



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Microencapsulación del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* mediante secado por aspersión con polímeros Eudragit®

Trabajo de Titulación, Modalidad: Proyectos de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Jessica Katherine Lozada López

Tutor: PhD. Orestes Darío López Hernández

Ambato - Ecuador

Enero - 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Orestes López Hernández

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de éste Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 26 de enero del 2021

.....

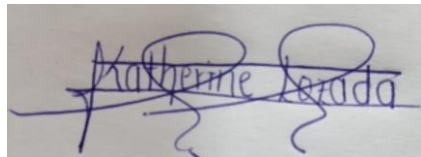
PhD. Orestes López Hernández

C.I. 175478486-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jessica Katherine Lozada López, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, Modalidad Proyectos de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored surface. The signature reads "Jessica Katherine Lozada López" and is written in a cursive, somewhat stylized script. The name is written in a single line, with the first and last names being more prominent.

Jessica Katherine Lozada López

180440265-7

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman

.....

PhD. Liliana Cerda Mejía

Presidente del Tribunal

.....

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

171434885-9

.....

PhD. Jeanette Verónica Carrera Cevallos

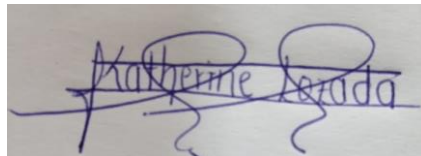
1716192271

Ambato, 26 de enero del 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored surface. The signature reads "Katherine Lozada" and is written in a cursive, somewhat stylized script. The name "Katherine" is written in a larger, more prominent font than "Lozada".

Jessica Katherine Lozada López

180440265-7

AUTORA

DEDICATORIA

"El Señor es mi roca y mi fortaleza; es mi libertador y es mi Dios, es la roca que me da seguridad; es mi escudo y me da la victoria"

Salmos 18,3

Con mucho amor a mis padres, Humberto y Patricia, por ser mi apoyo incondicional, mi ejemplo de lucha y perseverancia. Gracias porque han visto lo peor de mí y aun así me aman y protegen. Este sueño lo iniciamos juntos y al fin lo hemos logrado. Los amo con todo mi ser.

A mi único hermano, Julio, por ser mi cómplice de aventuras y protector. Gracias por todo el apoyo recibido.

A mi abuelita, Beatriz, mi ángel en la tierra.

KATHERINE

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser tan generoso conmigo por medio de la salud y la vida y por darme a tan hermosa familia.

A mis Padres, Humberto y Patricia, por ser mi pilar fundamental y apoyarme tanto económica como emocionalmente.

A mi único hermano, Julio, por comprenderme y ser paciente conmigo.

Al Sacerdote Marco Antonio Villalva por ser mi guía y consejero espiritual, por su comprensión y apoyo durante los últimos años de mi vida.

A mí estimado tutor, PhD Orestes López, por la confianza deposita en mí y su apoyo en la realización del presente trabajo de investigación.

Al PhD. Carlos Barba y la PhD. Linda Guamán por su ayuda con la obtención del microorganismo probiótico utilizado en el presente trabajo de Investigación.

A mí querida amiga y compañera Evelyn López, por su comprensión y ayuda durante estos años de estudio, además, por su colaboración en el proceso del trabajo experimental.

A mis hermanas de corazón, Jessica y Paola, por su amistad incondicional, sus consejos y por todos los momentos llenos de risas y diversión.

KATHERINE

ÍNDICE GENERAL

PÁGINAS PRELIMINARES

| | |
|---|------------|
| PORTADA..... | i |
| aprobación del tutor..... | IIi |
| DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD..... | III |
| APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO | IV |
| DERECHOS DE AUTOR..... | V |
| DEDICATORIA | VI |
| AGRADECIMIENTOS | VII |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

| | |
|------------------------------------|----------|
| 1.1. TEMA DE INVESTIGACIÓN..... | 3 |
| 1.2. JUSTIFICACIÓN | 3 |
| 1.3. OBJETIVOS | 5 |
| 1.3.1. Objetivo General | 5 |
| 1.3.2. Objetivos Específicos | 5 |

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

| | |
|--|----------|
| 2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS | 6 |
|--|----------|

| | |
|---|----|
| 2.1.1.1 Funciones de los probióticos | 6 |
| 2.1.1.2. Enfermedades contrarrestadas por Probióticos | 7 |
| 2.1.2.1 Levaduras como probióticos..... | 10 |
| 2.1.3.1. Ventajas y desventajas del Secado por Aspersión..... | 12 |
| 2.1.3.2. Parámetros de Operación..... | 12 |
| 2.1.3.3. Microencapsulación de Probióticos..... | 13 |

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---|-----------|
| 3.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS | 16 |
| 3.1.1. Recursos materiales..... | 16 |
| 3.1.1.1. Material Microbiano..... | 16 |
| 3.1.1.2. Material de laboratorio. | 16 |
| 3.1.2. Equipos de laboratorio..... | 16 |
| 3.2. METODOLOGÍA | 17 |
| 3.2.1. Preparación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> | 17 |
| 3.2.2. Microencapsulación por Secado de Aspersión..... | 19 |
| 3.2.3. Determinación de la Viabilidad de los microencapsulados | 19 |
| 3.2.4. Análisis Experimental para determinar el polímero más eficiente | 19 |
| 3.2.5. Formulación del microencapsulado en cápsulas duras | 20 |

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|---|-----------|
| 4.1. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 22 |
| 4.1.1. Rendimiento de Microencapsulación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.2. Análisis estadístico del rendimiento de microencapsulación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> | 24 |
| 4.1.3. Viabilidad de los microencapsulados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> por difusión en placa | 26 |
| 4.1.4. Análisis Estadístico de la Viabilidad de los Microencapsulados de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> | 27 |
| 4.1.5. Formulación de cápsulas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> | 29 |
| 4.1.4. Análisis Estadístico de la Formulación de cápsulas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> | 31 |

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 5.1. CONCLUSIONES | 34 |
| 5.2. RECOMENDACIONES | 35 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Taxonomía de <i>saccharomyces boulardii</i> | 9 |
| Tabla 2. Clasificación de polímeros eudragit® | 14 |
| Tabla 3. Polímeros eudragit® y su concentración polímero: levadura | 18 |
| Tabla 4. Rendimiento del proceso de microencapsulación de <i>saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Boulardii</i> | 22 |
| Tabla 5. Viabilidad de <i>saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Boulardii</i> por el método de difusión en placa. | 26 |
| Tabla 6. Formulación de cápsulas de <i>saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Boulardii</i> | 20 |
| Tabla 7. Tiempo de desintegración de las cápsulas de <i>s. Boulardii</i> formuladas..... | 29 |
| Tabla 8. Análisis de varianza del tiempo de degradación | 32 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Funciones de los microorganismos probióticos..... | 7 |
| Figura 2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Boulardii</i> bajo un microscopio electrónico..... | 10 |
| Figura 3. Relación de la concentración de la levadura <i>s. Boulardii</i> con respecto al rendimiento de microencapsulación..... | 23 |
| Figura 4. Gráfico de medias del rendimiento del proceso de microencapsulación de <i>saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Boulardii</i> . Intervalos de confianza hsd tukey al 95 %..... | 25 |
| Figura 5. Gráfico de medias de la viabilidad de microencapsulados de <i>saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Boulardii</i> . Intervalos de confianza hsd tukey al 95 %..... | 28 |
| Figura 6. Relación de la composición de las formulaciones de <i>s. Boulardii</i> y tiempo de desintegración..... | 31 |
| Figura 7. Tiempo de desintegración de las cápsulas de <i>s. Boulardii</i> formuladas. Nivel de confianza: 95%. | 33 |

RESUMEN

Saccharomyces cerevisiae var. boularii es una levadura no patógena, no sistémica, resiste pH ácidos, su temperatura óptima de crecimiento es de 37 grados centígrados. Es considerada un probiótico ya que genera enzimas capaces de degradar las toxinas producidas por agentes patógenos dentro del intestino humano. Se realizó la microencapsulación mediante secado por aspersión de la levadura antes mencionada con polímeros de recubrimiento entérico Eudragit® (L-100, S-100, L-10055) utilizando un mini Spray Dryer (BUCHI-B290) a una temperatura de entrada del aire de 120 grados centígrados y una temperatura de salida del aire de 70 grados centígrados

Se calculó el rendimiento del proceso y por medio de análisis estadístico se determinó que el polímero más adecuado para microencapsular esta levadura fue el L-100 con un valor del 53,41 por ciento. Para analizar la viabilidad de los microencapsulados se realizó la técnica de difusión en placa, por medio de la cual se determinó que el polímero más viable fue el L-100 con una concentración 60:40(polímero: levadura) y cuyo valor fue igual a $2,5 \times 10^{10}$ UFC por cada gramo de microencapsulado. Se formuló cápsulas duras de *Saccharomyces cerevisiae var. boularii* con su respectivo análisis de liberación del principio activo, por medio de lo cual se determinó que la mejor formulación contenía: 53 por ciento de microencapsulados de levadura, 1 por ciento de sodio almidón glicolato, 1 por ciento de dióxido de silicio coloidal y 20 por ciento de maltodextrina microgranulada y cuyo tiempo de desintegración fue igual a 13,50 minutos.

Palabras claves: *Saccharomyces cerevisiae var. boularii*, polímeros Eudragit®, viabilidad, formulación, tiempo de degradación.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae var. *boularii* is a non-pathogenic, non-systemic yeast, resists acidic pH, its optimum growth temperature is 37. It is considered a probiotic as it generates enzymes capable of degrading toxins produced by pathogens within the human intestine. Microencapsulation was performed by spray drying the aforementioned yeast with Eudragit® enteric coating polymers (L-100, S-100, L-10055) using a mini Spray Dryer (BUCHI-B290) at an inlet air temperature 120 and an outlet air temperature of 70.

The yield of the process was calculated and by means of statistical analysis it was determined that the most suitable polymer to microencapsulate this yeast was L-100 with a value of 53,41 percent. To analyze the viability of the microencapsulates, the plate diffusion technique was performed, by means of which it was determined that the most viable polymer was L-100 with a concentration of 60:40 (polymer: yeast) and whose value was equal to 2.5×10^8 CFU for each gram of microencapsulate. Hard capsules of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boularii* with its respective analysis of release of the active principle, by means of which it was determined that the best formulation contained: 53 percent of yeast microencapsulates, 1 percent of sodium starch glycolate, 1 percent of colloidal silicon dioxide and 20 percent of maltodextrin microgranulated with and whose desintegration time was equal to 13,50 minutes.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae* var. *boularii*, Eudragit® polymers, viability, formulation, degradation time.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. TEMA DE INVESTIGACIÓN

“Microencapsulación del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* mediante secado por aspersión con polímeros Eudragit®”.

1.2. JUSTIFICACIÓN

El tracto gastrointestinal humano es el hábitat natural de una gran cantidad de microorganismos cuya evolución continua ha permitido su adaptación. Estos pueden ser muy beneficiosos para la salud al mantener la homeostasis intestinal, sin embargo, existen bacterias patógenas que producen enfermedades digestivas al huésped (Arribas, Camuesco, Rodríguez, Zarzuelo, & Gálvez, 2008). Las enfermedades principales son: intolerancia a la lactosa, diarrea, gastroenteritis, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y úlcera gastroduodenal (Doménech & Mañé, 2006). En el Ecuador la enfermedad de diarrea y gastroenteritis aguda representan la tercera causa de morbilidad en la población, con un porcentaje de incidencia del 18,89 % (INEC, 2014).

A raíz de esto surgió la necesidad de utilizar alimentos funcionales que eliminen las bacterias patógenas del intestino. Los probióticos forman parte de este grupo de alimentos ya que contienen una cantidad exacta de microorganismos benéficos para la salud humana y cuyas funciones son: prevenir y contrarrestar enfermedades gastrointestinales, modificar la respuesta inmunitaria, reducir colesterol, entre otros (Anesto, De Las Cagigas, & Blanco, 2002). Los microorganismos que se utilizan principalmente corresponden a los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que producen ácido láctico, sin embargo, las levaduras del género de *Saccharomyces* han sido utilizadas recientemente, siendo *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* más eficiente al producir proteasas que destruyen a los patógenos (Bravo, Bunout, Leiva, De La Maza, Barrera & Hirsch, 2008).

En base a la información anterior se formuló el trabajo de investigación con el fin de aportar al desarrollo académico, científico e industrial por medio del análisis de la viabilidad y capacidad probiótica que tiene *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* microencapsulada con polímeros de recubrimiento entérico.

El secado por aspersión se fundamenta en la atomización de un líquido generando gotas microscópicas que al interactuar con aire caliente se transforman en un polvo. La calidad del producto final es dependiente de las condiciones iniciales de operación, siendo las más principales la temperatura de entrada y salida del flujo de aire, la temperatura de alimentación, la dimensión de las microgotas y la velocidad del aire (**I Ré , 1998**). Es una técnica muy utilizada en la industria biotecnológica, agroquímica, farmacológica y alimentaria; mantiene las propiedades físico-químicas del microorganismo evitando un estrés térmico ya que las células son inactivadas por la pérdida directa del agua, sin embargo, para llevar a cabo este proceso es necesario agentes de microencapsulación que protejan a las células (**Suárez & López, 2019**).

Los polímeros de recubrimiento entérico mantienen la viabilidad de un microorganismo, además, tienen la capacidad de resistir la actividad de los flujos gástricos, se disuelven en un valor de pH exacto que por lo general es cercano a 7 y cumplen las siguientes funciones: prevenir la degradación gástrica de un fármaco, evitar náuseas o vómitos y controlar la velocidad de adsorción (**Alpizar & Hernández, 2004**). La marca Eudragit® produce polímeros derivados del ácido metilacrílico dependientes del pH al contener distintos grupos funcionales lo cual hace que la liberación del fármaco sea inmediata o retardada; existen dos tipos aniónicos Eudragit® L y Eudragit® S que presentan mayores propiedades para enmascarar, siendo estos los más utilizados (**Blázquez & Córdova , 2018**).

1.3.OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

Microencapsular *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* mediante secado por aspersion con polimeros de recubrimiento entérico Eudragit® (L-100, L-100-55 y S-100).

1.3.2. Objetivos Especificos

1. Estudiar el efecto de los polimeros de recubrimiento entérico Eudragit® sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* microencapsulada.
2. Determinar el polimero de recubrimiento entérico Eudragit® más eficiente para la microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*
3. Formular el microencapsulado en cápsulas duras.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

2.1.1. PROBIÓTICOS

La organización mundial de la salud define un probiótico como un microorganismo vivo con efectos beneficiosos para la salud humana. Las características que deben cumplir son: ser de origen animal debido a su facilidad de adaptación en el intestino y su baja patogenicidad, además, de ser resistentes a condiciones ambientales. Los microorganismos más utilizados como probióticos pertenecen al género de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, sin embargo, algunas levaduras del género *Saccharomyces* han sido incorporadas a este grupo (**Villena, Morales, Gallardo , & Ruiz , 2009**).

2.1.1.1 Funciones de los probióticos

- **Competición frente a bacterias patógenas.-** previenen la unión al epitelio intestinal e inhiben la replicación y acción de bacterias perjudiciales para la salud humana por medio de 2 mecanismos. El primero se basa en la variación del pH del medio gracias a la liberación de ácidos orgánicos (lactato, propionato, butirato o acetato) producidos en la fermentación de fibras que se encuentran ya en el intestino, además, estos compuestos pueden servir como nutrientes cuando la mucosa intestinal sufre algún daño. El segundo mecanismo se basa en la liberación de compuestos antibacterianos (bacteriocinas, toxinas antimicrobianas protéicas, colicinas, mictrocinas, peróxido de hidrógeno o antibióticos como la nisina) los cuales inhiben el crecimiento del patógeno (**Arribas, Camuesco , Rodríguez, Zarzuelo, & Gálvez, 2008**).

- **Incremento de la función de la barrera intestinal.-** el epitelio intestinal o barrera intestinal está formado principalmente por la monocapa de epitelio, recubrimiento de moco y uniones estrechos que mantienen unidos a

enterocitos que impiden el ingreso de patógenos o compuestos provenientes de estos. La función probiótica está relacionada con la modulación de la respuesta antiinflamatoria dentro del intestino, normalizan la permeabilidad e incrementan la formación de nuevas células (Hernández, Coronel, Monge, & Quintana C, 2015).

- **Inmunomodulación.**- activan la respuesta inmunitaria en el intestino e incluso en el sistema inmune completo, al inducir la formación de distintas células involucradas en este proceso (TLR9, interleucinas, inmunoglobulinas, células K, entre otros) dependiendo del microorganismo probiótico (Arribas, Camuesco, Rodríguez, Zarzuelo, & Gálvez, 2008).

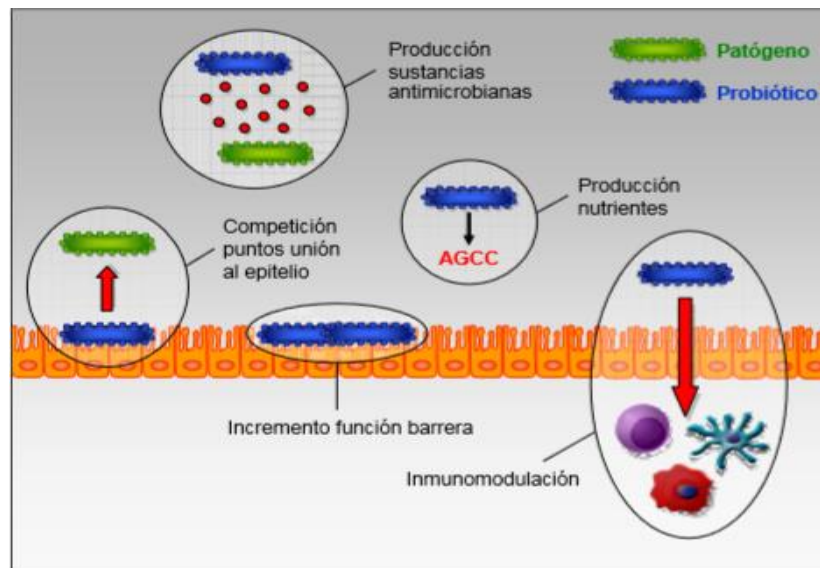


Figura 1. Funciones de los microorganismos probióticos

2.1.1.2. Enfermedades contrarrestadas por Probióticos

Los probióticos son capaces de generar múltiples beneficios para la salud humana, sin embargo, se ha demostrado que dichos beneficios son dependientes del microorganismo utilizado (FAO, 2006). A continuación se muestran algunas

enfermedades sobre las cuales se ha evidenciado un efecto positivo al consumir probióticos:

- **Diarrea Aguda.-** puede ser causada por rotavirus, bacterias y la que aparece luego del consumo de antibióticos. Al utilizar probióticos se reduce la severidad y el tiempo de la enfermedad estén o no acompañados de un tratamiento de hidratación. Los microorganismos más importantes en el control de dicha afección pertenecen al género de *Lactobacillus* (**Manzano, Estupiñan, & Poveda, 2012**).
- **Estreñimiento.-** afección en la cual las deposiciones de heces fecales semanales son menor a 3, por lo general, se produce también dolor y distensión abdominal. Los probióticos actúan al incrementar las deposiciones fecales, mejor consistencia, buen olor y disminución del dolor del abdomen (**FAO, 2006**).
- **Síndrome del Intestino Irritable (SII).-** afección con mayor índice de aparición en las personas, presenta: incremento en las deposiciones fecales, variación en la consistencia de las heces fecales, dolor abdominal e hinchazón. Al igual que en la enfermedad de diarrea aguda los beneficios de los probióticos son similares, adicionándole la disminución de gases y equilibrando la microbiota intestinal (**Manzano, Estupiñan, & Poveda, 2012**).
- **Intolerancia a la Lactosa.-** los alimentos que contienen lactosa no pueden ser digeridos por el intestino provocando: dolor del abdomen, náuseas, diarrea. Los probióticos y de manera especial los que pertenecen al género de *Lactobacillus* disminuyen los efectos provocados por esta afección al contener en su estructura lactasas que permite la digestión de alimentos lácteos (**Doménech & Mañé, 2006**).

2.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulevardii*

Es una levadura no patógena, no sistémica y termoresistente, ya que su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C. Fue aislada en 1923 de los frutales de lichi por el francés Henry Boulard durante la epidemia del cólera (Czerucka, Piche, & Rampal, 2007). Según McFarland & Bernarsconi (1993), la clasificación taxonómica de esta levadura es:

Tabla 1. Taxonomía de *Saccharomyces bouvardii*

| | |
|--------------------|----------------------|
| Dominio | Eucariota |
| Reino | Fungi |
| División | Ascomycota |
| Subdivisión | Saccharomycotina |
| Clase | Saccharomycetes |
| Orden | Saccharomycetales |
| Familia | Saccharomycetaceae |
| Género | <i>Saccharomyces</i> |
| Especie | <i>S. bouvardii</i> |

La pared celular de este tipo de levadura está compuesta por polisacáridos en una concentración del 30-60 %, donde la manosa y galactosa constituyen más de 50 µg/mg de masa de levadura (Badia, Zanella, Chevalere, Lizardo, Meurens, Martínez, Brufau & Salmon, 2012).



Figura 2. *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* bajo un microscopio electrónico (Billoldo, 2019)

2.1.2.1 Levaduras como probióticos

A pesar de que *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* pertenece a la misma especie que *Saccharomyces cerevisiae* estas difieren en su metabolismo y fisiología, es por ello que solamente la primera es considerada como medicamento probiótico. Estudios han demostrado que no degrada la galactosa, pero es capaz de resistir a pH ácidos presentes en el sistema gastrointestinal y por su temperatura óptima de crecimiento es capaz de adaptarse al intestino delgado del ser humano cuya temperatura es la misma (Czerucka, Piche, & Rampal, 2007) .

Al igual que las demás bacterias probióticas *S.boulardii* genera un efecto beneficioso para la salud humana, gracias a la producción de enzimas (fitasa y ácidos grasos de cadena corta) encargados de degradar los quelatos y las toxinas producidas por agentes patógenos, así como también es capaz de generar una respuesta inmune. Estos beneficios tienen una relación directa con la concentración de la levadura en la dieta, cuando existen más de 10^3 ufc/g de alimento, generan un mal sabor debido a la fermentación del alimento y por lo tanto la producción de alcohol (Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz, 2015).

Esta levadura ha sido muy utilizada contra las enfermedades gastrointestinales generadas por antibióticos e inflamaciones del intestino delgado. Estudios realizados en ratones demostraron que los niveles de inmunoglobulina A dentro

del intestino incrementaron en 4,4 veces con respecto a ratones de control, lo cual involucra la degradación de toxinas patógenas gracias a que el anticuerpo antes mencionado estimula la producción de una serina proteasa (54 kDa) **(Castagliuolo, LaMont, Nikulasson , & Pothoulakis, 1996)**. Adicionalmente, tiene un alto poder antioxidante con un alto contenido de flavonoides y fenoles gracias a un ensayo de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo **(Datta, Timson, & Annapure, 2017)**.

2.1.3. Microencapsulación mediante secado por aspersión

Es el proceso mediante el cual sustancias activas son recubiertas por matrices poliméricas con el fin de mantener sus características organolépticas y químicas, además, se da una protección contra el calor y la humedad para obtener una mayor estabilidad y viabilidad. Es una técnica muy utilizada en la industria alimentaria, sin embargo, ha sido incorporada para otros productos tales como medicamentos y microorganismos **(Villena, Morales , Gallardo, & Ruiz , 2009)**. En esta operación unitaria se da la transformación de un líquido (solución, suspensión o emulsión) en una partícula sólida, inicia con la atomización del líquido en micro gotas las cuales son liberadas a una cámara de secado para que se convierta en un fino polvo para ser direccionado con una corriente de aire hacia un recolector, las partículas finales tienen un tamaño entre 1- 250 μm **(Fabela, 2017)** .

El producto final que se obtiene es dependiente del líquido que va a ser atomizado. Si se trata de una emulsión, donde existe una fase oleosa y otra acuosa el producto final generado es una microcápsula, estructura vesicular la cual tiene una pared y un núcleo bien definido. Por otro lado si se trata de una suspensión o disolución, lo cual genera microesferas donde el componente activo se encuentra en la pared y no tiene núcleo definido. Dependiendo de las condiciones del proceso también se pueden generar productos pegajosos, cuya estructura tiene forma irregular, y no se observa un fino polvo y por ende su manejo resulta ser muy complicado **(Fabela, 2017)**.

2.1.3.1. Ventajas y desventajas del Secado por Aspersión

El Secado por Aspersión tiene las siguientes ventajas:

- Se pueden microencapsular todo tipo de sustancias incluyendo aquellas que son sensibles al calor.
- Se tiene un control total de los parámetros de calidad del producto final.
- Equipo simple de fácil manejo, que puede ser utilizado a escala de laboratorio e industrial.
- Genera partículas totalmente esféricas, el tamaño puede variar pero depende de las condiciones de operación.
- Proceso aséptico y rápido
- Alta eficiencia
- Equipo de fácil limpieza y mantenimiento, la formación del polvo seco evita todo tipo de problemas corrosivos.
- Se pueden secar cantidades de producto relativamente grandes, gracias a que se trata de una operación continua.

(Coronel, Ciro, & Cárdenas, 2015)

Dentro de las desventajas se encuentra la alta inversión inicial del equipo, su diseño está incapacitado para la formación de microcápsulas de tamaño grande y a veces suele presentar problemas de recolección del producto final (Siccha & Lock de Ugaz, 2015).

2.1.3.2. Parámetros de Operación

Como se mencionó anteriormente las condiciones de operación iniciales son factores muy importantes para obtener una microcápsula o microesfera con una estructura bien definida. En un estudio realizado para la microencapsulación de una proteasa se utilizaron 5 temperaturas de entrada (80, 90, 100, 120 y 150 °C) y maltodextrina como polímero microencapsulante (proporción 50:50) siendo 100 °C la temperatura óptima para obtener el mejor rendimiento de microencapsulación. Tanto la temperatura de entrada como la de salida poseen una relación directa con el porcentaje de humedad que tendrá el producto final, cuando existe una

variación de temperatura grande (ΔT) el ingreso de agua es mayor, por lo sería probable que el agua sea contenido por la microcápsula para que finalmente se vea evidenciada en la humedad del producto final (**Díaz, Serna, Torres, & Hoyos, 2016**).

La viscosidad del líquido que va a ingresar al equipo es uno de los parámetros más importantes, este valor nunca debe ser mayor a 250 cp. Si el líquido tiene un alto contenido de proteínas, enzimas como la lactosa y un alto porcentaje de sólidos totales la viscosidad tiende a incrementar, para la cual se debe incrementar la velocidad de atomización del equipo (**Ruiz, 2013**).

El flujo de aire de atomización por su parte posee una relación directa con el tamaño de partícula del producto final, a mayor flujo de aire de atomización menor tamaño de partícula, mientras que a menor flujo de aire de atomización mayor tamaño de partícula (**Ruiz, 2013**).

2.1.3.3. Microencapsulación de Probióticos

Este método es capaz de mantener la viabilidad de los microorganismos, incluyendo el probiótico *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* sin afectar ninguna de sus rutas metabólicas proporcionadas por las matrices poliméricas utilizadas, siempre y cuando las temperaturas de entrada y salida sean las más efectivas y no dañen la estructura probiótica (**Suárez & López, 2019**). Un estudio realizado en base a las características probióticas de la levadura antes mencionada demostró un mayor rendimiento de microencapsulación por la técnica de secador por aspersión con una mezcla de polímeros de goma arábiga y proteína de suero de leche (proporción 1:3) a una temperatura de entrada de 125 °C y una temperatura de salida de 80 °C (**Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz, 2015**). Además de los polímeros antes mencionados se pueden utilizar otros dentro de los cuales se incluyen proteínas, polisacáridos, azúcares o alguna combinación de estos son por lo general muy útiles para la microencapsulación de microorganismos probióticos (**Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz, 2015**).

2.1.4. Polímeros EUDRAGIT®

Son un grupo de polímeros cuyo origen radica en el ácido metacrílico con distintas formas iónicas. Son dependientes del pH, es decir tienen la capacidad de disolverse a un pH único, facilitando los procesos de disolución en el sistema gastrointestinal, es por ello que su uso facilita las formulaciones de la industria farmacéutica (Villamizar & Martínez , 2008). Este tipo de polímeros son muy útiles para la liberación inmediata o ajustada de un fármaco, o a su vez, una liberación después de un tiempo, además de que se pueden combinar con muchas sustancias activas e incluso microorganismos (Evonik Industries, 2019). Son sustancias registradas por la USPNF (Farmacopea y Registro Nacional de los Estados Unidos), BP (Farmacopea Británica) y PhEur (Farmacopea europea) (Rodríguez & López, 2016). Según Evonik Industries (2019), la clasificación de estos polímeros es:

Tabla 2. Clasificación de Polímeros Eudragit®

| Polímeros Eudragit® | Tipo de liberación | Presentaciones |
|---|---------------------------|---|
| Copolímeros de metacrilato de aminoalquilo | Inmediata | E-100, E-12,5, EPO |
| Copolímeros de ácido metacrílico | Lenta | L-30, D-55, FS-30 D |
| Copolímeros de éster metacrílico | Retardada | L-100-55, L-100, L-12,5, S-100, S-12,5, FS-30 D, etc. |
| Copolímeros de metacrilato de amonioalquilo | Controlada por Tiempo | RL-100, RL-PO, RL-30 D, RL-12,5, RL-30, RS-100, RS-PO, NE-30 D, NE-40 D, etc. |

Los copolímeros de éster metacrílico: L-100, L-100-55 y S-100 son aniónicos con presentación en forma de polvo blanco. Proporciona un revestimiento entérico y eficaz para fármacos con liberación intestinal debido a su dependencia al pH del

medio en que se encuentre (**Rodríguez & López, 2016**). A continuación se muestran algunas características de cada uno:

- **L-100.-** Compuesto por metacrilato de amonio, se disuelve a un pH igual a 6, soluble en el fluido intestinal específicamente en el yeyuno.
- **L-100-55.-** Compuesto por ácido metacrílico y acrilato de etilo, se disuelve a un pH igual a 5,5, soluble en el flujo intestinal del duodeno.
- **S-100.-** Compuesto por ácido metacrílico, se disuelve a un pH igual a 7, soluble en el flujo intestinal del íleon.

(Evonik Industries, 2019)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.1.1. Recursos materiales

3.1.1.1. Material Microbiano.

- Cepa de *Saccharomyces boulardii*

3.1.1.2. Material de laboratorio.

- Material de vidrio GLASSCO.
- Biorreactores de tanque agitado de 500, 3000 y 5000 ml de capacidad
- Papel aluminio (Home club)
- Papel filtro (Whatman)
- Puntas de micropipeta (CRM Globe)
- Botellas de tapa azul (Duran 250 mL)
- Asa Drigalsky
- Cajas Petri plásticas
- Tubos Falcon
- Lámpara de Alcohol

3.1.2. Equipos de laboratorio.

- Agitador vertical (THOMAS)
- Balanza de humedad (Citizen MB 200)
- Espectrofotómetro (Fisher Scientific accuSkan GO)
- mini Spray Dryer (BUCHI-B290)
- pH metro (Thermo Scientific ORION VERSASTAR)
- Refractómetro (ABBE NAR-2T)
- Refrigerador (Indurama)
- Cámara de flujo laminar (ESCO Opti. MAIR)

- Shaker
- Autoclave (Hirayama HICLAVE™ HV-85)
- Incubadora
- Centrífuga (Rotina 380)
- Vórtex (Fisher)
- Plancha de Caletamiento (Corning PC-620D)

3.1.3. Reactivos.

- Agua destilada
- Etanol comercial al 96 % de pureza
- Caldo YPD (Difco™)
- Ácido clorhídrico
- Polímero S-100 (Eudragit)
- Polímero L-100 (Eudragit)
- Polímero L-10055 (Eudragit)
- Hidróxido de sodio
- Agar-agar (Difco™)
- Maltodextrina DE 10-20
- Dioxido de silicio coloidal (Aerosil 200V)
- Sodio almidón glicolato(Explotab)

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Preparación de *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*

Se preparó 500 mL de medio de cultivo YDP (50 g/L: 20 g peptona, 20 g extracto de levadura, 10 g dextrosa), se esterilizó en un autoclave Hirayama HICLAVE™ HV-85 durante 15 min a 121 °C y 15 psi (Pérez, Sinóliz, Torralba , & Vázquez, 2011). Se sembró la levadura pura a partir de una difusión en placa y se incubó por 48 horas a 37 °C y 200 min⁻¹ (Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz, 2015). Se centrifugó el caldo durante 25 min a 5 000 min⁻¹ en la centrífuga Rotina 380 (Suárez & López, 2019).

Se eliminó el líquido y se lavó la levadura por 3 veces con agua destilada para eliminar restos del medio de cultivo.

El peso seco de *Saccharomyces boulardii* se obtuvo por medio de la balanza de humedad Citizen MB 200 (Suárez & López, 2019), a partir de este dato se calculó la cantidad de polímero entérico a utilizar según la proporción que fue microencapsulada por medio de la siguiente fórmula:

$$g \text{ polímero} = \frac{g \text{ levadura} * \text{Concentración del polímero}}{\text{Concentración de levadura}}$$

Se pesó la cantidad calculada, se disolvió en agua destilada a una concentración del 25 % y se estabilizó el pH con un pH-metro Thermo Scientific ORION VERSASTAR cuyo valor dependió del polímero entérico a utilizar (Evonik Industries, 2019). Finalmente se mezcló la levadura lavada con una varilla de agitación de vidrio. Los polímeros a utilizar, pH de disolución y sus proporciones se detallan a continuación:

Tabla 3. Polímeros Eudragit® y su concentración polímero: levadura

| Polímero | pH de Disolución | Concentración polímero: levadura |
|----------|------------------|----------------------------------|
| S-100 | 7 | 70:30 |
| | | 60:40 |
| | | 50:50 |
| L-100 | 6,5 | 70:30 |
| | | 60:40 |
| | | 50:50 |
| L-100-55 | 5,5 | 70:30 |
| | | 60:40 |
| | | 50:50 |

3.2.2. Microencapsulación por Secado de Aspersión

La suspensión fue alimentada al equipo mini Spray Dryer (BUCHI-B290) con los siguientes parámetros de operación: flujo de aire de secado de 50 m³/h, flujo de alimentación de 500 L/h, temperatura de entrada del aire de 120 °C ± 2 °C y temperatura de salida del aire de 70 °C ± 2 °C (Suárez & López, 2019).

La suspensión de alimentación se agitó constantemente para evitar precipitación de la levadura. El producto se recolectó en una funda de LDPE pesada con anterioridad, luego se determinó el peso final del microencapsulado y el rendimiento del proceso de microencapsulación por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Rendimiento} = \frac{g \text{ microencapsulado final}}{g \text{ polímero} + g \text{ de levadura}} * 100 \%$$

3.2.3. Determinación de la Viabilidad de los microencapsulados

El estudio de la viabilidad de la levadura se realizó por medio de la técnica de difusión en placa. Se realizó una serie de disoluciones que fueron de 10⁻¹ hasta 10⁻⁷ o más dependiendo de la concentración. Se inoculó 100 µL de disolución en placas que contengan medio de cultivo YPD sólido y se incubó a 37 °C durante 48 horas (Ramírez & Castaño, 2009). Posteriormente se hizo el recuento del número de colonias y se determinó el número de unidades formadoras de colonia por cada gramo de microencapsulado por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{g \text{ microencapsulado}} = \frac{\# \text{ de colonias} * \text{factor de disolución} * \text{Volumen total}}{\text{Volumen de inoculación} * \text{peso de microencapsulado}}$$

3.2.4. Análisis Experimental para determinar el polímero más eficiente

En base a los resultados obtenidos del rendimiento de microencapsulación y la viabilidad de los microencapsulados se procederá a obtener tanto el polímero de

recubrimiento entérico Eudragit® más eficiente, así como, su óptima concentración. Esto se llevará a cabo por medio del programa StatGrafics Centurion XV por medio de la herramienta de Análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza $p < 0.05$ (Suárez & López, 2019).

3.2.5. Formulación del microencapsulado en cápsulas duras

La formulación de la cápsula del probiótico de *S. boulardii* tuvo los siguientes componentes: Ingrediente activo (Microencapsulado de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*), desintegrante (Sodio almidón glicolato- Explotab), anticompactante (Dióxido de silicio coloidal- Aerosil 200V) y el relleno o coadyuvante de la fluidez (Maltodextrina microgranulada) (Rodríguez , Pérez , Escalona , Iraizoz , & Lafourcade, 2014). Las concentraciones se detallan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Formulación de cápsulas de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*.

| No. Corrida | Ingrediente Activo (%) | Desintegrante (%) | Anticompactante (%) | Relleno y coadyuvante de la fluidez (%) |
|-------------|------------------------|-------------------|---------------------|---|
| 1 | 78 | 1 | 1 | 20 |
| 2 | 78 | 5 | 1 | 16 |
| 3 | 78 | 1 | 6 | 16 |
| 4 | 78 | 5 | 5 | 12 |
| 5 | 53 | 1 | 1 | 45 |
| 6 | 53 | 5 | 1 | 41 |
| 7 | 53 | 5 | 1 | 41 |
| 8 | 53 | 5 | 5 | 37 |

A partir de esto se mezclaron los polvos en fundas de HDPE, se pesaron 400 mg y se colocaron en cápsulas duras formato 0E. Posteriormente para determinar el tiempo de desintegración, las cápsulas fueron colocadas en un vaso de precipitación con

500 ml de jugo intestinal simulado con agitación a 150 min^{-1} y se midió el tiempo con un cronómetro a partir de la adición de la cápsula hasta su total desintegración, se realizaron tres réplicas por cada una (**Calvo, Esquisabel , Hernández , & Igartua , 2015**).

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1.1. Rendimiento de Microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

El rendimiento de microencapsulación es un parámetro muy importante para estimar los costos de producción, ya que indican el número de microesferas obtenidas luego de alimentar al mini Spray Dryer cierto volumen de suspensión (polímero+levadura). El agua no cumple un papel fundamental en la estimación de este parámetro debido a que se evapora casi en su totalidad dentro del equipo de secado por aspersión (Pastuña & López, 2016). A continuación se presentan los resultados de rendimiento luego de microencapsular la levadura *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* con distintas matrices poliméricas Eudragit® a distintas concentraciones.

Tabla 4. Rendimiento del proceso de Microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

| Polímero Eudragit® | Concentración Levadura (%) | Peso de Microencapsulado (g) | Peso teórico (g) | Rendimiento (%) |
|-------------------------------|---------------------------------------|---|-----------------------------|----------------------------|
| S-100 | 30 | 4,10 | 8,3 | 49,40 |
| | 40 | 3,83 | 10 | 38,30 |
| | 50 | 4,12 | 12,3 | 33,50 |
| L-100 | 30 | 2,90 | 5,43 | 53,41 |
| | 40 | 3,51 | 7,67 | 45,76 |
| | 50 | 3,02 | 7,62 | 39,63 |
| L-100-55 | 30 | 4,92 | 10,59 | 46,46 |

| | | | | |
|--|----|------|------|-------|
| | 40 | 2,00 | 4,76 | 42,02 |
| | 50 | 2,32 | 6,44 | 36,02 |

En la **Tabla 4.** se observa que bajo los mismos parámetros de operación, temperatura de entrada del aire de $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y temperatura de salida del aire de $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ se obtienen un rendimiento igual a 53,41 % cuando se utiliza el polímero de recubrimiento entérico Eudragit® L-100 a una concentración del 70 % y levadura al 30 %. Bajo esta misma relación de polímero: levadura le prosigue el polímero Eudragit® S-100 y posteriormente el L-100-55 con valores de rendimiento 49,40 % y 46,46 % respectivamente.

En una investigación realizada por **Araujo & Ruiz (2016)**, se trabajó con probióticos pertenecientes al género *Lactobacillus* bajo la técnica de secado por aspersión donde obtuvieron un rendimiento del 86 % al trabajar a una temperatura de entrada de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual confirma que los parámetros de operación inicial utilizados en la presente trabajo de investigación son los adecuados para obtener un mejor rendimiento de microencapsulación del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*.

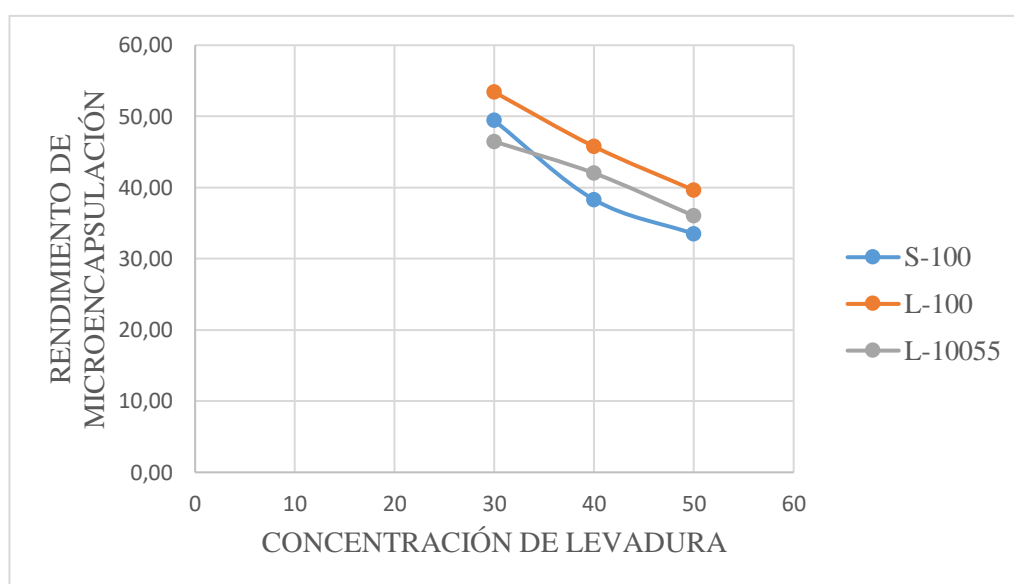


Figura 3. Relación de la concentración de la levadura *S. boulardii* con respecto al rendimiento de microencapsulación

En cada uno de los polímeros Eudragit® utilizados ocurre un comportamiento similar (**Figura 3.**), el rendimiento disminuye conforme incrementa el porcentaje de levadura siendo la concentración más óptima en todos los casos la 70:30 (polímero: levadura).

En una investigación realizada por **Suárez & López (2019)**, se microencapsuló la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con otras matrices poliméricas tales como goma arábica, malto dextrina y lactosuero obteniéndose un 75,33 % como mejor rendimiento al utilizar malto dextrina y levadura a la misma concentración (50:50), sin embargo no existe una relación directa entre la concentración de levadura y el parámetro antes mencionado.

4.1.2. Análisis Estadístico del Rendimiento de Microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*.

Una vez calculado el rendimiento de microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* es necesario identificar si existe relación directa entre el polímero utilizado y la concentración de la levadura por medio de un análisis de varianza, resultados que se encuentran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Análisis de Varianza del Rendimiento de Microencapsulación

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Polímero | 58,3489 | 2 | 29,1744 | 9,11 | 0,0324 |
| B:Concentración de Levadura | 270,446 | 2 | 135,223 | 42,24 | 0,0020 |
| RESIDUOS | 12,8055 | 4 | 3,20138 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 341,601 | 8 | | | |

El ANOVA muestra que tanto el polímero de recubrimiento entérico Eudragit utilizado, así como, la concentración de levadura tienen un efecto significativo en el rendimiento del proceso de microencapsulación al ser los valores $-P < 0,05$.

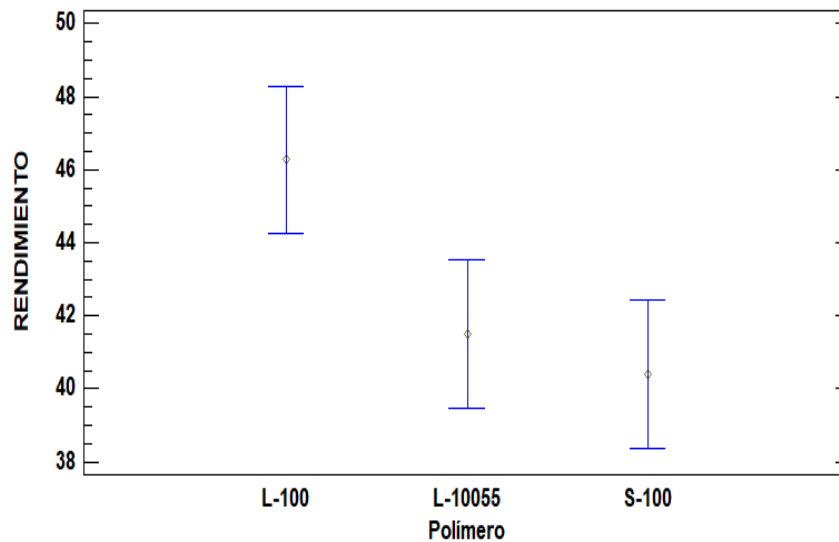


Figura 4. Gráfico de Medias del rendimiento del Proceso de Microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*. Intervalos de confianza HSD Tukey al 95 %.

En la **Figura 4.** Se observa que no existen diferencias significativas en el rendimiento de microencapsulación de *S. boulardii* al utilizar los polímeros Eudragit S-100 y L-10055, sin embargo, el polímero más idóneo por presentar los puntos más altos en el rendimiento es el L-100.

Rodríguez & López (2016), realizaron una investigación para evaluar la efectividad de los polímeros Eudragit® en el secado de aspersión de diclofenaco de sodio en la cual determinaron que el polímero que dio mayor rendimiento fue el L-100. **Córdova & López (2016)**, realizaron una investigación similar a la antes mencionada, pero en este caso utilizaron como principio activo al secnidazol, donde encontraron como polímero Eudragit® más eficiente al L-100. De esta manera se comprueba los resultados obtenidos en la presente investigación.

4.1.3. Viabilidad de los microencapsulados de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* por difusión en Placa

Los polímeros Eudragit® han sido ampliamente utilizados en la industria farmacéutica debido a su capacidad para mantener las propiedades físico-químicas del compuesto activo. Además permiten la conservación óptima de microorganismos (González, Fernández, Gómez, Núñez, & Lafita, 2005). Esto se pudo comprobar mediante el estudio de la viabilidad de *S. boulardii* luego de 60 días de su microencapsulación, resultados que se reflejan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* por el método de difusión en placa.

| POLÍMERO | CONCENTRACIÓN LEVADURA (%) | UFC/mL | UFC/g de microencapsulado |
|----------|----------------------------|---------|---------------------------|
| S-100 | 30 | 2,3E+09 | 2,1E+10 |
| | 40 | 2,7E+09 | 2,4E+10 |
| | 50 | 9,0E+08 | 8,1E+09 |
| L-100 | 30 | 2,5E+09 | 2,3E+10 |
| | 40 | 2,8E+09 | 2,5E+10 |
| | 50 | 1,0E+09 | 9,0E+09 |
| L-10055 | 30 | 1,0E+09 | 9,0E+09 |
| | 40 | 1,3E+09 | 1,2E+10 |
| | 50 | 5,0E+08 | 4,5E+09 |

Se verificó que el microorganismo no murió durante el proceso, siendo 2,5 E+10 UFC/g la concentración más alta de levadura perteneciente al polímero Eudragit® L-100 con una proporción igual a 60:40 (polímero: levadura). A este resultado le precede la concentración 2,4 E+10 UFC/g perteneciente al polímero Eudragit® S-100 con una proporción igual a 60:40 (polímero: levadura). El mejor resultado obtenido de UFC/g de microencapsulado obtenido contrasta con el de **Araujo & Ruiz (2016)**, en cuya investigación obtuvo una concentración de microorganismos probióticos igual a 6,5 E+09 UFC/g de microencapsulado bajo condiciones de operación similares.

Para que una composición probiótica sea considerada como tal es necesario que contenga una cantidad igual o mayor a 1 E+09 UFC/g (**González, Pérez, & Lena, 2015**); bajo este punto de análisis se comprueba que los microencapsulados obtenidos contienen una óptima concentración de *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*.

4.1.4. Análisis Estadístico de la Viabilidad de los Microencapsulados de *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*.

Para la selección del polímero más eficiente en la microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*, a parte del análisis estadístico del rendimiento de microencapsulación, fue necesario identificar si existe una relación directa entre el polímero utilizado y la concentración de levadura en la viabilidad del microorganismo, estos resultados se reflejan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Análisis de Varianza de la viabilidad de los Microencapsulados de *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Polímero | 1,9658E20 | 2 | 9,829E19 | 11,53 | 0,0218 |

| | | | | | |
|-----------------------------|------------|---|------------|-------|--------|
| B:Concentración de Levadura | 2,89147E20 | 2 | 1,44573E20 | 16,96 | 0,0111 |
| RESIDUOS | 3,40933E19 | 4 | 8,52333E18 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 5,1982E20 | 8 | | | |

En la tabla de ANOVA, se observa que tanto el polímero Eudragit® utilizado como la concentración de la levadura tienen un efecto significativo en la viabilidad de los microencapsulados, a un nivel de confianza del 95 %.

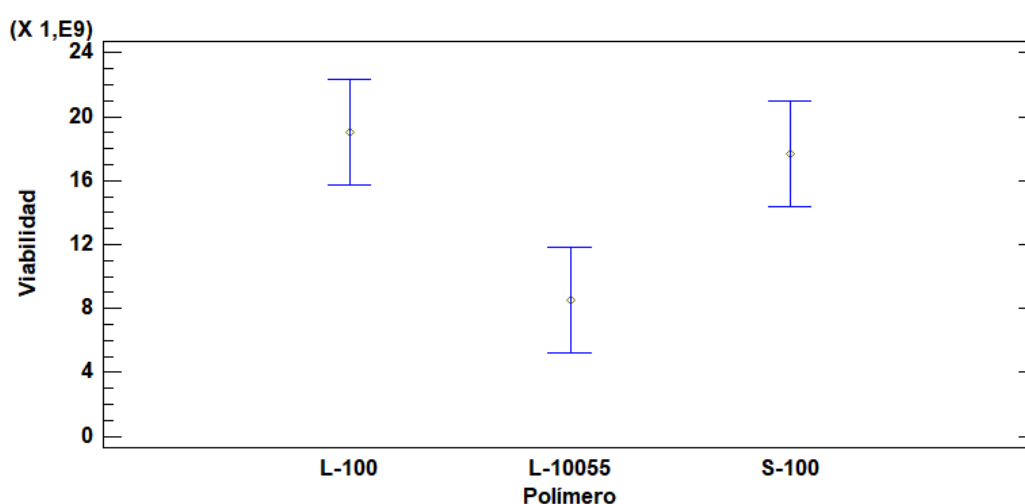


Figura 5. Gráfico de Medias de la viabilidad de microencapsulados de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Intervalos de confianza HSD Tukey al 95 %.

En la figura 5, se observa que no existen diferencias significativas entre los polímeros Eudragit® L-100 y S-100, sin embargo, con respecto al polímero L-10055 si existen diferencias significativas. Con base a la viabilidad, para el proceso de microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* se podría elegir entre el polímero L-100 y S-100, sin embargo, para corroborar con el análisis del rendimiento se escogió al polímero L-100.

La concentración de levadura óptima en todos los polímeros utilizados fue igual al 40 %. **Suárez & López (2019)**, en su investigación para microencapsular el probiótico *Saccharomyces cerevisiae* con el mismo proceso, determinaron que la

concentración de levadura más eficiente fue igual al 40 %, lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

González, Tarón & Morón (2015), en su estudio formaron microcápsulas del probiótico *Lactobacillus casei* por el método de gelación iónica, a pesar de que utilizaron otras matrices poliméricas determinaron que la concentración óptima de *Lactobacillus* fue igual al 40 %. Este resultado nuevamente concuerda con el obtenido en la presente investigación.

4.1.5. Formulación de cápsulas de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*.

Una vez determinado estadísticamente tanto el polímero de recubrimiento entérico Eudragit, así como, la concentración de levadura más eficientes se procedió a la formulación de cápsulas duras y analizar si las mismas tienen la capacidad de liberar a *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* microencapsulada.

La prueba de desintegración permitió conocer si las cápsulas formuladas en presencia de un medio líquido (fluido intestinal) tienen la capacidad de liberar al principio activo, en este caso la levadura *S. boulardii*. Esta prueba se utiliza principalmente en formulaciones que serán administradas oralmente y el tiempo máximo para su liberación es de 30 minutos (**OMS, 1980**). En la **Tabla 7**, se detallan los resultados obtenidos en esta prueba.

Tabla 8. Tiempo de desintegración de las cápsulas de *S. boulardii* formuladas

| No. Corrida | Tiempo de desintegración- Réplicas | | | Promedio |
|------------------------|---|----|----|-----------------|
| | (min) | | | |
| 1 | 13 | 14 | 13 | 13,50 |

| | | | | |
|---|----|----|----|-------|
| 2 | 21 | 25 | 23 | 23,00 |
| 3 | 17 | 15 | 19 | 17,00 |
| 4 | 22 | 24 | 23 | 23,00 |
| 5 | 9 | 11 | 8 | 9,33 |
| 6 | 12 | 15 | 11 | 12,67 |
| 7 | 8 | 10 | 13 | 10,33 |
| 8 | 13 | 15 | 11 | 13,00 |

Mientras más rápido se dé la liberación del principio activo dentro del organismo mayor eficiencia tendrá la formulación probiótica. En base a esto, el menor tiempo de desintegración se alcanza en la corrida 5, con un promedio igual a 9,33 min y la cual contiene el 53 % del principio activo. Seguido a este resultado está la corrida 7 con 10,33 min y con el mismo porcentaje de principio activo anterior. Después está la corrida 1, con 13,50 min y con el 78 % del principio activo. Con estos resultados se comprobó lo descrito por la OMS (1980), ya que todas las formulaciones liberaron la levadura antes de los 30 min establecidos. Es más recomendable el empleo de la composición 1 ya que permite contar con una mayor concentración del ingrediente activo.

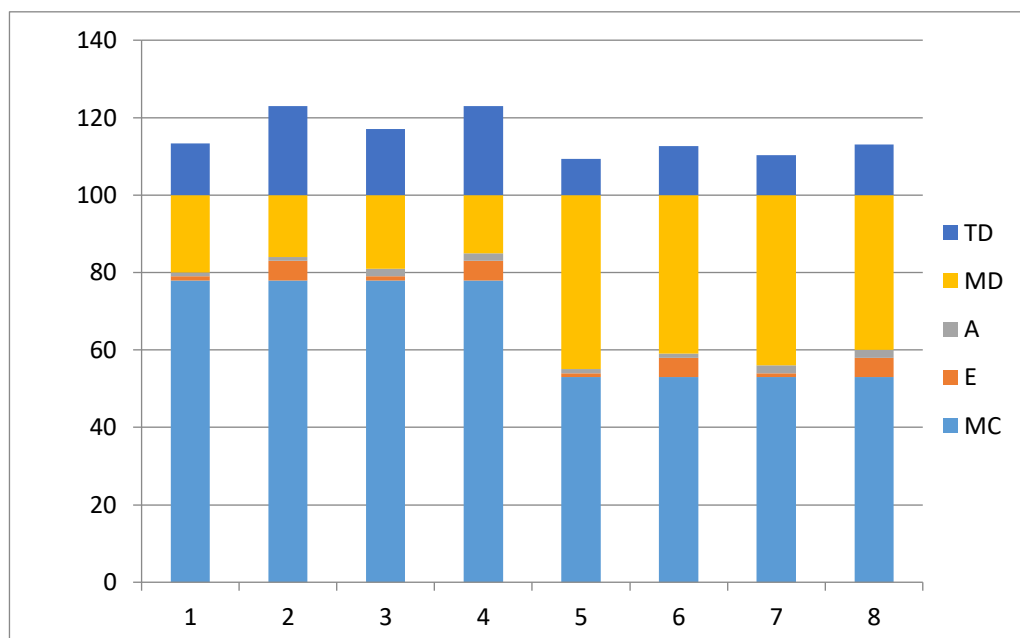


Figura 6. Relación de la composición de las formulaciones de *S. boulardii* y tiempo de desintegración.

En la **Figura 6**, se observa una relación directa entre la composición de las formulaciones de levadura y el tiempo de desintegración, es decir, a mayor concentración de levadura mayor tiempo de desintegración.

Franco, Matiz & Indira (2012), realizaron una investigación para comparar distintas formulaciones de fármacos comerciales que tenían como principio activo una sustancia química, en las pruebas de desintegración determinaron que la formulación más óptima se desintegró a 7,9 minutos y una concentración del principio activo igual al 65 %. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con la presente investigación, además señalan que mientras más concentración tenga el principio activo mejor es el tiempo de desintegración.

4.1.4. Análisis Estadístico de la Formulación de cápsulas de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*.

Las concentraciones de los distintos componentes de las cápsulas de *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* tienen una gran influencia en el tiempo de degradación de las mismas. Para comprobar esto, se realizó un análisis estadístico cuyos resultados se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Análisis de Varianza del Tiempo de Degradación

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 593,292 | 7 | 84,756 | 25,75 | 0,0000 |
| Intra grupos | 52,6667 | 16 | 3,29167 | | |
| Total (Corr.) | 645,958 | 23 | | | |

A un nivel de confianza del 95 % existen diferencias significativas entre la concentración del ingrediente activo (Microencapsulado de *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii*), desintegrante (Sodio almidón glicolato- Explotab), anticompactante (Dióxido de silicio coloidal- Aerosil 200V) y el relleno o coadyuvante de la fluidez (Maltodextrina microgranulada) en relación con el tiempo de degradación.

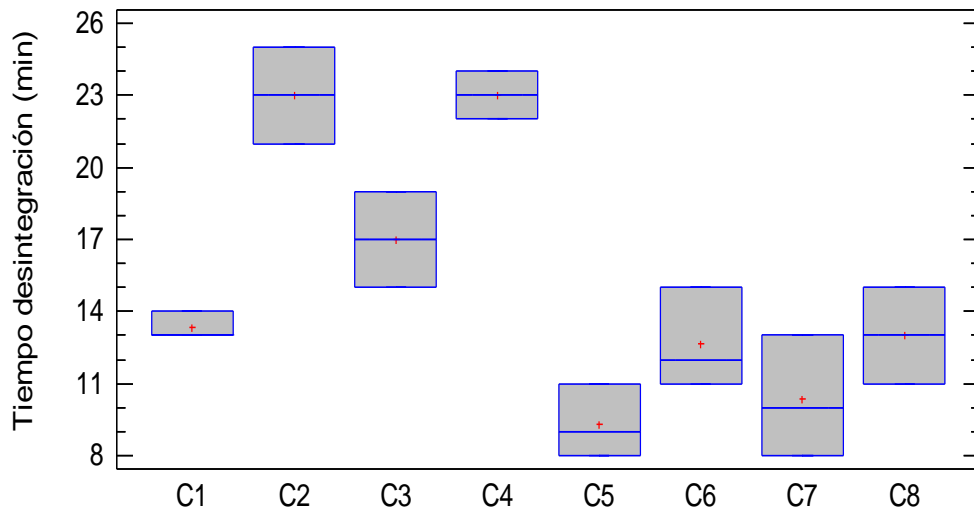


Figura 7. Tiempo de desintegración de las cápsulas de *S. boulardii* formuladas. Nivel de confianza: 95%.

En la figura 5, se observa que la corrida experimental C1 presenta una ligera diferencia significativa con respecto a C5 pero no con respecto a C7, siendo una diferencia igual a 4 minutos, sin embargo, como el tiempo de desintegración es inferior a 30 min, es adecuado para la desintegración de este tipo de forma terminada.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se microencapsuló la levadura *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulandii* mediante secado por aspersión con polímeros de recubrimiento entérico Eudragit® (L-100, L-100-55 y S-100), empleando una temperatura de entrada de 120 °C y de salida de 70 °C, alcanzándose un rendimiento de 53,41 % con el polímero Eudragit® L-100.
- Se estudió el efecto de los polímeros de recubrimiento entérico Eudragit® sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulandii* microencapsulada, encontrándose que la mejor viabilidad de 2,5 E+10 UFC/g de microencapsulado se logró con el polímero L-100, empleando una relación 60:40 (polímero: levadura).
- Se determinó el polímero de recubrimiento entérico más eficiente para la microencapsulación de *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulandii*, demostrándose con los análisis estadísticos que el mejor rendimiento de microencapsulación y viabilidad de la levadura se alcanzó con el Eudragit® L-100 con una relación 60:40 (polímero: levadura).
- Se formuló el microencapsulado en cápsulas duras utilizando como principio activo el microencapsulado con el polímero L-100, con una composición de 78 % de principio activo, 1 % de sodio almidón glicolato, 1 % de dióxido de silicio coloidal y 20 % de maltodextrina microgranulada, desintegrándose en un tiempo de 13,50 min.

5.2. Recomendaciones

- Continuar con el estudio de viabilidad de los microencapsulados probióticos utilizando curvas de crecimiento.
- Realizar pruebas de disolución *in vitro* a los microencapsulados.
- Estudiar otros microorganismos probióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alpizar, M., & Hernández, E. (2004). Formas Farmacéuticas Sólidas. México. Obtenido de <https://www.uv.mx/personal/izcamacho/files/2012/02/GRAGEAS.pdf>
- Anesto, J., De Las Cagigas, A., & Blanco, J. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Aliment Lutr*, 16(1), 63-68.
- Arribas, B., Camuesco, D., Rodríguez, M., Zarzuelo, A., & Gálvez, J. (2008). Therapeutic applications of probiotics. *Ars Pharm*, 49(1), 50-55.
- Arribas, B., Camuesco, D., Rodríguez, M., Zarzuelo, A., & Gálvez, J. (2008). Therapeutic applications of probiotics. *Repositorio Universidad de Granada*, 1-30.
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., & Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *Food Science and Technology*, 65(1), 685-690.
- Badia, R., Zanerillo, G., Chevalere, C., Lizardo, R., Meurens, F., Martínez, P., . . . Salmon, H. (2012). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* and β -galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with *Escherichia coli* F4 (K88). *Investigación Veterinaria*, 43(1), 4.
- Billoldo, A. (2019). *S. BOULARDII, LA LEVADURA AMIGABLE*. Obtenido de <https://thefourwinds.com/es/blog/shamanism/s-boulardii-friendly-yeast/>
- Blázquez, R., & Córdova, M. (2018). Últimos avances en Recubrimientos de formas farmacéuticas sólidas. *UNIVERSIDAD COMPLUTENSE*.
- Bustos, C., & Arancibia, M. (2017). Desarrollo de un método para recuento de *Listeria monocytogenes* utilizando turbidimetría. *Universidad Técnica de Ambato*, 1-54.

- Calvo, B., Esquisabel , A., Hernández , R., & Igartua , M. (2015). *Cápsulas Duras*. Obtenido de https://nanopdf.com/download/tema-2-capsulas-duras-archivo_pdf
- Castagliuolo, G., LaMont, J., Nikulasson , S., & Pothoulakis, C. (1996). Saccharomyces boulardii protease inhibits Clostridium difficile toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun*, 64(1), 5225-5232.
- Córdova , J., & López , O. (2016). Microencapsulación de secnidazol mediante secado por aspersión. *Repositorio Universidad Técnica de Ambato*, 1-50.
- Coronel, A., Ciro, H., & Cárdenas, J. (2015). EFECTO DE LAS CONDICIONES DE SECADO POR ASPERSIÓN EN LA OBTENCIÓN DE UN COLORANTE NATURAL A PARTIR DE EXTRACTOS LÍQUIDOS DE CÚRCUMA (*Curcuma longa* L). *Universidad Nacional de Colombia*, 1-89.
- Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Levadura como probióticos - Saccharomyces boulardii. *Farmacología y terapéutica alimentaria*, 26(6), 767-778.
- Datta, S., Timson, D., & Annapure, U. (2017). Antioxidant properties and global metabolite screening of the probiotic yeast Saccharomyces cerevisiae var. boulardii. *Revisat de la Ciencia de la Alimentación y la Agricultura*, 97(9), 3039-3049.
- De Araujo, N., & Ruiz , O. (2016). Viabilidad de los Probióticos Bacillus polymyxa, Bacillus megaterium y Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus microencapsulados bajo la técnica de secado por aspersión. *Universidad Nacional de Colombia*, 1-43.
- Díaz, Y., Serna, J., Torres, L., & Hoyos , J. (2016). Determinación de la temperatura de secado para la encapsulación de proteasa mediante secado por atomización. *Ingenio Magno*, 7(1), 134-142.

- Doménech, E., & Mañé, J. (2006). USO DE PROBIÓTICOS EN LA PREVENCIÓN Y EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DIGESTIVAS. *Butlletí d'informació terapèutica*, 18(3), 13-18.
- Evonik Industries. (2019). *Eudragit® Setting benchmarks in oral solid dosage forms since 1954*. Obtenido de https://healthcare.evonik.com/sites/lists/NC/DocumentsHC/Evonik-Eudragit_brochure.pdf
- Fabela, M. (2017). Secado por Aspersión. En *TECNOLOGÍAS DE NANO/MICROENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS* (págs. 189-199). Jalisco.
- FAO. (2006). *PROBIÓTICOS EN LOS ALIMENTOS. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la Evaluación*. Roma.
- Franco, L., Matiz, G., & Pájaro, I. (2012). A comparative biopharmaceutical study of brands of ciprofloxacin tablets available on the Colombian market. *Revista de Salud Pública*, 28-32.
- González, N., Fernández, D., Gómez, M., Núñez, L., & Lafita, O. (2005). Efecto del Eudragit y la Etilcelulosa como Agentes Retardantes de la Liberación sobre las Características Físico-Químicas y la Liberación In Vitro de Microesferas Cargadas con Zidovudina. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 24(3), 350-355.
- González, R., Pérez, J., & Lena, M. (2015). Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. *INFORMACIÓN TECNOLÓGICA*, 26(5), 11-16.
- González, R., Tarón, A., & Morón, L. (2015). Formación de Microcápsulas de Tamaño Controlado por Gelación Iónica Utilizando Mezclas Biopoliméricas Binarias. *Información Tecnológica*, 26(6), 31-38.
- Gonzalez, Y., Sosa, L., & Castelblanco, D. (2017). DISEÑO Y ELABORACIÓN DE FORMULACIÓN DEL PRODUCTO CEFTIBUTÉNO 400mg

CÁPSULA DURA DE GELATINA, VALIDACIÓN DE LAS TÉCNICAS.
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES, 1-108.

- Hernández, A., Coronel, C., Monge, M., & Quintana C. (2015). Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos. *Pediatría Integral*, 19(5), 337-354.
- I Ré, M. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Tecnología de Secado*, 16(6), 1195-1236.
- INEC. (2014). *Principales causas de Morbilidad en el Ecuador*. Recuperado el 2020, de <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/vdatos/>
- León, V., López, O., García, M., Rieumont, J., & Bordallo, E. (2015). A NOVEL ENTERIC POLYSACCHARIDE BASED ON CELLULOSE FOR SODIUM DICLOFENAC ENCAPSULATION. *Latin American Applied Research*, 45, 85-90.
- Manzano, C., Estupiñán, D., & Poveda, E. (2012). EFECTOS CLÍNICOS DE LOS PROBIÓTICOS: QUÉ DICE LA EVIDENCIA. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(1), 98-110.
- McFarland, L., & Bernarsconi, P. (1993). *Saccharomyces boulardii*: A Review of an Innovative Bio therapeutic Agent. *MICROBIAL ECOLOGY IN HEALTH AND DISEASE*, 6(1), 157-171.
- OMS. (1980). *Garantía de Calidad en los Sistemas de suministro de Preparaciones Farmacéuticas*. España: Gráficas Reunidas.
- Pastuña, A., & López, O. (2016). Microencapsulación de aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) mediante secado por aspersion. *Universidad Técnica de Ambato*, 1-49.
- Pérez, B., Sinóliz, B., Torralba, B., & Vázquez, C. (2011). Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. *Reduca(Biología)*, 3(5).

- Ramírez, L., & Castaño, D. (2009). METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL. *Scientia et Technica Año XV, 1*(42), 263-267.
- Rodríguez , J., Pérez , L., Escalona , J., Iraizoz , A., & Lafourcade, A. (2014). Formulación de cápsulas duras de Tamarindus indica L. *Revista Cubana de Farmacia, 48*(1), 118-128.
- Rodríguez, O., & López, O. (2016). Evaluación de Polímeros Eudragit en la Microencapsulación de Diclofenaco de Sodio (DCS) mediante Secado por Aspersión. *Repositorio Universidad Técnica de Ambato, 1-49*.
- Ruiz, P. (2013). *Secado por Atomización*. México.
- Siccha, A., & Lock de Ugaz, O. (2015). SECADO POR ATOMIZACION (SPRAY DRYER). *Revista Química, 9*(1), 39-49.
- Suárez, E., & López, O. (2019). Microencapsulación de levadura Saccharomyces cerevisiae como fuente de probióticos. *Respositorio de la Universidad Técnica de Ambato, 1-54*. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29733/1/BQ%20187.pdf>
- Villamizar, L., & Martínez , F. (2008). DETERMINATION OF THE BASIC CONDITIONS FOR MICROENCAPSULATION OF AN ENTOMOPATHOGENIC BACULOVIRUS BY MEANS OF COACERVATION USING EUDRAGIT S100®. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA, 15*(1), 123-131. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169815394014.pdf>
- Villena, M., Morales , M., Gallardo, V., & Ruiz , M. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica, 50*(1), 43-50.
- Villena, M., Morales, M., Gallardo , V., & Ruiz , M. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharm, 50*(1), 45-50.