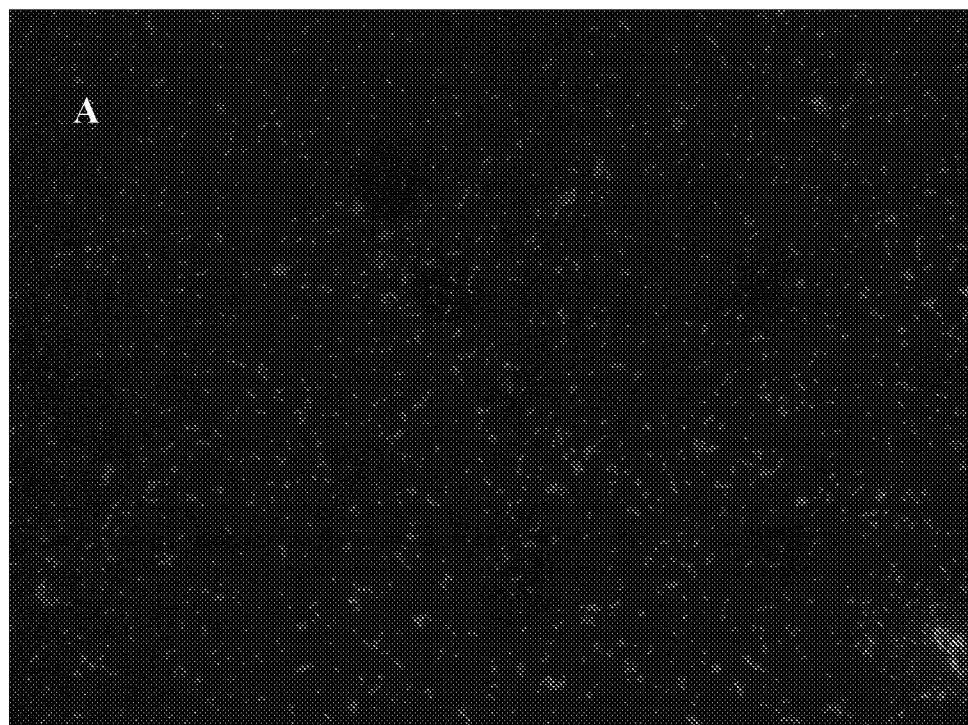
26. Una composición que comprende al menos una micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o según la reivindicación 22, y un vehículo aceptable en alimentación, farmacia, cosmética o nutracéutica.
27. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en la que dichas micropartículas se encuentran en forma de un polvo seco.
28. Un producto alimenticio, farmacéutico, cosmecéutico o nutracéutico, que comprende al menos una micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o según la reivindicación 22, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27.
29. Producto alimenticio, farmacéutico, cosmecéutico o nutracéutico según la reivindicación 28, en forma líquida, semi-sólida o sólida.
30. Uso de una micropartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o según la reivindicación 22, de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27, o de un producto según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29, en la elaboración de una composición moduladora del sistema inmune.

31. Uso según la reivindicación 30, en el que dicha composición moduladora del sistema inmune es una composición que induce preferentemente una respuesta Th1 y/o desplaza la respuesta inmunitaria hacia Th1.
32. Uso según la reivindicación 30, en el que dicha composición moduladora del sistema inmune es una composición oral para la prevención y/o el tratamiento de una alteración del sistema inmune.
33. Uso según la reivindicación 32, en el que dicha alteración del sistema inmune es una alteración natural o una alteración inducida.
34. Uso según la reivindicación 30, en el que dicha composición moduladora del sistema inmune es una composición oral para la prevención y/o el tratamiento de:
  - rechazo a un trasplante mediado por Th2,
  - alergias y enfermedades asociadas a la alergia,
  - inmunodeficiencias y patologías derivadas de dichas inmunodeficiencias,
  - infecciones causadas por patógenos intracelulares, o
  - infecciones de mucosas.
35. Uso según la reivindicación 34, en el que dicha alergia se selecciona entre alergias a pólenes de plantas, alergias a animales, alergias alimentarias, alergias a metales, y sus combinaciones.
36. Uso según la reivindicación 34, en el que dicha enfermedad asociada a la alergia se selecciona entre asma y dermatitis atópica.
37. Uso según la reivindicación 34, en el que dicha inmunodeficiencia es una inmunodeficiencia fisiológica, una inmunodeficiencia congénita, o una inmunodeficiencia adquirida.
38. Uso según la reivindicación 34, en el que dicho patógeno intracelular es un patógeno eucariota, un patógeno procariota o un virus.

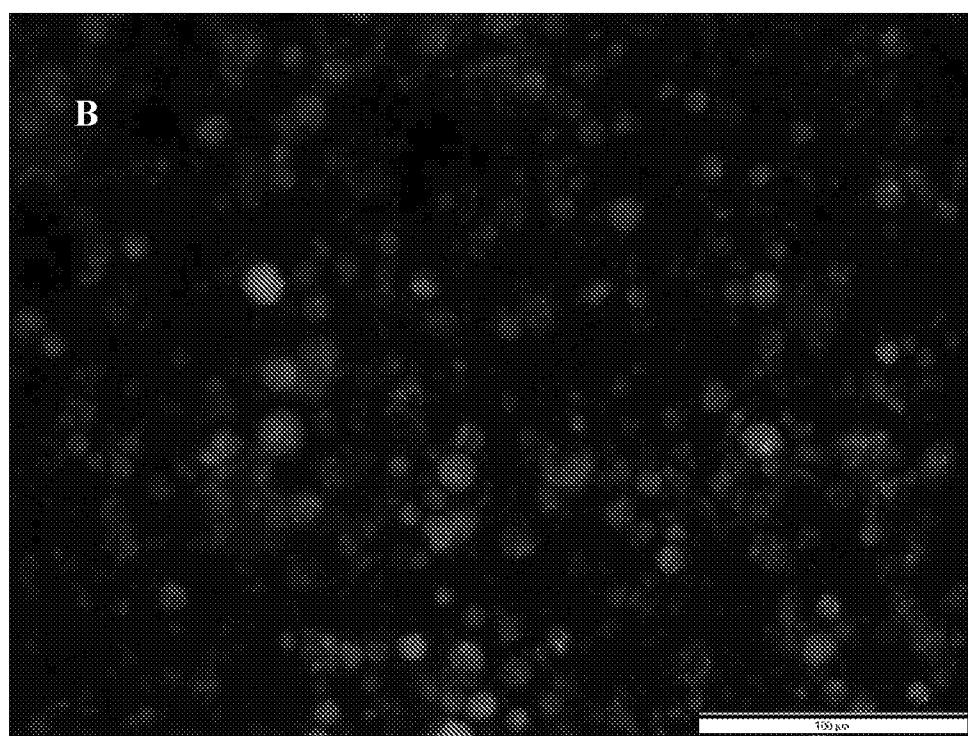
39. Uso según la reivindicación 38 en el que dicho patógeno intracelular eucariota es un protozoo o un hongo.
40. Uso según la reivindicación 38 en el que dicho patógeno intracelular procariota es una bacteria.
41. Uso según la reivindicación 30, en el que dicha composición moduladora del sistema inmune es una composición oral para la prevención y/o el tratamiento de infecciones de mucosas.
42. Uso según la reivindicación 41, en el que dicha mucosa se selecciona entre la mucosa de la cavidad oral, la mucosa del tracto gastrointestinal, la mucosa del aparato genitourinario y la mucosa del aparato respiratorio.
43. Uso según la reivindicación 41 ó 42, en el que el agente causante de la infección de la mucosa es una enterobacteria, un enterovirus o un protozoo.
44. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 43, en el que dicha composición moduladora del sistema inmune comprende un vehículo aceptable en alimentación, farmacia o nutracéutica.
45. Uso según la reivindicación 44, en el que dicha composición moduladora del sistema inmune es una composición farmacéutica, nutracéutica o está comprendida en un producto alimenticio.
46. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 45, en el que en dicha composición moduladora del sistema inmune, las micropartículas se encuentran en forma de un polvo seco.



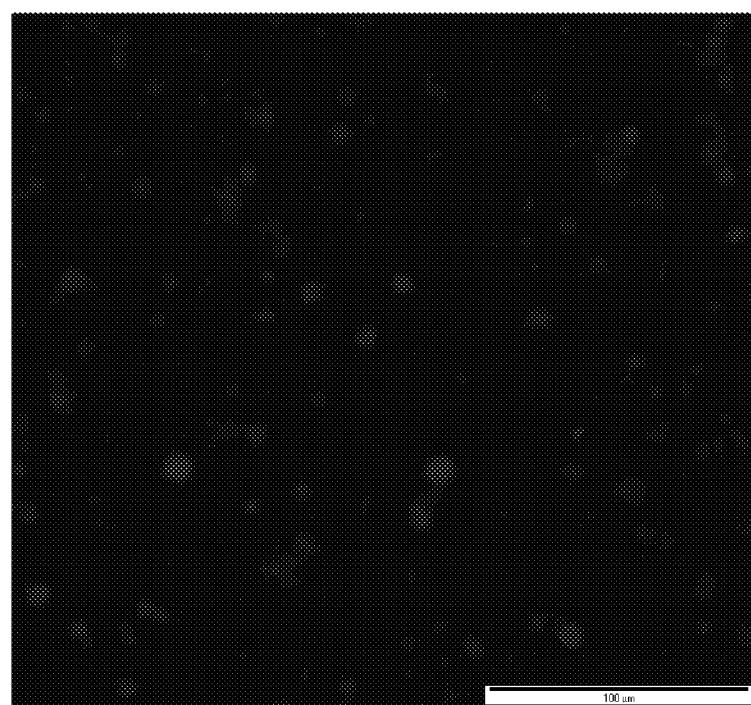
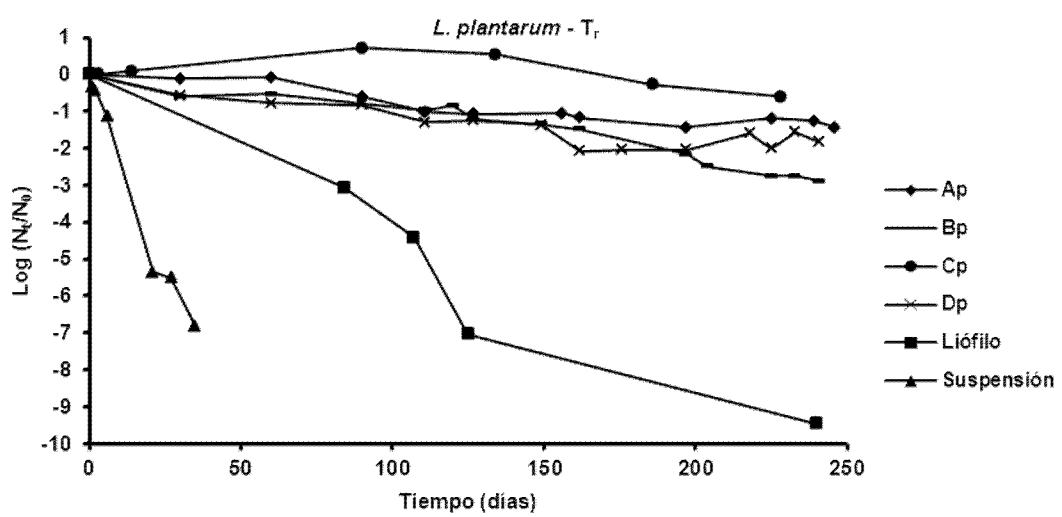
**Fig. 1**



100  $\mu$ m



**Fig. 2**

**Fig. 3****Fig. 4**

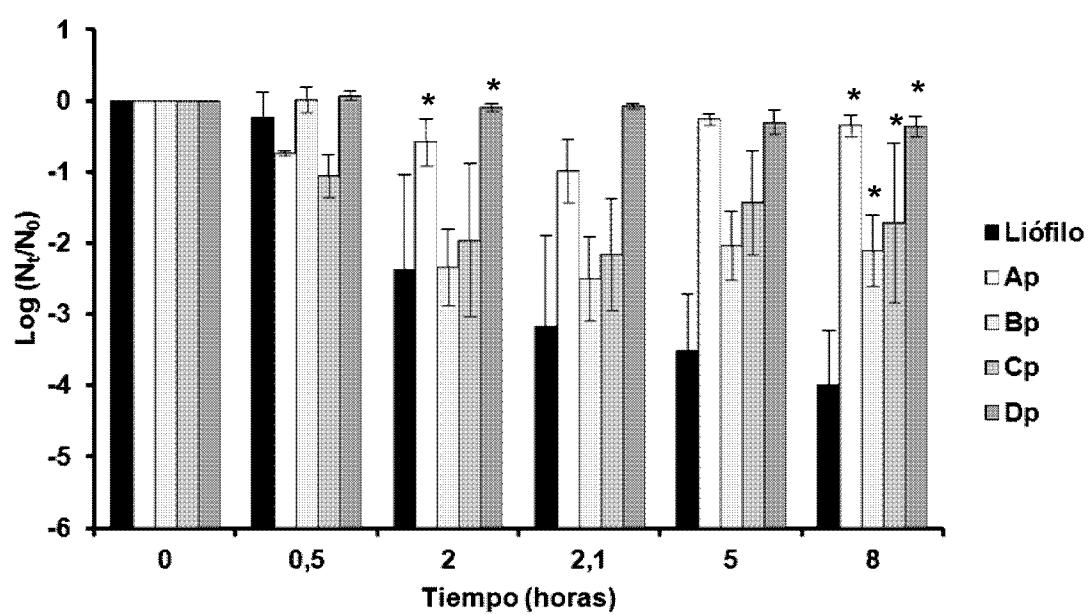
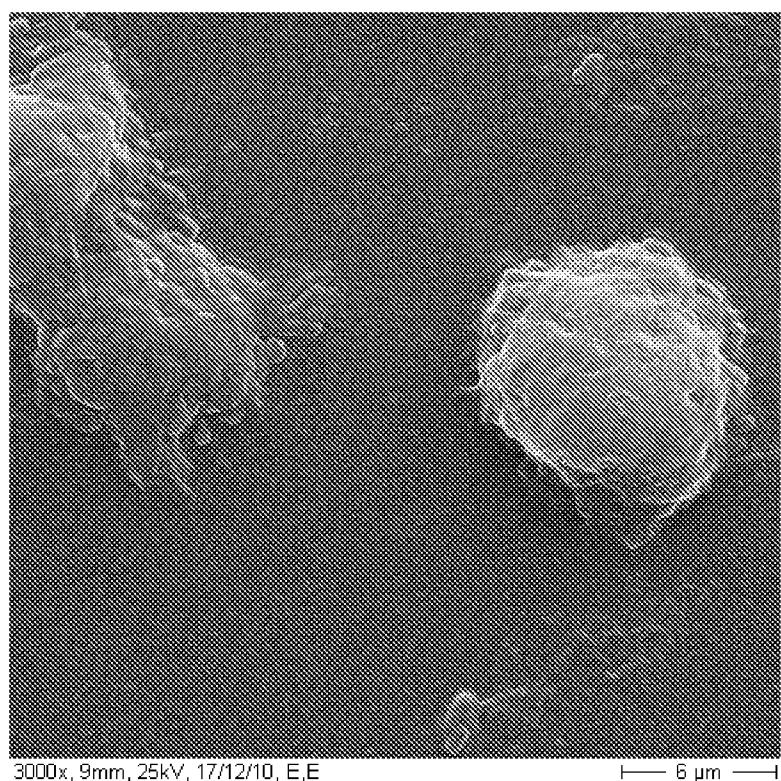
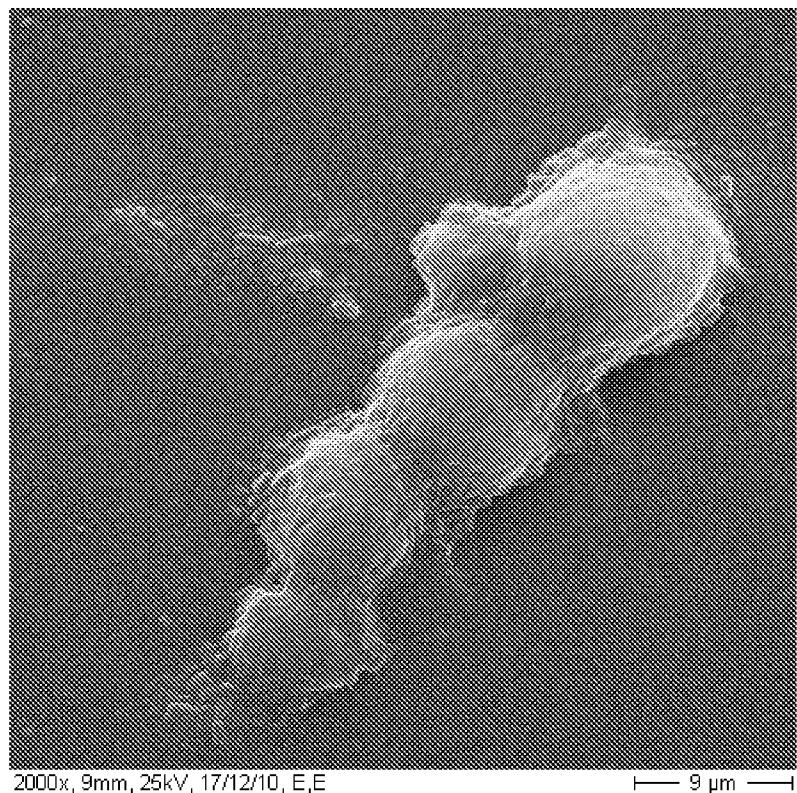


Fig. 5

5/7



**Fig. 6**

6/7

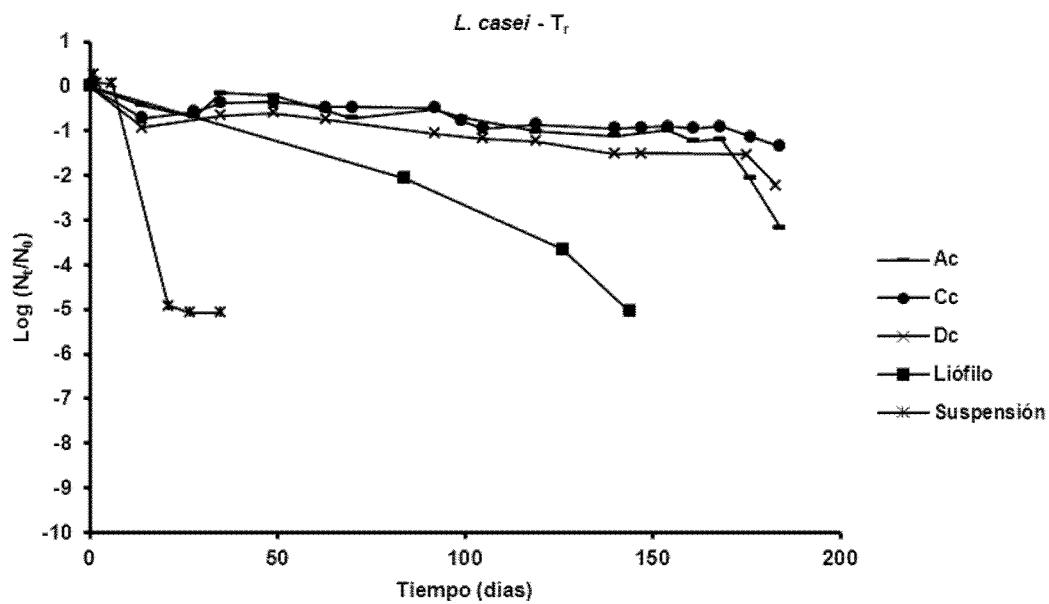


Fig. 7

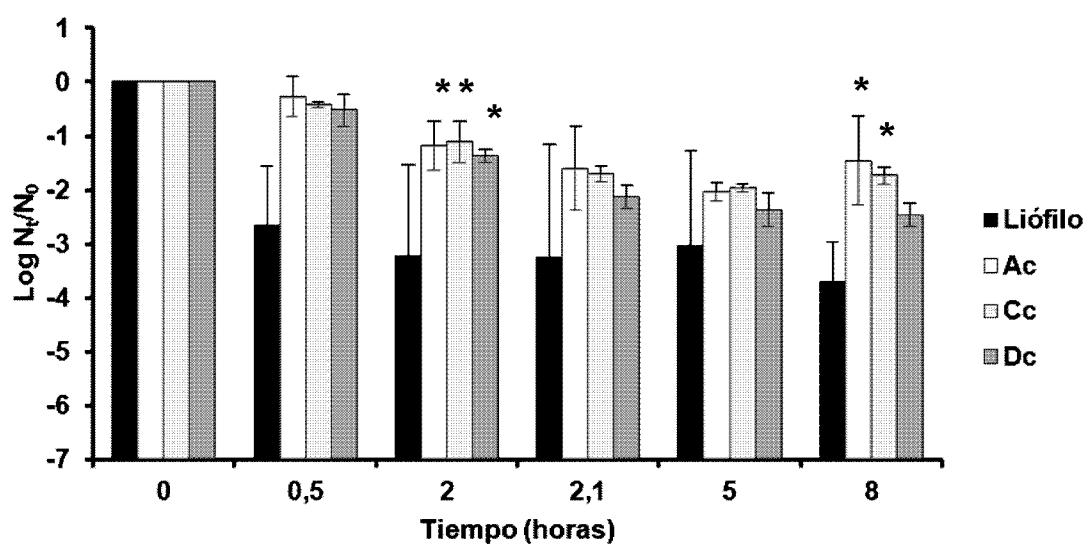


Fig. 8

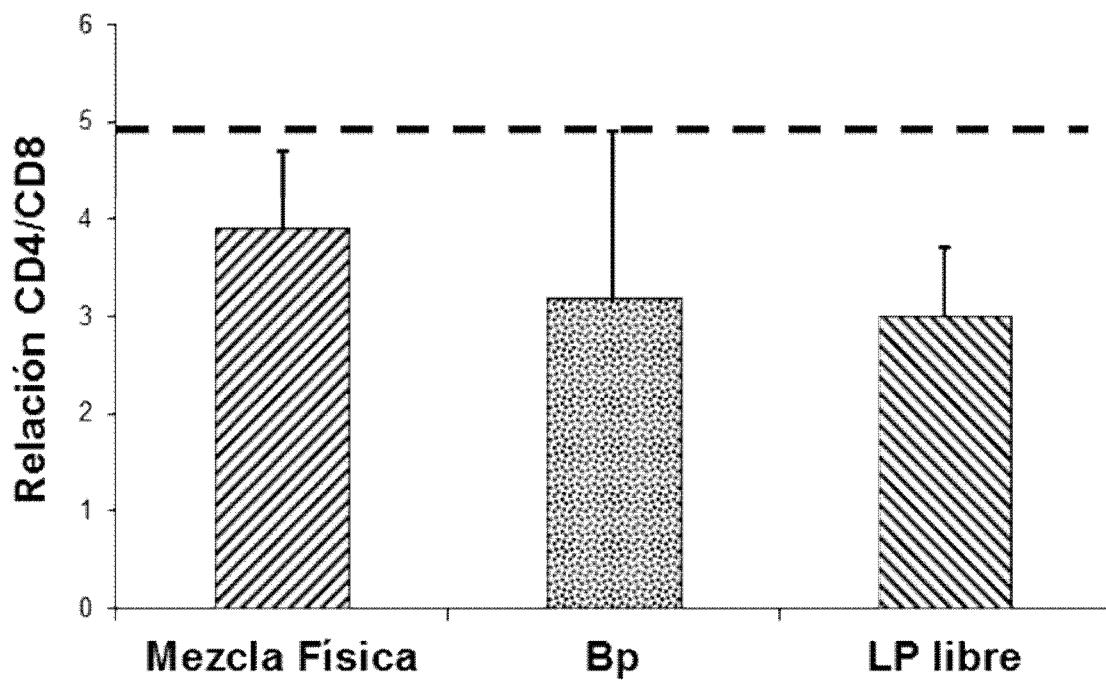


Fig. 9

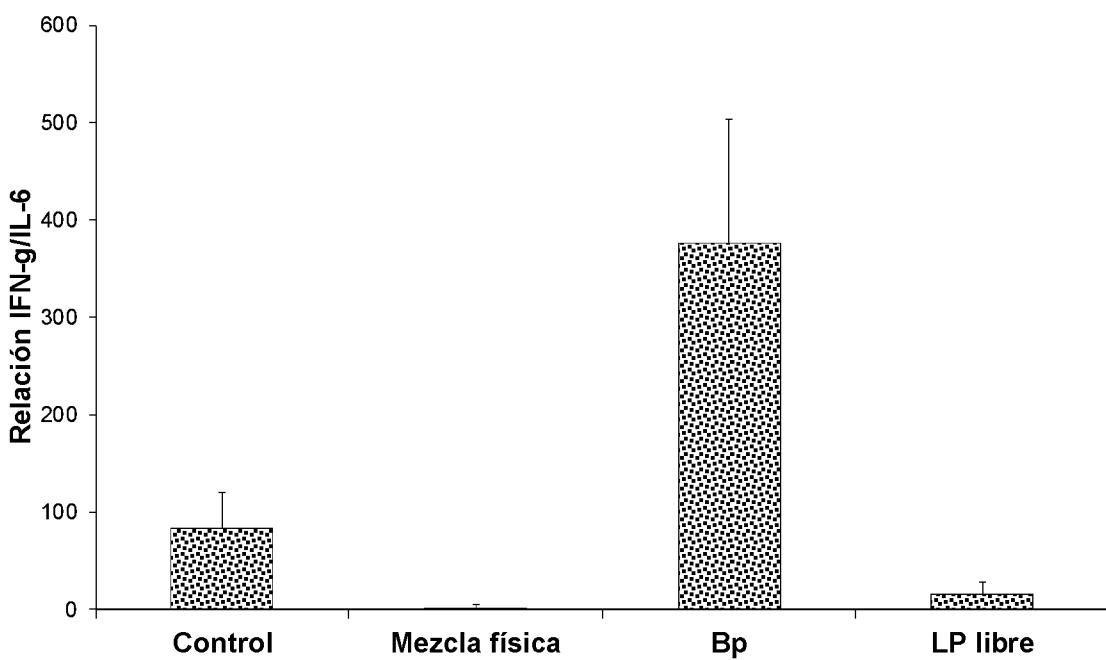


Fig. 10