

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
DISEÑO Y EVALUACIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS
ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS EN EL ÁREA FARMACÉUTICA

**“Elaboración y evaluación *in vitro* de un sistema de liberación modificada
a base de *Saccharomyces boulardii*”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

L.F Karla Lilian Bailon Barceinas

2181800762

COMITÉ TUTORAL

Co- Tutor: Dra. Luz María Melgoza Contreras

Co- Tutor: Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Asesor: MCF. Zacnite Sánchez Portilla

Septiembre/ 2020

"Elaboración y evaluación *in vitro* de un sistema de liberación modificada
a base de *Saccharomyces boulardii*"

Visto bueno (Vo.Bo) del Comité Tutorial



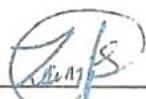
Vo. Bo

Co- Tutor: Dra. Luz María Melgoza Contreras



Vo. Bo

Co- Tutor: Dra. María Angélica Gutiérrez Nava



Vo. Bo

Asesor: MCF. Zacnite Sánchez Portilla



Alumno: L.F. Karla Lilia Bailon Barceinas

Matricula: 2181800762

**“Elaboración y evaluación *in vitro* de un sistema de liberación modificada
a base de *Saccharomyces boulardii*”**

Visto bueno (Vo.Bo) del Jurado de Examen

Vo. Bo

Presidente: Dr. Efrén Hernández Baltazar

Vo. Bo

Vocal: Dra. Raquel González Vázquez

Vo. Bo

Secretario: Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Resumen

El empleo de la terapia a base de probióticos es reconocido actualmente por su amplia variedad de beneficios en la salud, sin embargo, se ha estudiado que no todos los productos disponibles actualmente cumplen de manera óptima con la liberación de cantidades suficientes de células probióticas viables en el sitio de acción. Nuestro estudio, por lo tanto, tuvo como objetivo diseñar dos sistemas de liberación modificada (SLM) que contribuyan a superar estos inconvenientes.

Dos SLM se desarrollaron en este trabajo (pellets encapsulados y tabletas), incorporando la levadura probiótica *S. boulardii* mediante las técnicas de recubrimiento de película en bombo convencional y liofilización respectivamente, ambas formas farmacéuticas fueron protegidas con un polímero entérico (Eudragit® S12.5) y se estudió de qué manera afectaba cada operación unitaria la viabilidad de las levaduras.

Se obtuvieron cápsulas con una carga de levaduras de 7.0 Log₁₀ UFC y tabletas con 6.7 Log₁₀ UFC, las cuales se consideran cantidades adecuadas para su uso terapéutico. Respecto a los procesos implicados para su obtención, en los pellets hubo una menor disminución de la viabilidad implicando una pérdida total de 1.5 Log₁₀ UFC respecto a la pérdida en las tabletas que fue de 2.7 Log₁₀ UFC, al respecto señalamos que los efectos implicados en el proceso de tableteo fueron determinantes y en mayor medida para la pérdida de la viabilidad celular. Por otra parte, se estableció que la protección entérica conferida a los pellets fue eficiente durante 60 minutos en medio ácido (pH 1.2) y que la liberación de la levadura en medio alcalino (pH 7.5) ocurrió de manera óptima en un tiempo total de 20 minutos.

En conclusión, los pellets de liberación modificada a base de la levadura probiótica *S. boulardii* son una alternativa terapéutica que contribuye en la mejora de la preservación de la viabilidad celular a través de los procesos necesarios para su obtención, así como en la liberación de cantidades suficientes y viables de levadura en condiciones semejantes a las del sitio de acción (colon).

Agradecimientos Institucionales

Este trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de Ecología Microbiana y Farmacotécnica de la Unidad Interdisciplinaria de Docencia e Investigación y Servicio (UIDIS) perteneciente al departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Unidad Xochimilco. El autor Karla Lilian Bailon Barceinas (Becario 705051) contó con una beca de Maestría otorgada por el CONACYT, así como con el “Apoyo económico extraordinario para alumnos de posgrado registrados en el PNPC” otorgado por la UAM.

Agradecimientos personales

Al llegar al final de esta experiencia puedo ver claramente que no hubiera sido posible sin el apoyo de mi comité tutorial. Les estaré siempre agradecida por su esfuerzo y trabajo diario a lo largo de todo este proyecto, aprendí de su disposición e interés para continuar y corregir cuando fue necesario.

De igual manera agradezco a mis compañeros de laboratorio por compartir su conocimiento conmigo y reconozco en especial el apoyo de la Q.F.B Ericka García por su colaboración y entusiasmo en el proyecto; toda mi gratitud a los doctores que imparten las materias en la maestría, por su dedicación y por ser parte de mi formación en esta etapa.

Agradezco a mi familia por estar a mi lado y apoyarme en cada proyecto y porque siento su inmenso amor al compartir esta meta conmigo. Especialmente a mi esposo Fredy Sánchez, gracias por compartir mi ilusión y esfuerzo para lograr esta meta, que la vida siga siendo nuestro gran maestro para compartirla juntos; te amo.

A mi mamá Lilia Barceinas, gracias por tu inmenso amor y por forjar en mí el ejemplo de continuar siempre adelante, aprender y ser feliz; eres mi inspiración.

Gracias a mi hermana Daniela Barceinas por su solidaridad cuando inicié mi camino en el posgrado y por ser siempre incondicional, estoy segura de que en nuestro amor se resume todo lo que hemos vivido.

ÍNDICE

1.0	INTRODUCCIÓN.....	9
2.0	MARCO TEÓRICO.....	10
2.1	Microbiota intestinal.....	10
2.2	Probióticos.....	11
2.3	<i>Saccharomyces boulardii</i>	12
2.3.1	Características generales y condiciones de crecimiento.....	12
2.3.2	Efectos terapéuticos.....	13
2.3.3	Mecanismos de acción.....	14
2.3.4	Perdida de viabilidad de <i>S. boulardii</i> durante su paso a través del TGI.....	15
2.4	Técnicas de protección de cepas probióticas.....	17
2.4.1	Liofilización de probióticos.....	17
2.5	Sistemas de liberación modificada (SLM).....	18
2.5.1	Protección entérica como estrategia de liberación modificada.....	19
2.5.2	Proceso de recubrimiento entérico.....	21
2.5.3	Evaluación <i>in vitro</i> de formas de formas farmacéuticas con recubrimiento entérico	22
3.0	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4.0	HIPÓTESIS.....	23
5.0	OBJETIVOS.....	23
6.0	DIAGRAMA DE TRABAJO.....	24
7.0	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
7.1	Microorganismo y condiciones de cultivo.....	25
7.2	Caracterización microscópica de <i>S. boulardii</i>	25
7.3	Cinética de crecimiento.....	25
7.4	Obtención de la suspensión de incorporación de <i>S. boulardii</i>	25
7.5	Obtención de pellets a base de <i>S. boulardii</i> , protegidos entéricamente.....	25
7.5.1	Determinación de levaduras viables.....	26
7.5.2	Obtención de cápsulas de gelatina dura.....	26
7.5.3	Control de calidad de cápsulas.....	27
7.5.4	Perfil de disolución de cápsulas.....	27
7.6	Obtención de tabletas a base de <i>S. boulardii</i> liofilizada protegidas entéricamente.....	28

7.6.1 Suspensión de liofilización	28
7.6.2 Proceso de liofilización.....	28
7.6.3 Proceso de compresión del liofilizado de <i>S. boulardii</i>	28
7.6.4 Protección entérica de tabletas mediante el proceso de recubrimiento de película en bombo convencional	29
7.6.5 Control de calidad de las tabletas	29
7.6.6 Determinación de levaduras viables.....	30
7.6.7 Análisis estadístico	30
8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
8.1 Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces boulardii</i>	31
8.2 Caracterización microscópica de <i>S. boulardii</i>	32
8.3 Diseño y evaluación de un sistema de liberación modificada a base de <i>S. boulardii</i> en pellets con recubrimiento entérico encapsulados en cápsulas de gelatina dura	33
8.3.1 Obtención de pellets incorporados con <i>S. boulardii</i> , protegidos entéricamente	33
8.3.2 Encapsulación de pellets	34
8.3.3 Caracterización física de las cápsulas obtenidas	36
8.3.4 Efecto de los diferentes procesos en la obtención de pellets incorporados y protegidos entéricamente sobre la viabilidad de <i>S. boulardii</i>	36
8.3.5 Perfil de disolución de pellets contenidos en cápsulas de gelatina rígida	38
8.4 Diseño de un sistema de liberación modificada en tabletas protegidas entéricamente a base de liofilizado de <i>S. boulardii</i>	40
8.4.1 Proceso de liofilización.....	40
8.4.2 Proceso de compresión del liofilizado de <i>S. boulardii</i> y protección entérica de las tabletas obtenidas.....	41
8.4.3 Control de calidad de las tabletas	42
8.4.4 Efecto de los diferentes procesos para la obtención de tabletas sobre la viabilidad de <i>S. boulardii</i>	43
8.5 Comparación de la viabilidad de <i>S. boulardii</i> durante los procesos de obtención de pellets y tabletas	45
9.0 CONCLUSIONES.....	46
10.0 PERSPECTIVAS	46
11.0 BIBLIOGRAFÍA	47

1.0 INTRODUCCIÓN

Los efectos de los probióticos han sido estudiados durante décadas por la comunidad científica, así como por la industria farmacéutica y de alimentos; estas investigaciones han resultado en innumerables beneficios para la salud, tanto profilácticos como terapéuticos, gracias a estos avances actualmente los productos a base de probióticos constituyen un área en crecimiento (Suez *et al.*, 2019).

Actualmente, las preparaciones a base de probióticos tienen diversas problemáticas como una amplia variación entre el contenido de probiótico y la declaración de contenido en la etiqueta, se ha identificado que la causa de esto surge durante los procesos de obtención debido a los diferentes factores implicados (temperatura, tiempo de proceso, humedad etc.), los cuales están relacionados con la disminución de la viabilidad de las cepas probióticas; además se ha señalado que en general hasta el 60 % de los microorganismos probióticos mueren en el entorno gástrico antes de llegar al sitio de acción (intestino) (Sreeja *et al.*, 2013; Govender *et al.*, 2014).

Tomando en cuenta que el grado de beneficios para la salud proporcionado por las formulaciones probióticas varía según su capacidad para liberar bacterias viables en cantidades adecuadas, diferentes estrategias han sido desarrolladas para mantener la viabilidad a través de los procesos de producción, así como para propiciar su liberación en el sitio de acción. Una de estas estrategias son los SLM que se enfocan en proteger a las células del ambiente gástrico mediante el uso de polímeros para recubrimientos gastro-resistentes (Govender *et al.*, 2014).

Nuestro estudio está enfocado en la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*, la cual ha sido utilizada principalmente como agente antidiarreico, en la prevención y el tratamiento de enteritis infecciosa y entero colopatías asociadas al patógeno *Clostridium difficile* y como agente profiláctico en la sintomatología de diversos desordenes gastrointestinales, se ha reportado que la viabilidad de esta levadura disminuye de manera significativa ante las condiciones del pH gástrico (Blehaut *et al.*, 1989; Boddy *et al.*, 1991; Duongthingoc *et al.*, 2013), adicionalmente la necesidad de conferir protección a la levadura ante las condiciones

gastrointestinales especialmente ante los cambios de pH ha sido establecida en trabajos anteriores, tomando en cuenta la pérdida de viabilidad que tiene la levadura en solución acuosa a valores de pH 3.0 y la relación que se ha establecido con daños estructurales (Graff *et al.*, 2008), del mismo modo en las evaluaciones realizadas de los productos comerciales disponibles se ha demostrado que < 1 % de las células de *S. boulardii* sobrevivieron 120 minutos en condiciones gástricas simuladas (Vanhee *et al.*, 2005).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un SLM con concentraciones de levadura adecuadas que garantice la liberación de levaduras viables a nivel intestinal en cantidades apropiadas para favorecer su efecto benéfico.

2.0 MARCO TEÓRICO

2.1 Microbiota intestinal

Se le denomina microbiota intestinal a la comunidad de microorganismos vivos residentes en el tracto gastro intestinal (TGI), este ecosistema microbiano incluye especies nativas que colonizan permanentemente el TGI y una serie variable de microorganismos que sólo lo hacen de manera transitoria. Las bacterias de los filos *Bacteroidetes* (≈25 %) y *Firmicutes* (≈60 %) son mayoritarios (Icaza, 2013). En el intestino, los microorganismos deben adaptarse a las fuentes de energía disponibles que generalmente provienen de procesos como la fermentación de carbohidratos y la reducción de sulfato de la dieta del huésped (Thursby *et al.*, 2017).

Algunas de las funciones fisiológicas que ejerce son: fortalecimiento de la integridad intestinal, protección contra los patógenos y regulación de la inmunidad del huésped, por lo tanto, ha sido relacionada con el estado de salud y enfermedad. Su composición es afectada por gradientes químicos, nutricionales e inmunológicos a lo largo del intestino y las alteraciones en su composición (disbiosis) pueden producirse en cuestión de días, particularmente tras la ingesta de antibióticos o por cambios a largo plazo que se relacionan fundamentalmente con la dieta (del Campo

et al., 2018), para compensar el desequilibrio en la microbiota, se ha recurrido a estrategias como la suplementación con probióticos.

2.2 Probióticos

La palabra probiótico deriva de una palabra griega que significa “para la vida” y se utiliza para definir microorganismos vivos no patógenos relacionados con efectos benéficos ejercidos en el huésped (Pandey *et al.*, 2015). La definición de bacterias probióticas de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud establece que son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped (FAO/WHO, 2001).

Se ha propuesto un conjunto de criterios de selección para cualquier microorganismo probiótico (figura 1). La tolerancia al pH bajo y a las sales biliares se consideran requisitos para la supervivencia de la cepa a través del TGI, además para garantizar su mantenimiento durante un período largo de tiempo se recomienda que tenga la capacidad de adherirse a la superficie intestinal y así colonizar (Van der Aa Kuhle *et al.*, 2005).



Figura 1. Características de una cepa probiótica ideal, tomado y modificado de Pandey *et al.*, 2015.

Algunos de los microorganismos probióticos utilizados popularmente pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (*rhamnosus*, *reuteri*, *casei*, *acidophilus*), *Bifidobacterium* (*bifidum*, *breve*, *longum*), ciertos enterococos y bacilos especialmente *Enterococcus faecium* SF68, *Bacillus coagulans* y la levadura *Saccharomyces boulardii* (Pandey *et al.*, 2015). Cada cepa probiótica actúa mediante diferentes mecanismos para ejercer sus efectos benéficos:

- Producción de sustancias inhibitoras como H₂O₂, bacteriocinas y ácidos orgánicos
- Bloqueo de sitios de adhesión para bacterias patógenas
- Competencia con las bacterias patógenas por nutrientes
- Degradación de toxinas, bloqueo de los receptores de toxinas
- Modulación de la respuesta inmune

Respecto a su administración, no existe una dosis estipulada y como recomendación general se ha establecido que la ingesta de probióticos sea de al menos 10⁷ UFC/g (unidades formadoras de colonias /gramo) (Meng *et al.*, 2008).

2.3 *Saccharomyces boulardii*

2.3.1 Características generales y condiciones de crecimiento

Saccharomyces boulardii es una levadura que fue aislada durante el brote de cólera por el científico francés Henri Boulard en 1920, el observó que las personas que masticaban y tomaban té de la piel del fruto litchi o del mangostán no desarrollaron síntomas de cólera, este descubrimiento lo condujo al aislamiento de la levadura que actualmente es la única con propiedades probióticas reconocidas. Durante la década de 1980 se desarrollaron una serie de estudios que tuvieron como objetivo conocer sus efectos benéficos, así como sus mecanismos de acción. En la actualidad, *S. boulardii* se utiliza como tratamiento y se comercializa en Europa, África y América del sur (Tomicic *et al.*, 2016).

Las levaduras poseen una rápida velocidad de multiplicación y son capaces de emplear una gran variedad de fuentes de carbono y nitrógeno (sacarosa, glucosa,

peptona de soya, extracto de carne, extracto de levadura, suero de ternera, extracto de malta). Específicamente, *S. boulardii* crece de manera óptima a temperaturas de 37 °C y a valores de pH entre 4.5 – 6.5, debido a este rango de supervivencia *S. boulardii* puede tener diferentes sitios de acción en el TGI (Czerucka *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2008).

En la microbiota humana, las levaduras están presentes en menos del 1 % mientras que las bacterias predominan con un 99 %, sin embargo, estos dos tipos de células confieren diferentes propiedades probióticas, por ejemplo, las levaduras por su tamaño (10 µm) pueden actuar como obstáculo estérico para ciertos patógenos a diferencia del tamaño (1 µm) de las bacterias, de igual manera la diferente composición de sus paredes celulares les confiere formas específicas de ejercer sus efectos terapéuticos e interacciones con el TGI, además las diferentes temperaturas a las cuales crecen les permite actuar en diferentes sitios del TGI, finalmente las levaduras no presentan resistencia a los antibióticos siendo seguras para la combinación con antibioterapia (Czerucka *et al.*, 2007).

2.3.2 Efectos terapéuticos

La levadura *Saccharomyces boulardii* ha sido empleada mundialmente por sus beneficios en la salud gastrointestinal; sus primeros usos fueron identificados como remedio contra la diarrea desde el año 1950, y actualmente los estudios clínicos han demostrado que *S. boulardii* es eficaz en la prevención y el tratamiento de diferentes desordenes intestinales, incluidos la diarrea asociada al uso de antibióticos, diarrea aguda en adultos y niños, diarrea del viajero, diarrea en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), reducción de síntomas asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de Crohn, gastroenteritis aguda, colitis ulcerosa y efectos tróficos sobre la mucosa intestinal (Tomicic *et al.*, 2016).

Además de los efectos benéficos que han sido investigados, existen pocos reportes de efectos adversos asociados al uso de *S. boulardii*, estos señalan complicaciones por fungemia en pacientes inmunocomprometidos y pacientes con enfermedad intestinal severa que usaban catéter, el origen de estos casos de fungemia no está

claro del todo, pero es probable que esté relacionado con la colonización en el catéter, por lo tanto, la administración de *S. boulardii* en presencia de catéteres está restringida (Czerucka *et al.*, 2007).

2.3.3 Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción mediante los cuales *S. boulardii* ejerce sus efectos terapéuticos hasta ahora no reflejan el conjunto completo de interacciones de la levadura con el huésped, por lo que no está claro si el efecto probiótico está relacionado con la colonización intestinal (Edwards-Ingram *et al.*, 2007).

Una gran parte de las enfermedades gastrointestinales implican procesos inflamatorios, en este caso ha sido demostrado que *S. boulardii* es capaz de inhibir citocinas proinflamatorias y algunos reguladores de este proceso (factor nuclear kB (NF-kB), proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAP quinasas), ERK ½ y p38), también ha sido identificada la producción de moléculas antiinflamatorias como el receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR-γ) (Im *et al.*, 2010).

Por otra parte *S. boulardii* ha sido asociada principalmente como terapia en los cuadros diarreicos, la mayoría de estos son ocasionados por patógenos oportunistas, se ha demostrado que *S. boulardii* actúa en estas infecciones evitando la adhesión a la membrana intestinal o el crecimiento excesivo de las bacterias, este tipo de mecanismo ha sido estudiado en la infección causada por el patógeno *C. difficile* un anaerobio estricto que produce dos toxinas causantes de diarrea, la colonización de esta bacteria ocurre después de que la resistencia a la colonización ha sido comprometida por el uso de antibióticos, cirugías o procedimientos gastrointestinales, el mecanismo de acción que ha sido estudiado sugiere que *S. boulardii* produce una serina proteasa que genera la división de la toxina A generada por el patógeno y estimula la producción de anticuerpos contra esta toxina (Im *et al.*, 2010), otro caso es el de las infecciones enterohemorrágicas causadas por *E. coli*, que ha sido asociada con modificaciones de la permeabilidad de las uniones estrechas intestinales y la síntesis de la citocina proinflamatoria interleucina 8, *S.*

boulardii actúa secretando una proteína fosfatasa que desfosforila la endotoxina de *E.coli* (Khatri *et al.*, 2017).

Además, en las enfermedades diarreicas que no son generadas por patógenos, la producción de disacaridasas como lactasa, sacarasa, maltasa y n-aminopeptidasa en las células con borde de cepillo intestinales permiten una mayor degradación y absorción de carbohidratos en pacientes con diarrea y ayuda a restaurar los niveles de ácidos grasos de cadena corta en el colon que son necesarios para la correcta absorción de agua y electrolitos (Moré *et al.*, 2018).

Finalmente, se ha propuesto que los efectos tróficos que ejerce *S. boulardii* sobre la mucosa intestinal están mediados por la liberación de enzimas (sacarasa, proteína fosfatasa, leucina aminopeptidasa, proteasas etc.), sustancias antiinflamatorias, espermidina y espermina en el compartimento endoluminal; se cree que estas sustancias podrían ser liberadas por las células de levadura durante su catabolismo intestinal en lugar de ser secretadas por las células vivas porque los mayores efectos se han observado a nivel del íleon y el colon (Buts *et al.*, 2010).

2.3.4 Pérdida de viabilidad de *S. boulardii* durante su paso a través del TGI

Después de la ingesta, *S. boulardii* pasa por el estómago antes de llegar a su sitio de acción, durante este trayecto las levaduras se ven expuestas a la acidez del estómago que fluctúa entre un pH 1.5 a 6.0, lo cual propicia una disminución en la viabilidad celular. Adicionalmente, los ácidos biliares y la pancreatina secretados en el intestino delgado representan un desafío más, a pesar de que la resistencia a los ácidos es considerada un criterio clave en la selección de cepas probióticas siempre es cuestionable el umbral de viabilidad de los probióticos ante las condiciones fisiológicas y patológicas (Thursby *et al.*, 2017).

La resistencia de *S. boulardii* al pH ácido ha sido documentada por diversos autores, los primeros indicios de la viabilidad de la levadura a través de su paso por el TGI fueron relacionados con su detección en heces humanas; tanto Blehaut y colaboradores en 1989, como Boddy y colaboradores en 1991 informaron que únicamente entre el 1 y 3 % de la levadura viva era recuperada después de la administración oral, por otra parte, la resistencia al ácido entre la cepa *S. boulardii*

y *S. cerevisiae* también ha sido establecida. Fietto y colaboradores en 2004 estudiaron en medio gástrico simulado pH 2.0, durante 60 minutos células de *S. boulardii* y *S. cerevisiae*, los resultados mostraron que después de 15 minutos *S. boulardii* fue más resistente que *S. cerevisiae*, a pesar de esto la viabilidad de *S. boulardii* disminuyó en aproximadamente el 75 %.

Duongthingoc y colaboradores en 2013 inocularon *S. boulardii* (log 7.5 UFC/mL) en medio YNB con diversos valores de pH (2 a 8), después de una incubación durante 12 horas determinaron que en un pH 2 no se favorece el crecimiento de la levadura, mostrando un recuento celular reducido (6.5 Log UFC/mL), por el contrario entre un pH 4 – 6 las condiciones de crecimiento fueron óptimas obteniendo un recuento celular de Log 8.0 UFC/mL. Finalmente los estudios de resistencia al pH también han sido realizados en diferentes formas de la levadura; Graff y colaboradores en 2008 estudiaron el efecto de valores de pH 1.1 y 6.8 en suspensión acuosa y liofilizado de *S. boulardii*, demostraron que la viabilidad disminuye desde los cinco minutos para ambas formas de la levadura en HCl 0.1 N pH 1.2, estos resultados se apoyan con las microscopias electrónicas que mostraron deformidad considerable en la pared celular comparadas con las muestras control.

Asimismo, se ha asumido que la difusión del oxígeno molecular desde el tejido intestinal hacia la luz es determinante en la composición de la microbiota, siendo particularmente relevantes en el intestino delgado, por lo tanto estas condiciones pueden afectar en diferente medida la viabilidad celular de los probióticos (Friedman *et al.*, 2018).

Tomando en cuenta los inconvenientes en la viabilidad celular ante las barreras naturales que supone el ácido gástrico como primer obstáculo del TGI en la administración oral de *S. boulardii* se han propuesto diferentes innovaciones tecnológicas para mejorar la viabilidad de los probióticos y favorecer sus efectos terapéuticos.

2.4 Técnicas de protección de cepas probióticas

La incorporación de una barrera física para proteger a los probióticos de las condiciones ambientales adversas ha sido propuesta para mantener la viabilidad celular durante los procesos de obtención de formas farmacéuticas y productos alimenticios, así como durante su ingesta y paso a través del TGI (Vinderola *et al.*, 2011; Govender *et al.*, 2014). Algunas de las estrategias utilizadas para estos fines son: la liofilización, secado por aspersión, encapsulación, microencapsulación, compresión, protección entérica, así como la adaptación al estrés y la incorporación de micronutrientes (Sarkar, 2010).

2.4.1 Liofilización de probióticos

La tecnología de liofilización al vacío es actualmente utilizada ampliamente en la conservación de microorganismos debido a su utilidad al evitar la desnaturalización de varios componentes y preservar la fisiología de las células por más tiempo. El proceso de liofilización consiste esencialmente en tres pasos: congelación, secado primario o sublimación y secado secundario o desorción, en el paso de secado primario el agua congelada se elimina por sublimación al vacío, mientras que en el paso de secado secundario el agua no congelada se elimina por desorción, al respecto se ha observado que la eliminación del agua unida en las células bacterianas durante el secado conduce al daño de las proteínas de superficie, la pared y la membrana celular, debido a que el agua unida es importante en la estabilización de la integridad estructural y funcional de las macromoléculas biológicas, la consecuencia es la pérdida o deterioro de la función celular (van de Gauche *et al.*, 2002).

Esta técnica de conservación representa una ventaja debido a que la mayoría de los cultivos probióticos líquidos requieren de refrigeración para su almacenamiento y distribución lo que representa un gran inconveniente para su uso, además de contribuir en la mejora en la estabilidad de los probióticos a largo plazo por su bajo contenido de agua, la facilidad de manipulación, almacenamiento, comercialización y aplicación hace de esta práctica una de las más empleadas (Broeckx *et al.*, 2016).

Sin embargo, existen desventajas asociadas con esta técnica tales como una gran inversión de tiempo y altos costos, además esta técnica se ha asociado con una pérdida de viabilidad del cultivo afectando el estado fisiológico de las células debido a que la deshidratación implica un estrés oxidativo y una contracción mecánica induciendo un choque osmótico en las células bacterianas, el daño celular además puede ser atribuido principalmente al cambio en las estructuras de proteínas sensibles o en el estado físico de los lípidos de membrana. Por lo tanto, el uso de protección para mejorar la viabilidad bacteriana durante la liofilización se realiza con la adición de crioprotectores antes del proceso, siendo los más utilizados los disacáridos (sacarosa, lactosa, y tetralosa). Al respecto Guowei y colaboradores en 2019 optimizaron una combinación de crioprotectores para mejorar la viabilidad de *S. boulardii* durante el proceso de liofilización obteniendo una tasa de supervivencia de $64.22 \pm 1.35 \%$, con un número de células viables de $9.5 \pm 0.07 \times 10^9$ UFC/g.

2.5 Sistemas de liberación modificada (SLM)

Para lograr el suministro de probióticos han sido desarrollados diversos sistemas que incluyen tanto sistemas farmacéuticos convencionales como productos comerciales no convencionales (queso, yogurt, crema, leche, etc), sin embargo sólo pocos de estos productos tienen la capacidad de suministrar células probióticas viables en el intestino humano, diversos estudios han señalado que algunos productos probióticos disponibles en el mercado tienen deficiencias en la liberación de las cepas probióticas viables en el sitio de acción (Fasoli *et al.*, 2003; Masco *et al.*, 2005, Govender *et al.*, 2014), además se ha estimado que hasta el 60 % de las células mueren durante su paso gástrico antes de llegar al intestino, las desventajas implicadas en las tecnologías de fabricación, las condiciones de almacenamiento así como las características de los materiales de embalaje que permiten la permeabilidad del oxígeno, son otros factores asociados a la pérdida de la viabilidad celular (Sahadeva *et al.*, 2011).

Tomando en cuenta lo anterior es necesario buscar alternativas que ayuden en los inconvenientes anteriormente mencionados. El diseño de sistemas de liberación modificada es una alternativa, estos sistemas se definen como una formulación o

un dispositivo que permite la introducción de una sustancia terapéutica en el cuerpo con la finalidad de mejorar su eficacia y seguridad al controlar factores como la velocidad, el tiempo y el lugar de liberación, los beneficios de estos cambios incluyen reducir la frecuencia de dosis para mejorar el cumplimiento terapéutico, mejorar el control de los niveles plasmáticos del activo en medicamentos con riesgo de sobredosis y disminuir los efectos secundarios (Rathbone, 2008).

De acuerdo con las guías para la industria “Modified Release Solid Oral Dosage” publicadas por la FDA, se consideran sistemas de liberación modificada las formas denominadas de liberación retardada y liberación prolongada. La liberación retardada es aquella en la que no se libera el principio activo inmediatamente después de la administración, mientras que la liberación prolongada se considera la liberación del principio activo por un periodo largo y extendido (Wang *et al.*, 2017).

2.5.1 Protección entérica como estrategia de liberación modificada

La protección entérica es una estrategia para la liberación modificada de principios activos incorporados en formas de dosificación administradas por vía oral cuyo objetivo es garantizar la estabilidad del activo en condiciones gástricas y garantizar su liberación a nivel intestinal. Las formulaciones con protección entérica establecen tres principales beneficios: a) reducen la degradación del activo en el ambiente ácido del estómago, mejorando la biodisponibilidad, b) minimizan la irritación de la mucosa gástrica, que es característica de ciertos activos y, c) garantizan la liberación específica del activo, asegurando un efecto local (Li *et al.*, 2016).

La protección entérica generalmente está compuesta de polímeros sintéticos, dentro de los cuáles los más usados son: ftalato acetato de celulosa, copolímeros de ácido metacrílico y ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, Eudragit® es la marca comercial de una diversa gama de copolímeros basados en polimetacrilatos derivados del ácido metacrílico y ésteres metacrílicos o acrílicos, estos copolímeros poseen diferente grado de solubilidad dependiente del pH, así como diversas características aniónicas, catiónicas y neutras, su efecto entérico se atribuye a la presencia de sus grupos carboxílicos que permanecen sin ionizar a pH bajo, conforme aumenta el pH a lo largo del TGI los grupos funcionales ácidos son

capaces de ionizarse y el polímero se hincha o se vuelve soluble al pH intestinal. Los tipos de Eudragit® aniónicos son los denominados L y S, los cuales son solubles a valores de pH superiores a 6 y 7 respectivamente (Thakral *et al.*, 2013), un punto importante a considerar es que el aumento en peso del polímero entérico empleado debe ser suficiente para asegurar que se logre el efecto de protección entérica deseado (Maderuelo *et al.*, 2019).

Los recubrimientos entéricos son adicionados con excipientes que facilitan la formación de la capa de recubrimiento modificando la permeabilidad o las propiedades mecánicas del polímero debido a que estos son frágiles, la adición de agentes plastificantes que disminuyen la fragilidad funcionan debilitando las atracciones intermoleculares entre las cadenas de polímero provocando un aumento de la flexibilidad y una disminución en las fuerzas de tensión, ejemplo de ellos son: ésteres de ftalatos, ésteres de citrato, derivados del glicol, surfactantes, polímeros acrílicos y celulósicos. Por otra parte, los antiadherentes son adicionados a la formulación de recubrimiento para prevenir la aglomeración del sustrato durante el proceso de recubrimiento y el almacenamiento (García *et al.*, 2001).

Diversas formas pueden ser usadas como sustrato para la técnica de recubrimiento de película, estos generalmente se clasifican en tabletas y sistemas multiparticulados (pellets cargados de principio activo, gránulos, cristales, polvos, complejos de fármacos / resina de intercambio iónico), la tendencia en el uso de sistemas multi particulados ofrece varias ventajas sobre su contraparte de una sola unidad, la mayoría de ellas está asociada con la distribución uniforme de multi partículas en todo el TGI, en estos sistemas multi particulados es importante cumplir con ciertas características para ser recubiertos exitosamente tales como la composición, porosidad, tamaño, forma y densidad del sustrato, además de los parámetros durante el proceso de recubrimiento como la cantidad y tipo de este (Porter *et al.*, 1990).

2.5.2 Proceso de recubrimiento entérico

Uno de los métodos básicos para recubrir sólidos es el recubrimiento en bombo convencional mediante evaporación de disolvente. El sistema convencional consiste en un bombo redondo con baffles que gira en un eje inclinado, esta rotación provoca que el sustrato pase múltiples veces por la zona de aplicación, su movimiento se facilita por el uso de baffles favoreciendo una distribución uniforme del recubrimiento; un sistema de bombeo dirige el material polimérico hacia una pistola de aspersión que atomiza el líquido de recubrimiento sobre los núcleos, al mismo tiempo un sistema de secado elimina el disolvente acuoso u orgánico y de esta manera el material de recubrimiento forma una capa en la parte superior de la superficie de formulación (García *et al*, 2001).

En el proceso de recubrimiento, el equilibrio entre la velocidad de aplicación debe ser igual a la tasa de evaporación de los disolventes volátiles, este equilibrio implica la capacidad de aire que representa la cantidad de agua o disolvente que puede ser removida durante el proceso, esta capacidad está determinada por la cantidad de aire que fluye a través del lecho de tabletas, la temperatura del aire y la cantidad de agua que el aire de entrada contiene, adicionalmente existen tres factores principales a controlar durante el proceso para asegurar un producto de calidad:

- 1.- Las variables del bombo están relacionadas con su forma, velocidad de rotación, número de baffles y la carga, debido a que la forma en que se mezcla el lecho de sustrato determina la uniformidad en la cantidad de recubrimiento para cada sustrato.
- 2.- Las variables de la atomización a controlar son la tasa de líquido aplicado, patrón de rociado y el grado de atomización, es importante destacar que todas estas condiciones deben estar en equilibrio con la eficiencia del secado.
- 3.- Finalmente los parámetros del aire como la temperatura, el volumen, velocidad y calidad necesitan ser controlados para cada proceso particular (Seitz *et al.*, 1987).

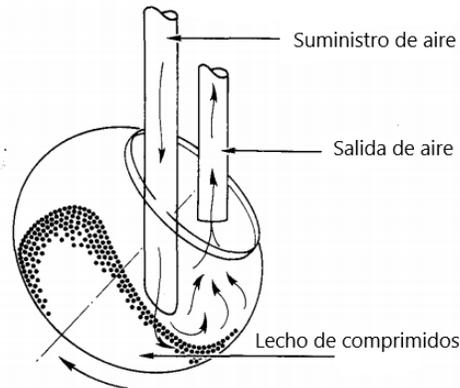


Figura 2. Diagrama de bombo de recubrimiento convencional. Tomado y modificado de Seitz *et al.*, 1987.

2.5.3 Evaluación *in vitro* de formas de formas farmacéuticas con recubrimiento entérico

La solubilidad o disolución es definida como un proceso por medio del cual una sustancia sólida entra o penetra un disolvente formando una solución, la importancia de los estudios de disolución tomo importancia al entender que este proceso es la primera limitante para la absorción del fármaco en el torrente sanguíneo, por lo tanto, una prueba de disolución mide el grado y la velocidad de formación de la solución a partir de una forma de dosificación como una tableta (Siew, 2016).

Por lo general, la evaluación *in vitro* de las formas de dosificación con recubrimiento entérico implica el uso de pruebas clásicas de desintegración establecidas en la farmacopea, o pruebas de disolución con medio de buffer fosfato pH 1.2 o 6.8, la fase ácida inicial simula la exposición de la forma farmacéutica al jugo gástrico, mientras que la segunda etapa debe imitar la exposición a las condiciones del intestino delgado (Maderuelo *et al.*, 2019).

El análisis de disolución para las formas farmacéuticas sólidas se ha convertido en uno de los análisis de mayor importancia para el desarrollo, manufactura y evaluación regulatoria de calidad de los productos farmacéuticos, esta prueba proporciona información decisiva sobre la selección de la formulación, las variables críticas del proceso, la correlación *in vitro/in vivo* y el aseguramiento de la calidad durante la fabricación (Yang *et al.*, 2002).

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que los probióticos son administrados oralmente la conservación de su integridad a través de su paso por el tracto gastrointestinal se ve comprometida por su susceptibilidad a las condiciones de pH, dicha característica es uno de los mayores retos en la efectividad de la terapéutica probiótica y un paso limitante para la llegada de los probióticos en cantidades adecuadas en el sitio de interés.

En particular *Saccharomyces boulardii* es afectada por las condiciones del pH gástrico, razón por la cual es de interés diseñar una forma farmacéutica capaz de asegurar la ingesta real de la concentración de la levadura para mantenerla viable hasta el sitio de interés.

4.0 HIPÓTESIS

La formulación de un sistema de liberación modificada a base de *Saccharomyces boulardii* utilizando un recubierto entérico, permitirá controlar su liberación en condiciones simuladas del intestino y mantener su viabilidad ante condiciones gástricas simuladas.

5.0 OBJETIVOS

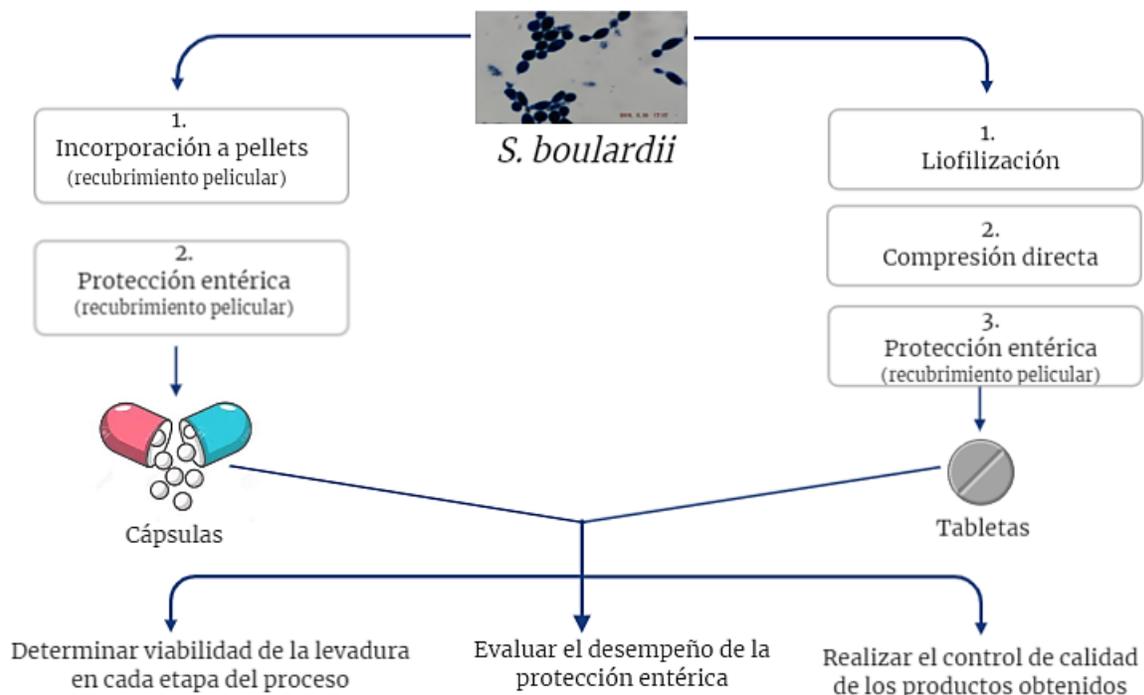
GENERAL

Diseñar un sistema de liberación modificada a base de la levadura *Saccharomyces boulardii* y evaluar su viabilidad en cada etapa de la formulación.

ESPECÍFICOS

- Obtener cultivos concentrados de *S.boulardii*.
- Diseñar un sistema de liberación modificada a base de *S. boulardii* en pellets con recubrimiento entérico y contenidos en cápsulas de gelatina dura.
- Formular un sistema de liberación modificada a base de tabletas de *S. boulardii* recubiertas con un polímero entérico.
- Determinar la viabilidad de *S.boulardii* en cada etapa del proceso de obtención de los sistemas de liberación modificada.
- Caracterizar los productos obtenidos y evaluar el desempeño del recubrimiento entérico por medio de una prueba de disolución.

6.0 DIAGRAMA DE TRABAJO



7.0 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Microorganismo y condiciones de cultivo

S. boulardii fue cultivada en medio YDP (glucosa y peptona de carne 2 %, extracto de levadura 1 %) y se incubó a 37°C a 200 rpm en condiciones aerobias.

7.2 Caracterización microscópica de *S. boulardii*

Para verificar la morfología respecto a lo ya reportado para esta levadura y descartar posibles contaminaciones en los cultivos, una muestra de levadura fue teñida mediante la técnica de tinción de Gram y observada en el microscopio óptico (Olympus Cx23) a un aumento de 40 y 100 X.

7.3 Cinética de crecimiento

Se realizó una cinética de crecimiento tomando 1.5 mL de cultivo cada dos horas que fue mantenido bajo las condiciones antes descritas, se determinó la densidad óptica (D.O) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm utilizando como blanco medio de cultivo YDP. Posteriormente se graficaron los tiempos de muestreo contra D.O.

7.4 Obtención de la suspensión de incorporación de *S. boulardii*

Una alícuota de *S. boulardii* almacenada a -70°C se activó mediante tres subcultivos en 250 mL del medio líquido YDP, los cultivos se incubaron a 37°C en agitación constante (200 rpm) durante 24 horas, posteriormente la obtención del paquete celular se realizó mediante dos ciclos de centrifugación (8mil rpm/ 10 min y 3 mil rpm/ 15 min) el cual se resuspendió por medio de agitación suave en 150 mL de una mezcla de leche descremada 30 % y HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) 2 % en solución salina fisiológica (SSF) previamente integrados mediante agitación mecánica (Caframo BDC2002).

7.5 Obtención de pellets a base de *S. boulardii*, protegidos entéricamente

La suspensión de levaduras se incorporó sobre pellets de azúcar entre 1.0 – 1.19 mm de diámetro (M16/18 Colorcon®), mediante la técnica de recubrimiento de película en bombo convencional, las condiciones utilizadas durante el proceso fueron: velocidad de giro del bombo 17 a 23 rpm, velocidad de dosificación 3 - 4 rpm, temperatura 35 - 39 °C, presión de atomización 20 - 25 psi, finalizado el

proceso se tomó una muestra para su analizar la viabilidad de las levaduras. Posteriormente, los pellets con las levaduras fueron protegidos entéricamente utilizando el polímero Eudragit® S12.5 el cuál fue preparado conforme a las especificaciones de la ficha técnica con una ganancia en peso (gp) del 5 y 10 %, calculando un excedente del 2 % para ambos casos; las condiciones del proceso de recubrimiento de película en bombo convención al fueron: velocidad de giro del bombo 17- 19 rpm, velocidad de dosificación 15-17 rpm, temperatura 30 -33 °C, presión de atomización 20 – 25 psi. Finalmente se tomó una muestra para analizar la viabilidad de las levaduras.

7.5.1 Determinación de levaduras viables

La viabilidad de las levaduras fue determinada respecto a la capacidad de multiplicarse después de la incubación microbiológica, una muestra de 1 g de pellets sin protección entérica se disolvió en 50 mL de SSF, para el caso de pellets con recubrimiento entérico la disolución se hizo en 50 mL buffer de fosfatos pH 7.5, en ambos casos se tomaron 100 µL de muestra y se realizaron diluciones decimales seriadas con medio de cultivo YDP, se sembraron 100 µL de muestra en medio sólido (YDP) mediante la técnica de extensión con varilla y posteriormente las cajas fueron incubadas durante 72 horas a $37 \pm 0.5^\circ$ C. Finalmente las unidades formadoras de colonia (UFC) se enumeraron expresando los resultados como Log_{10} UFC.

7.5.2 Obtención de cápsulas de gelatina dura

Cápsulas de gelatina rígida número 0 fueron llenadas con los pellets obtenidos en los procesos anteriores (incorporación y protección entérica), utilizando una encapsuladora manual Pro filler 1100.

La determinación de la dosis por cápsula se realizó estableciendo la cantidad de levaduras viables en 1 g de pellets respecto al peso de los pellets contenidos en una cápsula llena.

7.5.3 Control de calidad de cápsulas

- Uniformidad de peso

Se determinó el peso de diez cápsulas (con pellets sin protección entérica, y pellets recubiertos con el 5 y 10 % gp de polímero entérico) de manera independiente, los resultados de la variación de peso se muestran con el promedio y el coeficiente de variación y la desviación estándar.

- Desintegración

La desintegración se determinó de acuerdo con el MGA (método general de análisis) 0261 FEUM (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos) XI edición, 2014 conforme al apartado de cápsulas de gelatina dura o blanda utilizando un desintegrador (Mayasa, 2513), el resultado se expresa como el tiempo en el que la totalidad de las cápsulas desintegraron completamente.

7.5.4 Perfil de disolución de cápsulas

Para evaluar la liberación de la levadura a partir de la cápsula en condiciones ácidas y alcalinas, se siguió la metodología establecida en la FEUM XI edición 2014, MGA 0521 para sistemas orales de liberación retardada en general método B, utilizando el aparato de disolución I, que consiste en someter a las cápsulas en fase ácida pH 1.2 con 500 mL de HCl 0.1 N a $37\pm 0.5^\circ$ C durante 60 min, utilizando una agitación de 100 rpm, se tomaron alícuotas de 4 mL a los tiempos 0, 30 y 60 min, posteriormente se decantó el medio y fue remplazado por buffer de fosfatos pH 7.5, el aparato se operó durante 20 minutos correspondientes a la disolución total de los pellets, tomando alícuotas de 4 mL a los tiempos 0, 10 y 20 minutos.

Para la determinación de la viabilidad de las muestras obtenidas en medio ácido, se realizó un proceso de neutralización realizando diluciones con SSF y medio de cultivo YDP, esto con la finalidad de contrarrestar los efectos del pH durante la incubación microbiológica. De cada muestra se realizó el estudio de viabilidad conforme a lo descrito anteriormente. Los resultados se muestran graficando el tiempo de muestreo contra el Log_{10} de las UFC.

7.6 Obtención de tabletas a base de *S. boulardii* liofilizada protegidas entéricamente

7.6.1 Suspensión de liofilización

A partir de 500 mL de cultivo de *S. boulardii* incubado bajo las condiciones anteriormente descritas se obtuvo el paquete celular para posteriormente incorporarlo mediante agitación mecánica en 50 mL de suspensión al 30 % de leche descremada.

7.6.2 Proceso de liofilización

La suspensión para liofilización fue congelada durante 12 horas a -70°C , para posteriormente someterla al proceso de liofilización durante 24 horas (Labconco), posteriormente el polvo obtenido fue pesado y tamizado. Finalmente se tomó una muestra para realizar el análisis de viabilidad.

7.6.3 Proceso de compresión del liofilizado de *S. boulardii*

La formulación establecida para las tabletas a base de *S. boulardii* se presenta en la tabla 1. La mezcla de los componentes se realizó en un mezclador tipo pantalón a 10 rpm durante 10 minutos.

Tabla 1. Formulación de tabletas a base de liofilizado de *S. boulardii*

Ingredientes	%	mg
Liofilizado	33.3	100
Estearato de Mg	0.5	1.5
Almidón	10	30
Avicel® 102	56.2	168.5
	100	300

Posterior al mezclado, las tabletas fueron obtenidas por compresión directa en una prensa hidráulica (Carver), utilizando punzones cóncavos de 10 mm y una fuerza de compresión de 0.5 Tn. Se tomó una muestra para realizar el análisis de viabilidad de las levaduras.

7.6.4 Protección entérica de tabletas mediante el proceso de recubrimiento de película en bombo convencional

Las tabletas obtenidas fueron sometidas a un proceso de recubrimiento de película en bombo convencional utilizando el polímero entérico Eudragit® S12.5 el cual fue preparado conforme a las especificaciones de la ficha técnica, con una gp del 5 y 10 %, calculando un excedente del 2 % para ambos casos; las condiciones establecidas durante el proceso de recubrimiento fueron: velocidad de giro del bombo 17-19 rpm, velocidad de dosificación 15-17 rpm, temperatura 30–33 °C, presión de aire 25 psi, con un tiempo de proceso promedio de 40 min. Finalmente se tomó una muestra para realizar el análisis de viabilidad de las levaduras.

7.6.5 Control de calidad de las tabletas

- Uniformidad de peso

Se determinó el peso de diez tabletas sin protección entérica y diez tabletas con protección de manera individual. Los resultados se presentan respecto al cálculo del promedio, coeficiente de variación y desviación estándar de los datos.

- Diámetro y espesor

Con un vernier se determinó el valor de estos parámetros a diez tabletas de manera individual; para establecer el diámetro se orientaron las tabletas de manera horizontal y de manera vertical para determinar el espesor. Los resultados se expresan en términos del promedio y el coeficiente de variación de los datos.

- Resistencia a la ruptura

La resistencia a la ruptura se entiende como la integridad mecánica de las tabletas al aplicar una fuerza de forma diametral hasta fracturar el comprimido. La prueba se realizó de acuerdo con el MGA 1051 (FEUM XI edición, 2014) con un medidor de dureza (Pharma Alliance); diez comprimidos sin recubrimiento fueron colocados entre las platinas aumentando la presión de forma continua hasta fracturar el comprimido registrando la fuerza aplicada. Los resultados se muestran en términos del valor menor y mayor, promedio y coeficiente de variación.

- **Friabilidad**

De acuerdo con el MGA 1041 (FEUM XI edición, 2014) se define como la capacidad de resistir la abrasión o el desgaste por fricción durante la manipulación, el envasado y el transporte. En un friabilizador (Temsá), se colocaron 21 tabletas sin recubrimiento que correspondieron a un peso final de 6.5 g, el tambor giró durante cuatro minutos a 25 rpm. Los resultados se muestran respecto al porcentaje de peso perdido.

- **Desintegración**

La desintegración se determinó de acuerdo con el MGA 0261 FEUM XI edición, 2014 conforme al apartado de tabletas o tabletas con capa ácido resistente según corresponda, se utilizó un desintegrador (Mayasa, 2513), el resultado se expresa como el tiempo en el que la totalidad de las tabletas desintegraron completamente.

7.6.6 Determinación de levaduras viables

La viabilidad de las levaduras fue determinada conforme a su capacidad de multiplicarse después de la incubación microbiológica. Una tableta sin protección entérica se disolvió en 50 mL de SSF, para las tabletas con recubrimiento entérico la disolución se realizó en 50 mL buffer de fosfatos pH 7.5, en ambos casos se tomaron 100 μ L de muestra y se realizaron las diluciones decimales seriadas necesarias con medio de cultivo YDP, posteriormente se sembraron 100 μ L de muestra en medio sólido (YDP) mediante la técnica de extensión con varilla, en seguida las cajas fueron incubadas durante 72 horas a $37 \pm 0.5^\circ$ C. Finalmente las UFC se enumeraron expresando los resultados como Log_{10} UFC.

7.6.7 Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar de tres repeticiones por cada experimento. Se realizó un análisis de tipo ANOVA de una vía para determinar las diferencias significativas entre las condiciones estudiadas, excepto para el análisis de los efectos del proceso de liofilización sobre la viabilidad celular, en donde utilizamos un análisis tipo t de student.

8.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Cinética de crecimiento de *Saccharomyces boulardii*

Se realizó una cinética de crecimiento de la levadura en la que se midieron los cambios en la biomasa de manera directa mediante la determinación de la densidad óptica del cultivo a través del tiempo (figura 3). La cepa mostró un aumento constante en su crecimiento durante las primeras 12 horas de incubación que corresponden a la fase de crecimiento exponencial, en las 12 horas subsecuentes se distingue una fase estacionaria en el crecimiento.

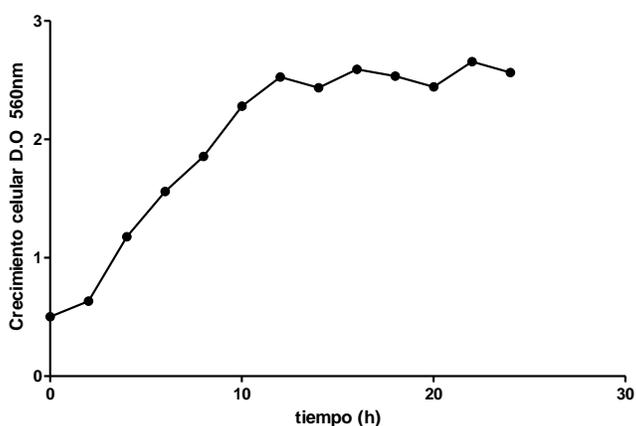


Figura 3. Cinética de crecimiento *S. boulardii* Condiciones de cultivo 37°C, agitación a 200 rpm en medio líquido YDP. Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

A partir de los resultados obtenidos se determinó que el tiempo óptimo de crecimiento para obtener un cultivo concentrado en la fase estacionaria temprana es de 12 horas de incubación. El crecimiento celular implica un aumento en la masa y tamaño físico de las células que está controlado por ambientes físicos, biológicos y químicos, de manera general durante la cinética de crecimiento la generación de biomasa se acompaña de procesos anabólicos y catabólicos (Du *et al.*, 2012; Feldman *et al.*, 2012).

En particular durante la fase estacionaria comienza el agotamiento de los nutrientes y por lo tanto comienza una fase de desaceleración en el crecimiento, las células pueden sobrevivir en la fase estacionaria durante largos periodos de tiempo debido

a los cambios moleculares que se producen como la ralentización de procesos celulares básicos, sin embargo un retorno de una fuente de carbono abundante puede hacer que las células vuelvan a entrar en el ciclo celular y comiencen a dividirse (Gray *et al.*, 2004); la utilidad de tomar las células probióticas en esta fase de crecimiento además de su capacidad de supervivencia, también se apoya en los hallazgos que señalan que durante las condiciones de crecimiento desfavorables ocurre una reprogramación de los procesos celulares en general para mantener la viabilidad como un proceso natural de adaptación, en el que las células sobreviven a condiciones de estrés o inanición, por ejemplo, se ha determinado que las levaduras se vuelven resistentes a la temperatura, altas concentraciones de H₂O₂ y altos niveles de osmolaridad del medio, además durante esta fase se expresan los genes esenciales para la supervivencia, los cuales están directamente relacionados con muchos eventos clave incluida la reparación del ADN y la producción de glucógeno; por todo lo anterior, se ha establecido que las características celulares durante la fase estacionaria del crecimiento pueden ser retomadas en aplicaciones tecnológicas (Wackett *et al.*, 2010; Jaishankar *et al.*, 2017).

8.2 Caracterización microscópica de *S. boulardii*

Para conocer las características morfológicas de la levadura y verificar la ausencia de contaminaciones a lo largo de los procesos de obtención de las formas farmacéuticas se observaron en el microscopio muestras de cultivo líquido y colonias en medio de cultivo sólido (figura 4).

En las imágenes del panel A (figura 4) se observa la forma ovalada característica de las levaduras distinguiéndose algunas en estado de gemación, posteriormente en la incubación en medio sólido (figura 4, panel B) las colonias presentan formas esféricas con bordes definidos de color blanco aperlado y relieve cóncavo. Estos resultados coinciden con lo observado en la investigación sobre las características y condiciones de cultivo de *S. boulardii* realizado por Du y colaboradores en el 2012, en donde describen a las células en medio de cultivo líquido con superficies lisas y formas elipsoidales u ovaladas, ocasionalmente esféricas.

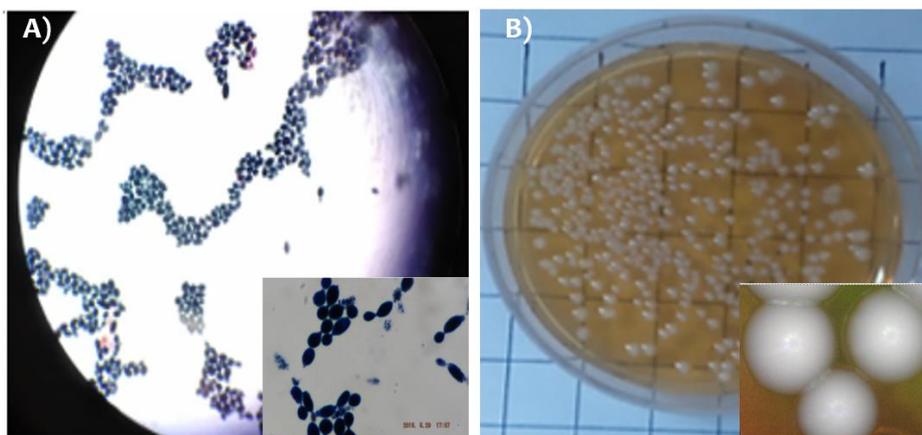


Figura 4. Caracterización microscópica de *S. boulardii*. A) Tinción de Garm de cultivo líquido, observado con microscopio óptico (Olympus Cx23) 100 x, y acercamiento fotográfico. B) Crecimiento de *S. boulardii* en medio sólido y acercamiento de colonias de la levadura observado con microscopio digital (DinoCapture 2.0) a un aumento de 40x.

8.3 Diseño y evaluación de un sistema de liberación modificada a base de *S. boulardii* en pellets con recubrimiento entérico encapsulados en cápsulas de gelatina dura

8.3.1 Obtención de pellets incorporados con *S. boulardii*, protegidos entéricamente

La obtención de los pellets a base de *S. boulardii* protegidos con un polímero entérico se realizó en tres procesos de recubrimiento de película en bombo convencional. En el primer proceso se realizó la incorporación de la suspensión de levaduras sobre los pellets de azúcar, seguido de un primer proceso de protección entérica realizando un recubrimiento con Eudragit® S12.5 a un aumento en peso del 5 % y finalmente se realizó un proceso adicional con el 5 % extra de ganancia en peso de polímero para obtener una protección entérica total del 10 %, en la tabla 2 se resumen los resultados de dichos procesos.

Tabla 2. Resultados de los diferentes procesos de recubrimiento de película en bombo convencional para la obtención de pellets a base de *S. boulardii* protegidos entéricamente. Cada resultado representa el promedio de los valores obtenidos en los tres lotes realizados.

Proceso	Rendimiento (%)	Tiempo de proceso (min)	Polímero aplicado (%)
Incorporación de <i>S. boulardii</i> en pellets	87.738	80	—
Protección entérica 5 % gp de polímero	92.636	54	5.094
Protección entérica 5% gp adicional de polímero	88.773	55	4.961

gp= ganancia en peso

Los tres procesos realizados tuvieron rendimientos mayores al 85 %, el tiempo de proceso de la incorporación duró 25 minutos más que los procesos de protección entérica, lo que puede estar relacionado con la fase acuosa de la suspensión de incorporación de la levadura, ya que requirió un mayor tiempo de secado en comparación con los tiempos necesarios para la fase orgánica (isopropanol) utilizada en la protección entérica; por otra parte los porcentajes de ganancia en peso de polímero entérico planteados fueron alcanzados en ambos procesos.

8.3.2 Encapsulación de pellets

Los pellets obtenidos en los diferentes procesos fueron encapsulados, la figura 5 muestra el contenido de *S. boulardii* por cápsula, de acuerdo con el análisis estadístico realizado no hubo diferencia significativa entre las dosis obtenidas (7.0Log_{10} UFC) para los tres tipos de cápsulas.

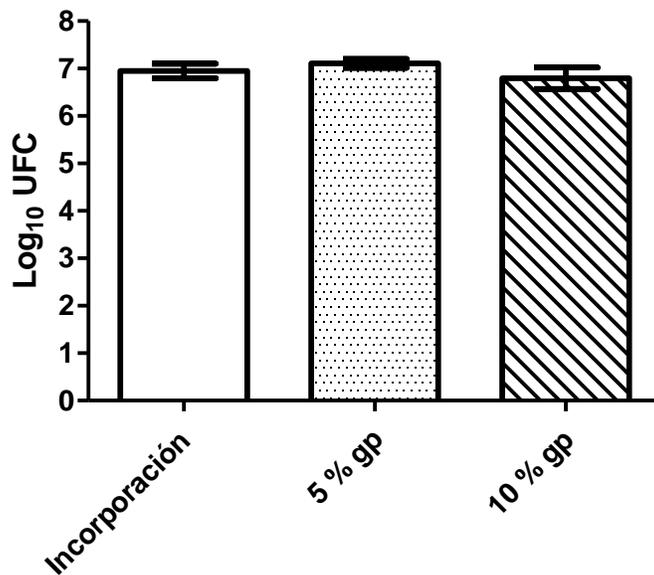


Figura 5. Contenido de *S. boulardii* por cápsula en los diferentes procesos de obtención. Cada barra representa el promedio de tres lotes obtenidos de manera independiente. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía, gp= ganancia en peso.

Se ha señalado como dosis de ingesta diaria de probióticos una concentración de al menos 1×10^7 UFC/g (Meng *et al.*, 2008), en la mayoría de los estudios clínicos se utiliza el rango de dosis diarias entre 1×10^6 y 1×10^9 UFC/g (Sreeja *et al.*, 2013), por lo tanto, nuestros resultados cumplen con los rangos de dosis necesaria recomendada. Por otra parte, de acuerdo a la búsqueda bibliográfica que se realizó existen 14 productos comerciales a base de *S. boulardii* en su totalidad cápsulas de gelatina rígida de 250 mg de liberación inmediata, de acuerdo a la información disponible reportan en su mayoría 1×10^9 UFC/ g sin especificar si estas concentraciones son posteriores a los procesos de obtención del producto o a la concentración inicial del cultivo, ninguno de ellos hace referencia a algún tipo de tecnología que ayude en la liberación dirigida de la levadura y la totalidad de estos productos son registrados como suplementos alimenticios.

8.3.3 Caracterización física de las cápsulas obtenidas

La determinación de la uniformidad de peso y tiempo de desintegración de las cápsulas obtenidas se realizó como parte del control de calidad del producto terminado. Los resultados de la tabla 3 demuestran que las cápsulas cumplen las especificaciones de las pruebas realizadas.

Tabla 3. Control de calidad de cápsulas

Prueba	Cápsulas 5 % gp	Cápsulas 10 % gp	Especificaciones FEUM (2014)
Variación de peso	a. 0.53 g ± 0.032 b. 6.10 %	a. 0.55 g ± 0.029 b. 5.35 %	NA
Desintegración	18 minutos	18 minutos	Límite de tiempo 30 min Farmacopea Europea

a. Valor promedio, b. coeficiente de variación, NA. No aplica. Los resultados se muestran como el valor promedio ± la desviación estándar. gp= ganancia en peso

8.3.4 Efecto de los diferentes procesos en la obtención de pellets incorporados y protegidos entéricamente sobre la viabilidad de *S. boulardii*

Debido a la importancia que tiene el consumo de productos que proporcionen una cantidad adecuada de probióticos vivos, estudiamos la viabilidad de la levadura a través de las diferentes etapas de obtención de las cápsulas de liberación modificada (figura 6). Los resultados muestran que el proceso determinante en la pérdida de la viabilidad fue la incorporación de la levadura (10.18 Log₁₀ UFC) sobre los pellets con una disminución significativa ($p < 0.0001$) de 1.5 Log₁₀ UFC respecto a la cantidad de levaduras en el cultivo inicial (11.698 Log₁₀), por el contrario, en los subsecuentes procesos de protección entérica (5 y 10 % gp) la viabilidad se mantiene en el mismo orden de magnitud (10.341 y 10.029 Log₁₀). De acuerdo con nuestros resultados podemos sugerir que la técnica de atomización sobre un núcleo es óptima al mantener la viabilidad celular después de exponer a las células a factores estresantes de temperatura y presión del aire de secado en los subsecuentes procesos (protección entérica), las capas generadas en la superficie

de los pellets en conjunto con los ingredientes de la mezcla de incorporación favorecen la viabilidad de la levadura.

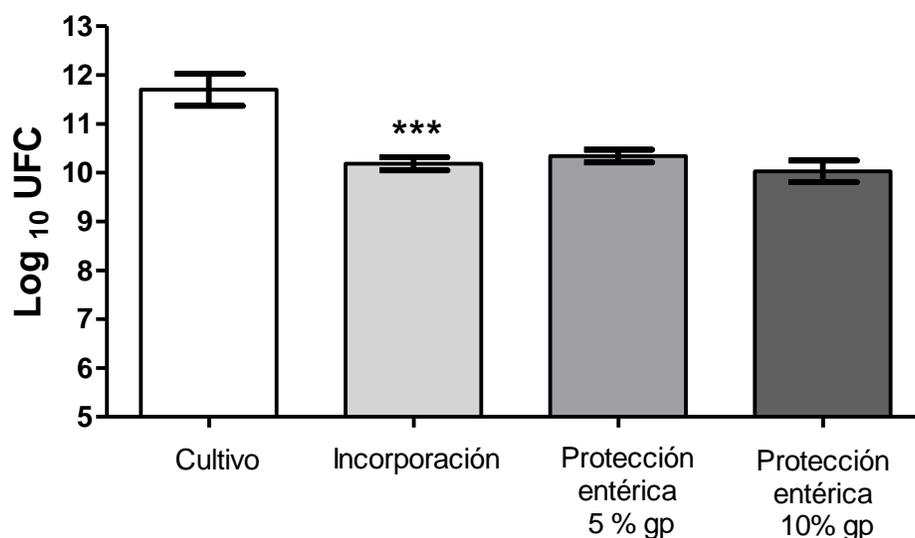


Figura 6. Efecto de los diferentes procesos en la obtención de pellets incorporados y protegidos entéricamente sobre la viabilidad de *S. boulardii*. Cada barra representa el promedio de tres lotes obtenidos de manera independiente. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía ***p<0.0001. gp= ganancia en peso.

Al igual que en el desarrollo de esta forma farmacéutica existen otros procesos en los que las levaduras son sometidas a procesos biotecnológicos, un ejemplo de ello es su aplicación en la elaboración de cerveza, fermentaciones de destilería y elaboración de vino, estos procesos implican una exposición a numerosas tensiones ambientales; al respecto se ha estudiado un conjunto complejo de respuestas al estrés por parte de las levaduras durante estos procesos, que ocurren cuando se encuentran en condiciones por debajo de las fisiológicamente ideales, en general estas repuestas implican control genético, fisiológico y metabólico; en este sentido durante los procesos de recubrimiento de película, factores como las variaciones de temperatura y fricción mecánica contribuyen en la disminución de la viabilidad, específicamente se ha determinado que las variaciones de la temperatura óptima de crecimiento (37 °C) pueden conducir a daños en la membrana, pérdida de solutos internos, desequilibrio iónico, acidificación interna, generación de radicales libres,

perdida de la función mitocondrial, daño a las proteínas y actividades enzimáticas, (Attfield *et al.*, 1997).

8.3.5 Perfil de disolución de pellets contenidos en cápsulas de gelatina rígida

La protección entérica de los pellets incorporados con *S. boulardii* fue evaluada mediante una prueba de disolución, los resultados muestran de acuerdo al análisis estadístico realizado que el aumento de polímero entérico no modifica de manera significativa la supervivencia celular en el medio ácido, puesto que para los dos aumentos en peso de polímero entérico estudiados (5 y 10 %) no hay evidencia de liberación en medio ácido durante los 60 minutos de evaluación, por el contrario en el medio con pH alcalino el tiempo total de disolución fue de 20 minutos (figura 7), la apariencia física de los pellets durante la disolución en medio ácido y alcalino se muestra en la figura 8.

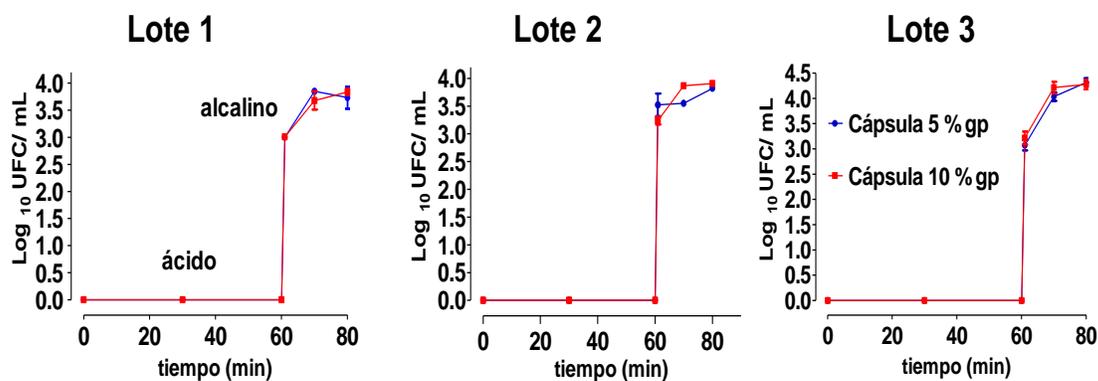


Figura 7. Perfil de disolución cápsulas al 5 y 10 % ganancia en peso (gp) de polímero entérico. Cada punto representa el promedio de tres ensayos independientes. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía.

**Medio
ácido**



30 minutos



60 minutos

**Medio
alcalino**



10 minutos



20 minutos

Figura 8. Apariencia física de los pellets durante la disolución en medio ácido y alcalino.

Las condiciones ácidas y alcalinas son importantes en las funciones metabólicas de los microorganismos; los cambios en el pH extracelular tienen un efecto negativo en el ciclo celular de la levadura, en el mantenimiento y homeostasis del pH intracelular que es importante en la viabilidad, sin embargo ante las condiciones cambiantes de pH, las levaduras pueden mantener un pH interno adecuado utilizando sistemas buffer celulares y consumo de H^+ a través de rutas metabólicas incrementando el eflujo de protones a través de la membrana plasmática por la bomba H^+ -ATPasa, transportando ácido entre el citosol y los orgánulos (Brandão *et al.*, 2014).

Vanhee y colaboradores en el 2010, estudiaron la viabilidad de productos comerciales a base de *S. boulardii*, los cuales fueron probados en condiciones gástricas simuladas, la prueba de disolución se realizó durante 2 horas en HCl 0.1 N utilizando el método de aparato tres (cilindro oscilante) después de 15 minutos de

exposición en medio ácido hubo diferencia significativa respecto al número inicial de levaduras, finalmente la reducción logarítmica promedio en el número de células de *S. boulardii* fue de 3.91, correspondiente a una supervivencia < al 1 % de células. Tomando en cuenta este tipo de evaluaciones en formas farmacéuticas a base de la levadura y debido a que la propuesta de este trabajo es favorecer la viabilidad de la levadura en su paso por el TGI consideramos que de acuerdo con nuestros resultados la protección entérica es efectiva.

8.4 Diseño de un sistema de liberación modificada en tabletas protegidas entéricamente a base de liofilizado de *S. boulardii*

8.4.1 Proceso de liofilización

El liofilizado tuvo un peso final de 37.69 g con un rendimiento de proceso del 75.38 %, el impacto del proceso de liofilización sobre la viabilidad celular se muestra en la figura 9, bajo las condiciones empleadas y usando como crioprotector leche descremada; la levadura disminuye de manera significativa ($p < 0.0001$) en 1.0 Log₁₀ UFC su viabilidad respecto al cultivo inicial.

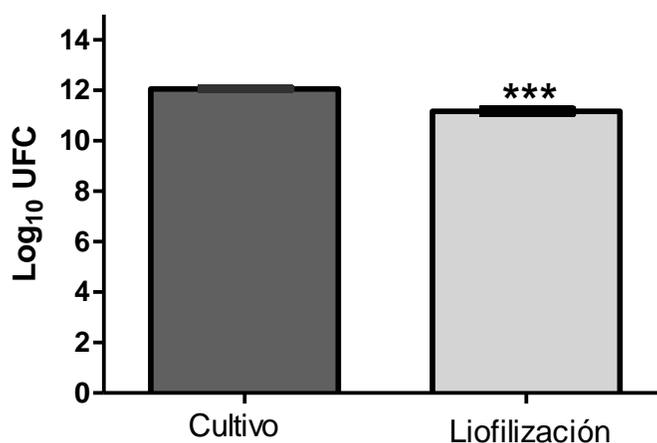


Figura 9. Efecto del proceso de liofilización sobre la viabilidad de *S. boulardii*. El análisis estadístico fue realizado con t de student. *** $p < 0.0001$.

La deshidratación durante el proceso de liofilización implica estrés oxidativo y una contracción mecánica, esto induce un choque osmótico en las células que genera daño celular el cual es atribuido principalmente al cambio en la estructura de las proteínas sensibles o en el estado físico de los lípidos de membrana, con la finalidad de disminuir estos efectos en las células durante el proceso de liofilización se usan agentes protectores que además de proteger de las condiciones durante el proceso, actúan aportando una estructura para la materia seca en el proceso de rehidratación (Broeckx *et al.*, 2016). Chen y colaboradores en 2016, reportaron que en la ausencia de crioprotector durante el proceso de liofilización la tasa de supervivencia de *S. boulardii* calculada respecto a la viabilidad inicial fue del 3.99 % y el número de células viables fue 0.36×10^{10} UFC/ g, por el contrario, al incorporar diferentes carbohidratos empleados como crioprotectores tuvieron diversas influencias favorables en la tasa de supervivencia de las células liofilizadas.

8.4.2 Proceso de compresión del liofilizado de *S. boulardii* y protección entérica de las tabletas obtenidas

Con los datos de viabilidad obtenidos en el liofilizado, se determinó la dosis de cada comprimido con el objetivo de obtener cantidades de levadura viable semejantes a las estudiadas en las cápsulas obtenidas anteriormente. El resultado muestra que 1 g de liofilizado contiene 4.00×10^9 UFC. En la formulación de las tabletas (tabla 1) se incorporaron 100 mg de liofilizado correspondientes a 4.00×10^8 UFC de levaduras viables; en el proceso de compresión se obtuvieron 197 tabletas que fueron protegidas entéricamente, inicialmente se incorporó un aumento en peso del 5 %, seguido de otro proceso con un aumento adicional del 5 % de gp de polímero entérico con la finalidad de obtener un aumento total del 10 %. En la tabla 4 se resumen los resultados de dichos procesos.

Tabla 4. Resultados de los diferentes procesos de recubrimiento de película en bombo convencional para la protección entérica de tabletas a base de *S. boulardii*. Cada resultado representa el promedio de los valores obtenidos en los tres lotes realizados.

Proceso	Rendimiento (%)	Dosificación (g/min)	Tiempo de proceso (min)	Polímero aplicado (%)
Protección entérica 5 % gp de polímero	94.605	6.2	45	5.203
Protección entérica 5 % gp adicional de polímero	94.929	6.2	40	5.221

gp= ganancia en peso

8.4.3 Control de calidad de las tabletas

Los resultados de las pruebas de control de calidad se muestran en la tabla 5. La variación de peso y el espesor evidencian el incremento en las tabletas con el 10 % de ganancia en peso debido a la capa de polímero entérico. Respecto a la prueba de friabilidad sólo se determinó en tabletas sin protección entérica con la finalidad de evaluar si eran aptas para el proceso de recubrimiento de película en donde el 0% de pérdida de peso indicó que las tabletas podían mantenerse íntegras.

Tabla 5. Control de calidad de tabletas

Prueba	Tabletas sin protección entérica	Tabletas 5 % gp	Tabletas 10 % gp	Especificaciones
Variación de peso	a. 0.298 g ±0.002 b. 0.67 %	a. 0.298 g ±0.001 b. 0.61 %	a. 0.304 g ±0.001 b. 0.50 %	Desviación máxima 10 % (Farmacopea Europea)
Diámetro	a. 10.08 mm ±0.010 b. 0.11 %	a. 10.07mm±0.005 b. 0.06 %	a. 10.09mm ±0.013 b. 0.14 %	NA
Espesor	a. 3.751 mm ±0.049 b. 1.31 %	a. 3.756mm±0.080 b. 2.14 %	a. 3.790 mm ±0.077 b. 2.04 %	NA
Resistencia a la ruptura	a. 14.19 kg ±1.732 b. 12.21 % valor max 17.62 valor min 11.83	NA	NA	NA
Friabilidad	0 %	NA	NA	< 1 % (FEUM, 2014)

a. Valor promedio, b. coeficiente de variación, NA. No aplica. Los resultados se muestran como el valor promedio ± la desviación estándar.

8.4.4 Efecto de los diferentes procesos para la obtención de tabletas sobre la viabilidad de *S. boulardii*

Se determinó la viabilidad de la levadura en cada etapa del proceso de obtención de las tabletas con la finalidad de evaluar su impacto sobre los valores iniciales de viabilidad (figura 10), de acuerdo con el análisis estadístico realizado existe una disminución significativa $p < 0.05$ (1.0 Log_{10} UFC) en la viabilidad de la levadura liofilizada respecto al cultivo inicial, posterior a este proceso durante la compresión la viabilidad disminuyó significativamente $p < 0.05$ (1.604 Log_{10} UFC) respecto al

liofilizado, por el contrario durante los procesos de protección entérica la viabilidad no disminuyó.

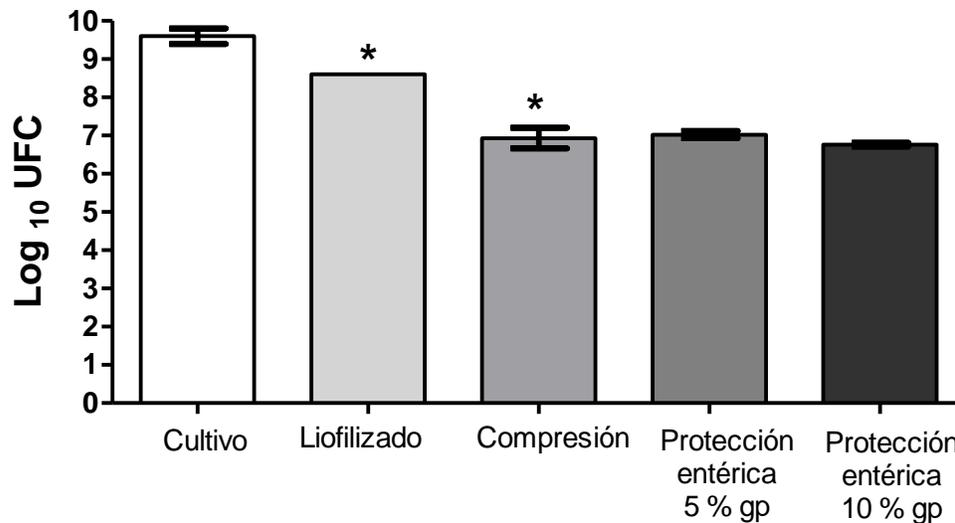


Figura10. Efecto de los diferentes procesos en la obtención de tabletas sobre la viabilidad de *S. boulardii*. El análisis estadístico fue realizado con ANOVA de una vía *p<0.05. gp= ganancia en peso.

De acuerdo con los resultados, el proceso de compresión es el que afecta en mayor medida la disminución de la viabilidad. Diversos autores han estudiado los factores que contribuyen en la pérdida de viabilidad de diferentes cepas probióticas durante estos procesos; Govender y colaboradores en el 2014 sugirieron que la producción de calor que ocurre durante la compresión alcanza hasta 60°C lo cual puede perjudicar a bacterias que son viables a temperaturas menores. Se ha establecido que en los procesos de compresión los microorganismos mueren a causa también del corte ocurrido durante la misma y que de acuerdo con el tamaño de los microorganismos los más grandes mueren por cizallamiento en lugar de hacerlo por el aumento de la temperatura (Tanangteerapong *et al.*, 2014), de igual manera se ha atribuido la mortalidad inicial de las células a las fuerzas de corte causadas por el movimiento interparticulado y la reducción del tamaño de poro en la mezcla de polvos durante el reordenamiento de las partículas durante la compresión (Plumpton *et al.*, 1986).

Por todo lo anterior se ha establecido que el estrés mecánico generado durante el proceso de compresión puede causar modificaciones morfológicas que desencadenan anomalías a nivel bioquímico y genético lo que puede provocar daños letales y subletales, así como una pérdida de viabilidad de la cepa probiótica.

8.5 Comparación de la viabilidad de *S. boulardii* durante los procesos de obtención de pellets y tabletas

La figura 11 muestra la comparación del efecto sobre la viabilidad que tienen los diferentes procesos para la obtención de los dos SLM propuestos (pellets y tabletas), en general la obtención de pellets tuvo una disminución de 1.5 Log₁₀ UFC en la viabilidad de la levadura, mientras que para las tabletas la disminución fue de 2.7 Log₁₀ UFC.

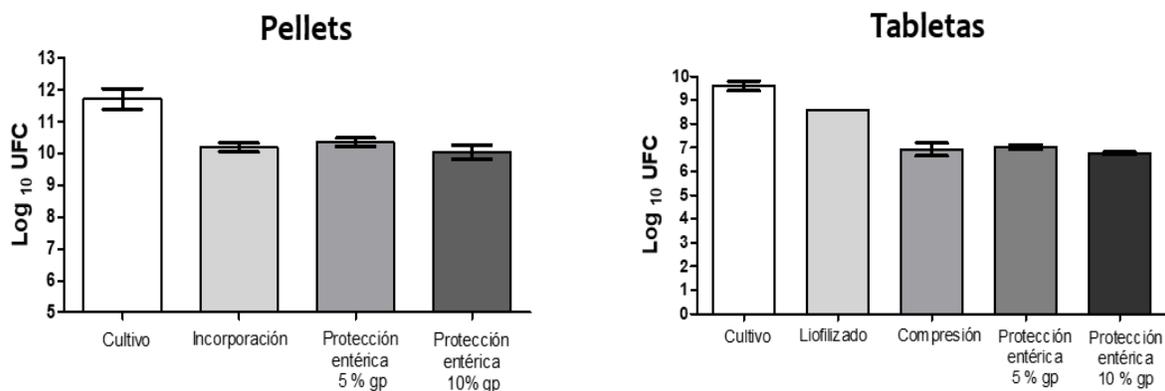


Figura 11. Comparación del efecto sobre la viabilidad de *S. boulardii* durante la obtención de dos sistemas de liberación modificada (pellets contenidos en cápsulas y tabletas)

Se puede establecer que, de acuerdo con los resultados para la obtención de tabletas el tipo de operaciones unitarias empleadas contribuye en mayor medida respecto a la obtención de pellets en la disminución de la viabilidad de la levadura, de igual manera considerando nuestros resultados encontramos que el proceso de compresión es el más perjudicial para la viabilidad de *S. boulardii* y debido a que uno de los objetivos de nuestro estudio fue comparar la obtención de dos SLM de administración oral concluimos que los procesos implicados en la obtención de pellets favorecen en mayor medida la viabilidad de la levadura.

9.0 CONCLUSIONES

El diseño de un sistema de liberación modificada a base de la levadura probiótica *S. boulardii* tuvo como objetivo preservar la viabilidad de la levadura a través de los procesos necesarios para su obtención; de acuerdo a los resultados, el proceso de incorporación de la levadura sobre un núcleo mediante recubrimiento resultó efectivo en la preservación de la viabilidad de *S. boulardii* y durante los procesos de protección entérica. Otra punto importante a considerar es la conservación de la viabilidad de la levadura a través de su paso por el tracto gastro intestinal, al respecto los resultados muestran que en la protección entérica conferida en un sistema multi particulado (pellets) el aumento en peso de polímero entérico (5 y 10 %) permitió de manera significativa la protección entérica y que el sistema de liberación modificada de pellets encapsulados en cápsulas de gelatina rígida fue efectivo en la protección de la levadura durante 1 hora en medio ácido pH 1.2. Por otra parte, respecto al sistema de liberación modificada a base de tabletas, se encontró que la operación unitaria de compresión perjudicó en mayor medida y de manera significativa la viabilidad inicial del cultivo.

Finalmente, tomando en cuenta el impacto de los procesos para la obtención de dos sistemas de liberación modificada a base de *S. boulardii*, los pellets implicaron en general una pérdida menor en la viabilidad de la levadura.

10.0 PERSPECTIVAS

A partir de los resultados presentados en este trabajo, se considera necesario realizar experimentos enfocados a establecer la comparación entre los dos SLM obtenidos, respecto a su liberación en pH ácido y alcalino, complementando el perfil de disolución de tabletas. Por otro lado, con la finalidad de caracterizar la morfología de la levadura incluida en ambos SLM sería pertinente realizar estudios de Microscopía Electrónica de Barrido tanto al cultivo de *S. boulardii* como a los pellets y tabletas. Finalmente resultaría de interés evaluar la estabilidad de los SLM en condiciones de anaquel mediante un estudio de viabilidad durante periodos de tres y hasta doce meses después de haber obtenido los productos.

11.0 BIBLIOGRAFÍA

Attfield P. (1997). Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, 15, 1351–1357.

Blehaut, H; Massot, J; Elmer, G; Levy R. (1989). Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharm Drug Dispos*, 10(4):353–364.

Boddy, A; Elmer, G; McFarland, L; Levy, R. (1991). Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. *Pharm Res*, 8(6):796–800.

Brandão, R; César, J., Rosa, C., Nicoli, J. R., Vinicius, M., Almeida, S., Castro, I. (2014). Investigating Acid Stress Response in Different *Saccharomyces* Strains. *Journal of Mycology*, 2014, 9.

Broeckx, G., Vandenneuvel, D., Claes, I., Lebeer, S., Kiekens, F. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 303–318.

Buts, J., De Keyser, N. (2006). Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Digestive Diseases and Sciences*, 51(8), 1485–1492.

Chen, H., Lei, Z., Hong, H., Zhai, Y., Huang, D. (2016). Screening Freeze-Drying Cryoprotectants for. *Food Preservation*, 40(2), 83–97.

Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. (2007). Review article: Yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26(6), 767–778.

del Campo-Moreno, R., Alarcón-Cavero, T., D'Auria, G., Delgado-Palacio, S., Ferrer-Martínez, M. (2018). Microbiota and Human Health: characterization techniques and transference. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 36(4), 241–245.

Du, L., Hao, R., Xiao, D., Guo, L., Gai, W. (2012). Research on the characteristics and culture conditions of *Saccharomyces boulardii*. *Advanced Materials Research*, 343–344, 594–598.

Duongthingoc, D., George, P., Katopo, L., Gorczyca, E., Kasapis, S. (2013). Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. *Food Chemistry*, 141(3), 1782–1788.

Edwards-Ingram, L., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D; Stateva, L. (2007). Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2458–2467.

FAO/WHO. (2001). Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria: Report from FAO/WHO expert consultation (pp. 1–4).

Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F.; Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology* 82: 59-70.

Feldman. (2012). Yeast Growth and the Yeast Cell Cycle. *Yeast*, 175–205.

Fietto, J., Araújo, R., Valadão, F., Fietto, L., Brandão, R., Neves, M., Castro, I. (2004). Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 615–621.

Friedman, E., Bittinger, K., Esipova, T., Hou, L., Chau, L., Jiang, J; Wu, G. (2018). Microbes vs. chemistry in the origin of the anaerobic gut lumen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(16), 4170–4175.

Garcia, S; Santos, B. (2001). Formas sólidas orales, Vila Jato José Luis, Tecnología farmacéutica II: Formas farmacéuticas, España, Síntesis farmacia.

Govender, M., Choonara, Y E., Kumar, P., Du Toit, L., Van Vuuren, S., Pillay, V. (2014). A review of the advancements in probiotic delivery: Conventional vs. Non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. *AAPS PharmSciTech*, 15(1), 29–43.

Graff, S., Chaumeil, J., Boy, P., Lai-Kuen, R., Charrueau, C. (2008). Formulations for protecting the probiotic *Saccharomyces boulardii* from degradation in acidic condition. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(2), 266–272.

Gray, J; Petsko, G., Johnston, G., Ringe, D., Singer, R., Werner-washburne, M. (2004). “Sleeping Beauty”: Quiescence in. *Society*, 68(2), 187–206.

Guowei, S., Yang, X., Li, C., Huang, D., Lei, Z., He, C. (2019). Comprehensive optimization of composite cryoprotectant for *Saccharomyces boulardii* during freeze-drying and evaluation of its storage stability. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(9), 846–857.

Icaza. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78(4), 240–248.

Im, E., Pothoulakis, C. (2010). Progrès récents dans la recherche sur *Saccharomyces boulardii*. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 34(SUPPL. 1), S62–S70.

Jaishankar, J., Srivastava, P. (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–12.

Khatri, I., Tomar, R., Ganesan, K., Prasad, G., Subramanian, S. (2017). Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Scientific Reports*, 7 (1), 1-13.

Li, M., Sander, S., Duan, J., Rosencrance, S., Miksinski, S., Yu, L., Rege, B. (2016). Scientific and Regulatory Considerations in Solid Oral Modified Release Drug Product Development. *AAPS Journal*, 18(6), 1406–1417.

Maderuelo, C., Lanao, J., Zarzuelo, A. (2019). Enteric coating of oral solid dosage forms as a tool to improve drug bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*,

138(May), 105019.

Masco, L., Huys, G., De Brandt, E., Temmerman, R; Swings, J. (2005). Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology* 105: 221–230.

Meng, X., Stanton, C., Fitzgerald, G., Daly, C., Ross, R. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106(4), 1406–1416.

Moré, M.,Vandenplas, Y. (2018). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 Improves Intestinal Enzyme Function: A Trophic Effects Review. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, 11.

Pandey, K., Naik, S., Vakil, B. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587.

Plumpton, E., Gilbert, P., Fell, J. (1986). The survival of microorganisms during tableting. *International Journal of Pharmaceutics*, 30(2–3), 241–246.

Porter, S; Bruno, C. (1990). Coating of pharmaceutical dosage forms, in: H.A. Lieberman, L. Lachman, J.B. Schwartz (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms Tablets*, Dekker, New York, pp. 77–159.

Rathbone, Hadgraft, Roberts, Lane. (2008). *Modified-Release Drug Delivery Technology*, Second Edition, CRC Press.

Rubio, A; Hernández, E., Aguirre, A; Poutou, R. (2008). In vitro preliminary identification of probiotic properties of *S. cerevisiae* strains. *Revista MVZ Cordoba*, 13(1), 1157–1169.

Jaishankar, J., Srivastava, P. (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in Microbiology*.

Sahadeva, R., Leong, S., Chua, K., Tan, C., Chan, H., Tong, E., Chan, H. (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*, 18(4), 1515–1522.

Sarkar, S. (2010) Approaches for enhancing the viability of probiotics: A review. *British Food Journal*, 112 (4), 329-349.

Siew, A. (2016). Dissolution testing. *Pharmaceutical Technology*, 40(11), 56–64.

Sreeja, V., Prajapati, J. (2013). Probiotic Formulations: Application and Status as Pharmaceuticals-A Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5(2), 81–91.

Suez, J., Zmora, N., Segal, E., Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*, 25(May).

Seitz, J. (1987). *Tablet coating. The theory and practice of industrial pharmacy*, Lachman L, Lieberman H, Kanig J, Varghese publishing house.

Siew, A. (2016). Dissolution testing. *Pharmaceutical Technology*, 40(11), 56–64.

Tanangteerapong, D. (2014). *Understanding the physiology of probiotic yeast cells under*

different formulation, processing and environmental conditions.

Thakral, S., Thakral, N., Majumdar, D. (2013). Eudragit®: A technology evaluation. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(1), 131–149.

Tomicic, Z., Colovic, R., Cabarkapa, I., Vukmirovic, D., Djuragic, O., Tomicic, R. (2016). Beneficial properties of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Food and Feed Research*, 43(2), 103–110.

Thursby, E., Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836.

Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S., Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1–4), 187–216.

Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 101(1), 29–39.

Vanhee, L., Goemé, F., Nelis, H., Coenye, T. (2010). Quality control of fifteen probiotic products containing *Saccharomyces boulardii*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1745–1752.

Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P., Reinheimer, J. (2011). Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2(MAY), 1–6.

Wackett, L. (2010). Microbial stress responses. *Environmental Microbiology*, 12(5), 1374–1375.

Wang, R., Conner, D., Li, B. (2017). Bioavailability and Bioequivalence Aspects of Oral Modified-Release Drug Products. *AAPS Journal*, 19(2), 360–366.

Yang, L., Chu, J., Fix, J. (2002). Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 235(1–2), 1–15.