

**FACULTAD DE FARMACIA**

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica*



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

***FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS  
DESTINADAS A LA BIOTERAPIA CON  
MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS***

**TESIS DOCTORAL**

***María Teresa Sánchez Rodríguez***

Granada, 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: María Teresa Sánchez Rodríguez  
ISBN: 978-84-9163-837-7  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/51117>

La doctoranda **María Teresa Sánchez Rodríguez** y las directoras de la Tesis **María Adolfina Ruiz Martínez** y **María Encarnación Morales**, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, para aspirar al Grado de Doctor y que, hasta donde nuestro conocimiento alcanza, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

**Granada, Enero de 2018**

Directoras de la Tesis:

**M<sup>a</sup> Adolfina Ruiz Martínez**

**M<sup>a</sup> Encarnación Morales Hernández**

Doctoranda:

**M<sup>a</sup> Teresa Sánchez Rodríguez**



*Enseñarás a volar, pero no volarán tu vuelo*

*Enseñarás a soñar, pero no soñarán tu sueño*

*Enseñarás a vivir, pero no vivirán tu vida*

*Sin embargo...*

*En cada vuelo,*

*En cada sueño,*

*En cada vida,*

*Perdurará siempre la huella del camino enseñado.*

*María Teresa de Calcuta*



## ***AGRADECIMIENTOS***

---





*“Camina solo y llegarás rápido, camina acompañado y llegarás lejos”*

Dicen que una vez alcanzados nuestros objetivos, nos olvidamos de todo lo pasado en el camino, incluso, que puede llegar a asaltarnos cierto egocentrismo que nos lleve a creer que esa gran victoria ha sido gracias, en mayor parte, a nuestro esfuerzo y sacrificio. He de decir que este no ha sido mi caso. Es ahora, al llegar al final de esta andadura, cuando siento la necesidad de dar las gracias a todas las personas que han hecho posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral, cada una de ellas de una forma distinta pero igualmente importante y necesaria.

En primer lugar, mi agradecimiento especial y sincero a la Dra. María Adolfin Ruiz Martínez y la Dra. María Encarnación Morales Hernández, mis directoras de Tesis. Gracias Adolfin por proponerme formar parte de este grupo de investigación, por velar por nosotros e intentar sacar siempre el máximo partido a nuestro trabajo. Gracias Maen por escuchar y apoyar cada una de mis ideas, por tu paciencia y sonrisa ante ese nerviosismo que me caracteriza, por tu manera tan sencilla de enseñar, por ser directora y actuar como amiga, por saber tranquilizar y hacer fácil lo difícil, y, sobre todo, por tu dedicación infinita. Gracias a las dos de todo corazón, sin vosotras este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias a las empresas Biosearch Life y Biotmicrogen S.L, por cedernos las cepas probióticas protagonistas de este trabajo.

Gracias a todo el profesorado del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, por acogerme desde el primer momento con cariño y por prestarme su ayuda de forma incondicional. Gracias a la Dra. Visitación Gallardo Lara, a quien he extrañado mucho este último año, y a la Dra. Margarita López-Viota, por alegrar el laboratorio, por saber escucharme y aconsejarme. Gracias a Isabel Morillas y Juan Manuel López por vuestro papel tan relevante para el correcto funcionamiento y organización de este Departamento.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, en especial a la Dra. Herminia Castán, a quien debo en gran medida el desarrollo de este trabajo. Gracias por compartir tu tiempo conmigo y, además, por hacerlo siempre con una sonrisa.

A mi compañera y, sobre todo, amiga Cristina. Admiro tu perseverancia y tu manera de afrontar las adversidades. Gracias por enseñarme tanto. Recordaremos siempre cada uno de los largos días en el laboratorio, noches en vela trabajando que fueron mucho más fáciles a tu lado. También recordaremos nuestras interminables conversaciones, algunas sin sentido, pero siempre alentadoras. A Nerea, no tengo palabras amiga, eres ejemplo de superación y lucha, una de las personas con más corazón que he tenido la suerte de conocer en mi vida y de las que llegan a ella para quedarse. A mi querida Ana Sánchez, gracias por estos cuatro años de amistad, por ser tan especial, por saber escuchar y por tu afán de ayudar a quien lo necesita desinteresadamente. Cuatro años que para mí parece toda la vida. A Ricardo Navarrete, nuestro hombre del grupo, porque nuestras charlas siempre me sacan una sonrisa incluso en momentos de angustia.

A mis amigas farmacéuticas, mi querido grupo “radio-patio”, porque nos conocimos en momentos duros, alejadas de nuestras familias y decidimos formar la nuestra propia, una familia elegida, de la que tengo la grandísima suerte de formar parte.

A mis amigas no farmacéuticas, mis hermanas, Sandra y Anabel. Gracias por estar conmigo durante veintiocho años de mi vida. No ha habido distancia que haya podido distanciarnos, porque no hay nada que no resuelva un café juntas, sea donde sea, con vosotras me siento en casa. Gracias por apoyarme en cada uno de mis pasos, por alegraros y entristeceros conmigo.

A Ismael, mi pareja, mejor amigo y confidente. Por conocerme mejor que nadie y querer compartir tu vida conmigo. Gracias por transmitirme siempre tu energía y alegría, por hacerme la vida más sencilla, por consentirme aun cuando no lo he merecido, por creer en mí y hacérmelo ver siempre. Gracias por estar día a día a mi lado.

A mis abuelos, tíos y Dori, quienes sin entender en qué andaba metida siempre han dedicado su tiempo a escucharme y tranquilizarme para que no abandonase a mitad de camino.

A mi hermano, Manuel Ángel, por ser mi inspiración en esos momentos en los que me falta coraje y valentía. Gracias por darnos lo más bonito de la casa, Manuela, la alegría de la familia.

Para finalizar, quiero agradecer y dedicar esta Tesis Doctoral a las personas más importantes de mi vida, mis padres, Mari Ángeles y Manuel, por ser mi pilar fundamental, quienes no han necesitado libros para enseñarme tanto. Por ser mi ejemplo a seguir, ejemplo de tenacidad, constancia y superación. A ellos debo mi persona, todo lo que soy y aquello que he conseguido. A ti mamá, debo valores tan importantes como es el perdón, el no albergar ira o rencor sea cual sea el motivo, el proteger siempre a las personas que quieres y el buscar siempre un resquicio de luz cuando todo parece negro. A ti papá, debo la necesidad de crecer, el luchar día a día sin rendirse y sin importar el cansancio o dificultades, la importancia de la amistad y el cariño a los demás. Gracias por enseñarme lo que es el amor incondicional, mimarme, apoyarme y, por supuesto, reñirme cuando ha sido necesario para hacerme mantener los pies en la Tierra. Gracias por facilitarme, sin medida, todo lo que he necesitado para alcanzar mis metas, porque cada uno de mis logros lo es vuestro también.



## ***ABREVIATURAS***

- 3- HPA: 3-hidroxi-propionaldehído.
- AGCC: ácidos grasos cadena corta.
- ARNm: ARN mensajero.
- BAL: bacterias ácido lácticas.
- BV: bacterial vaginosis.
- CAP: acetofalato de celulosa.
- CD: célula dendrítica.
- CDC: *Centers for Disease Control and Prevention* (Centros para la prevención y control de enfermedades).
- CFU: Colony-Forming Unit.
- CMC: carboximetilcelulosa.
- DS: matrix dissolution/erosion.
- EC: etilcelulosa.
- EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria).
- EHEC: etilhidroxietilcelulosa.
- EII: enfermedad inflamatoria intestinal.
- ESPGHAN: *European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica).
- EY: Encapsulation Yield.
- FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).
- FDA: *Food and Drug Administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos).
- GHS: glutatión hepático.
- GPC: Guías Práctica Clínica
- GRAS: *Generally Recognized As Safe* (Generalmente reconocido como seguros).
- HEC: hidroxietilcelulosa.
- HPC: hidroxipropilcelulosa.

- HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa.
- Ig: inmunoglobulina.
- IL: interleucina.
- IPC: interpolymer complex.
- ITU: infección tracto urinario.
- MC: metilcelulosa.
- MDA: malondialdehido.
- MM: MRS broth microparticles.
- MRS: medio cultivo Man, Rogosa, Sharpe.
- NaCMC: carboximetilcelulosa sódica.
- Nd: no datos.
- NK: Natural Killer.
- NMP: número más probable.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PBS: phosphate buffer solution.
- PVA: acetato de polivinilo.
- QPS: *Qualified Presumption of Safety* (Presunción calificada de seguridad).
- RFE: Real Farmacopea Española.
- rpm: revoluciones por minuto.
- RT: Room Temperature.
- SD: standard deviation.
- SEGO: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia.
- SEM: microscopía electrónica de barrido.
- SEPyP: Sociedad Española Probióticos y Prebióticos.
- SVF: fluido vaginal simulado.
- TLR: *Toll-like Receptor*.
- UFC: Unidades Formadoras Colonias.
- USP: United States Pharmacopoeia.
- VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- *VSL#3: Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium breve* y

*Streptococcus salivarius* subsp.  
*thermophilus*.

- VVC: vulvovaginal candidosis.
- WGO: *World Gastroenterology Organization* (Organización Mundial de Gastroenterología).
- WHO: *World Health Organization* (Organización Mundial de la Salud).
- WMM: Water- MRS broth microparticles.





## ***RESUMEN***

---



Actualmente la FAO/OMS define los microorganismos probióticos como “*microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada*”. Los trabajos realizados por numerosos autores demuestran que los probióticos, como medicamentos o suplementos dietéticos, abren una alternativa muy esperanzadora tanto en el ámbito de la alimentación funcional como en la mejora y profilaxis de determinadas patologías, principalmente gastrointestinales y urogenitales. Por este motivo, podemos encontrar probióticos bajo diferentes modalidades farmacéuticas como especialidades farmacéuticas de administración oral, suplementos dietéticos, soluciones de rehidratación oral, preparados para lactantes y especialidades de uso urogenital.

Por tanto, parece claro que la utilización de probióticos constituye una herramienta prometedora como potenciadores de la salud. Sin embargo, en muchas ocasiones, el éxito de estos microorganismos depende del medio que se utilice para administrarlos. De ahí que la presente Tesis Doctoral, llevada a cabo en el Grupo Farmacia Práctica CTS-205 del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada, ha perseguido el diseño y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas sólidas destinadas a la administración de microorganismos probióticos. Estos microorganismos han sido *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, cedida por Biosearch Life, y *Lactobacillus fermentum*, suministrada por Biotmicrogen.

Se ha seleccionado la gelificación iónica interna en el seno de una emulsión como técnica, previamente adaptada y puesta a punto por nuestro grupo de investigación, para la microencapsulación de *Lactobacillus fermentum*. Las micropartículas obtenidas han sido liofilizadas con objeto de mejorar su estabilidad, asegurándose el 100 % de supervivencia de las bacterias tras 150 días de conservación a diferentes temperaturas. Estas micropartículas podrían ser incorporadas a matrices alimentarias o bien acondicionadas en formas farmacéuticas secundarias.

En relación al diseño de formas farmacéuticas sólidas de administración oral, se han desarrollado diferentes comprimidos matriciales de liberación prolongada con *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711. Finalmente, se ha seleccionado la formulación elaborada con Methocel® K-15 M EP, Eudragit® L-100 y alginato sódico, como idónea

para la protección de las bacterias durante su paso por el estómago hasta su llegada al intestino, y de las condiciones ambientales adversas durante su almacenamiento.

Respecto al diseño y puesta a punto de comprimidos vaginales con *Lactobacillus fermentum*, se propone el desarrollo de un comprimido doble capa que permita la liberación de la carga probiótica a diferentes tiempos. Este comprimido contiene una capa de liberación inmediata y una capa matricial, mucoadhesiva y de liberación prolongada, gracias al empleo de polímeros como la carboximetilcelulosa sódica, Carbopol<sup>®</sup> 934 y quitosan. Entre sus propiedades tecnológicas destacan la alta capacidad de adhesión a la mucosa vaginal y la alta supervivencia de las bacterias tras 90 días de almacenamiento en diferentes condiciones de temperatura y humedad.

Con todo ello se pretende avanzar en el estudio de nuevas formas farmacéuticas, lo que podría tener un gran impacto en la Industria Farmacéutica, favoreciendo la incorporación de nuevos comprimidos probióticos, orales y vaginales, hasta el momento escasos en el mercado farmacéutico. Esto supone ampliar las opciones de elección por parte del paciente lo que conllevaría a una mayor aceptación por su parte y un mejor cumplimiento terapéutico.

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>Objetivos</b> .....  | 1  |
| <b>Capítulo I. Introducción</b> .....   | 7  |
| <b>I.1. Microbiota humana y salud</b> .....   | 9  |
| 1. Microbiota humana .....  | 11 |
| 1.1. Microbiota gastrointestinal .....  | 13 |
| 1.2. Microbiota urogenital .....  | 15 |
| 1.2.1. Lactobacilos vaginales en retirada .....   | 16 |
| <b>I.2. Probióticos. Aspectos generales y evidencias científicas</b> .....              | 21 |
| 1. Probióticos. Concepto y evolución histórica .....                                    | 23 |
| 2. Criterios de evaluación y requisitos .....   | 24 |
| 3. Principales microorganismos probióticos .....  | 27 |
| 3.1. Bacterias ácido lácticas (BAL) .....   | 27 |
| 3.1.1. Género <i>Lactobacillus</i> .....  | 28 |
| 3.1.2. Género <i>Bifidobacterium</i> .....  | 28 |
| 3.2. Otros microorganismos probióticos: Levaduras .....                                 | 30 |
| 4. Modo de actuación de los microorganismos probióticos .....                           | 31 |
| 5. Efectos beneficiosos derivados del consumo de probióticos. Evidencias clínicas ..... | 33 |
| 5.1. Probióticos en pediatría .....   | 34 |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.2. Probióticos en la edad adulta .....  | 36        |
| 5.3. Probióticos y patologías de la mujer .....   | 39        |
| <b>I.3. Bibliografía .....</b>  | <b>41</b> |
| <br>  |           |
| <b>Capítulo II. Microencapsulación de probióticos .....</b>   | <b>57</b> |
| <b>II.1. Microencapsulación. Fundamentos, aplicaciones y técnicas .....</b>                           | <b>59</b> |
| 1. Microencapsulación .....   | 61        |
| 1.1. Aplicaciones de la microencapsulación .....  | 62        |
| 1.2. Materiales utilizados en la microencapsulación .....   | 64        |
| 1.2.1. Características de los materiales de recubrimiento .....                                       | 64        |
| 1.2.2. Clasificación de los materiales de recubrimiento .....   | 65        |
| 2. Alginato de sodio como material polimérico en la microencapsulación de probióticos .....           | 67        |
| 2.1. Composición y estructura química .....   | 67        |
| 2.2. Solubilidad y viscosidad .....   | 68        |
| 2.3. Gelificación iónica .....  | 70        |
| 2.3.1. Gelificación externa .....   | 71        |
| 2.3.2. Gelificación interna .....   | 71        |
| 3. Métodos de microencapsulación mediante gelificación iónica adaptados a bacterias probióticas ..... | 73        |
| 3.1. Encapsulación en emulsión .....  | 73        |
| 3.2. Encapsulación en extrusión .....   | 75        |

|   |    |
|---|----|
| 3.3. Microencapsulación mediante secado por atomización o <i>spray drying</i> ..... | 79 |
| 3.4. Métodos de microencapsulación de probióticos derivados de la atomización ..... | 80 |
| 3.4.1. <i>Freeze drying</i> .....   | 80 |
| 3.4.2. <i>Fluidized bed coating</i> .....   | 81 |
| 3.4.3. <i>Impinging aerosol technology</i> .....                                    | 82 |
| 3.4.4. <i>Spray- chilling</i> .....   | 83 |
| 4. Otros métodos de microencapsulación de probióticos .....                         | 84 |
| 4.1. Coacervación o separación de fases .....                                       | 84 |
| 4.2. Polimerización interfacial .....   | 85 |
| 4.3. Inclusión molecular .....  | 86 |
| 4.3.1. Inclusión en ciclodextrinas .....  | 86 |
| 4.3.2. Inclusión en liposomas .....   | 87 |
| 5. Modos de incrementar la resistencia de las micropartículas de alginato .....     | 87 |
| 6. Viabilidad de las bacterias encapsuladas y eficacia de la encapsulación .....    | 89 |
| 6.1. Viabilidad de las bacterias encapsuladas .....                                 | 89 |
| 6.2. Eficacia de la encapsulación .....   | 90 |
| 7. Morfología y tamaño de las partículas .....                                      | 90 |
| 8. Cesión del material microencapsulado .....                                       | 90 |
| 9. Bibliografía .....   | 91 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>II.2. An improved ionic gelation method to encapsulate <i>Lactobacillus</i> spp. bacteria. Protection, survival and stability study</b> ..... | 101 |
| <br>   |     |
| <b>Capítulo III. Estudio teórico de la compresión y su aportación en la administración de probióticos</b> .....                                  | 115 |
| <b>III.1. Fundamentos de la compresión</b> .....   | 117 |
| 1. Comprimidos .....   | 119 |
| 1.1. Formulación de comprimidos .....  | 123 |
| 2. Proceso de compresión .....   | 126 |
| 3. Métodos de compresión .....   | 127 |
| 3.1. Compresión directa .....  | 128 |
| 3.2. Compresión de un granulado .....  | 129 |
| 3.2.1. Compresión previa granulación seca o doble compresión .....   | 129 |
| 3.2.2. Compresión previa granulación húmeda .....  | 129 |
| 4. Controles realizados sobre el comprimido terminado .....  | 130 |
| <b>III.2. Comprimidos de administración oral con probióticos</b> .....   | 133 |
| 1. Justificación del empleo de comprimidos para la administración oral de bacterias probióticas .....  | 135 |
| 2. Comprimidos de liberación modificada .....  | 136 |
| 2.1. Comprimidos matriciales .....   | 137 |
| 2.1.1. Comprimidos matriciales hidrófilos .....  | 138 |
| 2.1.2. Sistemas matriciales inertes .....  | 141 |
| 2.1.3. Sistemas matriciales lipídicos .....  | 143 |



|   |     |
|---|-----|
| 3. <i>Lactobacillus coryniformis</i> CECT 5711 .....  | 143 |
| 3.1. Seguridad de la cepa .....   | 144 |
| 3.2. Propiedades probióticas .....  | 145 |
| 3.3. Efectos beneficiosos .....   | 146 |
| <b>III.3. Evaluation of tablets containing a probiotic strain for an oral administration</b> .....                  | 149 |
| <b>III.4. Comprimidos de administración vaginal con probióticos</b> .....   | 167 |
| 1. Formas farmacéuticas destinadas a la administración vaginal .....  | 169 |
| 1.1. Formas farmacéuticas sólidas de administración vaginal .....   | 170 |
| 1.1.1. Óvulos vaginales .....   | 170 |
| 1.1.2. Cápsulas vaginales .....   | 170 |
| 1.1.3. Tampones vaginales .....   | 171 |
| 1.1.4. Comprimidos vaginales .....  | 171 |
| 2. Diseño de un comprimido vaginal para la administración de bacterias probióticas .....                            | 174 |
| <b>III.5. A novel double-layer mucoadhesive tablet containing probiotic strain for vaginal administration</b> ..... | 179 |
| <b>III.6. Bibliografía</b> .....  | 191 |
| <b>Conclusiones</b> .....   | 199 |
| <b>Anexo I</b> .....  | 205 |



## **OBJETIVOS**

---



La microbiota humana está constituida por un conjunto de microorganismos que colonizan de forma estable la superficie epidérmica además de las cavidades abiertas al exterior, como son el tracto gastrointestinal, el nasofaríngeo y el genitourinario. Gracias al advenimiento y mejora de nuevas técnicas de estudio moleculares y metagenómicas, podemos conocer la diversidad de esta comunidad microbiana y su funcionalidad. Son numerosos los efectos beneficiosos que ejerce sobre el hospedador como, por ejemplo, el suministro de nutrientes esenciales (vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos), aprovechamiento de nutrientes no digeribles, protección frente a agentes infecciosos, modulación de la respuesta inmune, etc. Sin embargo, debido a diversos factores, esta microbiota puede sufrir alteraciones en su homeostasis, temporales o permanentes, produciéndose una disbiosis y, con ello, la aparición de diferentes patologías asociadas.

Los microorganismos probióticos han sido propuestos como una alternativa terapéutica y preventiva de estas patologías, gracias a su capacidad de restablecer dicho equilibrio microbiano y las condiciones fisiológicas normales. El gran auge de los microorganismos probióticos en los últimos años es debido a los numerosos estudios científicos y clínicos que avalan sus beneficios sobre la salud. Si tenemos en cuenta que los probióticos son principalmente consumidos por vía oral, es lógico pensar que sus efectos beneficiosos se pondrán de manifiesto, fundamentalmente, en patologías intestinales. Sin embargo, la posibilidad de modular una respuesta inmune de tipo sistémica, hace que los probióticos también presenten efectos positivos en otras alteraciones extraintestinales, como alergias y vaginitis. No obstante, para el tratamiento de afecciones vaginales, se ha propuesto la administración de probióticos vía vaginal, lo cual supone una reducción de la dosis administrada y tiempo de tratamiento dado que al administrarlos vía oral tendrán que soportar su paso por el estómago y exposición a condiciones adversas.

Sin embargo, el principal problema que se presenta a la hora de utilizar los probióticos en el tratamiento o prevención de cualquier patología es la falta de formas farmacéuticas capaces de garantizar su viabilidad durante el almacenamiento y administración. Esto es debido al gran reto que supone en el ámbito de la Tecnología Farmacéutica la incorporación de probióticos a cualquier formulación, dada la escasa resistencia de estos microorganismos a los procesos tecnológicos, almacenaje (pH,

oxígeno, temperatura, humedad) y tránsito de los mismos por el aparato digestivo (pH, enzimas digestivas, sales biliares), lo que compromete la llegada de bacterias en número suficiente al lugar de acción. Esta dosis es dependiente de cada cepa, por ello no es posible establecer una dosis general.

Es por ello que el **principal objetivo de esta Tesis Doctoral** es el diseño de formas farmacéuticas sólidas que permitan la protección de los microorganismos probióticos contenidos. Estas deben garantizar una viabilidad adecuada de los mismos tras el proceso tecnológico y durante su almacenamiento, hasta el final de su vida útil. Además de asegurar la llegada de un número suficiente de bacterias al lugar de acción.

Con esta finalidad, en este trabajo se pretenden alcanzar los siguientes objetivos específicos:

- I. Realizar una completa revisión bibliográfica acerca de las diferentes formas farmacéuticas con microorganismos probióticos disponibles en oficinas de farmacia en España. Estudio de las preferencias y necesidades actuales por parte de la población.
  
- II. Estudiar las diferentes técnicas de microencapsulación adaptadas a microorganismos probióticos. Seleccionar y desarrollar un método de microencapsulación adecuado a *Lactobacillus fermentum*:
  - Esta selección se realizará en función del tamaño medio de partícula requerida, propiedades físicas del agente encapsulante, mecanismo y lugar de liberación deseado, coste y aplicación de los microorganismos encapsulados.
  
  - Selección de polímeros compatibles con las bacterias a encapsular y con la tecnología utilizada. Estos polímeros deben cumplir con una serie de requisitos como grado de protección de las bacterias, condiciones de liberación y estabilidad en las condiciones tecnológicas y durante su posterior almacenamiento y conservación.

- Caracterización de las micropartículas obtenidas con objeto de determinar su forma, tamaño y superficie, así como su estabilidad desde el punto de vista tecnológico.
  - Comprobar la protección de las bacterias microencapsuladas ante condiciones externas adversas como, por ejemplo, la supervivencia de las mismas en medio ácido.
  - Comprobar la viabilidad de las bacterias microencapsuladas a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones de conservación, con la intención de determinar las condiciones de almacenamiento más apropiadas.
  - Estudiar la influencia de la liofilización tanto en la estabilidad de las micropartículas como en la viabilidad de las bacterias microencapsuladas.
  - Valorar su inclusión en formas farmacéuticas secundarias tales como comprimidos orales y vaginales.
- III. Estudiar, desde un punto de vista teórico, la compresión como método tecnológico para el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas con microorganismos probióticos.
- IV. Diseñar y elaborar comprimidos de administración oral con *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 así como comprimidos de administración vaginal con *Lactobacillus fermentum* previamente microencapsulado:
- Seleccionar y desarrollar una operación de compresión adecuada a las bacterias probióticas con las que trabajamos. La compresión debe realizarse bajo condiciones operativas suaves que aseguren la supervivencia de las bacterias tras la operación.
  - Proponer polímeros que cumplan con los requisitos de compatibilidad con las bacterias, requerimientos de la tecnología utilizada, estabilidad en

las condiciones aplicadas, grado de protección de los microorganismos, condiciones de liberación de los mismos, etc.

- Caracterizar los sistemas diseñados con la intención de determinar sus propiedades físicas y mecánicas, así como su estabilidad desde el punto de vista tecnológico.
- Comprobar la viabilidad de los microorganismos a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones de conservación. Seleccionar las condiciones de almacenamiento que garanticen la calidad de las formas farmacéuticas propuestas.
- Estudiar la adhesión de los sistemas propuestos al tracto gastrointestinal y vaginal además de la cinética de liberación del probiótico desde los mismos.



# **CAPÍTULO I**

---

## **Introducción**



## **I.1. MICROBIOTA HUMANA Y SALUD**

---



## 1. Microbiota humana

La microbiota humana está constituida por el conjunto de microorganismos que colonizan de forma estable la superficie epidérmica así como los conductos y cavidades del organismo que se comunican con el exterior (tracto digestivo, nasofaríngeo y genitourinario) (Calum et al., 2014). La relación existente entre los componentes de la microbiota y su hospedador se denomina simbiosis. Habitualmente, la simbiosis establecida es mutualista y, por tanto, nuestro sistema inmune no establece una respuesta para su eliminación. Sin embargo, ante la amenaza de ciertas enfermedades y afecciones graves, los miembros de la microbiota pueden actuar como patógenos oportunistas dando lugar a infecciones endógenas. Entre sus componentes encontramos virus, arqueas, bacterias y organismos eucarióticos. Su composición es característica, en condiciones fisiológicas, para cada localización del organismo y, a su vez, difiere entre regiones. Es específica del hospedador y puede evolucionar a lo largo de su vida, ya que es susceptible a modificaciones de origen endógeno y exógeno.

Los efectos beneficiosos asociados a esta microbiota autóctona se postularon por primera vez en el siglo XIX gracias al trabajo de Theodor Escherich (Escherich, 1885) y Henry Tissier, quienes descubrieron los beneficios de la microbiota intestinal, así como Albert Döderlein y sus lactobacilos vaginales (Döderlein, 1892). Su actividad desempeña un papel importante en diversas funciones biológicas que tienen lugar en el organismo, entre ellas cabe destacar: funciones metabólicas, función barrera e interacciones con el hospedador.

### I. Funciones metabólicas

- Suministro de nutrientes esenciales, entre ellos encontramos vitaminas (vitamina K y B12) producidas por bacterias intestinales y  $\beta$ -galactosidasas producidas por lactobacilos.
- Aprovechamiento de nutrientes no digeribles mediante la fermentación de los mismos. Estos nutrientes son principalmente los glúcidos complejos (almidones, celulosa, pectinas de origen vegetal) cuya fermentación produce ácidos grasos

de cadena corta (AGCC) como son el acético, propiónico y butírico. Estos ácidos grasos inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, son fuente de energía metabólica y ejercen un efecto nutritivo sobre el epitelio intestinal.

## II. Función barrera

Impedir la adhesión y proliferación de microorganismos patógenos sobre nuestras mucosas y la posterior invasión de células epiteliales mediante:

- Competición por el sustrato o nicho ecológico.
- Competición por sitios de adhesión.
- Producción de un ambiente fisiológicamente adverso, por ejemplo variación de pH.
- Secreción de sustancias tóxicas como los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.

## III. Interacciones con el hospedador

Cabe destacar aquella que tiene lugar con el sistema inmune, puesto que induce tanto el desarrollo de la inmunidad innata como de la adquirida. Así la microbiota promueve el desarrollo y maduración de órganos linfoides secundarios incluyendo las placas de Peyer y los nódulos linfáticos mesentéricos.

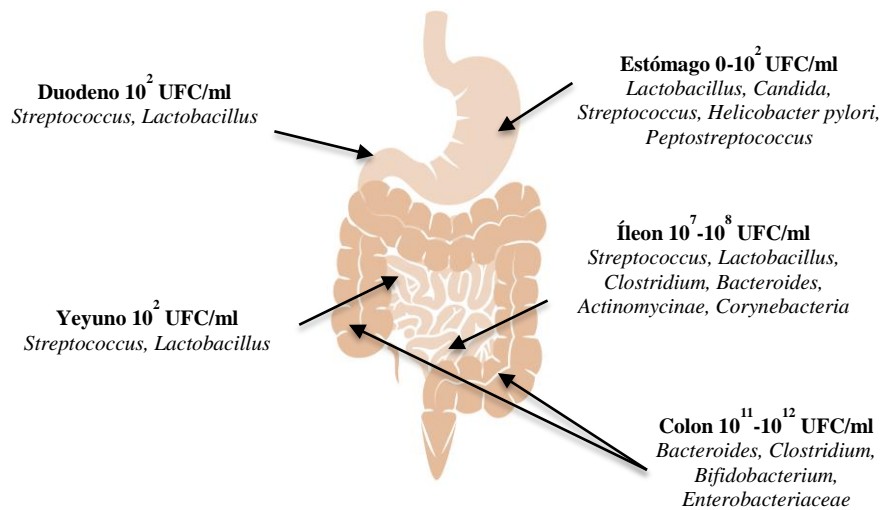
Todas las mucosas y epitelios que están expuestos al mundo exterior poseen una comunidad microbiana. En los últimos años, se ha demostrado la existencia de microbiotas en lugares del organismo humano que hasta entonces se creían estériles en condiciones fisiológicas, entre estos hallazgos se encuentran pulmones (Dickson & Huffnagle, 2015), glándula mamaria, leche humana (Fernández et al., 2013), útero y placenta (Aagaard et al., 2014). Sin embargo, entre las comunidades microbianas más estudiadas y reportadas se encuentran la microbiota gastrointestinal y la urogenital.

## 1.1. Microbiota gastrointestinal

El tracto gastrointestinal constituye la principal superficie de intercambio y comunicación entre el medio externo e interno. Se estima que puede albergar un rango de más de 100 billones de células microbianas, 1000 especies bacterianas diferentes y un número de genes 100 veces superior al genoma humano (Qin et al., 2010). Por ello, la microbiota gastrointestinal está considerada un órgano más, perfectamente integrado en la fisiología del organismo (Backhed et al., 2005).

Hasta el momento del parto el tracto intestinal es estéril y es entonces cuando comienza a colonizarse por los primeros microorganismos; si el bebé nace por vía vaginal, su tracto gastrointestinal se siembra con los microorganismos de la vagina materna, mientras que el tracto gastrointestinal de los bebés nacidos por cesárea está ampliamente colonizado por los microorganismos del entorno. Estos primeros microorganismos serán responsables de desencadenar los estímulos esenciales para el correcto desarrollo del sistema inmune e intestino. Este episodio es uno de los más importantes de la vida, ya que de él dependerá posteriormente la salud del individuo. Cada individuo alberga su propio patrón distintivo de composición bacteriana, determinado no solo por la colonización inicial en el nacimiento, sino también por factores tales como lactancia materna, entorno, enfermedades, dieta, estrés, edad y predisposiciones genéticas. No obstante, en adultos sanos la composición fecal es estable en el tiempo, describiéndose tres divisiones bacterianas dominantes: *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y, en menor grado, *Actinobacteria*.

La población bacteriana varía a lo largo del tracto gastrointestinal, así en estómago y duodeno encontramos un número reducido de microorganismos debido al efecto nocivo de las secreciones ácidas, biliares y pancreáticas. Su concentración aumenta progresivamente a lo largo del tracto digestivo llegando a ser máxima en el colon, donde habitan aproximadamente el 70 % de todas las bacterias corporales; además, esta concentración también es mayor a medida que nos adentramos en el lumen.



**Figura 1.** Composición y concentración luminal de especies microbianas dominantes en diversas regiones del tracto gastrointestinal (UFC, Unidades Formadoras de Colonias)

Ciertos factores tales como el perfil genético del hospedador, estrés, uso de medicamentos y antibióticos, dieta y estilo de vida pueden alterar el equilibrio entre las especies beneficiosas y otras cepas bacterianas indeseables o patógenas, causando un cuadro infeccioso e impidiendo el correcto funcionamiento del sistema inmunitario. El término “disbiosis” se refiere a estas situaciones en las que la composición y las actividades microbianas se desplazan de su estado normal o benigno a otro que es más perjudicial para el hospedador (Tamboli et al., 2004). Estos desequilibrios en la ecología microbiana intestinal han sido relacionados con diversas patologías de tipo autoinmune, alérgicas, gastrointestinales, metabólicas, bacterianas y cancerígenas (Tabla 1). De acuerdo con lo anterior, el poder modular positivamente la composición de la microbiota intestinal puede tener claras repercusiones positivas en la salud del individuo, así ha alcanzado gran interés la administración de bacterias vivas (probióticos) y sustratos no digeribles (prebióticos) para conseguir mantener, mejorar o restaurar la microbiota de personas en riesgo o enfermas.



**Tabla 1.** Patologías asociadas a disbiosis de la microbiota intestinal.

| <b>PATOLOGÍA</b>   | <b>REFERENCIA</b>  |
|--|--|
| Enfermedad Inflamatoria Intestinal:<br>Enfermedad de Crohn y Colitis | Baumgart & Carding, 2007<br>Frank et al., 2007           |
| Síndrome Intestino Irritable   | Carroll et al., 2010<br>Krogius-Kurikka et al., 2009     |
| Síndrome metabólico  | Vrieze et al., 2012                                      |
| Cáncer colorrectal   | Shen et al., 2010<br>Serban, 2013                        |
| Obesidad   | Tulika et al., 2013<br>Turnbaugh et al., 2009            |
| Diabetes tipo II   | Larsen et al., 2010<br>Qin et al., 2012                  |
| Enfermedad celíaca   | De Palma et al., 2010<br>Collado et al., 2009            |
| Artritis reumatoide  | Scher & Abramson, 2011<br>Vaghef- Mehrabany et al., 2014 |
| Ansiedad y depresión   | Olivares et al., 2015<br>Bravo et al., 2011              |
| Autismo  | De Theije et al., 2014<br>Hsiao et al., 2013             |
| Vejez  | Claesson et al., 2012                                    |
| Alergias y asma  | Round et al., 2009<br>Arrieta et al., 2015               |

## 1.2. Microbiota urogenital

El tracto inferior genital de la mujer es un nicho ecológico donde varios microorganismos anaerobios facultativos, aerotolerantes y estrictos, coexisten en un equilibrio dinámico fruto de la interacción y sinergia entre ellos. Su función es proteger

a la mucosa frente al establecimiento de microorganismos patógenos y del desarrollo excesivo de microorganismos indígenas como *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans*, cuya proliferación en exceso puede producir patologías asociadas.

La microbiota vaginal varía en función del estado hormonal de la mujer siendo escasa durante la infancia para después alcanzar la máxima concentración en el periodo fértil y finalmente disminuir de nuevo tras la menopausia. Esta microbiota fue descrita por primera vez por Döderlein (1892), quién demostró que estaba compuesta principalmente por lactobacilos, llamados posteriormente como bacilos de Döderlein. Dichos microorganismos son bacilos Gram positivos, principalmente anaerobios aerotolerantes, los cuales tienen un metabolismo estrictamente fermentativo en el que el producto final es el ácido láctico. Las cuatro especies predominantes en la microbiota vaginal son: *Lactobacillus crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* y *L. Iners*. También son frecuentes *L. salivarius* y *L. vaginalis*.

La protección de la mucosa vaginal es debida a lo que denominamos antagonismo microbiano, caracterizado principalmente por dos mecanismos: interferencia en la colonización y producción de compuestos antimicrobianos. Entre estas sustancias con capacidad antibiótica se encuentra el ácido láctico, obtenido a partir de la escisión del glucógeno vaginal en glucosa y la posterior fermentación de esta última. Este ácido láctico provoca la acidificación del medio hasta pH 4-4.5 y, por tanto, la inactivación de los microorganismos no adaptados.

### **1.2.1. Lactobacilos vaginales en retirada**

La vagina está sometida a cambios frecuentes que alteran su homeostasis, produciéndose un descenso en la concentración de lactobacilos. Esta situación es aprovechada tanto por microorganismos endógenos como por otros de origen exógeno, los cuales proliferan hasta hacerse dominantes, provocando un proceso infeccioso.

Entre las causas que provocan esta disminución de los lactobacilos vaginales está la descarga menstrual o el semen, ambos con un pH próximo a la neutralidad, circunstancias en las que los lactobacilos tienen dificultades para crecer puesto que el grado de acidez protector tarda varias horas en recuperarse (Martín et al., 2008).

Además, otras prácticas como los dispositivos intrauterinos, espermicidas, tratamiento con antibióticos y agentes antineoplásicos también modifican negativamente la microbiota. Son varias las patologías asociadas a la disminución de lactobacilos vaginales:

#### I. Vaginosis bacteriana

Se produce por un desequilibrio de la microbiota vaginal, en la que van a predominar bacterias como *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominus*, *Ureaplasma urealyticum* y otras anaerobias como *Prevotella*, *Mobilincus*, *Bacteroides* y *Peptostreptococcus* en detrimento de *Lactobacillus*.

Se calcula que afecta al 8-30 % de las mujeres sexualmente activas en países industrializados y está asociada a complicaciones, incluidas en el segundo trimestre del embarazo, tales como el aborto involuntario, inflamación pélvica, parto prematuro, corioamnionitis, endometritis postparto, infección postoperatoria tras cirugía ginecológica, y mayor facilidad para la adquisición de VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana). Los factores de riesgo para la vaginosis bacteriana incluyen las duchas vaginales y la raza entre otros, siendo las mujeres afroamericanas hasta dos veces más susceptibles de sufrir vaginosis que las mujeres blancas (Zhang et al., 2004).

Los tratamientos recomendados para la vaginosis bacteriana se centran en el uso de agentes anaerobicidas como el metronidazol y la clindamicina, administrados por vía oral o vaginal. No obstante, el potencial de reaparición de la enfermedad tras la curación, conocido como recidiva, es alto (Cancelo et al., 2013).

## II. Candidiasis

Es una enfermedad inflamatoria de la vagina y la vulva, producida por diferentes especies de hongos, fundamentalmente *Candida* spp., siendo *Candida albicans* la responsable del 90 % de los episodios de candidiasis vulvovaginal. Otras especies menos frecuentes son *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*, las cuales han mostrado un aumento en prevalencia y un incremento en la resistencia al tratamiento habitual.

Se estima que, aproximadamente, el 75 % de las mujeres sufrirán un episodio de candidiasis. Esta infección se clasifica como no complicada, recurrente o resistente teniendo en cuenta los síntomas, la microbiología y la respuesta al tratamiento.

Para su tratamiento se utilizan principalmente azoles tópicos (clotrimazol, miconazol, ketoconazol). Aunque, en ocasiones, también se emplean azoles vía oral (fluconazol, itraconazol), estos se deben reservar sólo para infecciones recurrentes o persistentes, y nunca en gestantes (Cancelo et al., 2013). Entre el 40-45 % de las mujeres que presentan un primer episodio de candidiasis sufrirán recidivas, llegando incluso a alcanzar cuatro episodios o más en un año.

## III. Tricomoniasis

Esta causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*, el cual no forma parte de la microbiota vaginal normal. Si no se trata a tiempo puede afectar al cuello uterino, además, está asociada a un mayor riesgo de contraer el VIH y a la coinfección con otras enfermedades de transmisión sexual. Es importante realizar un especial control en mujeres embarazadas ya que está asociada a rotura prematura de membranas, parto pretérmino y bajo peso al nacer.

El tratamiento recomendado por el Center for Disease Control (CDC, 2015) es metronidazol o tinidazol vía oral. Los tratamientos tópicos son bastante menos eficaces por no alcanzarse niveles terapéuticos ni en uretra ni en criptas vaginales. Se deben tratar los compañeros sexuales e incluso proponerse la abstinencia sexual.

#### IV. Infecciones del tracto urinario inferior (ITU)

Aunque las infecciones del tracto urinario inferior (ITU) no son propiamente trastornos genitales, la colonización vaginal por parte de las bacterias patógenas cuyo reservorio es el intestino grueso, parece ser un paso intermedio esencial en su migración a la región periuretral y posteriormente a la vejiga (Reid & Bruce, 2006). Están causadas principalmente por bacterias uropatógenas, siendo *Escherichia Coli* responsable del 80 % de los casos. También pueden aislarse bacterias gram positivas pertenecientes a los géneros *Staphilococcus* y *Enterococcus*. En mujeres sanas, una microbiota normal dominada por lactobacilos está relacionada con una menor frecuencia de ITU. Por ello, son más frecuentes en mujeres posmenopáusicas que han perdido gran parte de los lactobacilos vaginales. Estas infecciones se suelen tratar mediante la administración de antibióticos de amplio espectro, los cuales suponen un éxito variable y a corto plazo. Sin embargo, la terapia con antibióticos conlleva efectos negativos como es la aparición de disbiosis en las distintas microbiotas del paciente, lo cual lo predispone a sufrir diversas infecciones secundarias. Teniendo en cuenta los efectos adversos asociados al tratamiento farmacológico de estas patologías vaginales (riesgo de recidivas, disbiosis en otras microbiotas y aparición de cepas resistentes), surge la necesidad de plantear nuevas estrategias terapéuticas.

De acuerdo con todo lo expuesto, la modulación de esta microbiota mediante el empleo de microorganismos probióticos supone una alternativa terapéutica prometedora.



## **I.2. PROBIÓTICOS**

---

### **Aspectos generales y evidencias científicas**





## 1. Probióticos. Concepto y evolución histórica

Desde el punto de vista etimológico, el término probiótico deriva de la proposición latina “pro” (a favor de) y el adjetivo griego “biótico” (vida), “para la vida”. La historia de los probióticos es paralela a la evolución de la raza humana y se remonta a tiempos antiguos, hace cerca de 10 000 años. Mucho antes del conocimiento de la microbiología, ya se consumían determinados productos fermentados, tales como cerveza, pan, vino, kéfir o kumis y existían referencias sobre los beneficios que éstos proporcionaban en las personas que los consumían (Ozen, 2014). No obstante, el concepto probiótico surgió a principios del siglo XX de la hipótesis propuesta por el científico ruso ganador del premio Nobel, Elie Metchnikoff, quien relacionó por primera vez la ingesta de leches fermentadas, con la salud y longevidad de los habitantes de una región concreta de Bulgaria (Saini et al., 2009). Sugirió que “la autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían ser suprimidos mediante la modificación de la microbiota intestinal y llegó a desarrollar una dieta basada en leche fermentada por una bacteria a la que denominó “bacilo búlgaro”.

La primera cepa de *Bifidobacterium* conocida fue aislada por Henry Tissier (Instituto Pasteur) de un bebé alimentado con leche materna, y la denominó *Bacillus bifidus communis*. Tissier afirmó que las bifidobacterias eran capaces de desplazar las bacterias proteolíticas que causan la diarrea en bebés enfermos (Tissier, 1906). Sin embargo, el término probiótico no fue acuñado hasta 1965 por Lilly y Stillwell (Lilly & Stillwell, 1965) para definir a aquellos microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos de forma saludable para el individuo.

A partir de entonces el término “probiótico” ha sufrido numerosas redefiniciones hasta llegar a la dada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y los Alimentos (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual los cataloga como “*microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador*” (OMS/FAO, 2001). Además, los probióticos son definidos como organismos “GRAS”, acrónimo de *Generally Regarded As Safe* (generalmente reconocidos como seguros). Para ello se

requiere de una evidencia científica considerable y de calidad que será corroborada por una comisión de expertos de la OMS y FAO.

Por último, también es necesario definir conceptos relacionados, como prebiótico y simbiótico:

- Prebióticos: ingredientes fermentados selectivamente que dan lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped.
- Simbióticos: productos que contienen tanto probióticos como prebióticos.

## **2. Criterios de evaluación y requisitos**

Ante el cuestionamiento de la base científica que pueda justificar todos los efectos beneficiosos atribuidos a los probióticos así como las primeras dudas acerca de posibles fraudes, la FAO y OMS han publicado conjuntamente directrices para la evaluación de los probióticos en las que se especifican los estándares que deben cumplir estos productos para disponer de la calidad y la fiabilidad adecuadas que permitan su prescripción y/o recomendación (Tabla 2). Para ello, el comité de expertos recomienda el desarrollo de métodos más eficaces para evaluar la funcionalidad y la seguridad de los probióticos *in vitro* e *in vivo*, tanto en modelos de experimentación animal como en humanos. De modo que para que un microorganismo sea calificado como probiótico es imprescindible demostrar científicamente que produce efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador (Dunne et al., 2001; Ouwehand et al., 2002; Rodríguez, 2015).

**Tabla 2.** Requisitos que deben reunir las cepas probióticas (Dunne et al., 2001; Ouwehand et al., 2002; Rodríguez, 2015).

| <b>CARACTERÍSTICA</b>  | <b>RAZÓN</b>   | <b>EVALUACIÓN</b>   |
|--|--|---|
| <b>Identificación taxonómica</b>                               | - Secuenciación del genoma (recomendable) y depósito en colección internacional de cultivos  | Origen, género, especie y cepa  |
| <b>Resistencia a pH ácido, bilis, enzimas pancreáticos</b>     | - Supervivencia a la acidez gástrica<br>- Resistencia a los enzimas digestivos y secreciones biliares  |   |
| <b>Adhesión al epitelio intestinal</b>                         | - Mucoadhesión, colonización y persistencia en el epitelio intestinal<br>- Competencia con patógenos<br>Inmunomodulación   |   |
| <b>Presencia de actividades metabólicas deseables</b>          | - Fermentación de sustratos no digeribles<br>- Producción de ácidos grasos de cadena corta<br>- Activación de precursores (lignanos e isoflavonas)<br>- Degradación de alérgenos, carcinógenos y otros compuestos perjudiciales<br>- No actividad mutagénica y/o carcinógena | Evaluación funcional:<br>Ensayos <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> y en modelos animales |
| <b>Inhibición de patógenos y microorganismos perjudiciales</b> | - Resistencia a la infección<br>- Producción de sustancias antimicrobianas<br>- Modulación de la microbiota intestinal y sus metabolitos   |   |

**Tabla 2.** (Continuación) Requisitos que deben reunir las cepas probióticas.

| <b>CARACTERÍSTICA</b>                    | <b>RAZÓN</b>  | <b>EVALUACIÓN</b>  |
|--|---|--|
| <b>Seguridad microbiana demostrada</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sin riesgos para la salud del consumidor, no patógeno ni inflamatorio</li> <li>- Sin resistencias transferibles a antibióticos</li> </ul>  | Evaluación seguridad:<br>Ensayos en humanos fase 1   |
| <b>Efectos beneficiosos documentados</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Validación clínica de los efectos generales y/o específicos en la salud</li> <li>- Dosis mínima, relación dosis/efecto</li> <li>- Documentación de los efectos adversos</li> </ul> | Evaluación eficacia:<br>Ensayos en humanos fase 2 (doble ciego, placebo y al menos en dos laboratorios independientes) |
| <b>Efectos beneficiosos documentados</b> | <b>Probiótico como medicamento:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Comparación con tratamiento estándar para una patología específica</li> <li>- Documentación efectos adversos</li> </ul>                        | Evaluación eficacia:<br>Ensayos en humanos fase 3  |
| <b>Buenas propiedades tecnológicas</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tolerancia al oxígeno</li> <li>- Crecimiento en medios industriales</li> <li>- Estabilidad y viabilidad microbiana durante almacenamiento y vida útil del producto</li> </ul>      |  |

### 3. Principales microorganismos probióticos

Teniendo en cuenta todos los requisitos anteriores, la siguiente tabla recoge los principales microorganismos utilizados como probióticos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Principales especies probióticas reportadas (Alvarez-Olmos & Oberhelman, 2001; Holzapfel et al., 2001).

| <b>GÉNERO</b>          | <b>ESPECIE</b>  |
|------------------------|---|
| <i>Lactobacillus</i>   | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , ,<br><i>L. brevis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. crispantus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. coryniformis</i> ,<br><i>L. salivarius</i> , <i>L. delbrueckii</i> |
| <i>Bifidobacterium</i> | <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. lactis/animalis</i> , <i>B. adolescentes</i> , <i>B. infantis</i>  |
| <i>Enterococcus</i>    | <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>  |
| <i>Lactococcus</i>     | <i>L. lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. diacetylactis</i>   |
| <i>Streptococcus</i>   | <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i>   |
| <i>Bacillus</i>        | <i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. cereus</i>   |
| <i>Sacharomyces</i>    | <i>S. boulardii</i> , <i>S. cerevisiae</i>  |
| <b>Otros</b>           | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i><br><i>Escherichia coli</i> ( <i>E. Coli</i> Nissle)  |

#### 3.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)

En este grupo se incluye una clasificación funcional de bacterias no patógenas, no toxigénicas, Gram positivas y fermentativas. Se asocian a la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles para la fermentación de alimentos. Se incluyen las especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y *Streptococcus thermophilus*. Dado que el género *Bifidobacterium* no se asocia con fermentación de alimentos y es taxonómicamente diferente de otras BAL, habitualmente no se considera BAL.

### **3.1.1. Género *Lactobacillus***

Dentro de las bacterias ácido lácticas el grupo más numeroso es el género *Lactobacillus*. Forman parte de la microbiota normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. No son considerados patógenos (excepto algunas especies que parecen intervenir en la caries dental). Los lactobacilos presentan un gran interés tanto comercial como médico, ya que pueden tener un papel importante en la salud y nutrición humanas, a través de su influencia sobre la microbiota intestinal.

En cuanto a su morfología, son bacilos largos que tienden a formar cadenas. No obstante, pueden observarse frecuentemente bacilos cortos o coco-bacilos corineformes. Son Gram-positivos, inmóviles, aunque existen unas pocas especies móviles por flagelos peritricos. Además son catalasa- negativos y no esporulantes. Su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, por ello se clasifican en homofermentadores estrictos (Grupo I) y heterofermentadores facultativos y estrictos (Grupo II y III respectivamente).

Su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por tensiones de oxígeno reducidas. Crecen entre 2 °C y 53 °C, aunque su temperatura óptima es de 30-40 °C. Son acidúricos, creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5.5-6.2. Requieren medios nutricionales complejos, con aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables. El medio de cultivo más empleado es el medio MRS descrito por Man, Rogosa y Sharpe en 1960, el cual contiene sustratos que facilitan el crecimiento incluso de las especies más exigentes. El medio MRS está especialmente recomendado para la enumeración y mantenimiento de bacilos lácticos, ya sea por la técnica del número más probable (NMP) en caldo o por siembra en masa (Collado, 2004).

### **3.1.2. Género *Bifidobacterium***

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto gastrointestinal humano y de diversos animales y están presentes durante toda la vida pero en distintas cantidades,

apareciendo a los pocos días después del nacimiento. Constituyen una de las especies predominantes de la microbiota del colon, las cuales se encuentran presentes en niveles que van desde  $10^8$  a  $10^{11}$  bacterias por gramo de material del colon. Las principales especies de este género presentes en el intestino humano son: *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum* y *B. longum* subsp. *infantis*. La presencia de estas bacterias en el intestino humano está universalmente reconocida como beneficiosa para la salud y el bienestar.

Son bacilos de variada morfología, generalmente de forma bacilar, pueden ser cortos, regulares, con ramificaciones. Son Gram-positivos, inmóviles, no esporulados y anaerobios estrictos, sin embargo, el grado de tolerancia al oxígeno depende de la especie y del medio de cultivo. Se disponen aislados, en cadenas, en empalizada o en forma de V, Y o T.

Los valores de temperatura y pH óptimos para su crecimiento son: de 31-41 °C y 6.5-7.0, respectivamente; si el pH varía siendo menor o igual a 6.5 el crecimiento es muy lento o incluso nulo, por todo ello, es importante controlar el descenso del pH en los productos lácteos que contienen este microorganismo. Las bifidobacterias difieren del resto de bacterias ácido lácticas en que no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético, como uno de sus principales productos de fermentación. No producen CO<sub>2</sub> ni los ácidos butíricos y propiónico. En el género *Bifidobacterium*, las hexosas son degradadas exclusiva y específicamente por la ruta de la fructosa-6-fosfato gracia a la presencia de la enzima fructosa-6-fosfato fosfocetolasa, enzima característica del metabolismo de azúcares en estas bacterias (Vasiljevic & Shah, 2008).

*B. animalis* subsp. *lactis* es más aerotolerante y resistente a las condiciones de acidez y temperatura elevada que la mayoría de las otras especies de *Bifidobacterium* en humanos. Este hecho explica que es frecuentemente usada para el desarrollo de alimentos y productos nutracéuticos. La cepa *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, es una de las cepas más estudiadas clínicamente, habiendo sido aislada originariamente en heces de adultos sanos. Esta cepa fue seleccionada por su seguridad y eficacia demostradas en la prevención de rotavirus, así como por su alta capacidad de adhesión *in vitro*, lo que le permite realizar colonizaciones temporales. También presenta una excelente tolerancia

tanto a los ácidos gástricos, como a los biliares y muy buenas propiedades de adhesión. Como la mayoría de bifidobacterias, la Bb-12 es activa tanto en intestino grueso, como en delgado de personas sanas y podría tener un efecto en la microbiota intestinal y el sistema inmunitario útil para la prevención y el alivio de diarreas y enfermedades atópicas, así como efectos beneficiosos para recién nacidos y niños (Möller & De Vrese, 2004).

### **3.2. Otros microorganismos probióticos: Levaduras**

Las levaduras constituyen en torno al 0.1 % de la microbiota intestinal total. La mayoría de las levaduras aisladas del tracto gastrointestinal son *Candida albicans*, aunque *Torulopsis glabrata* y *Candida tropicalis* pueden también aislarse en algunos individuos. A pesar de que tan sólo representan una pequeña minoría de los organismos que componen la microbiota, su tamaño celular es 10 veces superior al de las bacterias y podrían representar una actividad significativa inhibiendo a otros microorganismos patógenos por impedimento estérico (Chung et al., 2012). Por otro lado, su uso resulta muy interesante en tratamientos antibióticos, dado que son resistentes a estos y, en consecuencia, permiten restablecer y apoyar la microbiota intestinal beneficiosa dañada por el mismo. Sus condiciones óptimas de crecimiento incluyen un pH 4.5-6.5 y una temperatura 20-30 °C, lo cual les confiere la capacidad de actuar en diferentes sitios del tracto gastrointestinal. No existe posibilidad de transmisión del material genético, al contrario que en el caso de las bacterias y, por tanto, no se darán resistencias antibióticas. Su capacidad de activar la respuesta inmune viene dada por los componentes de su pared celular, como quitina, glucano y manosa (fosfopetidomannan y fosfolipomannan).



#### **4. Modo de actuación de los microorganismos probióticos**

A lo largo del tiempo, se han atribuido las propiedades beneficiosas de los probióticos a su capacidad de actuación en la microbiota intestinal, pudiendo transformarla de potencialmente dañina a beneficiosa para la salud humana. Sin embargo, con el avance en las investigaciones científicas al respecto, se ha podido concretar cuáles son las acciones que ejercen para lograr los efectos beneficiosos anteriormente mencionados:

##### **I. Competición con bacterias patógenas**

En primer lugar, produciendo sustancias que resultan nocivas para las bacterias patógenas, tanto por producir un descenso del pH, como por presentar un efecto tóxico para las mismas. En cuanto a la reducción del pH, encontramos que las bacterias ácido lácticas, como consecuencia de su actividad fermentativa, producen ácidos orgánicos (lactato principalmente) que actúan disminuyendo el pH. Por otro lado, en cuanto a la producción de sustancias nocivas para las bacterias patógenas, cabe resaltar la capacidad que presentan la mayoría de los probióticos de producir bacteriocinas o peróxido de hidrógeno.

En segundo lugar, nos encontramos con el mecanismo consistente en el desplazamiento de bacterias nocivas de su sitio de unión al epitelio. Se trata de una competición física entre las bacterias por unirse al epitelio, en este caso por impedimento estérico: la bacteria probiótica, al unirse a la superficie celular, oculta los receptores de la mucosa a los que debe unirse el patógeno u obstaculiza el acceso del patógeno a los receptores.

Por último, es posible que en algunos casos, la competición por nutrientes juegue un papel en la capacidad de cepas probióticas para desplazar a una bacteria patógena; como, por ejemplo, el efecto de los oligosacáridos prebióticos, que favorecen el desarrollo de probióticos endógenos (o exógenos administrados junto con el prebiótico).

## II. Mejora de la función de la barrera intestinal

El epitelio intestinal y el revestimiento de moco que lo recubre, junto con las uniones estrechas entre los enterocitos, forman una barrera física que protege al organismo frente a la acción de patógenos y agresiones externas. La pérdida de la integridad de la barrera epitelial puede desencadenar desórdenes como la enfermedad inflamatoria intestinal, infecciones entéricas, enfermedad celíaca y algunas enfermedades autoinmunes.

Ciertos probióticos han demostrado ser capaces de contribuir al mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, bien mediante la estimulación en la producción de mucinas (componentes del moco intestinal) o bien al favorecer la regeneración del epitelio intestinal cuando se encuentra dañado (Ohland & MacNaughton, 2010).

## III. Producción de nutrientes importantes para la función intestinal

Los AGCC, principalmente acetato, propionato y butirato, resultantes de la fermentación llevada a cabo por las bacterias ácido lácticas, son la principal fuente de energía para los colonocitos, regulando su desarrollo y diferenciación (Arribas et al., 2008).

## IV. Modulación de la respuesta inmune

La inmunidad de las mucosas hace referencia a toda la inmunidad generada en las superficies que están en contacto directo con el ambiente como es la mucosa intestinal, la cual recibe diariamente una enorme carga antigénica, debiendo distinguir entre patógenos y antígenos inocuos. La bacteria probiótica o sus fragmentos solubles llegan a la luz intestinal, allí se inicia una cascada de señales debido a la interacción de las células epiteliales del intestino o bien por bacterias que son transportadas a través de la barrera epitelial por células M o células dendríticas (CD). Las células de respuesta inmune innata se activan, aumentando la expresión de receptores de membrana (TLR: *Toll-like-Receptor*) y CD206.

Como consecuencia se producen diversas citoquinas y además las células del epitelio activadas también producen diferentes interleucinas (IL-6, IL-8, IL-1) las cuales servirán de señal para que las células inmunes intensifiquen la respuesta inducida. A su vez, los probióticos inducen el aumento de células secretoras de determinadas inmunoglobulinas como la IgA.

En la actualidad no se conoce con exactitud cómo se lleva a cabo la interacción de los probióticos con las células del epitelio intestinal para conseguir la activación del sistema inmune intestinal, una posible razón es que las BAL contienen en su pared celular peptidoglicanos, polisacáridos y ácido teicoico todos ellos con propiedades inmunoestimuladoras (Maldonado et al., 2016).

## **5. Efectos beneficiosos derivados del consumo de probióticos. Evidencias clínicas.**

Si tenemos en cuenta que la principal vía de administración de probióticos es la vía oral, podremos pensar que sus efectos beneficiosos tendrán lugar fundamentalmente en patologías intestinales. Sin embargo, gracias a su capacidad de modular la respuesta inmune de tipo sistémico, los probióticos también presentan efectos positivos a nivel extraintestinal como, por ejemplo, el tracto urogenital o tracto respiratorio, en los que podemos encontrar una microbiota susceptible de ser modificada. Mientras que algunos de estos efectos han sido profundamente documentados y ensayados clínicamente en humanos, otros aún solo han demostrado sus efectos y su gran potencial en estudios con animales de experimentación.

Además, hay que tener en cuenta que los efectos saludables demostrados para una cepa probiótica específica no son extrapolables o atribuibles a otras cepas ni siquiera de la misma especie como tampoco lo son entre poblaciones de diferentes edades (niños, ancianos, etc.) o estado fisiológico (embarazo) (SEPyP, 2009). En este sentido, podemos afirmar que existen evidencias suficientes para afirmar el efecto beneficioso de estos microorganismos sobre las patologías que se citan a continuación.

## 5.1. Probióticos en pediatría

Las aplicaciones clínicas de los probióticos en la edad pediátrica han ido creciendo con el curso de los años. Junto a indicaciones clásicas y ampliamente estudiadas, como pueden ser la diarrea aguda y la asociada a antibióticos, han sido declaradas nuevas evidencias acerca de sus beneficios en otros procesos patológicos.

De acuerdo con la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition –ESPGHAN- ) (Guarino et al., 2014; Szajewska et al., 2014) y la Organización Mundial de Gastroenterología (World Gastroenterology Organization - WGO-) (Guarner et al., 2017), el uso de cepas probióticas en pacientes pediátricos solo se recomienda si existen evidencias científicas suficientes sobre su seguridad y eficacia en el tratamiento y prevención de trastornos gastrointestinales (Tabla 4).

Son muchos los autores que han estudiado el papel beneficioso de los probióticos en otras patologías pediátricas tanto digestivas como extradigestivas, sin embargo, no existe un nivel de evidencia científica suficiente para ser recomendados como coadyuvantes en el tratamiento habitual de las mismas. Esto es debido, en muchas ocasiones, a que sólo hay constancia de un solo ensayo clínico asociado o no hay identificación/especificación de la cepa y, en menor medida, a problemas metodológicos (Tabla 5).

**Tabla 4.** Probióticos recomendados para el tratamiento de trastornos gastrointestinales pediátricos (Guarino et al., 2014; Guarner et al., 2017).

| <b>PATOLOGÍA</b>                | <b>CEPA</b>                                    | <b>DOSIS</b>                     |
|---------------------------------|--|----------------------------------|
| Diarrea aguda infecciosa        | <i>L. rhamnosus</i> GG                         | $\geq 10^{10}$ UFC/día, 5-7 días |
|                                 | <i>S. boulardii</i> CNCM I-745                 | 250-750 mg/día                   |
|                                 | <i>L. reuteri</i> DMS 17938                    | $1-4 \times 10^8$ UFC/día        |
| Diarrea por antibióticos        | <i>L. rhamnosus</i> GG                         | $1-2 \times 10^{10}$ UFC/día     |
|                                 | <i>S. boulardii</i>                            | 250-500 mg/día                   |
|                                 | <i>B. lactis</i> Bb12+ <i>S. thermophilus</i>  | $10^7 + 10^6$ UFC/g fórmula      |
|                                 | <i>L. rhamnosus</i> (E/N,Oxy y Pen)            | $2 \times 10^{10}$ UFC/12 h      |
| Cólico del lactante             | <i>L. reuteri</i> DMS 17938                    | $10^8$ UFC/día (21 días)         |
| Dolor abdominal y estreñimiento | <i>L. rhamnosus</i> GG                         | $10^{10}-10^{11}$ UFC/12 h       |
|                                 | <i>L. reuteri</i> DMS 17938                    | $10^8$ UFC/día (4 semanas)       |
|                                 | Mezcla VSL#3                                   | 1 satchet/12-24 h                |
| Enterocolitis necrotizante      | <i>L. reuteri</i> DMS 17938                    |                                  |
| <i>Helicobacter pylori</i>      | <i>S. boulardii</i> CNCM I-745                 | 500 mg/día (2-4 semanas)         |
|                                 | <i>L. casei</i> DN-114 001 en leche fermentada | $10^{10}$ UFC/día (14 días)      |
| Colitis ulcerosa                | <i>E. coli</i> Nissle 1917                     | $4-9 \times 10^{11}$ UFC/12 h    |
|                                 | Mezcla VSL#3                                   |                                  |

Mezcla VSL#3: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

**Tabla 5.** Evidencias científicas sobre el efecto beneficioso de probióticos en pediatría (García et al., 2015).

| <b>PATOLOGÍA</b>                           | <b>CEPA</b>                | <b>REFERENCIA</b>                 |
|--|----------------------------|-----------------------------------|
| Síndrome<br>sobrecrecimiento<br>bacteriano | <i>L. rhamnosus</i> GG     | Galpin et al., 2005               |
|  | <i>L. plantarum</i> 299V   | Quigley et al., 2009              |
| Intolerancia a la<br>lactosa               | <i>L. acidophilus</i>      | Levri et al., 2005                |
|  | <i>L. delbrueckii</i>      | Vesa et al., 2000                 |
|  | <i>S. thermophilus</i>     |                                   |
| Enfermedad celíaca                         | <i>B. lactis</i>           | Lindfords et al., 2008            |
|  | <i>B. longum</i> CETC 7347 | Sánchez et al., 2010              |
| Fibrosis quística                          | <i>L. rhamnosus</i> GG     | Bruzzese et al., 2007             |
|  |                            | Infante et al., 2008              |
| Obesidad                                   | <i>L. rhamnosus</i> GG     | Luoto et al., 2010                |
| Malnutrición                               | <i>S. thermophilus</i>     | Dock et al., 2004                 |
|  | <i>L. helveticus</i>       |                                   |
| Caries                                     | <i>L. rhamnosus</i> GG     | Ashwin et al., 2015               |
| Eczema                                     | <i>L. rhamnosus</i> GG     | Ozdemir, 2010                     |
|  |                            | Bunselmeyer & Buddendick,<br>2010 |

## 5.2. Probióticos en la edad adulta

Es cada vez mayor el número de evidencias acerca de la eficacia de los probióticos en un amplio abanico de indicaciones (Tabla 6). La recomendación clínica de probióticos debe basarse en una combinación de evidencia científica y conocimiento práctico, por ello, resulta útil el uso de Guías de Práctica Clínica (GPC) basadas en numerosas evidencias científicas que avalan el empleo de probióticos en distintas patologías con excelentes resultados terapéuticos (Guarner et al., 2017).

**Tabla 6.** Evidencias científicas sobre el efecto beneficioso de probióticos en el adulto (Guarner et al., 2017; Herrera et al., 2017; Pérez et al., 2017; Tulika et al., 2013).

| <b>PATOLOGÍA</b>                                | <b>CEPA</b>   | <b>REFERENCIA</b>                               |
|---|---|---|
| Diarrea aguda                                   | <i>L. paracasei</i> B 21060   | Grossi et al., 2010                             |
|   | <i>L. rhamnosus</i> GG  | Allen et al., 2010                              |
|   | <i>S. boulardii</i> CNCM I-745  |   |
| Diarrea asociada a antibióticos                 | <i>L. rhamnosus</i> GG  | Hempel et al., 2012                             |
|   | <i>S. boulardii</i> CNCM I-745  | Szajewska & Kołodziej, 2015                     |
|   | <i>L. reuteri</i> DSM 17938   |   |
|   | <i>L. acidophilus</i> CL1285+ <i>L. casei</i> (Bio-K+ CL1285)                   | Cimperman et al., 2011                          |
|   | Yogur con <i>L. casei</i> DN114 + <i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i> |   |
| Diarrea asociada a <i>Clostridium difficile</i> | <i>L. acidophilus</i> CL1285  | Johnson et al., 2012                            |
|   | <i>L. casei</i> LBC80R  |   |
|   | <i>S. boulardii</i> CNCM I-745  | Goldenberg et al., 2013                         |
|   | <i>L. rhamnosus</i> HN001 + <i>L. acidophilus</i> NCFM                          | Lahtinen et al., 2012                           |
| <i>Helicobacter pylori</i>                      | <i>L. rhamnosus</i> GG  | Dang et al., 2014                               |
|   | <i>S. boulardii</i> CNCM I-745  |   |
|   | <i>B. animalis lactis</i> (DSM15954)  | Hauser et al., 2015<br>Francavilla et al., 2014 |
|   | <i>L. reuteri</i> DSM 17938   | Emara et al., 2014                              |
|   | <i>L. reuteri</i> ATCC 6475   | Du et al., 2012                                 |
|   | <i>L. acidophilus</i> , <i>S. faecalis</i> ,<br><i>Bacillus subtilis</i>        |   |
|   |   |   |
| Colitis ulcerosa                                | <i>E. coli</i> Nissle 1917  | Kruis et al., 2004                              |
|   | VSL#3   | Bibiloni et al., 2005                           |

**Tabla 6.** (Continuación) Evidencias científicas sobre el efecto beneficioso de probióticos en el adulto.

| <b>PATOLOGÍA</b>             | <b>CEPA</b>   | <b>REFERENCIA</b>         |
|------------------------------|---|---------------------------|
| Síndrome Intestino Irritable | <i>B. bifidum</i> MIMBb75   | Guglielmetti et al., 2011 |
|                              | <i>L. plantarum</i> 299V  | Ducrotté et al., 2012     |
|                              | <i>B. infantis</i> 35624  | Whorwell et al., 2006     |
|                              | <i>L. acidophilus</i> SDC 2012, 2013  | Sinn et al., 2008         |
|                              | <i>S. boulardii</i> CNCM I-745  | Choi et al., 2011         |
|                              | <i>B. animalis</i> DN-173 010 + <i>S. thermophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i>     | Guyonnet et al., 2007     |
| Encefalopatía hepática       | <i>VSL#3</i>  | Lunia et al., 2014        |
|                              |   | Agrawal et al., 2012      |
| Intolerancia a lactosa       | Yogur con <i>S. thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | EFSA, 2010                |
| Hipercolesterolemia          | <i>E. faecium</i> M-74  | Hlivak et al., 2005       |
|                              | <i>Propionibacterium freudenreichii</i>   | Kiatpapan et al., 2001    |
|                              | <i>L. plantarum</i> PH04  | Nguyen et al., 2007       |
| Obesidad                     | <i>L. rhamnosus</i> PL60  | Lee et al., 2006          |
|                              | <i>L. plantarum</i> PL62  | Lee et al., 2007          |
|                              | <i>L. gasseri</i> SBT2055   | Sato et al., 2008         |
|                              | <i>L. casei</i> Shirota   | Naito et al., 2011        |
|                              | <i>B. longum</i> 88   | Chen et al., 2011         |
|                              | <i>VSL#3</i>  | Esposito et al., 2009     |
| Cáncer colorrectal           | <i>L. rhamnosus</i> LC705   | Hatakka et al., 2008      |
|                              | <i>L. gasseri</i> LG21  | Ohara et al., 2010        |
|                              | <i>B. lactis</i> Bb12   | Rafter et al., 2007       |
|                              | <i>B. longum</i> + <i>L. acidophilus</i> + <i>E. faecalis</i>                     | Zhang et al., 2012        |
|                              | <i>VSL#3</i>  | Delia et al., 2007        |
| Eczema                       | <i>L. rhamnosus</i> GG  | Huurre et al., 2008       |
|                              | <i>B. lactis</i> Bb12   | Isolauri et al., 2000     |



### 5.3. Probióticos y patologías de la mujer

Las principales infecciones propias de la mujer, como es el caso de las mastitis lactacionales y las infecciones vaginales, son debidas a una disbiosis en la microbiota de la zona. La Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) sostiene que los lactobacilos podrían ser una alternativa prometedora, costo-efectiva y segura en comparación con los tratamientos habituales para el tratamiento de infecciones vulvovaginales, siendo recomendable para ello su administración vía vaginal durante 5-10 días o vía oral 15-30 días y repetir la pauta durante tres meses (SEGO, 2012). Por otro lado, los probióticos también representan una alternativa efectiva en la prevención y tratamiento de mastitis lactacionales, aunque aún queda pendiente el perfeccionamiento de los protocolos de utilización de los mismos.

**Tabla 7.** Evidencias científicas sobre el efecto beneficioso de probióticos en la mujer (Álvarez- Calatayud et al., 2015; García et al., 2015; González, 2015; SEGO, 2012).

| PATOLOGÍA            | CEPA  | REFERENCIA                              |
|----------------------|---|---|
| Mastitis lactacional | <i>L. fermentum</i> CECT 5716   | Arroyo et al., 2010                     |
|                      | <i>L. salivarius</i> CECT 5713, PS2   | Jiménez et al., 2008                    |
|                      | <i>L. gasseri</i> CECT 5714   |   |
|                      | <i>B. breve</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. plantarum</i>   | Fernández et al., 2015                  |
| Vaginosis bacteriana | <i>L. rhamnosus</i> GR-1,   | Petricevic & Witt, 2008                 |
|                      | <i>L. reuteri</i> RC-14   |   |
|                      | <i>L. rhamnosus</i> Lcr 35  | De Champs et al., 2003                  |
| Candidiasis          | <i>L. acidophilus</i> + <i>L. rhamnosus</i> +<br><i>S.thermophilus</i> + <i>L. delbrueckii</i><br>subsp. <i>bulgaricus</i>            | Kovachev & Vatcheva-<br>Dobrevska, 2015 |
|                      | <i>L. rhamnosus</i> Lcr35   | Coudeyras et al., 2009                  |
|                      | <i>L. gasseri</i> LN40 + <i>L. fermentum</i><br>LN99 + <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i><br>LN113 + <i>P. acidilactici</i> LN23 | Ehrström et al., 2010                   |
|                      | <i>L. plantarum</i> P17630  | De Seta et al., 2014                    |
|                      |   |   |



### **I.3. BIBLIOGRAFÍA**

---



Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiote. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 237-265.

Agrawal A, Sharma BC, Sharma P, Sarin SK. Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: an open-label, randomized controlled trial of lactulose, probiotics, and no therapy. *Am J Gastroenterol*. 2012; 107(7): 1043-1050.

Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 11: CD003048.

Álvarez-Calatayud G, Suarez E, Rodríguez JM, Pérez- Moreno J. Microbiota in women: clinical applications of probiotic. *Nutr Hosp*. 2015; 32: 56-61.

Alvarez-Olmos MI, Oberhelman RA. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 32: 1567-1576.

Arribas B, Rodríguez ME, Camuesco D, Zarzuelo A, Gálvez J. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharm*. 2008; 49: 1-30

Arrieta MC, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist- Doutsch S, Kuzeljevic B, Gold MJ, Britton HM, Lefebvre DL, Subbarao P, Mandhane P, Becker A1, McNagny KM, Sears MR, Kollmann T, Mohn WW, Turvey SE, Finlay BB. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med*. 2015; 30: 307.

Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis*. 2010; 50(12): 1551-1558.

Ashwin, D, Vijayaprasad KE, Taranath M, Ramagoni NK, Nara A, Sarpangala M. Effect of Probiotic Containing Ice-cream on Salivary Mutans Streptococci (SMS) Levels in Children of 6-12 Years of Age: A Randomized Controlled Double Blind Study with Six-months Follow Up. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(2): ZC06-9.

Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host- bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005; 307: 1915-1920.

Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640.

Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100(7): 1539-1546.

Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 16050-16055.

Bruzzese E, Raia V, Spagnuolo MI, Volpicelli M, De Marco G, Maiuri L, Guarino A. Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *Clin Nutr.* 2007; 26: 322-328.

Bunselmeyer B, Buddendick K. Probiotics and Prebiotics—Prevention and Therapy in Atopic Eczema. *Probiotics and health.* 2010; 279-292.

Calum JW, Caitriona MG, Paul W. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett.* 2014; 588: 4120-4130.

Cancelo MJ, Beltrán D, Calaf J, Campillo F, Cano A, Guerra JA, Neyro JL. The protocol of the Spanish Society of Obstetrics and Gynecology for the diagnosis and treatment of vulvovaginal infection. *Prog Obstet Ginecol.* 2013; 56: 278-284.

Centers for Diseases Control and Prevention CDC. Diseases Characterized for vaginal discharge. Treatment Guidelines. 2015. Disponible en: <https://www.cdc.gov/std/tg2015/trichomoniasis.htm> [consultado 23 Oct 2017].

Chen JJ, Wang R, Li XF, Wang RL. *Bifidobacterium longum* supplementation improved high-fat-fed-induced metabolic syndrome and promoted intestinal RegI gene expression. *Exp Biol Med.* 2011; 236: 823-831.

Choi CH, Jo SY, Park HJ, Chang SK, Byeon JS, Myung SJ. A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial of *Saccharomyces boulardii* in irritable bowel syndrome: effect on quality of life. *J Clin Gastroenterol.* 2011; 45(8): 679-683.

Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana N, Edelman SM, Troy EB, Reading NC, Villablanca EJ, Wang S, Mora JR, Umesaki Y, Mathis D, Benoist C, Relman DA, Kasper DL. Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota. *Cell*. 2012; 149: 1578-1593.

Cimperman L, Bayless G, Best K, Diligente A, Mordarski B, Oster M, Smith M, Vatakis F, Wiese D, Steiber A, Katz J. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in hospitalized adults. *J Clin Gastroenterol*. 2011; 45: 785-789.

Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O' Connor EM, Cusack S, et al. Gut Microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. 2012; 488: 178-184.

Collado MC, Donat E, Robes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol*. 2009; 62: 264-269.

Collado MC. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. 2004.

Coudeyras S, Jugie G, Vermerie M, Forestier C. Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2008; 549-640.

Dang Y, Reinhardt JD, Zhou X, Zhang G. The effect of probiotics supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during eradication therapy: a meta-analysis. *PloS One*. 2014; 9: e111030.

De Champs C, Maroncle N, Balestrino D, Rich C, Forestier C. Persistence of Colonization of Intestinal Mucosa by a Probiotic Strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after Oral Consumption. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(3): 1270.

De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiol* 2010; 10: 63.

De Seta F, Parazzini F, De Leo R, Banco R, Maso GP, De Santo D, Sartore A, Stabile G, Inglese S, Tonon M, Restaino S. *Lactobacillus plantarum* P17630 for preventing *Candida* vaginitis recurrence: a retrospective comparative study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014; 182: 136-139.

De Theije CGM, Wopereis H, Ramadan M, Van Eijndthoven T, Lambert J, Knol J, Garssen J, Kraneveld AD, Oozeer R. Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun.* 2014; 37: 197-206.

Delia P, Sansotta G, Donato V, Frosina P, Messina G, de Renzis C, Famularo G. Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea, *World J. Gastroenterol.* 2007; 13: 912-915.

Dickson RP, Huffnagle G.B. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. *PloS Pathog.* 2015; 11: e1004923.

Dock D, Aguilar-Nascimento JE, Latorraca MQ. Probiotics enhance the recovery of gut atrophy in experimental malnutrition. *Biocell.* 2004; 28: 143-150.

Döderlein A. Das Scheidensekret Und Seine Bedeutung Für Das Puerperalfieber. *Centralblatt für Bacteriologie.* 1892; 11: 699-700.

Du Y-Q, Su T, Fan J-G, Lu Y-X, Zheng P, Li X-H, Guo C-Y, Xu P, Gong Y-F, Li Z- S. Adjuvant probiotics improve the eradication effect of triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(43): 6302-6307.

Ducrotté P, Sawant P, Jayanthi V. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(30): 4012-4018.

Dunne C, O' Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O' Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73: 386-392.

EFSA Panel on Dietetic Products N and A (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose



digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA J. 2010; 8(10): 1763.

Ehrström S, Daroczy K, Rylander E, Samuelsson C, Johannesson U, Anzén B, Pählson C. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microbes Infect.* 2010; 12(10): 691-699.

Emara MH, Mohamed SY, Abdel-Aziz HR. *Lactobacillus reuteri* in management of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Ther Adv Gastroenterol.* 2014; 7(1): 4-13.

Escherich, T Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehungen zur Physiologie der Verdauung. 1885.

Esposito E, Iacono A, Bianco G, Autore G, Cuzzocrea S, Vajro P, Canani RB, Calignano A, Raso GM, Meli R. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J Nutr.* 2009; 139: 905-911.

Fernández L, Arroyo R, Espinosa I, Marín M, Jiménez E, Rodríguez JM. Probiotics for human lactational mastitis. *Beneficial microbes,* 2014; 5(2): 169-183.

Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. The human milk Microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69: 1-10.

Francavilla R, Polimeno L, Demichina A, Maurogiovanni G, Principi B, Scaccianoce G, Ierardi E, Russo F, Riezzo G, Di Leo A, Cavallo L, Francavilla A, Versalovic J. *Lactobacillus reuteri* strain combination in *Helicobacter pylori* infection: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Gastroenterol.* 2014; 48(5): 407-413.

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 13780-13785.

Galpin L, Manary M, Fleming K, Ching-Nan O, Ashorn P, Shulman R. Effect of *Lactobacillus* GG on intestinal integrity in Malawian children at risk of tropical enteropathy. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82: 1040-1045.

García L, Rodríguez M, Pérez FJ, Álvarez-Calatayud, G. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. Abordaje en farmacia comunitaria. En Empleo en pediatría y patología de la mujer. 2015. Disponible en: <https://www.campussefac.org/system/files/03.empleo-pediatria-patologia-mujer/tema-03.pdf> [consultado 21 Oct 2017]

Goldenberg JZ, Ma SSY, Saxton JD, Martzen MR, Vandvik PO, Thorlund K, Guyatt GH, Johnston BC. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*- associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; 5: CD006095.

González, SP. Evidencias sobre el uso de probióticos en la prevención/tratamiento de la vulvovaginitis por candida. 2015. Disponible en: <http://farmacosalud.com/evidencias-sobre-el-uso-de-probioticos-en-la-prevenciontratamiento-de-la-vulvovaginitis-por-candida/> [consultado 1 Nov 2017].

Grossi E, Buresta R, Abbiati R, Cerutti R, Pro-DIA study group. Clinical trial on the efficacy of a new symbiotic formulation, Flortec, in patients with acute diarrhea: a multicenter, randomized study in primary care. *J Clin Gastroenterol.* 2010; 44: 35-41.

Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, Lo Vecchio A, Shamir R, Szajewska H. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases. Evidence-Based Guidelines for the Management of Acute Gastroenteritis in Children in Europe. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 59: 132-152.

Guarner F, Sanders ME, Kaufmann P, de Paula JA, Fedorak R, Garisch J, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics. World Gastroenterology Organization. 2017. Disponible en: [www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html](http://www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html) [consultado 24 Oct 2017]

Guglielmetti S, Mora D, Gschwender M, Popp K. Randomised clinical trial: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome

and improves quality of life -a double-blind, placebo controlled study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 33(10): 1123-1132.

Guyonnet D, Chassany O, Ducrotte P, Picard C, Mouret M, Mercier CH, Matuchansky C. Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 26(3): 475-486.

Hatakka K, Holma R, El-Nezami H, Suomalainen T, Kuisma M, Saxelin M, Poussa T, et al. The influence of *Lactobacillus rhamnosus* LC705 together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *Int. J. Food. Microbiol.* 2008; 128: 406-410.

Hauser G, Salkic N, Vukelic K, JajacKnez A, Stimac D. Probiotics for standard triple *Helicobacter pylori* eradication: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Medicine (Baltimore).* 2015; 94: e685.

Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, Wang Z, Miles JNV, Shanman R, et al. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2012; 307: 1959-1969.

Herrera, C., Guarner, F., Azpiroz, F. Probióticos y prebióticos en Gastroenterología. En G., Álvarez-Calatayud, A., Marcos, A., Margolles (eds), *Probióticos, prebióticos y salud: evidencia científica.* España: Ergon; 2016. pp. 233-247.

Hlivak, P., Odraska, J., Ferencik, M., Ebringer, L., Jahnova, E., Mikes, Z. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. *Bratisl Lek Listy.* 2005; 106: 67-72.

Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73: 365-373.

Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH, Mazmanian SK. Microbiota modulate

behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*. 2013; 155: 1451-1463.

Huurre A, Laitinen K, Rautava S, Korkeamaki M, Isolauri E. Impact of maternal atopy and probiotic supplementation during pregnancy on infant sensitization: A double-blind placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38: 1342-1348.

Infante D, Redecillas S, Torrent A, Segarra O, Maldonado M, Gartner L, Hidalgo E. Optimización de la función intestinal en pacientes con fibrosis quística mediante la administración de probióticos. *An Pediatr (Barc)*. 2008; 69: 501-505.

Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E., Salmien, S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30: 1604-1610.

Jiménez E, Xaus J, Rodríguez JM. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 4650-4655.

Johnson S, Maziade PJ, McFarland LV, Trick W, Donskey C, Currie B, Low DE, Goldstein EJ. Is primary prevention of *Clostridium difficile* infection possible with specific probiotics? *Int Soc Infect Dis*. 2012; 16: 786-792.

Kiatpapan P, Yamashita M, Kawaraichi N, Yasuda T, Murooka Y. Heterologous expression of a gene encoding cholesterol oxidase in probiotic strains of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium freudenreichii* under the control of native promoters. *J Biosci Bioeng*. 2001; 92: 459-465.

Kovachev SM, Vatcheva-Dobrevska RS. Local Probiotic Therapy for Vaginal *Candida albicans* Infections. *Probiotic Antimicrob Proteins*. 2015; 7: 38-44.

Krogius-Kurikka L, Lyra A, Malinen E, Aarnikunnas J, Tuimala J, Paulin L, Mäkivuokko H, Kajander K, Palva A. Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers. *BMC Gastroenterol*. 2009; 9: 95.

Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. Maintaining remission of ulcerative colitis

with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut. 2004; 53(11): 1617-1623.

Lahtinen SJ, Forssten S, Aakko J, Granlund L, Rautonen N, Salminen S, Viitanen M, Ouwehand AC. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM® modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly. Age Dordr Neth. 2012; 34: 133-143.

Larsen N, Vogensen FK, Van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. PLoS One. 2010; 5: e9085.

Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ, Lee KE, Paek KS, Lee Y, Park JH. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. Mol Cell Biol 2006; 1761: 736-744.

Lee K, Paek K, Lee HY, Park JH, Lee Y. Antiobesity effect of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. J Appl Microbiol 2007; 103: 1140-1146.

Levri KM, Ketvertis K, Deramo M, Merenstein JH, D'Amico F. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. J Fam Pract. 2005; 54: 613-620.

Lindfors T, Blomqvist K, Juuti-Uusitalo K, Stenman S, Venäläinen J, Mäki M, Kaukinen K. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. Clin Exp Immunol. 2008; 152: 552-558.

Lilly DM, Stillwell RH. Growth promoting factors produced by probiotics. Science. 1965; 147 (3659): 747-748.

Lunia MK, Sharma BC, Sharma P, Sachdeva S, Srivastava S. Probiotics prevent hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a randomized controlled trial. Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc. 2014; 12(6): 1003-1008.

Luoto R, Kalliomaki M, Laitinen K, Isolauri E. The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. *Internat J Obesity*. 2010; 34: 1531-1537.

Maldonado C, Lemme JM, Vélez EM, Perdigón G. Sistema inmune de las mucosas. Influencia bacteriana en la activación y homeostasis intestinal. En G., Álvarez-Calatayud, A., Marcos, A., Margolles (eds), *Probióticos, prebióticos y salud: evidencia científica*. España: Ergon; 2016. pp. 133-138.

Martín R, Soberón N, Vázquez F, Suárez JE. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiol. Clin*. 2008; 26: 160- 167.

Möller C, De Vrese M. Review: Probiotic effects of selected acid bacteria. *Milchwissenschaft*. 2004; 59: 597-601.

Naito E, Yoshida Y, Makino K, Kounoshi Y, Kunihiro S, Takahashi R, Matsuzaki T, Miyazaki K, Ishikawa F. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *J Appl Microbiol*. 2011; 110: 650-657.

Nguyen TD, Kang JH, Lee MS. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol*. 2007; 113: 358-361.

Ohara T, Yoshino K, Kitajima M. Possibility of preventing colorectal carcinogenesis with probiotics, *Hepatogastroenterology*. 2010; 57: 1411-1415.

Ohland CL, MacNaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J of Physiol- Gastroint Liver Physiol*. 2010; 298: 807-819.

Olivares M, Neef A, Castillejo G, Palma GD, Varea V, Capilla A, Palau F, Nova E, Marcos A, Polanco I, Ribes-Koninckx C, Ortigosa L, Izquierdo L, Sanz Y. The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut*. 2015; 64: 406-417.

---

OMS/FAO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001. Disponible en: <http://www.isapp.net/Portals/0/docs/FAO-WHO-2001-Probiotics-Report.pdf> [consultado Sep 2017].

Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002; 82: 279-289.

Ozdemir O. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *Clin Experim Immunol* 2010; 160: 295-304.

Ozen MDE. The history of probiotics: the untold story. *Benef. Microbes*. 2014; 6: 1-7.

Pérez J., Álvarez-Calatayud, G., Guarner, F. Evidencia científica y guías de práctica clínica para el empleo de probióticos, prebióticos y simbióticos. Empleo en Adultos: evidencia en las guías de práctica clínica. Disponible en: <https://www.elprobiotico.com/curso-evidencia-cientifica> [consultado 28 Oct 2017]

Petricevic L, Witt A. The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr 35® in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis. *BJOG* 2008; 115: 1369-1374.

Qin J, Li R, Raes-Arumugam M, Burgdorf KS, et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464: 59-65.

Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome- wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012; 490: 55-60.

Quigley EMM, Quera R. Small intestinal bacteria overgrowth: roles of antibiotics, prebiotics and probiotics. *Gastroenterology*. 2006; 130: 78-90.

Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, Klinder A, O'Riordan M, O'Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Van Loo J, Watzl B, Collins JK. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomised and colon cancer patients, *Am. J. Clin. Nutr.* 2007; 85: 488-496.

Reid G, Bruce AW. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World J Urol.* 2006; 24: 28-32.

Rodríguez JM. Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutr Hosp.* 2015; 31(1): 33-47.

Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 313-323.

Saini R, Saini S, Sugandha. Probiotics: The Health Boosters. *Cutan Aesthetic Surger.* 2009; 2: 112.

Sanchez E, Donat E, Ribes-Konicks C, Calabuig M, Sanz Y. Intestinal *Bacteroides* species associated with coeliac disease. *J Clin Pathol.* 2010; 63: 1105-1111.

Sato M, Uzu K, Yoshida T, Hamad EM, Kawakami H, Matsuyama H, Abd El-Gawad IA, Imaizumi K. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr.* 2008; 99: 1013-1017.

SEGO. Diagnóstico y tratamiento de las infecciones vulvovaginales. 2012. Disponible en: [www.bartolobeltran.com/archivos](http://www.bartolobeltran.com/archivos) [consultado 28 Oct 2017].

SEPyP. Declaraciones consensuadas del Workshop “Probióticos y salud. Evidencia científica”. 2009. Disponible en: <http://www.sepy.es/pdf/Documento-de-Consenso-sobre-Probioticos.pdf> [consultado 30 Oct 2017].

Serban, D.E. Gastrointestinal cancers: Influence of gut Microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Letters.* 2013. 345; 258-270.

Shen XJ, Rawls JF, Randall T, Burcal L, Mpande CN, Jenkins N, Jovov B, Abdo Z, Sandler RS, Keku TO. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes* 2010; 1: 138-147.

Sher Ju, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nature Rev Rheumatol.* 2011; 7: 569-578



Sinn DH, Song JH, Kim HJ, Lee JH, Son HJ, Chang DK, et al. Therapeutic effect of *Lactobacillus acidophilus* SDC 2012, 2013 in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci.* 2008; 53(10): 2714-2718.

Szajewska H, Guarino A, Hojsak I, Indrio F, Kolacek S, Shamir R, Vandenas Y, Weizman Z. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Use of probiotics for management of acute gastroenteritis: a position paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 58: 531-539.

Szajewska H, Kołodziej M. Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015; 42: 793-801.

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel J.F. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004; 53: 1-4.

Tissier H. Le traitement des infections intestinales per la méthode de transformation de la fore bactérienne de l' intestine. *CR Soc Biol.* 1906.

Tulika A, Satvinder S, Raj KS. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition.* 2013; 29: 591-596.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009; 457: 480-484.

Vaghef-Mehrabany E, Alipour B, Homayouni-Rad A, Sharif S-K, Asghari-Jafarabadi M, Zavvari S. Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition.* 2014; 30: 430-435.

Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics- From Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J.* 2008; 18(7): 714-728.

Vesa TH, Marteau P, Korpela R. Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr.* 2000; 19:165-175.

Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JF, Dallinga-Thie GM, Ackermans MT, Serlie MJ, Oozeer R, Derrien M, Druesne A, Van Hylckama Vlieg JE, Bloks VW, Groen AK, Heilig HG, Zoetendal EG, Stroes ES, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M. Transfer of intestinal Microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic síndrome. *Gastroenterology*. 2012; 143: 913-916.

Whorwell PJ, Altringer L, Morel J, Bond Y, Charbonneau D, O'Mahony L, Kiely B, Shanahan F, Quigley EM. Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101(7): 1581-1590.

Zhang J, Hatch M, Zhang D, Shulman J, Harville E, Thomas, AG. Frequency of Douching and Risk of Bacterial Vaginosis in African-American Women. *Obstetrics & Gynecology*. 2004; 104: 756-760.

Zhang JW, Du P, Gao J, Yang BR, Fang WJ, Ying CM. Preoperative probiotics decrease postoperative infectious complications of colorectal cáncer. *Am. J. Med. Sci*. 2012; 343: 199-205.

## **CAPÍTULO II**

---

### **Microencapsulación de probióticos**



## **II.1. MICROENCAPSULACIÓN**

---

**Fundamentos, aplicaciones y técnicas**



## **1. Microencapsulación**

El concepto de encapsulación se fundamenta en el uso de una matriz de naturaleza polimérica, la cual forma un ambiente que controla la interacción de la misma con el exterior. Debido a ello, las técnicas utilizadas para realizar la microencapsulación se describen como un proceso en el cual pequeñas partículas o gotas son rodeadas con un recubrimiento, presentando con ello diversas aplicaciones (Borgogna et al., 2010).

La microencapsulación se define como: “técnica de obtención de una barrera que retarda las reacciones químicas con el medio, promoviendo con ello un aumento de la vida útil, la liberación modificada del compuesto microencapsulado y facilitando la manipulación, ya que nos permite convertir un material líquido o gaseoso, en una forma sólida” (Fang & Bhandari, 2010).

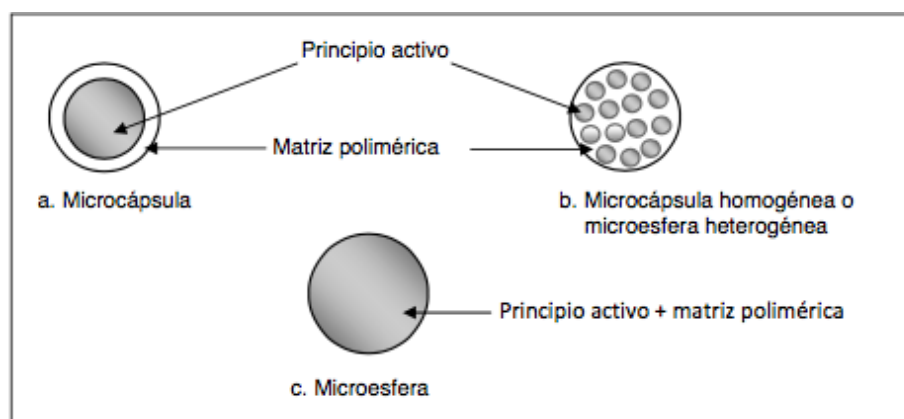
El producto resultante de la microencapsulación se denomina, de forma genérica, micropartícula, con un diámetro comprendido entre 0.5 y 1000  $\mu\text{m}$ . En función de su morfología y estructura interna, las micropartículas se clasifican en (Murillo et al., 2001):

- **Microcápsula:** partículas esféricas constituidas por un recubrimiento sólido en cuyo interior encontramos una sustancia sólida, líquida o pastosa. Cada microcápsula constituye un sistema reservorio recubierto por una película de material de recubrimiento, el cual da lugar a un estado de heterogeneidad máximo.

Nos referimos al núcleo como fase interna o principio activo, mientras que la membrana/película se denomina capa externa. Esta membrana es delgada, semipermeable y resistente.

- **Microesferas:** partículas esféricas constituidas por una red continua de material de soporte o polimérico en el cual la sustancia a encapsular se encuentra altamente dispersa en el seno de una matriz, bien en forma de partículas o moléculas. El resultado es un sistema matricial en estado de homogeneidad máximo.

- Microcápsulas homogéneas (formas multinucleares) o microesferas heterogéneas (partículas en dispersión): son sistemas intermedios entre los dos estados posibles de heterogeneidad (microcápsulas) y homogeneidad (microesferas). Presentan zonas ricas y pobres en principio activo, con una estructura interna tipo dispersión cristalina.



**Figura 2.** Tipos de micropartículas (Murillo et al., 2001)

Por tanto, las micropartículas pueden presentar una estructura tipo capsular o matricial. Dependiendo del método de microencapsulación empleado, se obtendrán micropartículas esféricas o irregulares. Además, estas podrán presentar más de un núcleo, membrana simple o bien constituir sistemas multicapa.

### 1.1. Aplicaciones de la microencapsulación

Las ventajas que ofrece la microencapsulación sobre un proceso convencional pueden resumirse en la protección y enmascaramiento de la sustancia encapsulada frente a medios inestables u hostiles para su posterior liberación progresiva. Estos dos factores han hecho que esta tecnología haya alcanzado gran auge en diferentes sectores industriales como es el alimentario, químico, farmacéutico o cosmético. Son muchos los beneficios que justifican el empleo de la microencapsulación (López, 2008; Martín, 2015):

- Asegurar la protección del principio activo frente a agentes atmosféricos que provocarían su degradación. Un ejemplo de ello son las vitaminas A y K, ambas



sensibles a la luz, o los microorganismos probióticos tan sensibles a estos agentes.

- Modificar el estado físico de una sustancia, de manera que permite transformar líquidos o gases en sólidos de granulometría controlada, lo que facilita su manipulación, almacenaje y transporte.
- Modificar la solubilidad de un principio activo, así una sustancia insoluble en agua puede convertirse en soluble y viceversa.
- Modificar la densidad de un principio activo para evitar su sedimentación en una suspensión.
- Prevenir la evaporación de productos volátiles tales como aceites esenciales y aromas.
- Enmascarar características organolépticas desagradables. El recubrimiento de una sustancia de características organolépticas indeseables con un material que hace imperceptibles dichas particularidades aporta, sin lugar a dudas, importantes ventajas desde el punto de vista de la aceptabilidad por parte del paciente. Esto ocurre con ciertos principios activos de sabor desagradable como tetraciclinas y ampicilina, también con aquellos que presentan olor desagradable como el aceite de pescado rico en omega-3.
- Reducción del efecto directo irritante causado por algunas sustancias en las mucosas. El ejemplo más ilustrativo lo representan, de modo general, los fármacos de carácter ácido, de los cuales un caso singular es el ácido acetilsalicílico. El recubrimiento de estos fármacos con un material no soluble a pH gástrico ha permitido reducir sensiblemente la irritación gástrica causada por los mismos.
- Conseguir una liberación sostenida o controlada del principio activo. Esta es, en la actualidad, la aplicación más frecuente de la microencapsulación. Gracias al recubrimiento eficaz del fármaco con un material adecuado, es posible conseguir, no únicamente una cesión gradual y sostenida del mismo, sino

también que la liberación se produzca a modo de pulsos, a un determinado pH o en una diana concreta.

- Proteger principios activos incompatibles entre sí, por ejemplo, ácidos y bases, metales que catalizan determinadas reacciones, etc.
- Permite mejorar las propiedades de compresibilidad de principios activos difícilmente compresibles.

## **1.2. Materiales utilizados en la microencapsulación**

La variedad de materiales que pueden emplearse en microencapsulación se va ampliando gradualmente en la medida que surgen nuevos biomateriales y se perfilan nuevas aplicaciones. De este modo, hace tan sólo diez años las micropartículas se administraban únicamente por vía oral; sin embargo, en la actualidad, existen diversas formulaciones en el mercado destinadas a su administración por otras vías.

### **1.2.1 Características de los materiales de recubrimiento**

Son diversos los criterios para seleccionar un material apropiado para la encapsulación. Generalmente se tiene en cuenta el tipo de principio activo, sus características y la aplicación a la que irá destinado. Estos materiales deben presentar una serie de requisitos como son (Shekar et al., 2010; Desai & Park, 2005):

- Buenas propiedades reológicas a altas concentraciones y fácil manejo.
- Habilidad de dispersarse o emulsionarse con el material a encapsular y mantener la estabilidad de la misma.
- No interaccionar con el material a encapsular durante el proceso de encapsulación seleccionado, así como en el tiempo de almacenamiento.
- Capacidad para cubrir y mantener dentro de su estructura al material encapsulado.

- Ser soluble en medio acuoso, disolventes o poder fundir la cubierta con la temperatura.
- Capacidad de proteger al máximo el material encapsulado de la acción de factores externos (oxígeno, temperatura, humedad, luz, entre otros).
- Capacidad de liberar completamente los disolventes u otros materiales utilizados durante el proceso de microencapsulación, ya sea en el secado o por condiciones de desolvatación.
- Controlar la liberación del material encapsulado en condiciones específicas.
- Poder llevar incorporados colorantes, plastificantes u otras sustancias que les permitan mejorar su aspecto o función.

### 1.2.2. Clasificación de los materiales de recubrimiento

De un modo general, los materiales capaces de constituirse en micropartículas se clasifican en tres categorías: grasas, proteínas y polímeros:

#### I. Grasas

La cera de carnauba, el alcohol estearílico, el ácido esteárico y los gelucires<sup>®</sup> son grasas que funden a una determinada temperatura y son erosionables por acción de las lipasas que existen a nivel gástrico. Otros lípidos utilizados son la triestearina y parafinas.

#### II. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas con estructuras químicas muy diversas, propiedades anfipáticas y con habilidad para asociarse entre ellas e interactuar con una gran variedad de sustancias. Estas características hacen que tengan excelentes propiedades funcionales como solubilidad, viscosidad, propiedades emulsificantes y propiedades para formar *films*, lo que da gran aplicabilidad en encapsulación.

La gelatina fue el primer material utilizado en microencapsulación y sigue siendo, en la actualidad, un material con un importante potencial. Ha sido ampliamente utilizada en los procesos de coacervación y secado por atomización (Ducel et al., 2004; Yoshii et al., 2001).

La albúmina, proteínas de soja y polipeptonas también son utilizadas en procesos de microencapsulación dada su capacidad de formar emulsiones estables.

Las proteínas aisladas de suero lácteo presentan todas las propiedades funcionales deseadas para un agente encapsulante (Amrita et al., 1999). La proteína de suero más usada en la industria alimentaria es la beta-lactoglobulina debido a sus propiedades emulsificantes (Jouene & Crouzet, 2000).

### III. Polímeros

Debido a su gran versatilidad, ésta es la familia de materiales más utilizada en microencapsulación. Además, podemos distinguir entre polímeros naturales, semisintéticos y sintéticos. Los polímeros naturales son principalmente de naturaleza polisacáridica, de origen animal o vegetal; destacan el alginato, el dextrano, la goma arábiga (goma acacia) y el quitosán. Los hidrocoloides han sido empleados como matriz debido a su capacidad para absorber agua, fácil manipulación e inocuidad. El alginato es un hidrocoloide que posee estas características como propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes.

Los polímeros semisintéticos engloban los derivados celulósicos, de los cuales existe una amplia variedad en el mercado con diferentes características de solubilidad. La etilcelulosa (EC) y el acetobutirato de celulosa, por ejemplo, son polímeros insolubles, mientras que el acetofalato de celulosa (CAP) presenta una solubilidad dependiente del pH. Otros derivados celulósicos empleados son metilcelulosa (MC), nitrocelulosa y carboximetilcelulosa. (CMC).

Los polímeros sintéticos más destacables son los derivados acrílicos y los poliésteres. Dentro de los derivados acrílicos existen polímeros insolubles con diferente

grado de permeabilidad y también variedades con solubilidad dependiente del pH, ofreciendo de este modo amplias posibilidades para controlar la liberación del material encapsulado. Por último, los poliésteres son polímeros de carácter biodegradable, lo que permite su administración por una vía parenteral. Dentro de ellos los más conocidos son la poliepsilon-caprolactona, el poli (ácido láctico), y los copolímeros del ácido láctico y ácido glicólico, los cuales son hidrofílicos y fácilmente eliminables del organismo por filtración glomerular.

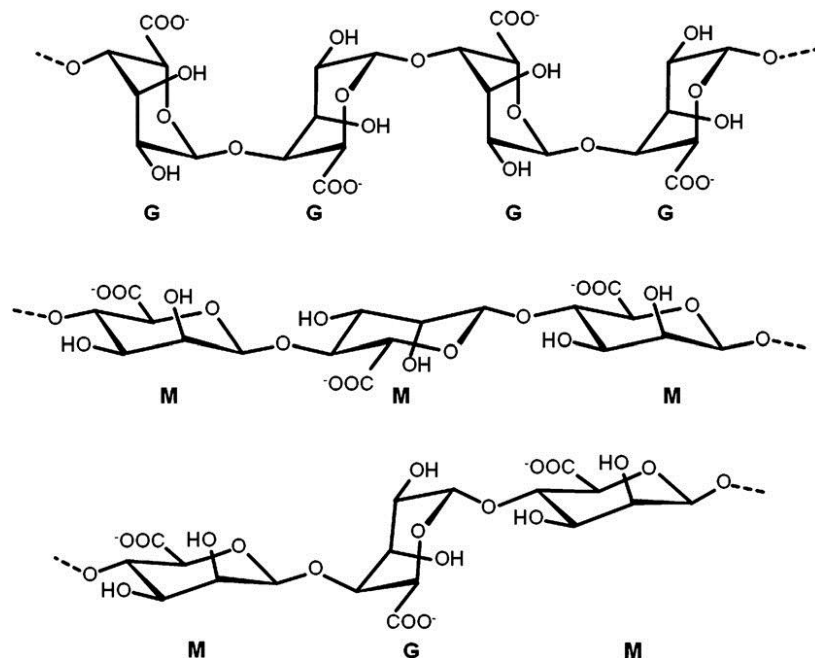
## **2. Alginato de sodio como material polimérico en la microencapsulación de probióticos**

La elección del polímero utilizado para la microencapsulación de probióticos se debe realizar teniendo en cuenta, entre otros factores, la toxicidad del mismo y la compatibilidad con los microorganismos a encapsular. El ácido algínico es un hidrocoloide presente en la pared celular de las algas pardas (*Phaeophyceae*), incluyendo *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*. Los hidrocoloides son macromoléculas con una gran afinidad por el agua donde se disuelven en mayor o menor medida, modificando su reología, aumentando la viscosidad del líquido e, incluso, llegando a gelificar dando un aspecto sólido al líquido inicial. Este ácido algínico se puede encontrar formando sales, por ejemplo con sodio, magnesio o potasio, las cuales se denominan alginatos. Entre sus múltiples ventajas recogidas por Imeson (2010), cabe resaltar el efecto prebiótico de los alginatos de bajo peso molecular, los beneficios de su ingesta como fibra diaria en la reducción de los niveles de azúcar y colesterol en sangre, así como la capacidad de prolongar la vida útil en productos.

### **2.1. Composición y estructura química**

El ácido algínico se ha descrito como un polisacárido lineal cuya estructura está compuesta por dos monómeros del ácido urónico, el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) y el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M), los cuales se distribuyen formando homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-) y M-bloques (-MMM-) o heteropolímeros donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-). En la estructura en bloques se encuentran

generalmente tres tipos de enlaces glucosídicos, incluyendo el diecuatorial (MM), diaxial (GG), y ecuatorial-axial (MG).



**Figura 3.** Estructura química de los G, M y MG- bloques (Lee & Mooney, 2012)

Los alginatos extraídos de diferentes fuentes (especie alga marina, parte del alga, ubicación costera) difieren en el contenido M/G así como en la longitud y configuración de los bloques. En alginatos de alto contenido en M, las cadenas son lineales, y tienen la función de ayudar a dar conformación tridimensional aguantando las cadenas G. Por esta razón dan lugar a un tipo de gel dúctil, flexible, elástico y con poca sinéresis. Mientras que, en alginatos de alto contenido en G, las cadenas tienen estructura de zigzag formando un gel consistente, rígido, quebradizo y con sinéresis (Cubero et al., 2002).

## 2.2. Solubilidad y viscosidad

El ácido alginico y sus sales son solubles en soluciones acuosas a pH superior de 3.5. Entre estas sales, el alginato sódico ha alcanzado un gran auge en la industria alimentaria y farmacéutica debido a su baja toxicidad, biocompatibilidad, bajo coste y capacidad de gelificación. La viscosidad es la característica principal de las soluciones

de alginato y, junto a su reactividad frente a los cationes polivalentes, es la que le otorga características como espesante, estabilizante y gelificante.

A fin de preparar soluciones de alginato de sodio homogéneas, se deben tener en cuenta los siguientes factores que afectan a su comportamiento (Cubero et al., 2002):

- Temperatura

La viscosidad de las soluciones de alginato decrece en aproximadamente un 2.5 % por cada grado de incremento en la temperatura, siendo el proceso reversible. La temperatura no tiene incidencias en las propiedades de congelación/descongelación.

- pH

La viscosidad de las soluciones de alginato aumenta a medida que el pH disminuye, y alcanza un máximo alrededor de pH 3-3.5, a medida que los grupos carboxilato en la cadena principal de alginato se protonan y forman enlaces de hidrógeno. A pH inferior a 2 el alginato es insoluble y precipita en forma de ácido algínico, mientras que un pH por encima de 10 causa una despolimerización.

- Fuerza iónica

La viscosidad de las soluciones del alginato de sodio decrece levemente con la presencia de sales con cationes monovalentes, debido a que, el polímero tiende a contraerse en solución al aumentar la fuerza iónica.

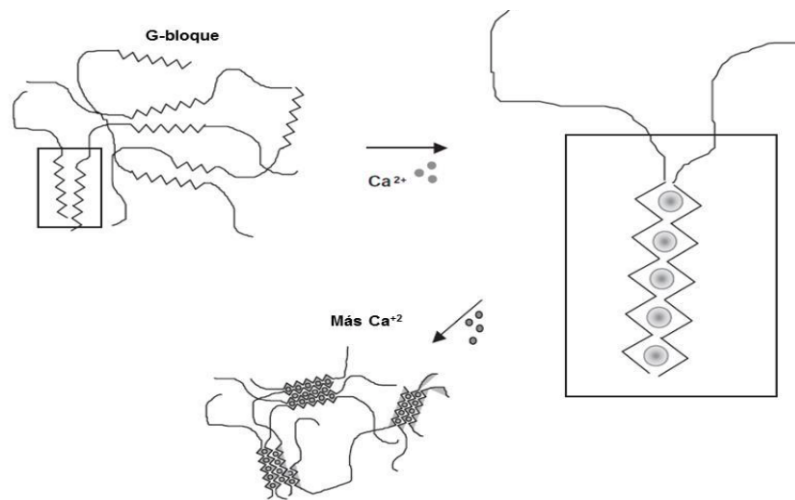
- Concentración y peso molecular

El aumento del peso molecular del alginato puede mejorar las propiedades físicas de los geles resultantes. Sin embargo, una solución de alginato formada a

partir de un polímero de alto peso molecular se vuelve muy viscosa, lo que a menudo es indeseable en el procesamiento. Además, la viscosidad de la solución acuosa de alginato sódico aumenta logarítmicamente a medida que aumenta la concentración del mismo.

### 2.3. Gelificación iónica

El proceso de gelificación se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de cationes divalentes (excepto el magnesio), de los cuales el ion calcio es el más empleado. Al alinearse los bloques-G de dos cadenas de alginato, se forma una configuración espacial tipo bucle con hendiduras en las cuales encajan perfectamente los iones calcio, formando una estructura conocida como “modelo de caja de huevos” descrita por Grant y colaboradores en 1973. Se establecen para ello enlaces cruzados con un solo ion calcio a través de los grupos hidroxilo y carboxilo de ambas cadenas implicadas.



**Figura 4.** Gelificación del alginato con calcio. Modelo “caja de huevos”.

(Draget, 2000)

Se forma así una red intermolecular de tipo matricial. Los bloques-M y bloques-MG no participarán en las zonas de unión, sino que forman los llamados segmentos elásticos en la red del gel. El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ion calcio y el contenido de los G-bloques (Funami et al., 2009).



La transición sol-gel se ha visto esencialmente controlada por la habilidad de introducir el ion vinculante al alginato. De este modo, según la procedencia de la fuente de calcio podemos diferenciar dos mecanismos de gelificación iónica: gelificación externa y gelificación interna.

### **2.3.1. Gelificación externa**

El proceso de gelificación externa ocurre al introducir la solución de alginato en otra solución con presencia de iones calcio. Así se produce la difusión del ion calcio desde dicha solución externa hacia la solución de alginato de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interfase y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, de manera que el contraión proveniente de la sal de alginato es desplazado por el catión divalente solubilizado en agua. Éste interacciona con los bloques-G de diferentes moléculas poliméricas, enlazándolas entre sí (Lupo et al., 2012). La principal fuente de calcio utilizada ha sido el  $\text{CaCl}_2$  debido a su mayor porcentaje de calcio disponible y bajo coste. La concentración de calcio y la composición del polímero son factores a tener en cuenta en el control de la transición sol-gel.

### **2.3.2. Gelificación interna**

El proceso de gelificación interna consiste en la liberación controlada del ion calcio desde una fuente interna de sal de calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa previamente en la solución de alginato de sodio. La liberación del ion calcio puede ocurrir mediante dos mecanismos (Figura 5):

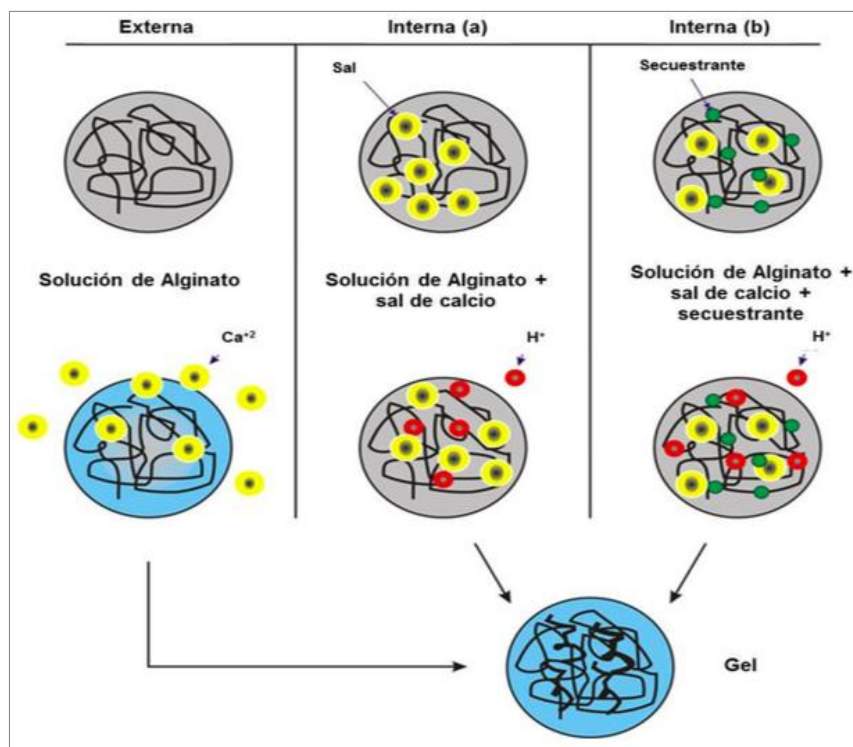
- Sal de calcio soluble a pH ácido (insoluble pH neutro):

Se adiciona un ácido orgánico a una fase externa la cual entrará en contacto con la solución de alginato. Los protones difunden hasta la fase acuosa y acidifican el medio, de este modo se solubilizan los iones calcio.

- Sales de calcio empleadas: carbonato de calcio, fosfato tricálcico, fosfato dicálcico y citrato tricálcico.
- Ácidos orgánicos: acético, adípico y glucono delta-lactona.
- Sal de calcio parcialmente soluble:

Se adiciona un agente secuestrante a la mezcla de alginato y sal de calcio. Este secuestrante evita la formación previa del gel al unirse al calcio. De este modo, al añadir el ácido orgánico dará lugar a la liberación de los iones calcio y, en consecuencia, se formará un gel homogéneo.

- Agentes secuestrantes empleados: fosfato, sulfato y citrato de calcio.



**Figura 5.** Mecanismos gelificación iónica externa e interna. (a) sal insoluble (b) sal parcialmente soluble (Helgerud et al., 2010).

Por tanto, en términos generales, factores como la solubilidad y concentración de la sal de calcio, la concentración del agente secuestrante y del ácido orgánico empleado determinarán la transición sol-gel.

### **3. Métodos de microencapsulación mediante gelificación iónica adaptados a bacterias probióticas**

Debido a las ventajas presentadas por el alginato, que avalan la versatilidad de este material de recubrimiento, y a las posibilidades ofrecidas por la gelificación iónica del mismo, han sido seleccionados como alternativa más adecuada para la microencapsulación de bacterias probióticas. En este sentido, es importante tener presente que las técnicas para la microencapsulación de probióticos deben permitir la obtención de micropartículas con las características físico-químicas necesarias y, al mismo tiempo, causar un daño mínimo a la integridad y viabilidad de las células. Además, deben ser fáciles de producir con costos de procesamiento aceptables.

La protección de los probióticos mediante su microencapsulación con hidrocoloides, como el alginato sódico, ha sido una práctica muy extendida con objeto de alargar su vida útil y, al mismo tiempo, ofrecer mayor versatilidad en el uso de los mismos. Las micropartículas resultantes serán permeables a nutrientes, gases y metabolitos, permitiendo mantener la viabilidad celular en su interior (Ding & Shah, 2009; John et al., 2011). Al emplear alginato sódico como matriz polimérica, las técnicas de encapsulación de probióticos se reducen a una gelificación iónica en el seno de una emulsión o bien mediante extrusión o atomización.

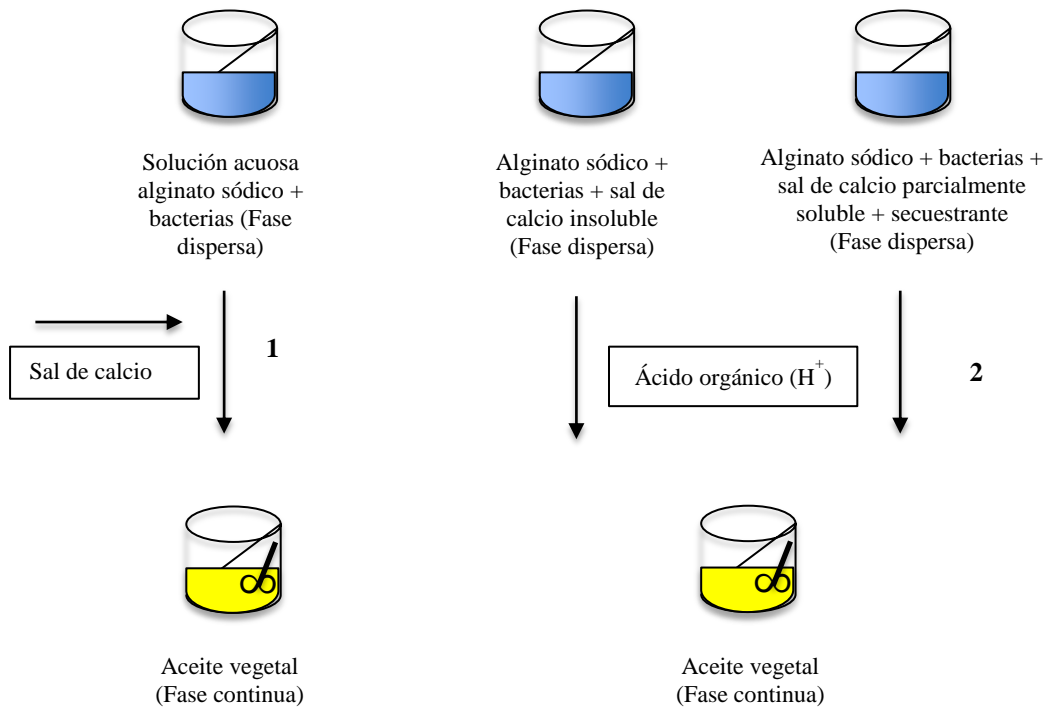
#### **3.1. Encapsulación en emulsión**

Esta técnica consiste en la dispersión de un líquido (fase dispersa) en otro inmiscible (fase continua), siendo la fase dispersa aquella que contiene la solución de alginato. Dicha fase formará la matriz polimérica donde se encontrarán las bacterias a encapsular mientras que la fase continua está constituida por un aceite vegetal. Los aceites vegetales más utilizados son aceite de soja, aceite de girasol, aceite de canola y aceite de maíz. Para ayudar a la formación y estabilidad de la emulsión se suelen

adicionar tensioactivos, los cuales inducen la encapsulación mediante la formación de micelas, vesículas, bicapas y micelas invertidas alrededor del producto a encapsular. La encapsulación en emulsión permite la preparación de micropartículas mediante ambos mecanismos de gelificación iónica: externa e interna.

En caso de gelificación externa en emulsión, tras la dispersión de la solución acuosa de alginato y bacterias en la fase continua no acuosa, se adiciona la fuente de calcio que iniciará la gelificación y desestabilizará la emulsión para separar las micropartículas formadas. Entre las fuentes de calcio disponibles, el cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) es la sal más comúnmente utilizada en este caso dada su alta solubilidad en agua y, por lo tanto, los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en solución se entrecruzarán de forma instantánea con las gotas de alginato para formar partículas (Figura 6).

En la gelificación interna, la fuente de calcio se encuentra en la misma fase dispersa, pero en forma de sal o complejo insoluble o parcialmente soluble en cuyo caso se adiciona un agente secuestrante (Gouin, 2004; Chan et al., 2006). La liberación del ion  $\text{Ca}^{2+}$  se produce gracias a que se añade un ácido orgánico que provoca una disminución del pH, dando lugar a la solubilización de la sal de calcio y a la consecuente gelificación (Figura 6). Entre las sales de calcio insolubles destaca el uso de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), la cual nos permite conseguir una reticulación gradual o controlada. A diferencia de las partículas formadas a través de la gelificación externa, la estructura del gel producida por la gelificación interna es más homogénea (Poncelet, 2001). La sal de calcio insoluble se dispersa homogéneamente dentro de la gota de alginato, y, tras la adición del ácido, se produce la disolución de esta sal de calcio dentro de la gota de alginato, dando como resultado una distribución más uniforme del polímero. Por lo tanto, la reticulación entre las cadenas poliméricas de alginato y los iones  $\text{Ca}^{2+}$  se produce homogéneamente dentro de las gotitas dispersas. Además, la actuación de este ácido da como resultado la liberación de dióxido de carbono, el cual facilita la formación de una matriz de gel más porosa y más suelta en comparación con las obtenidas mediante gelificación externa. Estas características son ventajosas en la encapsulación de microorganismos, que requieren un intercambio de solutos eficiente con el entorno externo (Jun-Yee et al., 2015) (Tabla 8).



**Figura 6.** Técnica de microencapsulación en emulsión (1) asociada a gelificación externa, (2) asociada a gelificación interna.

Las partículas obtenidas mediante emulsión tienen un tamaño comprendido entre 25  $\mu\text{m}$  y 2 mm, dependiendo, principalmente, de la velocidad de agitación y del tipo de tensioactivo empleado. Se trata de una técnica de fácil producción a gran escala dado que no necesita dispositivos específicos. Sin embargo, a pesar de ser muy utilizada en la encapsulación de probióticos gracias a la gran supervivencia alcanzada (80-95 %), presenta algunos inconvenientes; por un lado, el aceite residual en las cápsulas perjudica la textura y características organolépticas de las micropartículas, por otro, la necesidad de añadir un paso más al proceso para eliminar estos residuos, junto con el empleo de aceites vegetales, encarecen este método de encapsulación (Luján, 2010).

### 3.2. Encapsulación en extrusión

La extrusión es la técnica más antigua y común para la microencapsulación con hidrocoloides (King, 1995) (Tabla 8). Esta técnica consiste en hacer pasar la solución de alginato sódico y bacterias a encapsular por un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de goteo controlado. Esta solución se hace gotear sobre una solución de endurecimiento, la cual contendrá la fuente de calcio que iniciará el proceso de

gelificación. Se trata de una técnica relativamente sencilla y de bajo costo. Además, es poco agresiva, no emplea disolventes perjudiciales para las bacterias y se puede llevar a cabo tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

La principal limitación presentada por esta técnica es el gran tamaño de las partículas formadas respecto a las obtenidas por emulsión. Los factores que afectan el tamaño de las partículas producidas incluyen el diámetro del orificio, la viscosidad y la velocidad de flujo de la solución polimérica, la distancia de caída desde el orificio a la solución de reticulación y la concentración/temperatura de la solución de polímero (Brun-Graepi et al., 2011). Además, se produce una reticulación y endurecimiento muy rápido en la superficie de las partículas formadas, dificultando el movimiento de los iones calcio hacia el núcleo interno y dando como resultado partículas menos estables. Por otro lado, su producción a gran escala es difícil dada la necesidad de dispositivos específicos.

Estudios recientes demuestran que la técnica mejora notablemente al incorporar dispositivos extrusores como boquillas múltiples, discos atomizadores (Champagne et al., 2000), inyectores con impulsos vibratorios (Dohnal & Steepánek, 2010), generador electrostático de goteo, flujo de aire coaxial o co-extrusión (Mark et al., 2009) y rotura de aire laminar o *jet-cutter*, todos diseñados con el mismo objetivo, la producción masiva de partículas.

**Tabla 8.** Microorganismos probióticos microencapsulados en matrices de alginato sódico.

| <b>MICROORGANISMO PROBIÓTICO</b>  | <b>TÉCNICA MICROENCAPSULACIÓN</b> | <b>REFERENCIA</b>         |
|---|-----------------------------------|---------------------------|
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp.<br><i>bulgaricus</i> NBRC 13953                             | Emulsión                          | Takei et al., 2008        |
| <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> especies  | Emulsión                          | Ding & Shah., 2009        |
| <i>Enterococcus faecium</i> A 2000  | Extrusión                         | Ivanova et al., 2000-2002 |
| <i>Escherichia coli</i> (genéticamente<br>modificado)   | Extrusión                         | Hucík et al., 2010        |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> DPC16  | Extrusión                         | Zhao et al., 2012         |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> CSCC 2400  | Extrusión                         | Chandramouli et al., 2004 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i><br>GG, <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> | Extrusión                         | Brachkova et al., 2010    |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSMZ20079  | Extrusión                         | Lotfipour et al., 2012    |

**Tabla 8.** (Continuación) Microorganismos probióticos microencapsulados en matrices de alginato sódico.

| <b>MICROORGANISMO PROBIÓTICO</b>   | <b>TÉCNICA MICROENCAPSULACIÓN</b> | <b>REFERENCIA</b>  |
|--|-----------------------------------|--|
| <i>Lactobacillus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>   | Emulsión                          | Larisch et al., 1994   |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> F-35  | Emulsión                          | Qiang et al., 2011   |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> | Emulsión                          | Pliszczak et al., 2011   |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> CGMCC1.2686   | Emulsión                          | Sha et al., 2014   |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> CRL 1324  | Extrusión                         | Juárez et al., 2015  |
| <i>Staphylococcus succinus</i> MA <b>B</b> 4,<br><i>Enterococcus fecium</i> FIdM3              | Extrusión                         | Sathyabama et al., 2014  |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>   | Extrusión                         | Kearney et al., 1990   |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> ,<br><i>Bifidobacterium lactis</i>                            | Emulsión                          | Talwalkar & Kailasaphaty, 2003; Kailasaphaty & Masondole, 2005 |
| <i>Lactobacillus reuteri</i>   | Emulsión<br>Extrusión             | Muthukumarasamy & Holley, 2006                                 |

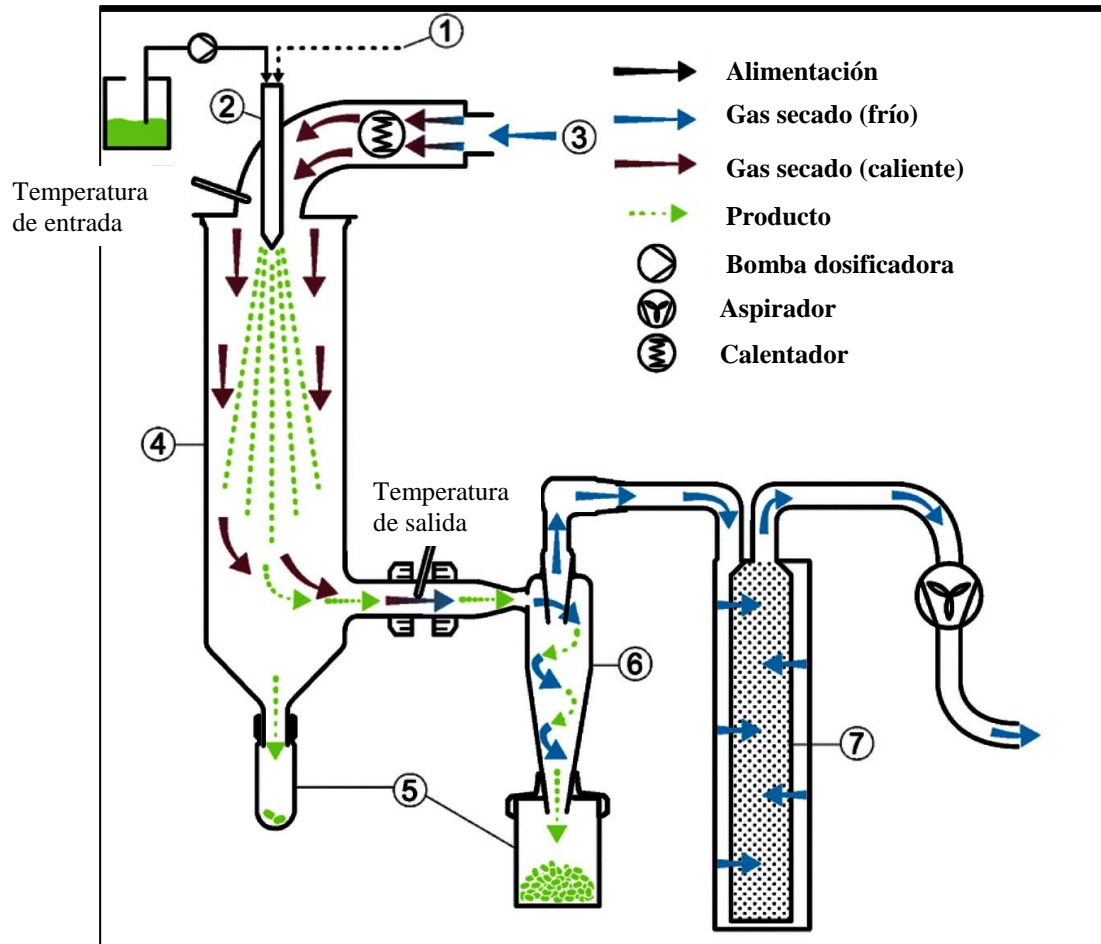


### **3.3. Microencapsulación mediante secado por atomización o *spray drying***

Se trata de una técnica muy utilizada para la encapsulación de probióticos (Corcoran et al., 2004; Zhao et al., 2008). El procedimiento consiste en la preparación de una emulsión o suspensión previamente homogeneizada de probióticos en la matriz del material polimérico elegido para encapsular. Esta se pulverizará sobre un gas caliente, generalmente aire, promoviendo así la evaporación instantánea del solvente (agua) y permitiendo que los probióticos queden inmovilizados en el material encapsulante en forma de partículas de polvo (de Vos et al., 2010; Rokka & Rantamaki, 2010). Las micropartículas en polvo obtenidas son separadas del gas a bajas temperaturas.

El proceso de microencapsulación estará controlado por la velocidad de alimentación del producto, el flujo de aire, la temperatura de alimentación, la temperatura del aire de entrada y la temperatura del aire de salida (O’Riordan et al., 2001; Vega & Roos, 2006). De esta manera, si el aire de entrada se ajusta a una temperatura baja, se reduce la tasa de evaporación del agua, lo que conduce a la formación de partículas agregadas con membranas de alta densidad y propiedades de flujo deficientes; sin embargo, Brun-Graepi y colaboradores (2011) mostraron que si esta temperatura alcanza valores muy altos puede conducir a una evaporación rápida y excesiva de la humedad, lo que produce grietas en la membrana polimérica, así mismo, la alta temperatura también afecta de forma negativa a la viabilidad celular debido a una deshidratación de las mismas e inactivación de enzimas esenciales para el equilibrio celular. Además, la temperatura de alimentación es crucial para conseguir una pulverización de la solución de polímero homogénea.

En comparación con otras técnicas de microencapsulación, esta técnica ofrece la atractiva ventaja de establecer esta tecnología como un proceso continuo, su facilidad de manejo y su bajo coste. Sin embargo, cuando se aplica a gran escala, los altos costos de instalación y operación, así como el considerable área de piso requerida por el equipo, representan los principales desafíos del proceso (Figura 7) (John et al., 2011).



**Figura 7.** Esquema del proceso de atomización o *spray drying*. (1) Gas atomización, (2) Boquilla atomización, (3) Gas de secado, (4) Cámara de atomización, (5) Vasos de recogida de producto en polvo, (6) Ciclón, (7) Filtro.

### 3.4. Métodos de microencapsulación de probióticos derivados de la atomización

Con objeto de solventar los efectos indeseados de la microencapsulación mediante secado por atomización o *spray drying*, han sido ideadas algunas modificaciones dando lugar a variantes tecnológicas como *freeze drying*, *fluidized bed coating*, *impinging aerosol technology* y *spray-chilling* (Martín et al., 2015).

#### 3.4.1. *Freeze drying*

La obtención de micropartículas como polvo seco facilita la manipulación y su almacenamiento por más tiempo. La técnica de *spray drying* se puede utilizar para

producir y secar micropartículas en un solo paso o se puede usar por separado como método de secado para micropartículas preparadas utilizando otras técnicas. Sin embargo, existe otra técnica más efectiva que solventa los problemas asociados a *spray drying*, conocida como *freeze drying* o liofilización. En ella, las micropartículas se someten a una temperatura muy baja, lo que da lugar a la formación de cristales de hielo a partir del agua residual. Posteriormente, se procede a la sublimación de estos cristales a baja presión, de este modo el agua pasa de estado sólido a estado gaseoso sin pasar por el estado líquido, dando como resultado un producto seco y poroso.

Sin embargo, se sabe que incluso las bajas temperaturas causan lesiones por frío en las células microbianas y, por lo tanto, es necesario el uso de crioprotectores en el proceso. Por ello, el costo de operación es elevado ya que se necesitan bajas temperaturas, vacío y largos tiempos de procesado (Chen & Wang, 2007; Oliveira et al., 2007). Además, durante el proceso se forma una cubierta porosa entre las bacterias y su entorno, esta cubierta de alta porosidad ofrece una protección deficiente cuando se requiere la liberación prolongada de la carga probiótica (Zuidam & Shimoni, 2009).

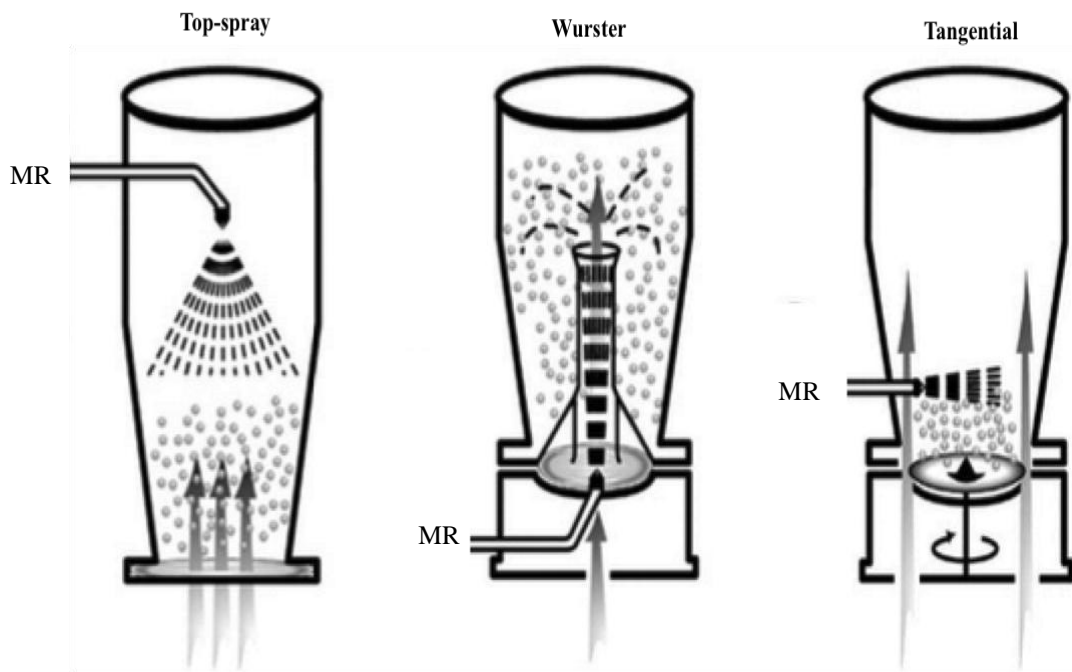
### **3.4.2. Fluidized bed coating**

El recubrimiento en lecho fluido se basa en una modificación de la metodología del *spray drying*, la cual amplía su campo de aplicación en la industria alimentaria. En ella, las partículas en polvo se encuentran en suspensión, llamado lecho fluido, y son pulverizadas con el material de recubrimiento, bien en un proceso continuo o discontinuo. Para su aplicación en probióticos, los microorganismos han de ser liofilizados como paso previo al recubrimiento utilizando como material de soporte, por ejemplo, leche desnatada, alginato cálcico o grasas. Como materiales para recubrimiento se pueden utilizar gomas, proteínas, hidratos de carbono y grasas.

En su desarrollo hay que tener en cuenta ciertas variables como la velocidad de circulación de las partículas, la presión de atomización de la boquilla (Kage et al., 2003), la velocidad de alimentación del revestimiento y la temperatura (Guignon, et al., 2002) ya que tienen un impacto en la aglomeración y formación de película de las partículas, lo que influye en la eficacia del recubrimiento.

Su producción a gran escala es fácil y de costo moderado, lo cual, junto con el control total de la temperatura, hacen que sea uno de los métodos de encapsulación de probióticos de gran interés comercial.

En función del ángulo de entrada del material de recubrimiento, podemos diferenciar cuatro métodos de lecho fluido: top-spray, bottom-spray, Wurster y tangential-spray (Figura 8) (Champagne & Fustier, 2007).



**Figura 8.** Métodos de recubrimiento en lecho fluido.

(MR) Material de recubrimiento

### 3.4.3. *Impinging aerosol technology*

Uno de los inconvenientes asociados a las técnicas de microencapsulación es su dificultad de producción industrial. Esta técnica surge ante la necesidad de conseguir una producción de alto rendimiento. Consiste en el uso de dos aerosoles de forma separada, de manera que uno de ellos contiene la solución de alginato con las bacterias a encapsular y será inyectado por la parte superior de la cámara de atomización (top-spray), mientras que el otro aerosol contiene la solución de reticulación de cloruro cálcico, que será inyectada simultáneamente por la parte inferior de la cámara (bottom-

spray). El gas para la atomización de ambas soluciones también entrara por ambos ángulos superior e inferior. De esta forma, se consigue una producción continua de micropartículas cuyo diámetro medio es inferior a 40  $\mu\text{m}$  (Sohail et al., 2011).

#### **3.4.4. *Spray-chilling***

Esta tecnología, también conocida como *spray-cooling*, fue diseñada para superar el problema de daño celular debido a la exposición de las bacterias a altas temperaturas durante la atomización y, es por ello, que en ella se aplica el principio opuesto a la atomización dado que se usa aire frío o cámara fría en lugar de aire caliente. En este método el material encapsulante o cubierta es sometido a un proceso de fusión. La mezcla de este junto con el material a encapsular disuelto o disperso en la misma es fundido y se atomiza a través de una boquilla al interior de una cámara en la que circula una corriente de aire o gas frío, dando lugar a la inmovilización de las bacterias. Es una técnica muy adecuada para la encapsulación de compuestos termolábiles, además es de bajo coste y, por tanto, aplicable en procesos industriales.

Los materiales utilizados para formar la cubierta son productos de bajo punto de fusión entre los que se destacan las ceras, las grasas y los ácidos grasos. Dado el carácter lipídico de las micropartículas obtenidas, resultan muy interesantes en la industria alimentaria puesto que son digeridas de una forma sencilla a nivel intestinal por acción de lipasas, dando lugar a la liberación de los microorganismos probióticos en las proximidades de su lugar de acción. Sin embargo, la carga probiótica también puede ser liberada sometiendo las micropartículas a temperaturas por encima del punto de fusión de la grasa (Schrooyen, et al., 2001).

Estas micropartículas pueden presentar algunas desventajas, que incluyen una baja capacidad de encapsulación y la expulsión del material del núcleo durante el almacenamiento como resultado de la estructura cristalina y la disposición polimórfica característica de muchos materiales lipídicos durante el proceso de solidificación y cristalización (Sato & Ueno, 2005; Westesen et al., 1997).

## **4. Otros métodos de microencapsulación de probióticos**

En la actualidad el número de métodos de microencapsulación continúa creciendo a medida que van apareciendo nuevos materiales de microencapsulación y nuevas aplicaciones probióticas que requieran su microencapsulación. A parte de las técnicas de microencapsulación ya descritas, han sido demostrados los beneficios otorgados por otros métodos de encapsulación en relación a la protección y supervivencia de las bacterias encapsuladas.

### **4.1. Coacervación o separación de fases**

Esta técnica ha sido utilizada para la encapsulación de células microbianas y, además, aceites aromatizantes, conservantes y enzimas. Se basa en inducir la desolvatación del polímero de recubrimiento, obteniéndose entonces dos fases líquidas, una rica en coloides (coacervado) y otra pobre (sobrenadante). Este coacervado se depositará a continuación en forma de gotículas alrededor de las bacterias a encapsular. Como procedimientos inductores de la desolvatación están los cambios de temperatura, modificaciones de pH, adición de un “no solvente”, de una sal o polímero incompatible. Se entiende por “no solvente” aquel disolvente en el cual el polímero es insoluble y cuya adición provoca la insolubilización del polímero y su deposición alrededor de las partículas en suspensión. Si es necesario, pueden usarse agentes de reticulación químicos o enzimáticos para fortalecer las partículas obtenidas. De un modo más específico, las etapas en las que tiene lugar el proceso de coacervación son las siguientes:

- Dispersión de las bacterias a encapsular en una solución del polímero/s que formará la cubierta mediante una agitación continua y adecuada.
- Inducción a la desolvatación polimérica por alguno de los procedimientos anteriormente indicados. Se pueden observar las gotículas de coacervado las cuales recuerdan a una emulsión. Por otro lado, tendremos un sobrenadante turbio, que irá clarificando a medida que avanza la coacervación.

- Las gotículas formadas de adsorben alrededor de las bacterias a encapsular de forma continua.
- Tiene lugar la coalescencia de estas gotículas que formarán una cubierta continua alrededor de los núcleos encapsulados.
- Puede procederse al endurecimiento de la cubierta mediante enfriamiento o agentes de reticulación químicos y enzimáticos.
- Separación de las partículas obtenidas mediante centrifugación y filtración.

Los factores de procesamiento más importantes que deben considerarse en esta técnica son la velocidad de adición del agente de desolvatación, la velocidad de agitación de la dispersión, así como la viscosidad y composición del coacervado y del sobrenadante, ya que afectarán a la distribución del tamaño, morfología y porosidad interna de las partículas obtenidas.

La encapsulación de probióticos mediante coacervación resulta interesante puesto que permite la liberación controlada de los mismos por cambios de estrés, temperatura o pH (Oliveira et al., 2007). Además, se pueden obtener partículas muy pequeñas y con una eficacia de encapsulación elevada. Sin embargo, los altos costes de producción y la necesidad de dominio y control de diversos factores hacen la técnica poco útil a nivel industrial (Freitas et al., 2005; Park & Chang, 2000).

#### **4.2. Polimerización interfacial**

En este proceso se produce la polimerización de dos monómeros (uno soluble en aceite, y otro soluble en agua) en la interfase de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana que dará lugar a la pared de las cápsulas. El proceso consiste, primeramente, en la formación de una emulsión de fase externa oleosa (A/O), en la que la fase acuosa interna contiene la sustancia a encapsular y uno de los monómeros, y la fase lipófila dispersante está formada por un disolvente orgánico, el segundo monómero y un tensioactivo. Los monómeros difunden hacia la interfase donde reaccionarán para formar un único polímero que encapsula la fase dispersada constituyendo las partículas.

Esta es la diferencia de este tipo de polimerización con respecto a los métodos convencionales, en donde la reacción se produce en el seno de una única fase. El último paso consiste en la separación de estas partículas mediante centrifugación y lavado de las mismas.

### **4.3. Inclusión molecular**

La inclusión molecular en ciclodextrinas y liposomas se presentan como otra alternativa de encapsulación de sustancias bioactivas. Estas técnicas son más costosas y, por lo tanto, están menos explotadas.

#### **4.3.1. Inclusión en ciclodextrinas**

Se trata de diferentes moléculas de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1-4-glucosídicos y que se pueden obtener de forma natural a partir del almidón mediante la acción de enzimas microbianas. El número de unidades de glucosa determina el nombre de cada ciclodextrina, que es designada por una letra griega:  $\alpha$ -CD (6 unidades de glucosa),  $\beta$ -CD (7 unidades de glucosa)  $\gamma$ -CD (8 unidades de glucosa). Estructuralmente presentan un interior altamente apolar y un exterior muy hidrofílico. Esta estructura es la que le confiere la capacidad de encapsular distintos activos o moléculas huésped en su cavidad interna. La estabilidad de estos complejos depende de factores como la estructura molecular e hidrofobicidad de la molécula huésped, pH de la solución, disolvente orgánico, temperatura de la solución, concentración y estructura molecular de las ciclodextrinas (Yañez et al., 2005).

Entre las ventajas de la encapsulación en ciclodextrinas podemos destacar la protección de sustancias sensibles a factores ambientales como luz y oxígeno, fijación de sustancias volátiles, aumento de la solubilidad, absorción y biodisponibilidad de las moléculas huésped, así como el enmascaramiento de características organolépticas desagradables.

Los principales inconvenientes derivados de su uso son la poca estabilidad frente a la oxidación, bajos rendimientos de encapsulación y alto costo de la técnica.



#### **4.3.2. Inclusión en liposomas**

Los liposomas son partículas esféricas con un tamaño de 30 nm a varios micrómetros. Se trata de estructuras formadas por moléculas anfifílicas, las cuales presentan sitios hidrófobos e hidrófilos, como por ejemplo los fosfolípidos. En solución acuosa, las colas lipófilas de los fosfolípidos entran en contacto unas con otras formando una membrana de doble capa que es hidrófila en sus partes exteriores y lipófila en su interior. Por lo tanto, el interior y el exterior de un liposoma es hidrosoluble y el interior de la membrana del liposoma es liposoluble. Durante su preparación, el material a encapsular se añade en la fase acuosa cuando es de carácter hidrófilo, sin embargo, si lipófilo se agrega en el solvente orgánico donde se disuelven los fosfolípidos. La lecitina (fosfatidilcolina) es el fosfolípido más utilizado, ya que se extrae fácilmente de la yema de huevo y la semilla de soja.

Estos liposomas transportan las sustancias encapsuladas bien unidas a su membrana, intercaladas o disueltas en su bicapa o bien encapsuladas en su interior. De esta forma, las sustancias hidrosolubles presentan una mejor eficacia de encapsulación que las sustancias hidrófobas.

#### **5. Modos de incrementar la resistencia de las micropartículas de alginato**

Las micropartículas obtenidas a partir de alginato pueden presentar algunas limitaciones entre las que cabe destacar su poca estabilidad en presencia de agentes quelantes como lactatos, fosfatos y citratos. Estos agentes quelantes comparten afinidad por los iones calcio y conllevan a la desestabilización del gel (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990). Por otro lado, el gel de alginato presenta sensibilidad ante pHs extremos, lo que puede comprometer la protección de las bacterias encapsuladas. Además, las matrices formadas son porosas, lo que condiciona la liberación del contenido.

Por todo ello, estas micropartículas pueden someterse a tratamientos especiales con la finalidad de mejorar sus propiedades e incrementar la protección de las bacterias encapsuladas.

- Entrecruzamiento con polímeros catiónicos:

La formación de matrices mixtas de alginato con polímeros catiónicos como el quitosán (Chávarri et al., 2010), polilisina (Cui et al., 2000), polietilenimina y polipropilenimina presentan una mayor estabilidad que aquellas formada solo con alginato.

- Recubrimiento con otros polímeros:

El recubrimiento de las micropartículas de alginato con una capa semipermeable de quitosán incrementa su estabilidad en ambientes hostiles (Krasaekoopt et al., 2003) y, al mismo tiempo, proporciona forma esférica sin modificar el tamaño de las mismas. Otros materiales de recubrimiento son el cloruro cálcico (Chandramouli et al. , 2004) y poly-L-lysina (Champagne et al.,1992), los cuales han demostrado una mayor viabilidad de las bacterias encapsuladas y una reducción de su liberación del 50 %, así como el almidón y gelatina (Rokka & Rantamaki, 2010).

- Mezcla con almidón:

El almidón resistente es aquel no digerible por las enzimas pancreáticas, de modo que llega intacto al intestino donde será fermentado por nuestra microbiota y mejorará la integridad de la mucosa intestinal. La mezcla de este almidón con alginato permite a las bacterias encapsuladas alcanzar el intestino así como conseguir una mayor viabilidad de las mismas (Vivek, 2013, Sultana et al., 2000).

- Incorporación de aditivos:

El empleo de crioprotectores confiere una protección adicional durante el proceso de liofilización, esto se traduce en un aumento de la viabilidad de los microorganismos encapsulados durante el almacenamiento así como tras su

rehidratación. Algunos de estos crioprotectores son el glicerol (Sultana et al., 2000), Unipeptine<sup>TM</sup> RS 150 (Capela et al., 2006; Ravula & Shah, 2000), trehalosa y maltosa (Martin-Dejardin et al., 2013).

Por otro lado, la incorporación de prebióticos a las micropartículas también ha demostrado un aumento de la viabilidad de las bacterias encapsuladas hasta el momento de su consumo. Estos prebióticos son la inulina, fructoolisacáridos, almidón resistente, raíz de achicoria, remolacha y avena (Capela et al., 2006; Sathyabama et al., 2014).

## **6. Viabilidad de las bacterias encapsuladas y eficacia de la encapsulación**

Para poder llevar a cabo la función deseada de forma eficiente, es necesario que las micropartículas contengan un número suficiente de bacterias. Esta viabilidad puede verse comprometida por diversos factores como las propiedades físico-químicas de las partículas y el procesamiento utilizado para la microencapsulación. Por tanto, es necesario medir la viabilidad de las bacterias encapsuladas. Otro requisito importante para un sistema de microencapsulación de probióticos óptimo, es alcanzar una eficacia de encapsulación aceptable. La eficacia de encapsulación trata de medir la calidad en la que las micropartículas separan el contenido del núcleo del entorno.

### **6.1. Viabilidad de las bacterias encapsuladas**

La medición de la viabilidad de las células encapsuladas generalmente se realiza rompiendo primero las micropartículas usando métodos físicos o químicos, seguido de cultivo y conteo de las células liberadas en la superficie de agar, denominadas como UFC. A la hora de su determinación hay que tener en cuenta que algunas micropartículas son bastante rígidas y pueden ser difíciles de romper y la viabilidad de las células encapsuladas puede verse afectada.

## **6.2. Eficacia de la encapsulación**

Generalmente se define como la proporción (en porcentaje) entre el peso del componente realmente encapsulado y su peso total utilizado en la formulación. Es un parámetro que describe la supervivencia de las células viables y la eficacia del atrapamiento durante el procedimiento de microencapsulación, siendo ideal una eficacia del 100 %.

## **7. Morfología y tamaño de las partículas**

Uno de los desafíos más importantes para la encapsulación celular es el gran tamaño de las células microbianas, típicamente 1-4  $\mu\text{m}$ , o de las partículas de cultivo liofilizado, más de 100  $\mu\text{m}$ , lo que limita su carga en micropartículas pequeñas. Además, cuando se producen partículas de gran tamaño, este puede afectar negativamente la textura y el perfil sensorial de los productos a los que se agregan. Por lo tanto, el tamaño y la morfología de las micropartículas se han identificado como uno de los factores clave para su aplicación en alimentos o productos farmacéuticos de forma exitosa.

Para evaluar la morfología y el tamaño de las micropartículas obtenidas, se pueden usar varias técnicas de microscopía, como microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM), así como mediciones de la distribución del tamaño de partícula basadas en la dispersión de la luz láser. Sin embargo, el microscopio electrónico de barrido es el más utilizado, ya que permite el análisis de la superficie de la partícula, así como su tamaño y forma ya que nos permite hacer barridos del material en tres dimensiones. (Prasertmanakit et al., 2009). La exactitud del método depende de tomar un número de partículas representativas para el análisis con objeto de eliminar los errores inherentes al mismo.

## **8. Cesi3n del material microencapsulado**

Como ya ha sido mencionado, la encapsulaci3n tiene como objetivo proteger las bacterias probi3ticas durante su almacenamiento y del da3o a su paso por el organismo.

Sin embargo, no solo se necesita la protección del material encapsulado, sino que éste tenga la posibilidad de poder ser liberado en el momento y lugar deseado. Es por ello que el mecanismo de liberación del principio activo debe ser tenido en cuenta a la hora de seleccionar el procedimiento de síntesis y la aplicación final a la que irá destinado el producto microencapsulado.

La liberación del contenido nuclear puede ser de forma instantánea al producirse la rotura de la cubierta. Este fenómeno está ligado a la erosión de la misma, la aplicación de fuerza o bien a una disolución del material de recubrimiento. La disolución de la cubierta puede estar producida por acción de disolventes, ataque enzimático, hidrólisis, fusión o reacciones químicas (Poshadri et al., 2010).

También se puede lograr una liberación lenta y controlada del contenido gracias a la difusión del mismo a través de la cubierta. La velocidad de difusión dependerá de la permeabilidad de la cubierta y de las propiedades de la sustancia encapsulada (Jyothi et al., 2012). Esta liberación sostenida también puede conseguirse gracias a cubiertas hinchables, formadas por polímeros que responden a estímulos externos como pH, luz, temperatura y humedad (Shulkin & Stover, 2003). Gracias al hinchamiento se promueve la liberación de la sustancia encapsulada.

## 9. Bibliografía

Amrita K, Dabur RS, Kapoor CM. Application of microencapsulation technology in dairy industry. *IFI*. 1999; 18: 57–64.

Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Technol.* 2007; 18: 240-251.

Borgogna M, Bellich B, Zorzin L, Lapasin R, Cesàro A. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chem.* 2010; 122(2):416-423.

Brachkova M, Duarte MA, Pinto JF. Preservation of viability and antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. in calcium alginate beads. *Eur J Pharm Sci.* 2010; 41: 589–596.

Brun-Graeppi AKAS, Richard C, Bessodes M, Scherman D, Merten OW. Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *J Control Release*. 2011; 149 (3): 209–224.

Capela P, Hay TKC, Shah NP. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yogurt. *Food Res Int*. 2006; 39: 203–211.

Champagne CP, Blahuta N, Brion F, Gagnon C. A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. *Biotechnol Bioeng*. 2000; 68(6): 681-688.

Champagne CP, Fustier P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr Opin Biotechnol*. 2007; 18(2): 184- 190.

Champagne CP, Gaudy C, Poncelet D, Neufeld RJ. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. *Appl Environ Microbiol*. 1992; 58(5): 1429–1434.

Chan LW, Lee HY, Heng PWS. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydr Polym*. 2006; 63(2): 176-187.

Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P, Jones M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J Microbiol Methods*. 2004; 56: 27–35.

Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, Villarán MC. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *Int J Food Microbiol*. 2010; 142(1-2): 185-189.

Chen G, Wang W. Role of freeze drying in nanotechnology. *Dry Technol*. 2007; 25 (1): 29–35.

Corcoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J Appl Microbiol*. 2004; 96 (5):1024–1039.

Cubero N, Monferrer A, Villalta J. Hidrocoloides. En: Madrid Vicente A (Eds). *Aditivos Alimentarios*. Madrid: Mundi-Prensa; 2002.

Cui JH, Goh JS, Kim PH, Choi SH, Lee BJ. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L- lysine microparticles. *Int J Pharm*. 2000; 210(1-2): 51-59.

de Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int Dairy J*. 2010; 20(4): 292-302.

Desai KG, Park HJ. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Dry Technol*. 2005; 23: 1361-1394.

Ding WK, Shah NP. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *J Food Sci*. 2009; 74 (2): 53–61.

Ding WK, Shah NP. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *J Food Sci*. 2009; 74 (2): 100–107.

Dohnal J, Stepánek F. Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules. *Powder Technol*. 2010; 200(3): 254-259.

Draget KI. Alginates. En: Phillips GO, Williams PA (Eds). *Handbook of hydrocolloids*. England: Woodhead Publishing Limited; 2000. pp. 379-395.

Ducel V, Richard J, Saulnier P, Popineau Y, Boury F. Evidence and characterization of complex coacervates containing plants proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids Surf A- Physicochem Eng Asp*. 2004; 232: 239- 247.

Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends Food Sci Technol*. 2010; 21(10): 510-523.

Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/ evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release*. 2005; 102 (2): 313–332.

Funami T, Fang Y, Noda S, Ishihara S, Nakauma M, Draget I, Nishinari K, Phillips O. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and  $\text{Ca}^{2+}$  binding. *Food Hydrocoll.* 2009; 23(7):1746- 1756.

Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci Technol.* 2004; 15: 330-347.

Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg- Box Model. *FEBS letters.* 1973; 32: 195-198.

Guignon B, Duquenoy A, Dumoulin ED. Fluidized bed encapsulation of particles: principles and practice. *Dry Technol.* 2002; 20: 419–447.

Helgerud T, Gåserød O, Fjæreide T, Andersen PO, Larsen CK. Alginates. Food stabilizers, thickeners and gelling agents. En: Imeson A (Eds). United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2010. pp. 50-72.

Hucík M, Bucko M, Gemeiner P, Štefuca V, Vikartovská A, Mihovilovic M, Rudroff F, Iqbal N, Chorvát D, Lacík I. Encapsulation of recombinant *E. coli* expressing cyclopentanone monooxygenase in polyelectrolyte complex capsules for Baeyer-Villiger biooxidation of 8-oxabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-one. *Biotechnol Lett.* 2010; 32 (5): 675–680.

Ibarz G, Dähne L, Donath E, Möhwald H. Smart Micro and Nanocontainers for Storage, Transport and Release. *Adv Mater.* 2001; 13: 1324-1327.

Imeson A. Alginates. En: Imeson A (Eds). Food stabilizers, thickeners and gelling agents. United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2010. Pp. 50-69.

Ivanova E, Chipeva V, Ivanova I, Dousset X, Poncelet D. Encapsulation of lactic acid bacteria in calcium alginate beads for bacteriocin production. *J Cult Collect.* 2000–2002; 3: 53–58

John RP, Tyagi RD, Brar SK, Surampalli RY, Prévost D. Bioencapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Crit Rev Biotechnol.* 2011; 31 (3): 211–226.



Juárez MS, De Gregorio PR, Leccese MC, Nader-Macías MEF. Encapsulation and subsequent freeze-drying of *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 for its potential inclusion in vaginal probiotic formulations. *Pharm Sci.* 2015; 79: 87–95.

Jun-Yee L, Weng-Hoong L, Kiang-Wei H, Wan-Ping V, Micky Fu-Xiang L, Hui-Peng L, Swee-Lu L, Beng-Ti T, Denis P, Eng-Seng C. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology.* 2015; 24: 44-60.

Jyothi S, Seethadevi A, Suria K, Muthuprasanna P, Pavitra P. Microencapsulation: A review. *Int J Pharma. Bio. Sci.* 2012; 3(1): 509-531.

Kage H, Abe R, Hattanda R, Zhou T, Ogura H, Matsuno Y. Effect of solid circulation rate on coating efficiency and agglomeration in circulating fluidized bed type coater. *Powder Technol.* 2003; 130: 203–210.

Kalasapathy K, Masondole L. Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. *Aust J Dairy Technol.* 2005; 60(3): 252-258.

Kearney L, Upton M, Loughlin A. Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* inoculum by immobilizing the cells in calcium-alginate beads. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56(10): 3112–3116.

King AH. Encapsulation of food ingredients: a review of available technology, focusing on hydrocolloids. En Risch SJ, Reineccius GA (Eds). *Encapsulation and controlled release of food ingredients.* Washington: American Chemical Society; 1995. pp. 213–220.

Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int Dairy J.* 2003; 13: 3–13.

Lee KJ, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2012; 37: 106–126.

López, G. Diseño de formas farmacéuticas líquidas de liberación modificada para el tratamiento del dolor. Universidad de Granada, Granada. 2008.

Lotfipour F, Mirzaeei S, Maghsoodi M. Evaluation of the effect of CaCl<sub>2</sub> and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. *Adv Pharm Bull.* 2012; 2(1): 71-78.

Luján M. Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora en la encapsulación para su administración oral. Universidad de Granada, Granada. 2010.

Lupo B, González C, Maestro A. Microencapsulation in alginate for food. *Technologies and applications. Rev Venez Cienc Tecnol Aliment.* 2012; 3(1):130-151.

Mark D, Haeberle S, Zengerle R, Ducree J, Vladisavljević GT. Manufacture of chitosan microbeads using centrifugally driven flow of gel-forming solutions through a polymeric micronozzel. *J. Colloid Interface Sci.* 2009; 336(2): 634-641.

Martin-Dejardin F, Ebel B, Lemetais G, Nguyen H, Gervais P, Cachon R, Chambin O. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 49: 166–174.

Martín MJ. Formas farmacéuticas y microencapsulación para la administración oral de probióticos. Universidad de Granada, Granada. 2015.

Martín MJ, Lara-Villoslada F, Ruiz MA, Morales ME. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2015; 27: 15-25.

Murillo M, Espuelas S, Prior S, Vitas I, Renedo J, Goñi M, Irache JM, Gamazo C. Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. *Rev Med Univ Navarra.* 2010; 45 (4): 19-34.

Muthukumarasamy P, Holley RA. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *Int J Food Microbiol.* 2006; 111(2): 164-169.

O’Riordan K, Andrews D, Buckle K, Conway P. Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. J Appl Microbiol. 2001; 91 (6): 1059–1066.

Oliveira AC, Moretti TS, Boschini C, Baliero JCC, Freitas LAP, Freitas O, Favaro-Trindade CS. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. Dry Technol. 2007; 25 (10): 1687–1693.

Park JK, Chang HN. Microencapsulation of microbial cells. Biotechnol Adv. 2000; 18 (4): 303–319.

Pliszczak D, Bourgeois S, Bordes C, Valour JP, Mazoyer MA, Orecchioni AM, Nakache E, Lanteri P. Improvement of an encapsulation process for the preparation of pro- and prebiotics-loaded bioadhesive microparticles by using experimental design. Eur J Pharm Sci. 2011; 44: 83–92.

Poncelet D. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. Ann NY Acad Sci. 2001; 944, 74-82.

Poshadri A, Kuna A. Microencapsulation Technology: A review. Journal of Research ANGRAU. 2010; 38(1): 86-102.

Prasertmanakit S, Praphairaksit N, Chiangthong W, Muangsin N. Ethyl Cellulose Microcapsules for Protecting and Controlled Release of Folic Acid. AAPS Pharm Sci Tech. 2009;10(4):1104-1112.

Qiang Z, Jianxin Z, Xiaoming L, Fengwei T, Heping Z, Hao Z, Wei C. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification / internal gelation. Int J Food Sci Technol. 2011; 46: 1672–1678.

Ravula RR, Shah NP. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented desserts. Aust J Dairy Technol. 2000; 55(3): 139-144.

Rokka S, Rantamaki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. Eur Food Res Technol. 2010; 231(1): 1–12.

Saez V, Hernández JR, Peniche C. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biología Aplicada*. 2007; 24(2): 98-107.

Sathyabama S, Ranjith kumar M, Bruntha P, Vijayabharathi R, Brindha V. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *Food Sci Technol*. 2014; 57: 419-425.

Sato K, Ueno, S. Polymorphism in fats and oils. En: Shahidi F (Eds). *Bailey's industrial oil and fat products*. New York: Wiley Interscience; 2005. pp. 77-120.

Schrooyen P, Meer P, Kruif C. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 2001; 4: 475-479.

Sha C, Meng Z, Yapeng F, Katsuyoshi N, Glyn O.P, Fatang J. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO<sub>3</sub> as calcium sources. *Food Hydrocoll*. 2014; 39: 295-300.

Shekhar K, Madhu NM, Pradeep B, Banji DA. A review on microencapsulation. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2010; 5(2): 58-62.

Shulkin A, Stover HDH. Photostimulated Phase Separation Encapsulation. *Macromolecules*. 2003; 36: 9836-9839.

Smidsrod O, Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol*. 1990; 8(3): 71-78.

Sohail A, Turner MS, Coombes A, Bostrom T, Bhandari B. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *Int J Food Microbiol*. 2011; 145: 162-168.

Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int J Food Microbiol*. 2000; 62: 47-55.

Takei T, Yoshida M, Hatate Y, Shiomori K, Kiyoyama S. Lactic acid bacteria enclosing poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules as soil bioamendment. *Journal of Biosci Bioeng*. 2008; 106 (3): 268–272.

Talwalkar A, Kailasaphaty K. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Aust J Dairy Technol*. 2003; 58(1):36-39.

Vega C, Roos YH. Invited review: spray-dried dairy and dairy-like emulsions compositional considerations. *J Dairy Sci*. 2006; 89 (2): 383–401.

Vivek KB. Use of encapsulated probiotics in dairy based foods. *IJASVM*. 2013; 3: 188–199.

Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J Control Release*. 1997; 48: 223-236.

Yañez J, Salazar J, Chaires L, Jiménez J, Márquez M, Ramos E. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Mundo alimentario*. 2005; 2: 24 -30.

Yoshii H, Soottitantawat A, Liu XD, Atarashi T, Aishima MO, Linko P. Flavor release from spray- dried maltodextrins/gum Arabic or soy matrices as a function of storage. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2001; 55- 61.

Zhao Q, Mutukumira A, Lee S, Maddox I, Shu Q. Functional properties of free and encapsulated *Lactobacillus reuteri* DPC16 during and after passage through a simulated gastrointestinal tract. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012; 28 (1): 61–70.

Zhao R, Sun J, Torley P, Wang D, Niu S. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. *World J Microb Biotechnol*. 2008; 24 (8): 1349– 1354.

Zuidam NJ, Shimoni E. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them En: Zuidam NJ, Nedovic VA (Eds). *Encapsulation technologies for food active ingredients and food processing*. Netherlands: Springer; 2009. pp. 3–31.



**II.2. An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus* spp. bacteria. Protection, survival and stability study**

---

**Un método mejorado de gelificación iónica para encapsular bacterias *Lactobacillus* spp. Estudio de protección, supervivencia y estabilidad**



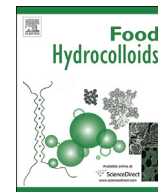


**An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus* spp. bacteria.  
Protection, survival and stability study.**

María Teresa Sánchez, María Adolfin Ruiz, Agustín Lasserrot, Marta Hormigo, María Encarnación Morales. Food Hydrocolloids. 2017; 69: 67-75. Factor de impacto (JCR)-  
Percentil (JCR): 4.747-96.538.

Se requiere que haya un gran número de microorganismos viables presentes en una fórmula probiótica para poder obtener sus efectos beneficiosos. Por ello, el principal objetivo de este trabajo es proteger a las bacterias probióticas durante su incorporación a una fórmula así como durante su almacenamiento. De este modo, se ha llevado a cabo la encapsulación de una cepa *Lactobacillus* mediante un procedimiento modificado de gelificación iónica interna en emulsión, reduciendo el contenido de agua tradicionalmente utilizado para obtener dicha emulsión, ya que es perjudicial para la supervivencia bacteriana. Por ello, parte del agua utilizada en la síntesis o su totalidad se ha reemplazado por caldo MRS previamente inoculado con bacterias. Como resultado, se obtuvieron dos micropartículas diferentes: MM (40 ml de caldo de bacterias / sin agua) y WMM (20 ml de caldo de bacterias / 20 ml de agua). La eficacia de encapsulación en ambas micropartículas fueron similares,  $100.66 \pm 0.58 \%$  y  $101.73 \pm 4.12 \%$  respectivamente. El proceso de liofilización mejoró la supervivencia de las bacterias en ambos casos tras su conservación durante 120 días a 4 °C. Sin embargo, los lactobacilos no encapsulados no mostraron supervivencia trascurrido este tiempo. Debido a su mayor supervivencia bajo estas condiciones de conservación, se seleccionaron las micropartículas MM liofilizadas como óptimas para estudiar la viabilidad de las bacterias bajo diferentes temperaturas de almacenamiento (20 °C, 4 °C, 25 °C), así como la supervivencia de las bacterias en medio ácido. Los resultados mostraron que hubo un 100 % de supervivencia de las bacterias en cada una de las temperaturas tras 150 días. Además, las micropartículas MM otorgaron protección a las bacterias a pH ácido (1.8-2), con una disminución de 5 log CFU/g transcurridos 60 minutos, en comparación con los lactobacilos no encapsulados, los cuales no sobrevivieron. También se estudió y discutió la morfología y la distribución del tamaño de las micropartículas MM.





## An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus* spp. bacteria: Protection, survival and stability study



María Teresa Sánchez <sup>a</sup>, María Adolfiná Ruiz <sup>a</sup>, Agustín Lasserrot <sup>b</sup>, Marta Hormigo <sup>b</sup>,  
María Encarnación Morales <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071, Granada, Spain

<sup>b</sup> BiotMicrogen S.L., BIC Granada, PTS, Avda de la Innovación 1, 18016, Granada, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 October 2016

Received in revised form

11 January 2017

Accepted 14 January 2017

Available online 18 January 2017

#### Keywords:

*Lactobacillus* spp.

Microencapsulation

Emulsification-internal gelation

MRS broth

Survival

### ABSTRACT

A high number of viable microorganisms are required to be present in a probiotic formula in order to get its beneficial effects. So, the main objective in this work is to protect probiotic bacteria during its incorporation into a formula and its storage. A modified emulsification – internal gelation procedure has been carried out to encapsulate a *lactobacillus* strain by reducing the water content traditionally used to obtain the emulsification, which is detrimental to bacterial survival, and replacing it with MRS broth previously inoculated with bacteria. As a result, two different microparticles MM (40 ml bacteria broth/no water) and WMM (20 ml bacteria broth/20 ml water) were obtained. Bacteria encapsulation yields for both microparticles were similar,  $100.66 \pm 0.58\%$  and  $101.73 \pm 4.12\%$  respectively. The process of lyophilisation improved the survival of bacteria in each microparticle after 120 days at 4 °C. However, there was no survival for non-encapsulated *lactobacillus* after this time. Due to its highest survival under these storage conditions, freeze-dried MM microparticles were selected as optimal to study the bacteria survival under several temperatures of storage (–20 °C, 4 °C, 25 °C) and bacteria survival in acid. Results showed that each temperature assured a 100% of bacteria survival after 150 days of storage. Furthermore, MM microparticles conferred bacteria protection in acid pH (1.8–2) with a decrease of 5 log CFU/g beyond 60 min compared to non-encapsulated *lactobacillus* which did not survive. MM microparticles morphology and size distribution were also studied and discussed.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Probiotic bacteria are defined ‘live microorganisms which, administered in adequate amounts, confer a beneficial physiological effect on the host’ (FAO/WHO, 2001). Due to the growing interest of consumers in probiotic products, the volume of research related to the subject has been expanding rapidly since the year 2000. Among the probiotic bacteria, *bifidobacteria* and *lactobacilli* have been demonstrated to play significant roles in maintaining the intestinal ecosystem and in stimulating the immune system of their host (Saarela, Lathenmasoki, Crittenden, Salminen, & Mattilasandholm, 2002; Shah, 2007). In order to produce therapeutic benefits, sufficient number of viable and biological active lactobacilli must be present. The dose level of probiotics depends

on the considered strain (Sanders, 2008), but  $10^6$ – $10^7$  CFU/g of product per day is generally accepted (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003). Therefore, to design probiotic products, the main technological requirement is the bacteria stability during the production (to include the required number of viable and active microorganisms in the final formula) and during the shelf life period (Domig et al., 2014; Du Toit, Vesterlund, Gueimonde, & Salminen, 2013; Hill et al., 2014).

Immobilization of microbial cells can be defined as the physical confinement of whole cells to a certain defined space while preserving their viability (Karel, Libicki, & Robertson, 1985). Various techniques have been investigated for the purpose of microbial cell immobilization such as adsorption or attachment of cells to an inert substrate, self-aggregation by flocculation or use of cross-linking agents and entrapment or encapsulation using polymers. Encapsulation of microbial cells involves entrapping cells within a polymeric material matrix to produce beads or capsules, which are permeable to nutrients and metabolites for maintaining cell

\* Corresponding author. Department of Technology and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Campus de Cartuja s/n, University of Granada, Granada, 18071, Spain.

E-mail address: [maen@ugr.es](mailto:maen@ugr.es) (M.E. Morales).

viability inside them and offers protection against both mechanical as well as environmental stress. Depending on the type of application, microbial cells can be encapsulated for the purpose of isolation, protection and/or controlled release. Probiotic encapsulation has been a powerful technology used in both food and pharmaceutical industry.

Not all the techniques of encapsulation are suitable for probiotic cell, among all the techniques that have been used to encapsulate probiotics, the following should be highlighted: extrusion, atomization or spray-drying and emulsification (Brachkova, Duarte, & Pinto, 2010; Cai et al., 2014; Chávarri et al., 2010; Huiyi, Weiting, Meng, Xiudong L, & Xiaojun, 2013; Martin, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2013; Juárez, Romina, Leccese, & Nader-Macía, 2015; Kent & Doherty, 2014; Khan, Korber, Low, & Nickerson, 2013; Krasaekoopt et al., 2003; Mirzaei, Pourjafar, & Homayouni, 2012; Pedroso, Thomazini, Heinemann, & Favaro-Trindade, 2012; Rathore, Desai, Liew, Chan, & Heng, 2013; Rosas-Flores, Ramos-Ramírez, & Salazar-Montoya, 2013; Sathyabama, Ranjith, Bruntha, Vijayabharathi, & Brindh, 2014; Sousa et al., 2015; Xu, Gagné-Bourque, Dumont, & Jabaji, 2016). However, different drawbacks are associated to these methods. On the one hand, the inefficiency in producing microspheres smaller than 500 µm (Reis, Neufeld, Vilela, Ribeiro, & Veiga, 2006), the obtaining of less stable microspheres (Liu et al., 2002) and the difficulty in scaling up the process because of the slow rate of production microspheres (Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011) are some limitations of the extrusion method. On the other hand, the use of a high inlet air temperature during the spray-drying process, could lead to excessive rapid moisture evaporation, resulting in cracks in the polymeric membrane (Brun-Graeppli, Richard, Bessodes, Scherman, & Merten, 2011). Moreover, the use of high temperatures has also been reported to severely impact the viability of encapsulated cells (Doherty et al., 2010; John, Tyagi, Brar, Surampalli, & Prévost, 2011). An emulsification internal gelation had been firstly described by Poncelet et al. (1992) with the aim of immobilizing microbial cells within alginate beads. Alginate is used as a salt form, mostly as sodium alginate, to crosslink with calcium ions.

Alginate is the most widely used matrix to encapsulate probiotics, which have been found to increase the chances of survival of probiotic bacteria from 80 to 95% (Mandal, Puniya, & Singh, 2006), also it is the preferred because of its structural simplicity, non-toxicity, biocompatibility and low cost (Chávarri et al., 2010; Krasaekoopt et al., 2003). However, there is some controversy about the resistance of these microparticles in the stomach conditions as alginate has a low stability in acidic conditions below pH 2.0, also it is affected by the presence of chelating agents. While some authors defended the high survival rate of different probiotic strains in acidic environment as a result of their alginate encapsulations (Chandramouli, Kailasapathy, Peiris, & Jones, 2004; Cook, Tzortzis, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2011; Ding & Shah, 2009; Mandal et al., 2006), other authors rejected that idea and reported only a viability improvement during its storage (Sultana et al., 2000). At higher concentrations of sodium alginate, the number of blinding sites for Ca<sup>2+</sup> is increased. As a result, a more densely cross-linked gel structure will be formed, and a better protection of bacterial cells will be achieved. It was even found that matrix porosity was significantly reduced by drying the microspheres (Smidsroed, Glover, & Whittington, 1973). Furthermore, once the particles are prepared, it is usually desirable to isolate them as a dry powder for ease of handling and storage. With this purpose, different drying procedures have been used including spray-drying, air-drying, freeze-drying and fluid bed drying. For the long-term preservation of encapsulated bacteria, freeze-drying has been the most widely used process. However, it leads to a situation of stress and affects the physiological state of cells, which means a

loss of viability (Beal, Fonseca, & Corrieu, 2001; Panoff, Thamavongs, & Guéguen, 2000). In order to solve this problem, different cryoprotectants have been used to preserve bacteria from adverse conditions (Borges, Costa, Silva, & Teixeira, 2013; Muller et al., 2013). Previous studies carried out in our research group showed a marked decrease in bacteria viability after microparticles freeze-drying in spite of using starch as a protective agent (Martin et al., 2013). All in all, in this work we intended to improve the encapsulation methodology as well as the freeze-drying conditions with respect to our previous experiences in order to assure a competitive and useful product in food and pharmaceutical field.

The overall objective of this work was to encapsulate a *Lactobacillus* strain into calcium alginate microparticles via emulsification internal gelation. The procedure was modified with the aim of improving bacteria protection and survival, thus the stability of these particles was evaluated during encapsulation, freeze-drying and storage under different conditions. Lastly, encapsulated bacteria stability in acid environment was tested and compared with non-encapsulated bacteria.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Sodium alginate was purchased from Fagron Iberica S. A. (Barcelona, Spain). Calcium carbonate and acetic acid were provided by Panreac Quimica S.A.U. (Barcelona, Spain). Soya oil and Span 80 were purchased from Guinama S.L.U. (Valencia, Spain). Calcium chloride was obtained from VWR International BVBA (Leuven, Belgium). Distilled water was prepared by a Millipore (Billerica, MA, USA) system.

### 2.2. Microorganism and cultivation

*Lactobacillus* bacteria was provided by BiotMicrogen S.L. (Granada). The strain was cultivated in the de-Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth. This probiotic bacterium was supplied at different concentration (colony forming units CFU/mL) due to the fact that the microencapsulation procedure was carried out several times. Each cell culture in MRS broth resulted in a final cell concentration of around 8,9 log CFU/ml.

### 2.3. Microencapsulation method

The emulsification/internal gelation technique to prepare alginate microparticles for cell immobilization has been described previously by different authors (Corinne et al., 2011; Larisch, Poncelet, Champagne, & Neufeld, 1994; Martin et al., 2013; Poncelet et al., 1992; Yu, Lin, Liu, & Ma, 2009; Zou et al., 2011). This technique is based on the formation of a water-oil emulsion (W/O). The procedure was modified in order to reduce water content, so it was carried out by using two different methodologies. According to the first methodology, the dispersed phase was prepared mixing the MRS broth inoculated with *Lactobacillus* bacteria with sodium alginate and calcium carbonate; 2 g of sodium alginate was added to 40 ml of bacteria broth, the mixture was stirred with a mechanical stirrer until total solution of sodium alginate. Then, CaCO<sub>3</sub> 0,5% (w/v) was added to the solution as Ca<sup>2+</sup> donor. After homogenization, the dispersed phase was added to 80 ml of soya oil containing 3% (w/v) of Span 80<sup>®</sup> whilst being stirred continuously at 700 rpm during 10 min. After that, 20 ml of soya oil containing 4,25% (v/v) glacial acetic acid is added to initiate internal gelation; it reacts with CaCO<sub>3</sub> forming Ca<sup>2+</sup> and carbonic acid, resulting in the gelation of alginate. Finally, after 10 min of stirring, microparticles were solidified and separated from the oil dispersion by mixing

5 ml of 0.45M calcium chloride solution. The temperature was maintained at 37 °C during the process. These MRS broth microparticles (MM) were harvested by centrifugation at 1050 rpm for 10 min and vacuum filtration.

The second methodology only differs from the above in the preparation of the dispersed phase; sodium alginate was added to a solution formed by distilled water (20 ml) and MRS broth with *Lactobacillus* bacteria (20 ml). The following steps are similar and these microparticles were called Water-MRS broth microparticles (WMM).

#### 2.4. Morphology and size distribution analysis

Microparticles size was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) using a ZEISS DSM 950 scanning electron microscope operated at 5 Kv. Samples were chemically stabilized by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.05 sodium cacodylate buffer, pH 7.4 for 2 h at 4 °C and were postfixed with 1.0% osmium tetroxide for 1 h at room temperature. Samples were then dehydrated with series of 50%–70% ethanol concentrations, and critical point dried with carbon dioxide, using a Polaron CPD 7501. Dried samples were frozen in liquid nitrogen and fractured. Samples were mounted on a carbon adhesive to the sample holders and were coated with gold. This method allowed the visualization of whole and fractured alginate microparticles, as well as details about the entrapped bacteria.

Particle size is expressed as volume mean diameter ( $\mu\text{m}$ ). Particle diameter of 100 microparticles was measured randomly and the average particle size was determined. The SD represents the standard deviation.

Size distribution of these particles was estimated with SPAN factor (El-Mahdy et al., 1998), which is defined as Eq. (1):

$$\text{SPAN} = (D_{90\%} - D_{10\%}) / (D_{50\%}) \quad (1)$$

where  $D_{90\%}$ ,  $D_{50\%}$ , and  $D_{10\%}$  were the mean diameters at which 90%, 50% and 10% (vol%) of the particles were counted and calculated. A high SPAN indicates a wide distribution size, whereas a low value indicates a narrow size distribution.

The shape, surface and internal morphology of the microparticles were also examined.

#### 2.5. Enumeration of bacteria entrapped within microbeads

Entrapped bacteria in MM and WMM microparticles were released by homogenizing 0.5 g of each sample in 50 ml of sodium citrate solution (0.1M). The suspension was gently shaken in an orbital shaker at 300 rpm during 40 min and 0.1 ml of the homogenized solution was 10-fold diluted into peptone water (previously cleaved 121 °C, 15 min); thereafter 0.1 ml aliquots of the dilutions were plated in triplicate onto MRS agar. All of the plates were incubated at 37 °C for 48h before enumeration of encapsulated bacteria as CFU/g. All samples were analysed in triplicate.

Bacteria incorporation to microparticles was expressed in terms of encapsulation yield (EY). The encapsulation yield is a combined measurement of the efficacy of entrapment and survival of viable cells during the microencapsulation procedure; it was calculated applying Eq. (2):

$$\text{EY} = (N/N_0) \times 100 \quad (2)$$

where  $N$  is the number of viable entrapped cells released from the microspheres,  $N_0$  is the number of viable cells in the cell concentrate for microencapsulation. The assay was carried out in triplicate.

#### 2.6. Lyophilization of encapsulated bacteria and *Lactobacillus* spp. free cells

It is important to optimize the production process of probiotic preparations in order to obtain a product with suitable properties and higher number of viable probiotic microorganisms. MM beads, WMM beads and *Lactobacillus* free cells were subjected to a freeze-dry process. So, they were suspended in a lyoprotector solution containing skim milk 20%. These samples were distributed in vials (3 ml) and frozen at  $-80$  °C for at least 4 h. Lastly; they were submitted to a dry process at 20 °C and 35 °C. About 36 h are needed for the lyophilization procedure.

#### 2.7. Stability assays

To investigate the self-life of encapsulated bacteria, we transferred MM and WMM fresh beads into Petri plates and covered with aluminium foil. The samples were stored at 4 °C in order to compare the bacteria protection that provides each microencapsulation procedure. The stability of both microparticles (MM, WMM) was tested using the methods described in Section 2.5 at predetermined time points (0, 15, 30, 45 and 60 days) in triplicate.

To study the effect of freeze-drying on bacteria viability, freeze-dried MM, WMM beads were also stored at the same temperature into crystal vials. *Lactobacillus* free cells (N) were also freeze-dried in order to demonstrate if microencapsulation procedure improves bacteria viability in respect to non-encapsulated bacteria. Viability was tested at predetermined time points (0, 15, 30, 90 and 150 days) in triplicate.

#### 2.8. Effect of temperature on bacteria viability

To determine the temperature that assure a higher bacteria survival, MM freeze-dried microparticles were storage at room temperature (25 °C), in a fridge (4 °C) and in a freezer ( $-20$  °C). Bacteria viability was studied during 150 days and the results obtained were compared. The survival rate of *Lactobacillus* bacteria during the storage was calculated for each temperature by applying Eq. (3):

$$\text{Survival rate} = (N_T/N_{FD}) \times 100 \quad (3)$$

where  $N_{FD}$  (CFU/g) is the number of viable cells after freeze-drying and  $N_T$  (CFU/g) is the number of viable cells within beads after storage. The storage test was done in triplicate.

#### 2.9. Acid resistance assay

In order to assess the protective effect of encapsulation and subsequent freeze-drying on gastric resistance of *Lactobacillus* bacteria, the resistance of the encapsulated probiotic cells was compared with free cells.

Freeze-dried MM microparticles and free cells were immersed in 50 ml of HCl 0.04 N (pH 1.8) for 120 min. Bacteria viability was tested using the method described in Section 2.5 at 0, 30, 60 and 120 min. All determinations were performed in triplicate.

#### 2.10. Statistical analysis

Data were subjected to normal distribution tests (Shapiro-Wilks). Particle size and distribution as well as Encapsulation yield (EY) of MM and WMM particles were analysed by Kolmogorov-Smirnov test. Viability of MM and WMM microparticles was analysed by Kruskal-Wallis test. Stability of MM microparticles at different temperatures was analysed by Friedman test taking as

factors time and temperature. The number of *Lactobacillus* viable cells (log CFU/g) was the response of interest analysed in the different processes. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . All analysis were performed using IBM SPSS version 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, Illinois, USA). Values are expressed as mean of triplicate determinations  $\pm$  standard deviation (SD).

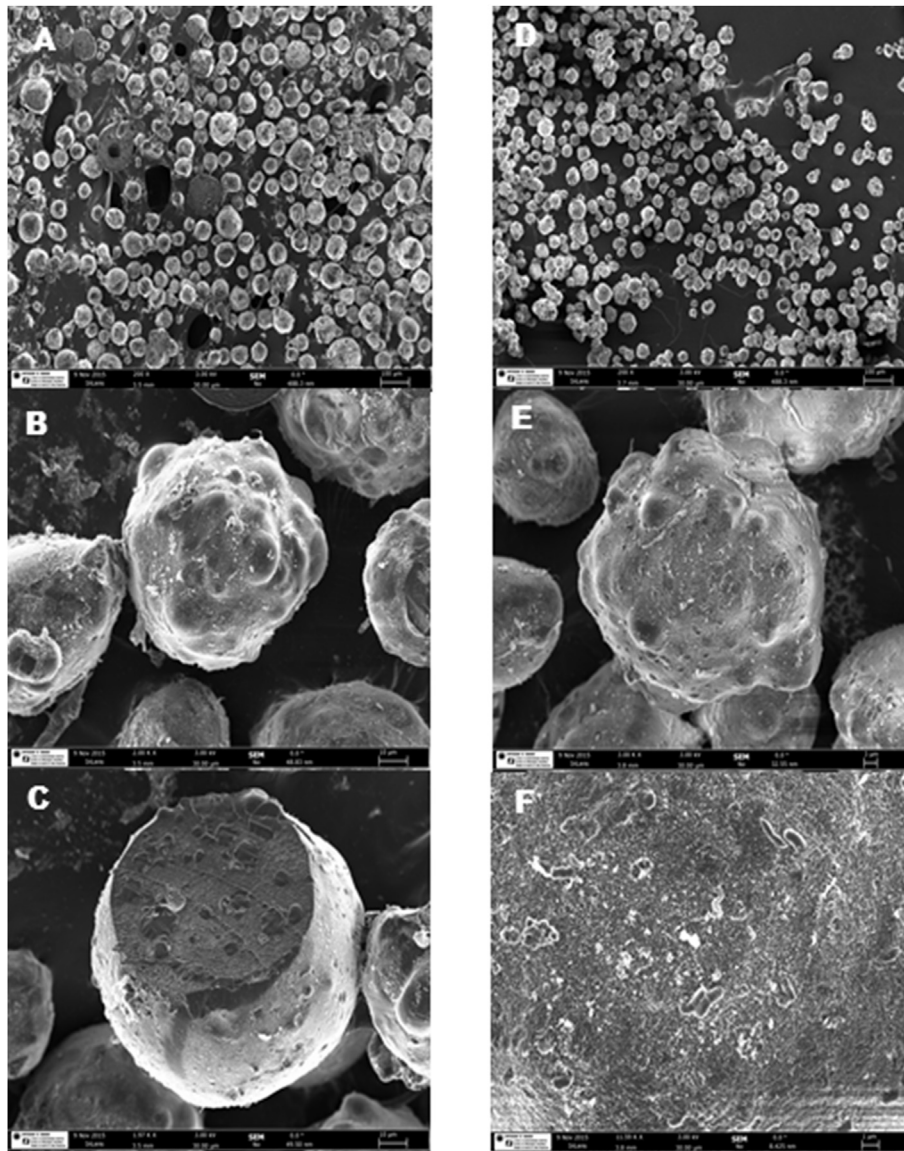
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Morphology and size distribution

The objective was to study the effect of microorganisms upon the microparticles morphology and size. So we subjected to scanning electron microscopy (SEM) two samples of freshly made beads: MM microparticles with probiotic bacteria and MM microparticles without probiotic bacteria only with non-inoculated MRS broth. Although data and figures are not shown in this paper, WMM microparticles with and without probiotic bacteria were also studied. No significant differences in morphology and size

distribution were found with MM microparticles.

As we can see in Fig. 1, microparticles show spherical shape with a defined limit. According to Huiyi, Weiting, Meng, Xiudong, and Xiaojun (2013), the spherical shape could be better for the maintenance of the textural quality in the food industry so as to provide protection for the encapsulated probiotics. The surface is rough and with an irregular topography in both cases, so the incorporation of probiotic cells did not affect the integrity and shape of beads. There are no evident pores on the surface, which is a good achievement because a high porosity is associated with a fast and easy diffusion of water and other fluids in and out of the matrix and subsequently with the cell leakage (Anil & Harjinder, 2007; Rathore et al., 2013). Fig. 1C shows an internal structure with cavities or void spaces, this fact could be produced by two phenomena; on the one hand, due to the movement of  $\text{Ca}^{2+}$  which would act to draw the  $\text{Na}^+$ - alginate junctions towards  $\text{Ca}^{2+}$  as it migrates, leading to the formation of this microstructure (Quong & Neufeld, 1998). On the other hand, the liberation of  $\text{CO}_2$  from the reaction between  $\text{H}^+$  (glacial acetic acid) and  $\text{CaCO}_3$  also resulted in the formation of abundant minute



**Fig. 1.** Scanning electron microscope photographs of fresh MM microparticles. (A) unloaded MM microparticles, (B) surface of an unloaded MM microparticles, (C) fractured unloaded MM microparticles, (D) *Lactobacillus* MM microparticles, (E) Surface of *Lactobacillus* MM microparticles, (F) Surface of *Lactobacillus* MM microparticles at high magnification.

cavities (Lai, Huey, & Paul, 2006). Fig. 1F shows probiotic microorganisms attached to the surface, some of them are covered with a thin layer of polymer material.

It has been known that the size, size distribution of the beads can be influenced by the ratio of oil to water (v/v), the concentration of surfactant, and the stirring speed. Particle size analysis (Table 1 and Fig. 2) showed in both cases a unimodal size distribution, ranging from 20 to 140  $\mu\text{m}$ , with a mean diameter of 53.64  $\mu\text{m}$  for probiotic loaded microparticles and 69.62  $\mu\text{m}$  for microparticles without probiotic ( $p < 0.05$ ), in both cases there is a higher percentage of microparticles in the range 40–60  $\mu\text{m}$ . The SPAN factor of probiotic and non-probiotic microparticles was 0.402 and 0.825 respectively, which indicated a narrower size distribution for probiotic microparticles. The fact that the incorporation of probiotic cells leads to a reduction in the size of microparticles has been reported before by Martin et al. (2013) and Sousa et al. (2015); however, they had not explained the causes of this effect. It could be attributed to the formation of more compact beads, due to the presence of probiotic cells, and more rigid shell layer of gel, which compresses the matrix of the beads and therefore expels the inner water. This phenomenon is known as syneresis (Lupo, Maestro, Gutierrez, & Gonzalez et al., 2015). Another explanation could be attributed to the replacement of  $\text{Ca}^{2+}$  with probiotic cells, which cause a change on  $\text{Ca}^{2+}$  concentration leading to syneresis.

### 3.2. Number of cells entrapped

Section 2.3. describes the procedures that were carried out to obtain MM and WMM microparticles. In order to compare the protection efficiency of each microparticle for *Lactobacillus* bacteria

and identify the most effective encapsulating methods, probiotic viability and encapsulation yield (EY).

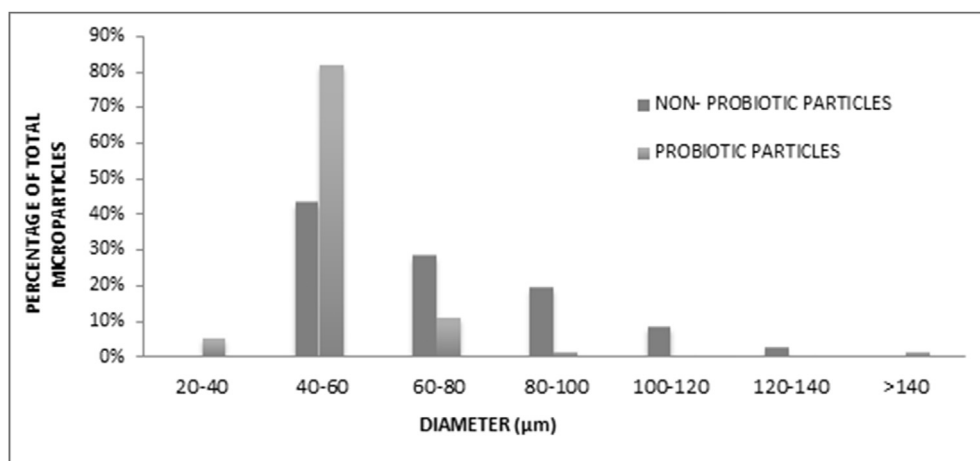
Table 2 shows the results obtained for MM and WMM microparticles. As we can see, both procedures carried out assured an optimal encapsulation yield of 100%, with no significant difference between them ( $p > 0.05$ ). To our knowledge, no other report of probiotic encapsulation has shown similar results. Previous reports (Cai et al., 2014; Martin et al., 2013; Rosas-Flores et al., 2013; Huiyi et al., 2013) showed less survival using emulsification technique; the maintenance of cell viability is an important factor for the selection of alginate beads production process. Even, previous works carried out in our research group with probiotic-alginate beads resulted in an encapsulation yield of  $74.41 \pm 1.76\%$  and  $97.26 \pm 0.33\%$  for starch-alginate beads (Martin et al., 2013). Although more studies would be needed to better characterize the encapsulation mechanism, the higher protection of probiotics in MM and WMM microparticles could be associated with the replacement of the aqueous content with MRS broth, which improves the bacteria survival.

Apart from the aqueous content, the use of acid is another important factor that may affect the cell (Huiyi et al., 2013). The concentration of glacial acetic acid should be sufficient to initiate the gelation reaction, but also to decrease the damage to cell (Yu et al., 2009); in that case a concentration of 4.25% (v/v) was optimal to prompt the alginate gelation with no cell damage. The stirring rate has also been studied as detrimental factor; Rosas-Flores et al. (2013) determined the encapsulation efficiency of two different *Lactobacillus* strains encapsulated by the same technique at 400, 800 and 1200 rpm. In their work, increasing the stirring rate from 400 rpm to 1200 rpm leads to a decrease in

**Table 1**

Size and size distribution of probiotic and non-probiotic MM particles. (n = 200).

| MM particles            | Mean ( $\mu\text{m}$ ) | Mode ( $\mu\text{m}$ ) | S.D. ( $\mu\text{m}$ ) | $D_{10\%}$ ( $\mu\text{m}$ ) | $D_{50\%}$ ( $\mu\text{m}$ ) | $D_{90\%}$ ( $\mu\text{m}$ ) | SPAN  |
|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------|
| Non- Probiotic bacteria | 69.62                  | 81.10                  | 20.16                  | 48.60                        | 64.90                        | 102.16                       | 0.825 |
| Probiotic bacteria      | 53.64                  | 48.60                  | 13.70                  | 43.20                        | 54.00                        | 64.90                        | 0.402 |



**Fig. 2.** Particle size distribution expressed as percentage of total particles. (n = 200) ( $P < 0.05$  between Non-probiotic and Probiotic particles).

**Table 2**

Number of cells entrapped compared to initial number of cells and encapsulation yield.

| Microparticles type | Initial number of cells (log CFU/g) | Microparticles weight (g) | Number of cells entrapped (log CFU/g) | Encapsulation yield (EY)* |
|---------------------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| MM                  | $8.85 \pm 0.21$                     | 26.03                     | $8.90 \pm 0.16$                       | $100.66 \pm 0.58$         |
| WMM                 | $8.70 \pm 0.14$                     | 25.63                     | $8.85 \pm 0.21$                       | $101.73 \pm 4.12$         |

Values are mean (n = 3)  $\pm$  standard deviation. Log CFU: colony forming units. \*( $P > 0.05$ ).

encapsulation efficiency from 92.83% to 4.56% respectively. Other reports of emulsification-internal gelation technique also showed less cell survival, thus Cai et al. (2014) related an encapsulation yield of 36.9%; Ribeiro, Silva, Ferreira, and Veiga (2005) obtained a maximum encapsulation yield of 90.9% in alginate-chitosan beads; Huiyi et al. (2013), who microencapsulated yeast cells in alginate-chitosan beads, had an encapsulation yield of 77%. *Bifidobacterium bifidum* F-35 was microencapsulated in alginate-starch microspheres by Zou et al. (2011) with an encapsulation yield ranging from 43% to 50%; in this work the authors associated again the low encapsulation yield with the addition of glacial acetic acid. Therefore, all of the above factors should be considered in order to select the adequate encapsulation process, also it should be taken into account that not all probiotics strains have the same properties and making comparison between the encapsulation results of two different strains has its limitations.

### 3.3. Stability assays

Fig. 3 shows the stability of MM and WMM microparticles during 60 days of the storage in the refrigerator at 4 °C. After 60 days, the survival rate of *Lactobacillus* bacteria in WMM microparticles presents a decrease higher than 7 log CFU/g. However, MM microparticles survival decreased from  $9.18 \pm 0.08$  log CFU/g to  $4.76 \pm 0.52$  log CFU/g with a viability loss of 4.42 log CFU/g after this period of time. The residual water that is present in the microparticles could explain this low bacteria survival. Furthermore, microparticles were stored in Petri plates during the storage test and for each testing samples were withdrawn from these plates, so moisture from the atmosphere could enter plates with a rise in of the water activity. It is well known the negative effect of humidity upon probiotic viability (Heidebach, Först, & Kulozik, 2010). Another possible explanation of this viability loss could be the production of compounds, such as metabolic acids and bacteriocins, and/or the absence of substrates that may cause the inactivation of the viable cells in the microparticles because at 4 °C microorganisms are metabolically active in the microparticles. Mechanical disruption of microspheres had been considered, due to the high-density growth of encapsulated cells and the production of fermentation gases. Similar results were founded by Chávarri et al. (2010) using the extrusion method to encapsulate *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium bifidum*, both of them blended with quercentin. They reported a viability loss of 3.34 log CFU/ml and 4.11 log CFU/ml respectively after 11 days, and no survival was noted after 14 days. Xu et al. (2016), who encapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 via extrusion technology, also reported

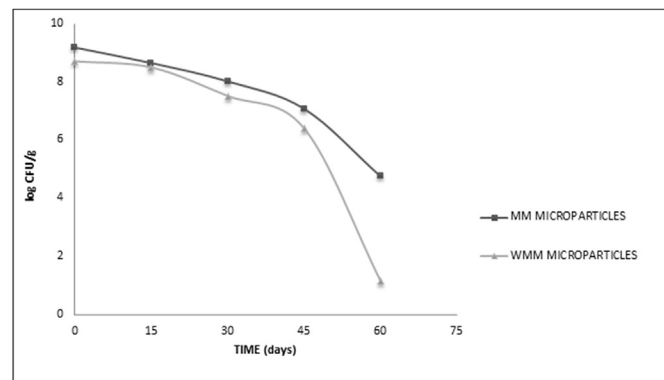


Fig. 3. Stability of MM and WMM microparticles of *Lactobacillus* during 60 days at 4 °C. Means ( $n = 3$ )  $\pm$  SD. ( $P < 0.05$  between MM and WMM).

a low survival rate at 4 °C, which decreases from about 80% to 20% after 84 days.

All in all, due to the adverse effect of the residual water upon bacteria survival, it is expected that a reduction or removal of it could be beneficial. Preparation in a dry form is necessary for both prolonged storage and application of microencapsulated bacteria. Freeze-drying is a commonly used technique for the production of dried powder of probiotic. However, previous research has found that certain strains of probiotic are better able to survive the freeze-drying process. It could be associated to differences in the surface of the microorganisms or maybe to a variation in walls and membranes composition (Rybka & Kailasapathy, 1995). Free *Lactobacillus* cells (N), WMM and MM microparticles were freeze-dried and stored at 4 °C, and bacteria survival was studied for 120 days (Fig. 4).

After analysing the results, we could affirm two hypotheses: first of all, encapsulation process enhanced bacteria survival in respect to non-encapsulated bacteria during storage; secondly, freeze-dried microparticles showed an improvement on bacteria survival, so the residual water causes detrimental effects on bacteria viability. Before freeze-dry process, viability of MM, WMM and non-encapsulated bacteria was 8.90 log CFU/g, 9 log CFU/g and 9.26 log CFU/g, respectively. Just after freeze-drying, viability decreased in 0.79 log CFU/g, 1 log CFU/g and 1.86 log CFU/g respectively. This could be attributed to the formation of ice crystals during freeze-drying step, which were likely to induce cell damage. Different authors such as Juárez et al. (2015) and Xu et al. (2016), even found higher decreases of 3.17 log CFU and 1.42 log CFU on encapsulated bacteria via extrusion after freeze-drying. In our case, the skimmed milk used as cryoprotectant agent is expected to prevent this cellular injury by stabilizing the cell membrane constituents (Castro, Teixeira, & Kirby, 1995). So, despite this initial loss, bacterial viability remained unchanged until 120 days for MM microparticles. This loss was higher for WMM microparticles (0.80 log CFU/g) and no survival for non-encapsulated bacteria (N) after this period of time. Due to the best bacteria survival (100%) inside MM microparticles, they were selected for the following studies.

### 3.4. Influence of temperature on the storage of freeze-dried microparticles

Freeze-dried MM microparticles were stored at room temperature (25 °C), in a fridge (4 °C) and in a freezer (−20 °C) for 150 days

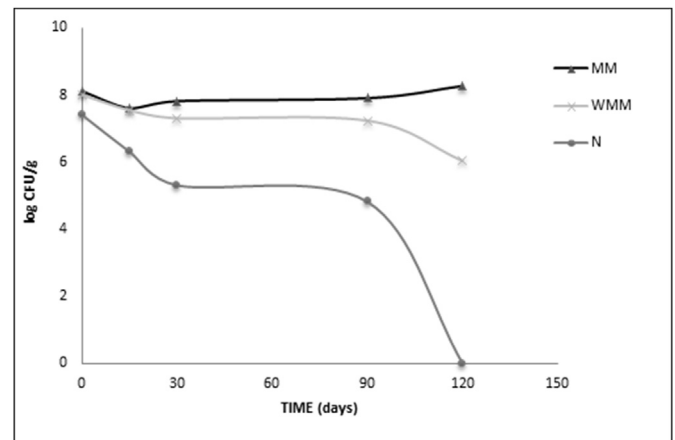


Fig. 4. Stability of WMM, MM microparticles and free *Lactobacillus* cells (N) after freeze-drying process. Means ( $n = 3$ )  $\pm$  SD. ( $P < 0.05$  between N, MM and WMM particles).



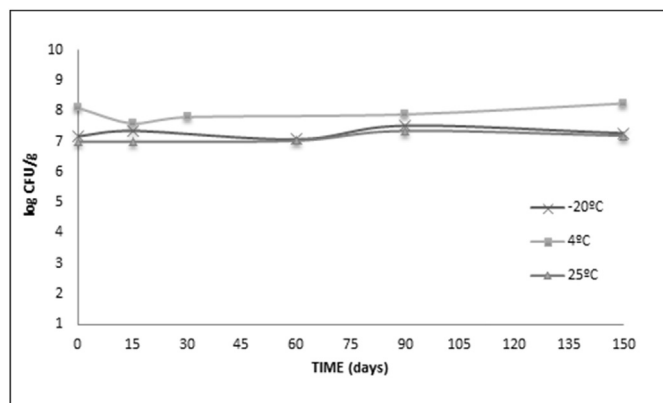


Fig. 5. Influence of temperature on the storage of freeze-dried microparticles. Means ( $n = 3$ )  $\pm$  SD. ( $P < 0.05$  between  $-20^\circ\text{C}$ ,  $4^\circ\text{C}$  and  $25^\circ\text{C}$ ).

and cells viability was calculated (Fig. 5). As we can see in Fig. 5, all of the storage temperatures studied assure 100% of survival of microencapsulated bacteria after 150 days. There was no significant difference between viability data at 150 days and 0 days ( $p > 0.05$ ) for each temperature. To our knowledge, there are no previous reports that assure the total protection of the encapsulated bacteria after 150 days of storage. In contrast, Xu et al. (2016) reported a survival rate of 59.9% at  $-15^\circ\text{C}$  after 84 days of storage, and relatively low survival rate at  $22^\circ\text{C}$  and  $4^\circ\text{C}$  for *L. casei* lyophilized microparticles. Martin et al. (2013), found a decrease of 2.5 log CFU after 30 days at both  $-20^\circ\text{C}$  and  $4^\circ\text{C}$ , and no survival at  $25^\circ\text{C}$  for *L. fermentum*. Juárez et al. (2015), also found no viable cells after 60 days of storage at room temperature for *L. reuteri* microparticles and a loss of 1 log CFU/g after 150 days at refrigerated temperature. Other authors (Lievense and Van 't Riet, 1994; Pedroso et al., 2012) defend that storage temperature is indirectly proportional to viability of encapsulated cells, consequently a decrease in temperature leads to increase in bacteria stability. Thus, encapsulated *B. lactis* by spray chilling showed a high log reduction of 4.83 in cell viability at  $37^\circ\text{C}$  and only 1.85 log CFU/g at  $-18^\circ\text{C}$  after 90 days of storage.

Retention of cell viability during storage holds special importance in the food industry. The effectiveness of probiotic depends on the number of viable cells; being 7 log CFU and 9 log CFU the recommended amount per dose (Hill et al., 2014; Mastromarino, Vitali, & Mosca, 2013). Furthermore, the preservation of the viability during processing and storage was of paramount importance for the expression of lactobacilli activity (Brachkova et al., 2010). However, there is a sizeable body of evidence showing that the components of dead bacteria may be able to exert some anti-inflammatory responses (Flanagan & Singh, 2006). So, the high bacteria protection achieved in this assay ( $>7$  log CFU/g) assured the suitability of MM microparticles as bacteria carriers and they could be stored evenly under the temperatures tested, providing a long and satisfactory bacteria shelf-life.

### 3.5. Bacteria survival in acid

An important factor that affects the survival of probiotic bacteria is pH; survival is constrained at low pH values. Free *Lactobacillus* cells and loaded *Lactobacillus* MM microparticles, after being freeze-dried, were submitted to survival test in acid at pH 1.8–2, in order to compare protection efficiency of microparticles for bacteria. Results for the test are shown in Fig. 6. There is a significant difference between the survival of free cells and encapsulated cells in acid environment. In the case of free cells, a high reduction of

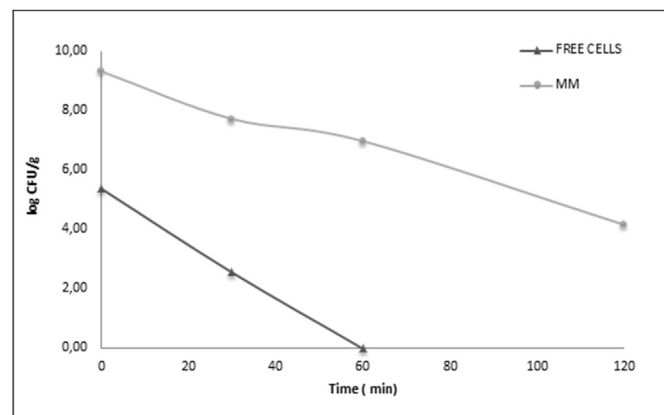


Fig. 6. Survival of free *Lactobacillus* cells and loaded *Lactobacillus* MM microparticles in pH 1.8–2. ( $n = 3$ )  $\pm$  SD.

2.83 log CFU/g in cell viability was observed within the first 30 min, and continue declining until 0 CFU/g after 60 min. However, encapsulated bacteria showed a cell reduction of 1.60 log CFU/g after 30 min in acid and 5 log CFU/g at the end of the assay. That loss could be justified because of the freeze-drying process, which created a highly porous structure and that fact let the diffusion of  $\text{H}^+$  ions into the particles, so these capsules were expected to have weaker buffering effect than fresh capsules. Moreover, Santivarangkna, Kulozik, and Foerst (2008) affirmed that cell membranes are the major site of damage that occurs during the freeze-drying process. Thus, during the dehydration process, the membrane suffers a rupture with an increase in the sensitivity of the cells to ions. Due to this imbalance of  $\text{H}^+$  in the bacteria cytoplasm and the external environment, bacteria attempt to maintain their cytoplasmic  $\text{H}^+$  concentrations by using their own energy (ATP) to expel protons via reverse ATPase. If bacteria lose their energy because of the internal limited ATP sources, they cannot effectively metabolize nutrients from the environment and gradually bacteria start to die. Similar result was found by Khan et al. (2013), who after submitted free *L. adolescentis* cells to a pH of 1.8 observed 0 CFU/g after 60 min. Chávarri et al. (2010) also reported a decrease of free *L. gasseri* and *B. bifidum* to less than 10 CFU/ml after 120 min and 60 min respectively at pH 2. The results of viability of encapsulated cells were in accordance with other previous works (Cai et al., 2014; Krasaekoopt et al., 2003; Lee & Heo, 2000; Truelstrup-Hansen Jin, Allan-Wojtas, & Paulson, 2002); which reported the advantage of encapsulation against free cells in acid conditions. The likely mechanism for the protection of cells by alginate encapsulation is a buffering effect, in which the activity of the protons is reduced by the dense polymer environment (Cook et al., 2011).

Despite the results obtained, which could affirm a bacteria protection in acid media through its encapsulation in MM microparticles, this assay is out of the scope of this work as we intend to incorporate freeze-dried MM microparticles into food products or secondary dosage forms, such as oral matrix tablets, oral capsules or vaginal forms, which could offer probiotic microorganisms even higher protection against hostile environment.

### 3.6. Conclusions

The present study demonstrated a process for immobilizing a *Lactobacillus* strain within calcium alginate capsules via emulsification internal gelation technology by using MRS broth as aqueous phase. Two different procedures were carried out resulting in

WMM and MM microparticles respectively. Owing to its properties, MM microparticles were selected as optimal with an encapsulation yield of  $100.66 \pm 0.58$ . The incorporation of probiotic bacteria to MM microparticles resulted in a reduction in particle size until a mean diameter of  $53.64 \mu\text{m}$ . This fact favours the incorporation of probiotic microparticles in functional food and pharmaceutical preparations. Due to the poor survival of microencapsulated bacteria during its storage at  $4^\circ\text{C}$ , microparticles were dried by freeze-drying in presence of skim milk (20%) as cryoprotectant. Surprisingly, bacteria viability just after freeze-drying decreased only in  $0.79 \log \text{CFU/g}$ , which was a good achievement. Freeze-dried MM microparticles were stored at different temperatures ( $25^\circ\text{C}$ ,  $4^\circ\text{C}$  and  $-20^\circ\text{C}$ ) during 150 days showing a survival rate of 100% at each temperature after this period of time, which led us to affirm that the matrix, the encapsulation process and the cryoprotectant selected were considered compatible with the probiotic strain. Our results are according to other authors, who reported that MRS medium promoted lactobacilli activity and, if it is intended to design dosage forms, they should include MRS components to maximize both viability and antibacterial activity of lactobacilli bacteria. Lastly, although more studies are needed to improve bacteria stability under adverse conditions, MM microparticles even conferred protection to probiotic bacteria in acid environment with a survival of  $5 \log \text{CFU/g}$  at the end of the assay compared with non-encapsulated bacteria whose viability decreased to  $0 \log \text{CFU/g}$  after 60 min. To sum up, lactobacilli could be successfully encapsulated in calcium alginate beads via emulsification internal gelation with a modification of the method up to now reported. This modification consists in replacing distilled water that constitute aqueous phase by MRS broth inoculated with lactobacilli bacteria. The use of MRS broth in the synthesis contributes to an improvement in bacteria protection and survival during both storage and acid conditions.

## Acknowledgments

We want to thank BiotMicrogen S. L. (Granada), which is the owner of the *Lactobacillus* strain studied, for their kind supply of the microorganisms and the co-funding of this work. The authors would also like to thank Dr. Mariano José Valderrama Bonnet for his valued help with the statistical analyses.

## References

- Anil Kumar, A., & Harjinder, S. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, *18*, 240–251.
- Beal, C., Fonseca, F., & Corrieu, G. (2001). Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, *84*, 23–47.
- Borges, S., Costa, P., Silva, J., & Teixeira, P. (2013). Effects of processing and storage on *Pediococcus pentosaceus* SB83 in vaginal formulations: Lyophilized powder and tablets. *BioMed Research International*, *2013*, 680–767.
- Brachkova, M. I., Duarte, M. A., & Pinto, J. F. (2010). Preservation of viability and antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. in calcium alginate beads. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *41*, 589–596.
- Brun-Graepi, A. K. A. S., Richard, C., Bessodes, M., Scherman, D., & Merten, O. W. (2011). Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *Journal of Controlled Release*, *149*, 209–224.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, *104*, 467–483.
- Cai, S., Meng, Z., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G. O., & Jiang, F. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and  $\text{CaCO}_3$  as calcium sources. *Food Hydrocolloids*, *39*, 295–300.
- Castro, H. P., Teixeira, P. M., & Kirby, R. (1995). Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *44*, 172–176.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, *56*, 27–35.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibanez, F. C., Marzo, F., & Villaran, M. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *142*, 185–189.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2011). Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *Biomacromolecules*, *12*, 2834–2840.
- Corinne, A. H., Kamini, R., Roger, L. J. K., Dusana, M., Xiao, K. H., James, D. J., et al. (2011). Pancreatic cell immobilization in alginate beads produced by emulsion and internal gelation. *Biotechnology and Bioengineering*, *108*, 424–434.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009). An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *Journal of Food Science*, *74*, 53–61.
- Doherty, S. B., Gee, V. L., Ross, R. P., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Brodtkorb, A. (2010). Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Microbiological Methods*, *80*, 231–241.
- Domig, K. J., Kiss, H., Petricevic, L., Viernstein, H., Unger, F., & Kneifel, W. (2014). Strategies for the evaluation and selection of potential vaginal probiotics from human sources: An exemplary study. *Beneficial Microbes*, *5*, 263–272.
- Du Toit, E., Vestelund, S., Gueimonde, M., & Salminen, S. (2013). Assessment of the effect of stress-tolerance acquisition on some basic characteristics of specific probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, *165*, 51–56.
- El-Mahdy, M., Ibrahim, E. S., Safwat, S., El-Sayed, A., Ohshima, H., Makino, K., et al. (1998). Effects of preparation conditions on the monodispersity of albumin microspheres. *Journal of Microencapsulation*, *15*, 661–673.
- FAO/WHO. (2001). *Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. Available at [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).
- Flanagan, J., & Singh, H. (2006). Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, *46*, 221–237.
- Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2010). Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*, *98*, 309–316.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*, 506–514.
- Huiyi, S., Weiting, Y., Meng, G., Xiudong, L., & Xiaojun, M. (2013). Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*, *96*, 181–189.
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, *31*, 211–226.
- Juárez, M. S., Romina, P., Leccese, M. C., & Nader-Macía, M. E. F. (2015). Encapsulation and subsequent freeze-drying of *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 for its potential inclusion in vaginal probiotic formulations. *Pharmaceutical Sciences*, *79*, 87–95.
- Karel, S. F., Libicki, S. B., & Robertson, C. R. (1985). The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical Engineering Science*, *40*, 1321–1354.
- Kent, R. M., & Doherty, S. B. (2014). *Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation*.
- Khan, N. H., Korber, D. R., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2013). Development of extrusion-based legume protein isolate-alginate capsules for the protection and delivery of the acid sensitive probiotic *Bifidobacterium adolescents*. *Food Research International*, *54*, 730–737.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, *13*, 3–13.
- Lai, W. C., Huey, Y. L., & Paul, W. S. H. (2006). Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, *63*, 176–187.
- Larisch, B. C., Poncelet, D., Champagne, C. P., & Neufeld, R. J. (1994). Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris. *Journal of Microencapsulation*, *11*, 189–195.
- Lee, K. Y., & Heo, T. R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 869–873.
- Lievens, L. C., & Van 't Riet, K. (1994). Convective drying of bacteria. II. Factors influencing survival. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, *51*, 71–89.
- Liu, X. D., Yu, W. Y., Zhang, Y., Xue, W. M., Yu, W. T., Xiong, Y., et al. (2002). Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. *Journal of Microencapsulation*, *19*, 775–782.
- Lupo, B., Maestro, A., Gutierrez, J. M., & Gonzalez, C. (2015). Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. *Food Hydrocolloids*, *49*, 25–34.
- Mandal, S., Puniya, A. K., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, *16*, 1190–1195.
- Martin, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *Food Science and Technology*, *53*, 480–486.

- Mastromarino, P., Vitali, B., & Mosca, L. (2013). Bacterial vaginosis: A review on clinical trials with probiotics. *New Microbiology*, *36*, 229–238.
- Mirzaei, H., Pourjafar, H., & Homayouni, A. (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white-brined cheese. *Food Chemistry*, *132*, 1966–1970.
- Muller, C., Busignies, V., Mazel, V., Forestier, C., Nivoliez, A., & Tchoreloff, P. (2013). Mechanistic approach to stability studies as a tool for the optimization and development of new products based on *L. rhamnosus* Lcr35® in compliance with current regulations. *PLoS ONE*, *8*(11), e79041. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079041>.
- Panoff, J. M., Thammavongs, B., & Guéguen, M. (2000). Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology*, *40*, 264.
- Pedroso, D., d. L., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., & Favaro-Trindade, C. S. (2012). Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal*, *26*, 127–132.
- Poncelet, D., Lencki, R., Bcaulicu, C., Hallé, J. P., Neufeld, R. J., & Fournier, A. (1992). Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *38*, 39–45.
- Quong, D., & Neufeld, R. J. (1998). DNA protection from extracapsular nucleases, within chitosan- or poly-L-lysine coated alginate beads. *Biotechnology and Bioengineering*, *60*, 124–134.
- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, *116*, 369–381.
- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Vilela, S., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles. *Journal of Microencapsulation*, *23*, 245–257.
- Ribeiro, A. J., Silva, C., Ferreira, D., & Veiga, F. (2005). Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *25*, 31–40.
- Rosas-Flores, W., Ramos-Ramírez, E. G., & Salazar-Montoya, J. A. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. *Carbohydrate Polymers*, *98*, 1011–1017.
- Rybka, S., & Kailasapathy, K. (1995). The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, *50*, 51–57.
- Saarela, M., Lathenmasoki, L., Crittenden, R., Salminen, S., & Mattiliasandholm, T. (2002). Gut bacteria and health foods — the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, *78*, 99–117.
- Sanders, M. E. (2008). Probiotics: Definition, sources, selection and uses. *Clinical Infectious Diseases*, *46*, 58–61.
- Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, *105*, 1–13.
- Sathyabama, S., Ranjith, M., Bruntha, P., Vijayabharathi, R., & Brindh, V. (2014). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *Food Science and Technology*, *57*, 419–425.
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, *17*, 1262–1277.
- Smidsroed, O., Glover, R. M., & Whittington, S. G. (1973). Relative extension of alginates having different chemical composition. *Carbohydrate Research*, *27*, 107–118.
- Sousa, S., Gomes, A. M., Pintado, M. M., J. P., Costa, P., Amaral, M. H., et al. (2015). Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food and bioproducts processing*, *93*, 90–97.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate—starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, *62*, 47–55.
- Truelstrup-Hansen, L., Jin, Y. L., Allan-Wojtas, P. M., & Paulson, A. T. (2002). Survival of Ca- alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, *19*, 35–45.
- Xu, M., Gagné-Bourque, F., Dumont, M. J., & Jabaji, S. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, *168*, 52–59.
- Yu, W. T., Lin, J. Z., Liu, X. D., & Ma, X. J. (2009). Preparation of microcapsules for immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* by emulsification-internal gelation technology. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *60*, 710–717.
- Zou, Q., Zhao, J. X., Liu, X. M., Tian, F. W., Zhang, H. P., et al. (2011). Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*, 1672–1678.



## **CAPÍTULO III**

---

### **Estudio teórico de la compresión y su aportación en la administración de probióticos**



## **III.1. FUNDAMENTOS DE LA COMPRESIÓN**

---





## **1. Comprimidos**

Los comprimidos son formas farmacéuticas sólidas de dosificación unitaria. Se obtienen aglomerando por compresión volúmenes constantes de partículas constituidas por uno o más principios activos, pulverizados o granulados, puros o adicionados de algún excipiente. Los comprimidos pueden variar en lo relativo a su forma, tamaño y peso. A las formas cilíndricas tradicionales se han incorporado comprimidos con sección cuadrada, ovoide, rómbica, etc. Suelen tener un peso comprendido entre 0.1 y 1 g, dependiendo de la dosis de principio activo, de sus características y del uso al que esté destinado el comprimido (García & Santos, 2001).

Los comprimidos pueden clasificarse en función de su presentación, forma de administración recomendada y lugar de acción:

### **I. Comprimidos orales para ingestión**

- Se ingieren enteros (acción sistémica o local)
  - Comprimidos convencionales (no recubiertos)
  - Comprimidos multicapa
  - Comprimidos masticables
  - Comprimidos recubiertos: gastrosolubles, gastrorresistentes, insolubles
  - Comprimidos de liberación modificada
- Destinados a disolverse o dispersarse antes de la administración (acción sistémica)
  - Solubles o dispersables
  - Efervescentes

II. Comprimidos que se mantienen en cavidad oral (acción sistémica o local)

- Comprimidos para chupar
- Sublinguales
- Mucoadhesivos
- Bucodispersables

III. De administración por otras vías (generalmente acción local)

- Vaginales
- Rectales
- Para implantación subcutánea u oftálmica

De este modo, los comprimidos convencionales están destinados a ser ingeridos y liberar el principio activo en el tracto gastrointestinal para ejercer una acción local o una acción sistémica, previa absorción del principio activo. La introducción de nuevos materiales como polímeros nos permite obtener comprimidos especiales, los cuales presentan alguna característica fármaco-técnica diferente a las descritas para los comprimidos convencionales.

La gran difusión alcanzada por esta forma farmacéutica ha sido consecuencia de las numerosas ventajas que presenta, entre las que pueden destacarse las siguientes:

- Fácil y exacta dosificación, consiguiéndose dosis uniformes. Además, nos permite fragmentar el comprimido si fuese necesario gracias a la homogeneidad en la distribución del principio activo.
- Sencilla y cómoda administración por su forma, estructura compacta y reducido tamaño. En algunos casos es posible su desleimiento en agua u otros líquidos, lo que facilita su aceptación e ingestión.

- Se pueden enmascarar con facilidad características organolépticas desagradables, bien mediante el uso de técnicas de recubrimiento o incorporando correctivos a la formulación.
- Son formas orales con mejores propiedades de estabilidad mecánica, química y microbiológica que las líquidas.
- Fácil acondicionamiento. Al ser formas planas se pueden envasar en tubos o blíster reduciendo así el espacio ocupado y favoreciendo el almacenamiento y transporte.
- Simple identificación, gracias a la gran variedad de formas, así como el empleo de marcas, letras, colores, etc. Lo que resulta útil en caso de intoxicación.
- Buena presentación gracias a que podemos darle color y olor, garantizándose el cumplimiento terapéutico.
- Liberación controlada, puesto que mediante el diseño adecuado podemos modular la velocidad y lugar de liberación del principio activo.
- Los métodos modernos de fabricación, capaces de una producción a gran escala, con elevados rendimientos, hacen que el coste de producción sea bajo.

Algunas limitaciones alejan a los comprimidos de la forma posológica ideal. Éstas son debidas, en ocasiones, a las características del fármaco, o bien están relacionadas directamente con la forma farmacéutica:

- Forma poco apropiada para algunas sustancias activas.
  - Poco hidrosolubles y poco absorbibles.
  - Aquellas que requieren una dosis muy alta. Ejemplo: carbonato cálcico, antiácidos. Para comprimirlos hay que añadir más excipiente, lo que hace que los comprimidos sean muy grandes. Por ello, se usan polvos o granulados.

- Las que causan irritación gástrica.
  - De escasa compresibilidad. Si el polvo tiene mala compresibilidad, cuando cese la presión aplicada, las partículas no quedarán unidas y se romperá el comprimido.
  - Líquidas y en alta dosis. Si queremos hacer un comprimido con un principio activo líquido, primero deberemos convertirlo a sólido adsorbiéndolo sobre una sustancia en dicho estado. Si la dosis de líquido es alta, se requerirá una gran cantidad de sustancia sólida para adsorberla. Si a esto le sumamos la adición de excipientes, concluimos que no se podrá comprimir.
- 
- Dificil ingestión. Algunos pacientes, en especial los lactantes, ancianos, adultos en grave estado o pacientes con sonda nasogástrica, no pueden tragar el comprimido. Su trituración es desaconsejable en muchos casos, por modificar características diseñadas para garantizar su estabilidad y eficacia terapéutica.
  - Formulación compleja. Al tener varios excipientes, debe hacerse un estudio de preformulación.
  - A pesar de los avances tecnológicos, su fabricación exige numerosos controles a fin de garantizar una óptima dosificación y absorción de los fármacos. Para ello se requiere personal especializado. Se trata de una producción industrial, por lo que se necesita disponer de un local apropiado y máquinas y dispositivos adecuados.
  - Se pueden plantear problemas de biodisponibilidad, ya que los comprimidos deben disgregarse y dispersarse en los fluidos biológicos antes de la disolución de los principios activos. De hecho, al ser una forma compacta, si la disgregación no se realiza de forma rápida, puede retrasar la absorción e, incluso, ser perjudicial para la mucosa del tubo digestivo.

## **1.1. Formulación de comprimidos**

Los principios activos constituyen, desde el punto de vista terapéutico, los componentes esenciales de un comprimido. La obtención de comprimidos, con los equipos actualmente disponibles, requiere que el material a comprimir posea ciertas características físicas y mecánicas: capacidad de fluir libremente, cohesividad y lubricación. La mayoría de los principios activos no poseen, por si mismos, todas estas propiedades y es necesaria la adición de una serie de adyuvantes, materiales inertes, conocidos como excipientes (García & Santos, 2001).

Los excipientes utilizados para la elaboración del comprimido persiguen dos fines: tecnológico (facilitar la compresión) y biofarmacéutico (conseguir una biodisponibilidad adecuada). Además, deben cumplir los siguientes requisitos:

- Inertes. No deben tener actividad farmacológica.
- Inocuos/ biocompatibles. No pueden causar reacciones alérgicas ni efectos indeseables. Si los presentan, debe indicarse (excipientes de declaración obligatoria).
- Buenas características organolépticas.
- Económicos.
- Buenas características de compresibilidad. Deben tener buena deformación plástica y buenas propiedades de flujo.

A continuación se revisan brevemente los excipientes empleados en la elaboración de comprimidos:

- I. Diluyentes.** Su función consiste en aumentar el volumen aparente de la sustancia activa para:

- Adecuar este volumen al de la cámara de compresión, consiguiendo una dosificación exacta.
- Facilitar la manejabilidad desde el punto de vista tecnológico.
- Disminuir las incompatibilidades, reduciendo las posibilidades de contacto entre las partículas de sustancia activa.

Algunos ejemplos son: lactosa, almidones en estado seco, sacarosa, celulosa microcristalina, manitol, fosfato dicálcico, sorbitol, glucosa.

**II. Aglutinantes.** Cuando el material no tiene buenas características de compresibilidad, se añaden estos excipientes para favorecer la formación de uniones interparticulares, consiguiendo disminuir la presión de compresión y unas mejores propiedades de flujo. Se logran dos efectos distintos: comprimidos con buena resistencia mecánica y buena friabilidad (no se rompen ni erosionan) y comprimidos con mayor tiempo de disgregación (disminuye la velocidad de disolución de la sustancia activa y esto afecta a la biodisponibilidad).

Los aglutinantes de origen natural más usados han sido la acacia, la goma de tragacanto, la gelatina, el mucílago de almidón y el almidón hidrolizado. Sin embargo, están siendo sustituidos por los de origen sintético, de los cuales los más empleados son la polivinilpirrolidona y diferentes derivados de la celulosa (MC, EC, carboximetilcelulosa sódica –NaCMC- e hidroxipropilmetilcelulosa –HPMC-).

**III. Disgregantes.** Tienen una función contraria a la de los aglutinantes. Favorecer que los comprimidos se rompan en fragmentos pequeños cuando se ponen en contacto con los fluidos biológicos para que el fármaco quede libre y pueda disolverse y absorberse. Pueden actuar por diferentes mecanismos:

- Aumentando el volumen al ponerse en contacto con los fluidos acuosos, lo que favorece la separación de las partículas que constituyen el

comprimido, incrementando la superficie específica y, en consecuencia, la velocidad de disolución.

Entre los disgregantes que actúan por este mecanismo figuran el almidón y sus derivados, utilizados con este fin por sus buenas propiedades y bajo coste. Algunos derivados de la celulosa, como la CMC y MC, entre otros, también presentan características disgregantes.

- Disolviéndose en el agua y formando en el comprimido unos canalículos o capilares que facilitan la penetración de los fluidos y, por tanto, su desmoronamiento.

Cabe destacar en este grupo algunas sustancias marcadamente hidrosolubles, como el cloruro sódico y la lactosa, utilizadas con mucha menor frecuencia que las anteriores.

- Reaccionando con el agua para dar lugar a la liberación de un gas, normalmente, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Este gas se produce al reaccionar en medio acuoso un bicarbonato, habitualmente sódico, con un ácido orgánico, como el cítrico o tartárico.

**IV. Lubrificantes.** Mejoran las propiedades de flujo del material para poder obtener un llenado correcto de la cámara de compresión y evitan la adherencia de partículas a las piezas metálicas del dispositivo. Pueden tener acción deslizante, antiadherente o lubricante como tal.

Los más utilizados son almidones (almidón de maíz), talco, derivados del silicio, ácido esteárico, estearato de magnesio, parafina líquida, polietilenglicol.

**V. Correctivos organolépticos.** Están relacionados con la aceptabilidad de la formulación por el paciente. No es habitual emplearlos en los comprimidos

normales de administración oral porque su uso complica la formulación y afecta a la compresibilidad y estabilidad del comprimido. Son más usuales en los comprimidos de disolución lenta en la boca o en los masticables. Entre ellos se encuentran los colorantes, aromatizantes, saborizantes y edulcorantes.

## VI. Otros excipientes

- **Reguladores pH:** Protegen a los principios activos contra las variaciones de pH y reducen la acción irritante de algunos fármacos sobre las mucosas.
- **Humectantes:** Favorecen la mojabilidad y, por tanto, la disgregación del comprimido.
- **Conservantes:** Relacionados con la estabilidad de la formulación. Garantizan la calidad microbiológica.
- **Adsorbentes:** Sólidos finamente divididos que se emplean cuando la sustancia activa es líquida y queremos incorporarla en un comprimido.

## 2. Proceso de compresión

Las máquinas de comprimir constan de una serie de elementos fundamentales: punzones, matriz y sistema de distribución del polvo o tolva (García & Santos, 2001):

- **Punzones:** son los elementos mediante los cuales se va a aplicar la fuerza axial sobre el polvo o granulado. Se trata de piezas metálicas, generalmente de acero inoxidable y de forma cilíndrica, con superficie plana o cóncava.
- **Matriz:** constituida por una pieza metálica perforada con uno o varios orificios (según se vayan a usar punzones simples o múltiples), la cual puede adoptar



diversas formas geométricas de acuerdo a los punzones que se vayan a emplear puesto que deben adaptarse a ellos.

- Tolva: en ella se introduce el polvo a comprimir y, generalmente, consta de un dispositivo que facilita el llenado homogéneo de la matriz.

De este modo, el proceso de compresión puede considerarse dividido en las siguientes etapas:

- Primera fase: descenso del punzón inferior dentro de la matriz, lo que da lugar a una cavidad en la que el polvo o granulado fluirá por gravedad. La profundidad a la que se sitúa el punzón inferior en la matriz determinará el volumen de la cámara de compresión y, en consecuencia, el peso del comprimido.
- Segunda fase: aplicación de la fuerza por descenso del punzón superior únicamente o por acción simultánea de ambos punzones, ejerciendo sobre las partículas la presión necesaria para formar un comprimido consolidado.
- Tercera fase: ascenso del punzón superior al tiempo que sube el punzón inferior hasta alcanzar el tope de la matriz y eyección del comprimido.

### **3. Métodos de compresión**

La formulación propuesta debe permitir la adecuada compresión del material pulverulento que la constituye. Asimismo, hay que considerar que existen tres procedimientos principales para la elaboración de comprimidos, los cuales parten de una previa pulverización y selección del tamaño de partícula y una posterior mezcla y homogeneización del principio activo y los excipientes.

### 3.1. Compresión directa

Se entiende por compresión directa la compresión de fármacos pulveriformes o de mezclas de éstos con coadyuvantes, sin tratamiento previo. Las ventajas de la compresión directa frente otras operaciones tecnológicas de compresión son las siguientes:

- Se requieren menos operaciones y dispositivos para elaborar la forma farmacéutica, así se disminuyen los costes de producción.
- Menor tiempo de elaboración.
- No se usa agua ni calor, de modo que tienen una estabilidad alta y adecuada para sustancias tanto termolábiles como hidrolizables. Esta es la razón fundamental que hace de esta técnica la idónea para los microorganismos probióticos, ya que la ausencia de humedad y calor garantizan la viabilidad durante la compresión.
- Elevada velocidad de disolución del comprimido, al ponerse en contacto con los fluidos biológicos se disgrega dejando libres las partículas de polvo originales, que posteriormente se disuelven.
- Permite la elaboración de comprimidos de liberación modificada.

Entre sus principales limitaciones podemos citar:

- Diferencias en la densidad y el tamaño de partícula del fármaco y el excipiente pueden dar lugar a una estratificación, lo que se traduce en problemas en la uniformidad de contenido del fármaco, en especial en los principios activos que se utilizan a bajas dosis.
- Fármacos que se dosifican en cantidades grandes pueden plantear problemas en la compresión directa dado que al adicionar excipientes daría lugar a comprimidos de gran tamaño y de alto costo.

### **3.2. Compresión de un granulado**

La granulación consiste en la transformación de partículas de polvo amorfo en agregados sólidos más o menos resistentes y porosos, conocidos como granulados. Este granulado será un estado intermedio para la posterior elaboración de los comprimidos.

Se recurre a la granulación para tratar de solventar algunos efectos indeseados de la compresión directa como prevenir la segregación de los componentes con diferente tamaño y densidad, así como mejorar las propiedades de flujo de la mezcla. Otras razones para su elección se basan en la expulsión del aire interpuesto entre las partículas, reducir la higroscopicidad de la mezcla y modificar la velocidad de disolución gracias al carácter hidrofílico de los aglutinantes.

#### **3.2.1. Compresión previa granulación seca o doble compresión**

Cuando los componentes del comprimido son sensibles a la humedad, no soportan las temperaturas altas durante el secado o son excesivamente solubles en los líquidos de humectación utilizados y si, además, poseen suficientes propiedades cohesivas, se recurre a esta vía para formar un granulado. Tras la compactación de la mezcla, se obtienen unos aglomerados llamados briquetas, que serán sometidos a una concuasación o fragmentación en molinos. Gracias a un proceso de doble tamización se selecciona el tamaño de partícula para conseguir unos fragmentos uniformes a los que se les añade un lubricante, un disgregante extragranular y, en ocasiones, un aglutinante seco. La mezcla y homogeneización de este granulado será la operación previa a la compresión, que se divide en una primera compresión, no muy bien regulada, a través de unos rodillos de acero y en una compresión definitiva que dará lugar a los comprimidos.

#### **3.2.2. Compresión previa granulación húmeda**

Inicialmente se llevan a cabo los procesos ya mencionados de pulverización y posterior mezclado con algunos excipientes. La obtención del granulado por esta técnica implica la realización de las siguientes fases (García & Santos, 2001):

- Humectación del polvo mezclado. Tiene por objeto conferir a las partículas, mediante la adición de un líquido aglutinante, unas características de adhesividad tales que sea posible la obtención de una masa adecuada para la granulación. Se lleva a cabo utilizando equipos de malaxado.
- Granulación de la masa húmeda. Se realiza en extrusores, donde se somete la masa humectada a una presión mecánica, que fuerza su paso a través de una superficie perforada o tamiz, de una determinada abertura de malla, para obtener unos filamentos de forma cilíndrica que constituyen el granulado.
- Desección del granulado para eliminar el exceso de humedad en estufas, armarios de desecación, equipos de lecho fluido, etc.
- Doble tamización para obtener la fracción granulométrica más adecuada, de acuerdo con el tamaño y peso final del comprimido.
- El granulado obtenido se mezcla, si se requiere, con otros excipientes tales como lubricantes, disgregantes y, en ocasiones, aglutinantes secos (no es lo habitual), procediéndose, a continuación, a su compresión.

#### **4. Controles realizados sobre el comprimido terminado**

Los controles que habitualmente se realizan sobre muestras tomadas al azar de lotes de comprimidos terminados son múltiples y de diferente naturaleza, incluyendo características físicas, químicas e indicadores de las propiedades biofarmacéuticas. En base a estos resultados, se decide si se aprueba, rechaza o se reprocesa el lote procesado.

##### **I. Controles tecnológicos obligatorios**

- Posología: uniformidad de peso y uniformidad de contenido
- Tiempo de disgregación
- Velocidad de disolución

II. Controles tecnológicos no obligatorios (en función de la formulación)

- Resistencia a la fractura: dureza
- Resistencia mecánica: friabilidad

III. Caracteres organolépticos (color, aspecto, sabor, textura)

IV. Caracteres geométricos (dimensiones, forma, marcas)

V. Estabilidad

- Principio activo
- Frente a humedad, luz, calor



## **III.2. COMPRIMIDOS DE ADMINISTRACIÓN ORAL CON PROBIÓTICOS**

---





## **1. Justificación del empleo de comprimidos para la administración oral de bacterias probióticas**

Puesto que la principal vía de administración de los microorganismos probióticos es la oral, con objeto de proporcionar estos efectos beneficiosos en el hospedador ya mencionados en capítulos precedentes, las bacterias probióticas deben sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal, tolerar el ácido, la bilis y las enzimas a nivel gástrico y, posteriormente, adherirse al epitelio intestinal. Es por ello que deben administrarse incluidos en formas farmacéuticas o bien en alimentos que les otorguen protección frente a esas condiciones adversas. Estos productos probióticos, además, deben garantizar la supervivencia de los microorganismos en forma viable durante el almacenamiento hasta el final de su vida útil (Sánchez et al., 2015).

Según el estudio realizado por Sánchez y colaboradores (2015), adjuntado como Anexo I de esta Tesis Doctoral, la mayor parte de los productos orales comercializados hasta la fecha son cápsulas gelatinosas duras o granulados, mientras que los comprimidos disponibles son mínimos. La falta de comprimidos con probióticos y el solapamiento con otras formas farmacéuticas, mayoritariamente cápsulas, ha ido en detrimento de la dosis de bacterias administrada por forma farmacéutica, la cual debe ser suficiente para generar un efecto satisfactorio sobre la salud del paciente. Así, las condiciones tecnológicas empleadas para la obtención de cápsulas son menos agresivas, por tanto, la supervivencia de las bacterias será muy alta y permitirá un menor coste de producción. Por el contrario, la compresión requiere de presiones altas que conlleva la pérdida de una gran parte de las bacterias. Sin embargo, son múltiples las ventajas que nos aportan los comprimidos en la administración de probióticos, como puede ser el permitirnos alcanzar una liberación controlada o modificada de los mismos. De este modo, merecen una mención especial los comprimidos de liberación modificada, altamente sofisticados y de biodisponibilidad programada.

Son varios los autores que han centrado sus investigaciones en el diseño y desarrollo de comprimidos probióticos, los cuales supongan una gran innovación en el sector y que confieran la protección necesaria para lograr el efecto deseado (Calinescu & Mateescu, 2008; Govender et al., 2015; Muller et al., 2014; Nagashima et al., 2013;

Poulin et al., 2011; Stadler & Viernstein, 2003; Klayraung et al., 2009; Martín-Villena et al., 2015). Sin embargo, es necesario seguir investigando en este campo ya que cada cepa y cada forma farmacéutica supone un nuevo reto desde el punto de vista tecnológico.

## **2. Comprimidos de liberación modificada**

Atendiendo a la definición dada por la Real Farmacopea Española (RFE, 2015) se trata de comprimidos los cuales contienen excipientes especiales o se preparan por procedimientos especiales con el fin de modificar la velocidad, el lugar o el momento de liberación del principio activo.

La terminología utilizada para definir las formas farmacéuticas orales de liberación modificada es amplia y confusa. No obstante, ha habido diversos intentos de clasificación, siendo quizás el más clarificador el propuesto por Ballard y Nelson en 1970 que las divide en las siguientes (Suñé, 2003):

### **I. Comprimidos de liberación sostenida**

Liberan inicialmente la cantidad necesaria de fármaco para conseguir tener la respuesta farmacológica deseada de forma rápida y, posteriormente, en una cantidad adecuada y constante para que la velocidad de absorción del fármaco sea igual a la velocidad de eliminación durante un tiempo prolongado, normalmente de 10 a 24 horas. Se incluyen en este grupo los comprimidos osmóticos (elemental y bicompartimental).

### **II. Comprimidos de liberación repetida o pulsátil**

Son aquellos que inicialmente proporcionan una dosis simple de fármaco y a un tiempo posterior liberan otra dosis similar; en el intervalo de tiempo entre la liberación de una dosis y otra no existe liberación de principio activo. Se trata de liberar el fármaco en dos o más dosis iguales espaciadas en el tiempo. Un

ejemplo de ellos son comprimidos moteados, comprimidos estratificados o de doble o múltiple capa o comprimidos de doble núcleo.

### **III. Comprimidos de liberación retardada o diferida**

Liberan el principio activo después de transcurrido un tiempo de latencia, por lo que no se obtienen niveles plasmáticos del fármaco hasta que la forma farmacéutica se encuentre en la zona del tracto digestivo donde se desea que se active el sistema. Ejemplo de ello son los clásicos comprimidos gastrorresistentes y los sistemas colónicos.

### **IV. Comprimidos de liberación prolongada**

Corresponde a aquellas formulaciones en que el fármaco se libera inicialmente en la cantidad suficiente para producir la acción terapéutica o incluso en un pequeño exceso nunca nocivo para el organismo, para después continuar liberándolo de forma lenta, pero a una velocidad que no siempre es igual a la velocidad de eliminación. Es decir, estas formas farmacéuticas presentan una liberación lenta pero no constante.

Pertencen a este grupo los comprimidos matriciales hidrófilos de hinchamiento controlado o ilimitado, comprimidos matriciales lipídicos, comprimidos matriciales inertes, multicapa o parcialmente recubiertos y recubiertos perforados.

#### **2.1. Comprimidos matriciales**

Los comprimidos matriciales son formas farmacéuticas en las que la sustancia activa se encuentra uniformemente distribuida en un soporte o matriz, generalmente polimérica, que dificulta el acceso del medio de disolución hasta la superficie de las partículas y a su vez dificulta la difusión hacia el exterior de la sustancia activa en solución (Suñé, 2003). Desde hace ya algunos años, la investigación en el diseño de

formas farmacéuticas se ha centrado en la búsqueda de sistemas que prolonguen la liberación del principio activo tras su administración. Las razones, entre otras, se derivan del deseo de alcanzar la liberación prolongada de los compuestos altamente solubles en agua, alcanzar velocidades de liberación que responden a un objetivo dado, disminuir el número de administraciones diarias y reducir al mínimo efectos secundarios (Maderuelo et al., 2011). Por todo ello, y de acuerdo con los objetivos de la presente Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo el diseño y evaluación de comprimidos matriciales con *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, cuyos resultados se muestran en el apartado III.3.

A su vez, dependiendo de la naturaleza del polímero empleado, los sistemas matriciales pueden ser clasificados en inertes, hidrofílicos o lipídicos (Rathore et al., 2013).

### **2.1.1. Sistemas matriciales hidrófilos**

Los sistemas matriciales hidrófilos resultan muy interesantes desde el punto de vista tecnológico gracias a las siguientes ventajas:

- Son fáciles de formular.
- Los excipientes utilizados son baratos y considerados seguros.
- Pueden incluir grandes cargas de sustancia activa.
- Son erosionables, lo que reduce la aparición de restos de matriz en heces.
- Fáciles de fabricar con equipos accesibles, mediante compresión directa o previa granulación húmeda.

Su composición comprende principios activos en un porcentaje alto (60-80 % m/m) junto con polímeros hidrófilos en nivel moderado (10-30 % m/m) los cuales formarán la matriz. Estos polímeros, al entrar en contacto con agua, experimentan una rápida hidratación de las moléculas situadas en la interfaz sólido-líquido. Dicha

hidratación conduce a la transición vítrea del polímero, pasando de estado vítreo a un estado “gomoso” formándose una capa de gel en toda la superficie que controla la liberación del principio activo y la entrada de agua en la matriz. A medida que el agua va penetrando en el sistema con una velocidad que depende en gran medida de la naturaleza del polímero, la capa de gel experimenta una expansión progresiva que externamente se manifiesta en un incremento de su espesor, avanzando hacia el núcleo sólido, donde el polímero se encuentra en estado no hidratado. Debido a la pérdida de cohesión de las cadenas poliméricas, puede presentarse asimismo un mecanismo de erosión o disolución de la capa gelificada externa, lo que lleva consigo la posibilidad de que el proceso de penetración de agua se prolongue hasta la total dispersión del sistema. De este modo, la liberación del principio activo a partir de un sistema matricial hidrofílico puede producirse por dos procesos simultáneos:

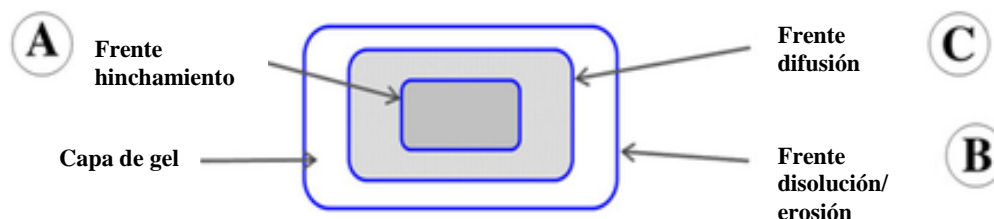
- Erosión o desgaste de las capas más externas del gel.
- Disolución del principio activo en el medio líquido y difusión a través del gel barrera.

El predominio de uno u otro mecanismo está directamente relacionado con la hidrosolubilidad del principio activo. Si el principio activo es insoluble en agua, las posibilidades de liberación del mismo por difusión serán prácticamente nulas y esta se producirá casi exclusivamente por erosión superficial, con lo que se obtendrán perfiles característicos de la cinética de orden 0 (independiente de la concentración de principio activo, constante). En cambio, si el principio activo es hidrosoluble, moderada o marcadamente, el mecanismo implicado en la liberación será la difusión del mismo a través de la capa de gel formada.

Por lo tanto, la penetración del medio en la matriz está acompañada por la formación de una serie de frentes, que más tarde desaparecerán a lo largo del proceso de disolución/erosión de la matriz (Maderuelo et al., 2011):

- Frente de hinchamiento: separa el estado vítreo/cristalino del estado hidratado o gel del polímero (A).

- Frente de erosión o disolución: separa la matriz gelificada del medio de disolución (B).
- Frente de difusión: se encuentra entre los dos anteriores. Separa la zona de la matriz gelificada que contiene el fármaco disuelto en el medio, de la zona de la matriz que contiene el fármaco sólido no disuelto (C).



**Figura 9.** Esquema de matriz hidrófila tras la entrada de medio de disolución

Los principales polímeros empleados en la preparación de matrices hidrófilas son:

- Derivados celulósicos: HPMC, MC, NaCMC, CAP, etilhidroxietilcelulosa (EHEC), hidroxipropilcelulosa (HPC)
- Naturales: agar, alginatos
- Semisintéticos: chitosanos, almidones modificados
- Acrílicos: Carbopol®

Methocel® es una marca registrada para una línea de productos de éter de celulosa. Una letra inicial identifica el tipo de éter de celulosa, “A” identifica los productos metilcelulosa y “E”, “F” y “K” identifica diferentes productos de hidroxipropilmetilcelulosa, siendo Methocel E y Methocel K los de mayor interés, puesto que la HPMC es el material de soporte utilizado con más frecuencia en comprimidos de matriz hidrófila (Colombo et al., 2000; Siepmann & Peppas, 2001; Miller-Chou & Koenig, 2003). Presenta un excelente historial de seguridad, además, todos los datos necesarios están fácilmente disponibles. Asimismo, cuenta con la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration) como aditivo alimentario

directo.

Debido a que su uso está tan extendido, las técnicas y equipos para el desarrollo de formulaciones y producción son de fácil acceso. Es un polímero no iónico, por lo que minimiza los problemas de interacción cuando se utiliza en sistemas electrolíticos ácidos, básicos o de otro tipo. Al comparar el efecto que produce la concentración de iones del medio de disolución sobre distintos grados de viscosidad de HPMC, se pone en manifiesto que la fuerza iónica del medio solo repercute en la velocidad de liberación del fármaco en el caso de la K100LV, que presenta muy baja viscosidad (~100 mPa·s); sin embargo, para grados de viscosidad mayor, tales como K4M, K15M y K100M (4000, 15 000 y 100 000 mPa·s respectivamente), no ha resultado decisiva. Funcionan bien con fármacos solubles e insolubles y en niveles altos y bajos de dosificación, son tolerantes respecto a variables en ingredientes y métodos de producción. En los casos en los que el fármaco es muy soluble en agua, se deberá tener especial control de la velocidad de entrada del medio en la matriz, lo que depende en gran medida del peso molecular del polímero HPMC. A medida que aumenta su peso molecular, la velocidad de entrada del agua es más lenta. La evidencia sugiere que la química de HPMC fomenta una formación de gel fuerte y consistente en comparación con otros materiales celulósicos. Como resultado, las tasas de liberación del fármaco se han mantenido durante más tiempo con HPMC que con niveles equivalentes de MC, CMC o hidroxietilcelulosa (HEC).

### **2.1.2 Sistemas matriciales inertes**

La liberación de la sustancia activa desde la matriz inerte se da por difusión a través de una red capilar formada por los espacios vacíos que quedan entre las partículas del polímero a medida que el frente del medio de disolución penetra en la matriz. En este proceso de difusión la porosidad de la matriz y la tortuosidad de los pequeños canales que la conforman juegan un papel primordial. La matriz polimérica en sí misma constituye un esqueleto poroso, indeformable e insoluble en los fluidos gastrointestinales y, una vez que ha liberado la totalidad del principio activo, se expulsa con las heces.

Las matrices inertes pueden prepararse fácilmente mediante compresión directa de la mezcla de principio activo y de polímero, siempre y cuando el polímero posea una granulometría y compresibilidad adecuadas. Además, estos polímeros son hidrófobos, no digeribles, insolubles en líquidos digestivos y no tóxicos. Destacan los copolímeros metacrílicos (Eudragit<sup>®</sup>), EC, polietileno, fosfato cálcico dibásico, acetato de polivinilo (PVA) y poliamida. Entre ellos, los Eudragit<sup>®</sup> junto con la EC han sido muy utilizados como materiales de recubrimiento para alcanzar una liberación prolongada de la sustancia activa.

Bajo la denominación de Eudragit<sup>®</sup> se engloban los copolímeros del ácido metacrílico y diferentes ésteres acrílicos o metacrílicos de interés farmacéutico. Son biocompatibles y farmacológicamente inertes, además se excretan del organismo sin sufrir metabolismo sistémico. En función de su estructura molecular, los Eudragit<sup>®</sup> se dividen en cinco grupos: Eudragit E, Eudragit L y S, Eudragit FS30D, Eudragit RS y RL, Eudragit NE30D, NE40D y NM30D.

- Variedades E: presentan grupos funcionales amino en su estructura lo que permite la formación de películas de recubrimiento solubles a pH ácido. Son muy útiles en la liberación de principios activos a nivel gástrico, enmascarar caracteres organolépticos desagradables o proteger la sustancia activa frente a humedad y condiciones ambientales adversas.
- Variedades FS, L y S: tienen carácter aniónico y presentan grupos carboxílicos en su estructura molecular. Solubles a valores de pH > 6, por lo que son utilizados como materiales gastrorresistentes. La cesión del principio activo tiene lugar a nivel intestinal.
- Variedades NE, NM, RL y RS: poseen carácter neutro (NE y NM) y catiónico (RL y RS). Son insolubles y adecuados para la liberación controlada de fármacos en función del tiempo.

Para el diseño y desarrollo de los comprimidos matriciales contenidos en *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, recogidos en el apartado III.3 de la presente Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo la combinación de diferentes polímeros así como el



estudio de su papel protector. Entre ellos encontramos el alginato sódico e HPMC, polímeros formadores de matrices hidrófilas. También se han empleado polímeros gastrorresistentes, solubles únicamente a pH intestinal, como Eudragit<sup>®</sup> L y CAP. Por último, se llevo a cabo la adición de la EC, polímero insoluble en agua, con objeto de analizar su combinación con Eudragit<sup>®</sup> y superar los posibles problemas asociados a sistemas de liberación intestinal, tales como una resistencia gástrica demasiado corta y liberación prematura.

### **2.1.3. Sistemas matriciales lipídicos**

Las matrices lipídicas, también llamadas ceras o hidrófobas, están formadas por un lípido que constituye la matriz en la que se encuentra dispersa el principio activo. Los principales excipientes utilizados son glicéridos, generalmente saturados, ácidos grasos (ácido esteárico, ácido palmítico), alcoholes grasos (alcohol cetílico y estearílico) y ceras (cera blanca, cera de Carnauba).

La liberación del principio activo a partir de comprimidos matriciales lipídicos puede llevarse a cabo mediante dos mecanismos:

- Difusión a través de la matriz. Este proceso depende de la liposolubilidad del principio activo.
- Erosión de la superficie matricial por lipólisis enzimática, hidrólisis o ionización. Depende del pH y actividad enzimática, lo cual está ligado a variaciones interindividuales.

### **3. *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711**

A continuación pasamos a describir las características fundamentales de la cepa probiótica utilizada en la elaboración de los comprimidos orales. Se trata de *Lactobacillus coryniformis*, una de las especies menos estudiadas del género *Lactobacillus*, asociada generalmente a productos vegetales fermentados incluido el ensilado. *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 es una bacteria Gram-positiva,

perteneciente al género *Lactobacillus*, patentada y comercializada por Biosearch Life. Esta cepa se aisló originalmente de un queso artesanal elaborado a partir de leche de cabra probablemente debido a una contaminación con este material vegetal.

### 3.1. Seguridad de la cepa

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe cumplir una serie de requisitos, entre ellos, y los más importantes, ser seguros y no producir toxicidad en el hospedador. *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, tras ser sometida a numerosos ensayos, ha sido considerada una cepa segura, sin efectos nocivos para la salud humana:

- *L. coryniformis* está considerada segura por la EFSA (European Food Safety Authority) y, por tanto, se encuentra incluida en su lista QPS (Qualified Presumption of Safety) (EFSA, 2008).
- No produce aminas biógenas. Las aminas biógenas están relacionadas con la producción de varios problemas toxicológicos, así por ejemplo la histamina y tiramina tienen propiedades vasoactivas y psicoactivas, mientras que la cadaverina puede potenciar la actividad de las anteriores y ser precursor de agentes carcinógenos (Martín et al., 2005).
- Es bien tolerada, no degrada la mucina gástrica en ensayos realizados *in vitro*. Esta propiedad es importante puesto que podría dar lugar a una translocación de la microbiota intestinal a tejidos extra-intestinales (Martín et al., 2005).
- No presenta actividad  $\beta$ -glucuronidasa, actividad indeseable a nivel del colon puesto que puede convertir pro-carcinógenos en carcinógenos.
- Olivares y colaboradores (2006) demostraron una reducción de los metabolitos tóxicos en el contenido luminal de aquellos sujetos a los cuales se les había administrado la cepa respecto al grupo control.
- No tiene actividad enzimática perjudicial (Lara-Villoslada et al., 2006).

- No presenta signos de bacteriemia, incluso a pesar de las grandes dosis administradas a los ratones sometidos a ensayo (500 veces superior a la consumida normalmente por humanos). No hay translocación bacteriana a sangre, bazo ni hígado (Lara-Villoslada et al., 2006).
- El GSH, glutatión hepático, es un metabolito tóxico principal responsable del daño hepático. Ratones tratados con probióticos mostraron una concentración total de GSH en el hígado similar al grupo control. Además, no se encontró diferencias significativas en la concentración plasmática de MDA (malondialdehído), biomarcador de peroxidación lipídica, por tanto, la cepa tampoco es responsable de estrés oxidativo.

### 3.2. Propiedades probióticas

Son muchas las propiedades asociadas a *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 que la hacen atractiva como cepa probiótica de gran potencial:

- Actividad antimicrobiana contra varios microorganismos (*Lactococcus lactis* MG1614, *Lactobacillus sakei* CECT 5712, *Enterococcus faecium* P21, *Enterococcus faecalis* TAB28, *Pediococcus acidilactici* 347, *Listeria monocytogenes* ScottA, *L. monocytogenes* Ohio, *Listeria seeligeri* RdC, *Staphylococcus aureus* CECT 5191, *Staphylococcus epidermidis* CECT 231, *Escherichia coli* CECT 4076 (O157:H7), *Klebsiella pneumoniae* CECT 142, *Proteus vulgaris* CECT 484, *Klebsiella oxytoca* CECT 860T, entre otros). Esta actividad viene dada por la producción dos enantiómeros de ácido láctico (ácido L-láctico y ácido D-láctico), ácido acético y reuterina (3-hidroxi propionaldehído, 3-HPA). Además, también produce cobalamina, un cofactor necesario para la conversión de glicerol en 3-HPA (Martín et al., 2005).
- Fuerte actividad  $\beta$ -galactosidasa, beneficiosa para la salud de individuos con intolerancia a la lactosa.
- La supervivencia de *L. coryniformis* CECT 5711 tras su exposición a las condiciones encontradas en el tracto gastrointestinal, y particularmente a pH

bajo y bilis, fue aproximadamente 50 %, utilizando para ello un modelo gastrointestinal dinámico y computarizado (Martín et al., 2005).

- Otra propiedad importante que deben presentar las cepas probióticas, es la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, ya que se considera un requisito previo para la colonización del intestino y que, además, puede llevar a la exclusión competitiva de bacterias patógenas. Para determinar esta propiedad se han usado modelos celulares que implican las líneas celulares HT-29 y Caco-2 encontradas en el epitelio intestinal humano, donde se mostró una capacidad de adherencia alta, incluso mayor a la observada en *L. rhamnosus* GG o *L. johnsonii* La1 (Martín et al., 2005).

Las altas tasas de supervivencia y adhesión a la mucosa alcanzadas por *L. coryniformis* CECT 5711 sugieren que la producción de reuterina y cobalamina por esta cepa podría aprovecharse en beneficio de los huéspedes mediante la consumición de productos que contengan *L. coryniformis* CECT 5711.

### 3.3. Efectos beneficiosos

Los efectos beneficiosos de *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 ya han sido demostrados tanto en modelos animales como en ensayos clínicos llevados a cabo en humanos.

- Efectos beneficiosos sobre la función intestinal (Olivares et al., 2006):
  - Producción de AGCC. Las propiedades beneficiosas de estos ácidos grasos, ya mencionadas previamente en el Capítulo I, están relacionadas con contribuir a varias funciones intestinales, incluyendo el metabolismo de carbohidratos y lípidos, control del pH colónico, mantenimiento de la integridad de la mucosa colónica, motilidad intestinal, etc.
  - Aumento del contenido del volumen, contenido en agua y frecuencia de heces. Todo ello disminuye carcinógenos, mutágenos y reduce el riesgo de cáncer de colon.

- Efectos beneficiosos sobre sistema inmune y alergias, mejorando la respuesta inmune innata y específica (Martínez-Cañavate et al., 2009; Olivares et al., 2006):
  - Aumento de las células fagocitarias, como monocitos y neutrófilos, así como de su actividad fagocitaria, jugando un papel crucial en la respuesta inmune innata.
  - Aumento de la proporción de células NK (Natural Killer), linfocitos citolíticos naturales, implicados en la respuesta inmune innata.
  - Aumento de la concentración de IgA, principal inmunoglobulina implicada en la defensa de la mucosa. Efecto beneficioso de los probióticos en procesos de diarrea.
  - Disminución de la concentración sérica de IgE, involucrada en procesos de alergia.
  - Aumento de células T-reguladoras ( $CD4^+/CD25^+$ ), células inmunorreguladoras cruciales, implicadas en la protección contra el proceso de inflamación alérgica.



### **III.3. Evaluation of tablets containing a probiotic strain for an oral administration**

---

**Evaluación de comprimidos de administración oral que contienen una cepa probiótica**





**Evaluation of tablets containing a probiotic strain for an oral administration.**

María Teresa Sánchez, María Adolfin Ruiz, María Encarnación Morales. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017; 5: 194-206. Factor de impacto (JCR)-Percentil (JCR): 2.405-49.611.

El concepto científico de probióticos ha sido ampliamente aceptado en las últimas décadas, en consecuencia, su producción industrial y comercialización se han incrementado. Esto es solo el comienzo, ya que un reciente análisis global del mercado probiótico estimó un crecimiento anual del mismo en los próximos cinco años, impulsado, principalmente, por una creciente demanda de los consumidores asiáticos y europeos. Por lo tanto, la Industria Farmacéutica necesita desarrollar nuevas formas de dosificación que contengan microorganismos probióticos para ofrecer a estos consumidores una amplia variedad de productos. Fueron diseñados diferentes tipos de comprimidos matriciales con *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 con objeto de proteger a esta cepa durante el proceso tecnológico, las duras condiciones gastrointestinales hasta su llegada al intestino, así como las condiciones ambientales durante su almacenamiento. Con este objetivo, se combinaron diversos polímeros para obtener comprimidos de liberación controlada. Todas las formulaciones se evaluaron en términos de producción tecnológica, viabilidad bacteriana y estabilidad. Finalmente, se seleccionó una formulación óptima con Methocel<sup>®</sup> K-15 M EP, Eudragit<sup>®</sup> L-100 y alginato de sodio, la cual contiene *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, debido a que asegura una excelente supervivencia de los microorganismos después de su exposición a todas las condiciones mencionadas anteriormente.



# Evaluation of Tablets Containing a Probiotic Strain for an Oral Administration

María Teresa Sánchez, María AdolfinarRuiz and María Encarnación Morales

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada 18071, Spain

**Abstract:** The scientific concept of probiotics has been widely accepted throughout the last decades; consequently, its industrial production and commercialization have been increased. This is only the beginning since a recent global probiotic market analysis estimated an annual growth, boosted mainly by a rising request from the Asian and European consumer in the next 5 years. So the pharmaceutical industry needs to develop new dosage forms containing probiotic microorganisms in order to offer consumers a variety of products. Different kinds of matrix tablets with *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 were designed to protect this strain from the technological process and harsh gastrointestinal conditions up until their arrival in the gut, as well as environmental conditions during their storage. With this aim, various retarding polymers were combined so as to get controlled release tablets. All formulations were evaluated in terms of technological processability, bacterial viability and stability. Finally, an optimal formulation with Methocel® K-15 M EP, Eudragit L-100 and alginate sodium, which contain *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, was selected due to the fact that it assured an excellent survival of the microorganisms after their exposition to all conditions mentioned above, besides it will be able to improve human's health.

**Key words:** *Lactobacillus coryniformis*, matrix tablets, retarding polymers, health.

## 1. Introduction

The concept of probiotic was probably firstly introduced by the Russian Nobel laureate Elie Metchnikoff in 1907 (*The Prolongation of Life: Optimistic Studies*), he supported the idea that this kind of microbes were beneficial to human gastrointestinal tract [1]. The WHO (World Health Organization) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations have defined probiotics as “live microorganism, which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host”. This adequate amount varies from country to country; however, generally a probiotic product should contain more than  $10^6 \sim 10^8$  CFU/g or  $> 10^8 \sim 10^{10}$  CFU (colony forming units)/dosage of viable cells [2]. Commercially, the most commonly used bacterial probiotics are *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, non-pathogenic *E. coli* Nissle 1917 and *Saccharomyces boulardii*. Increasing market interest in

promoting health in a natural way has intensified research in this area. Today, the practical use of food and supplements, including probiotics, is driven by “soft” health effects and promotion of well-being rather than the treatment of disease symptoms [3]. Nevertheless, there is enough evidence about the success of probiotics in different diseases like infant diarrhea [4, 5], antibiotic-associated-diarrhea [6], traveler's diarrhea [7], ulcerative colitis [8-10] and Crohn disease [11], lactose intolerance [12], *Helicobacter pylori* eradication [13-15], pulmonary infections [16], low cholesterol level [17-19], antiobesity [20] and diabetes [21], allergy [22, 23], atopic eczema and skin diseases [24], cancer [25, 26] and urogenital infection [27]. Clinical trials have used various formulations and strains and the overall conclusion is that strain specificity and disease setting is important, whilst dosage and route, duration and frequency of administration must also be considered carefully [28].

*Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 was isolated

---

**Corresponding author:** María Encarnación Morales, Ph.D., research fields: Pharmaceutical Technology.

from an artisanal cheese elaborated from goat's milk by Biosearch Life; it was selected because of its broad antimicrobial activity within other probiotics properties like a high cellular adhesion and a 50% of survival in stomach [29]. Furthermore, this strain is well tolerated [30] and exerts a beneficial effect in the bowel function of healthy adult [31]. Studies are in progress to elucidate the effects of this strain on immunological parameters of healthy adult host [31, 32].

The main problem associated with the administration of probiotic microorganisms is to maintain the survival of them along the gastrointestinal tract and storage conditions; therefore, there is a need for formulations which could protect the bacteria from the stomach acid and bile effects. It seems hard to judge whether probiotic food or supplements act more efficiently in exerting the claimed health effects. To our knowledge, only one study has compared the survivability of probiotic bacteria in food versus supplements. The results showed that the capsules used as supplement did not protect lactobacilli strain until the end of the gastrointestinal tract but the health effectiveness was not investigated and compared. Different forms of probiotic supplements are available in the market including pills, capsules, tablets, gelcaps, liquids and powders. In the pharmaceutical field, acid labile drugs are formulated mainly in tablets, which are able to ensure a higher protection and deliver the active substances into the intestinal tract. In addition, tablets have advantages over other dosage forms; these are ease of administration, accurate dosage, good patient acceptance and suitability for large-scale production [33, 34]. Based on this knowledge, we investigated whether it is possible to design a probiotic tablet supplement, which protects them from degradation at low pH and lets the delivery of the viable probiotics into the colon carrying out the beneficial effects. In this sense, we employ different polymers according to our objective; these polymers are for example hydroxypropyl methylcellulose (Methocel<sup>®</sup> K-15 M

EP) [35-41] and sodium alginate [42, 43], which form hydrophilic matrix tablets in contact with aqueous media. Bacteria released from this kind of tablets are controlled by the formation of a hydrated viscous layer around the tablet, after ingestion of the dosage form. The surface acts as a release barrier by opposing penetration of water into the tablet and the dissolution of the matrix. The release of the microorganisms could be by diffusion through the gel layer or by erosion [44-48], in this case, the release of the probiotic bacteria is by diffusion. The cellulose acetate phthalate provides lipophilic matrix tablets with an erosion process, which allows the probiotic release. Other polymers are Eudragit<sup>®</sup> L-100, a metacrylic acid-ethylacrylate copolymer [49, 50] and ethylcellulose, which is water-insoluble, both form inert matrix and its combination were investigated to overcome the problems of colonic delivery systems, such as a too short gastric resistance and premature release [50].

In the present study, we intend to develop different matrix tablets with *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, a probiotic strain, which can achieve an optimal survival of bacteria after technological process, gastrointestinal tract until colon and storage conditions with the possibility of being marketed. Lastly, the current probiotic interest from consumers, scientists, and healthcare workers will only increase as more and better information is becoming available [51].

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Materials

Lyophilized batches of the lactic acid bacteria strain *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 were supplied by Biosearch Life S.A (Spain). Sodium alginate, talcum and magnesium stearate were purchased from Guinama (Spain), Methocel<sup>®</sup> K-15 M EP (HPMC (hydroxypropylmethylcellulose)) from Palex Laboratories S.A (Spain), Eudragit<sup>®</sup> L-100 from Degussa (Germany), EC (ethyl cellulose) from Dow Chemical Company (USA), cellulose acetate phthalate

from Sigma- Aldrich Company (USA).

## 2.2 Methods

### 2.2.1 Tablets Preparation

Tablet processing took place by direct compression using a single punch manual tablet press (SPECAC SC-15011, Spain) connected to a pressure gauge. An exact amount of powder mixture containing *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 and different polymers in each case was poured into a 10 mm diameter die under a certain force ranging from 5 to 25 kN and several compression times. Tablets with plane surface were formed. The polymers were used in order to achieve a controlled release. Besides of polymers, tablets also contain a suitable amount of magnesium stearate as lubricant and talcum as antiadherent (0.1% and 0.9%, w/w, respectively). Tablets formulations designed in this study are summarized in Table 1.

### 2.2.2 Technological Evaluation

Once obtained probiotic tablets, they must be

evaluated according to United States Pharmacopeia (USP 29) and Real Farmacopea Española (RFE, 3<sup>a</sup> Ed) methods for modified release tablets. They were evaluated in order to know their disintegration, tensile strength, friability and mass uniformity [52, 53].

Disintegration of tablets was examined by means of a disintegration apparatus (Erweka, Germany) and they were placed separately in the test chamber and then immersed in HCL 37% for 1 h and then in phosphate buffer solution PBS pH 6.8 for 24 h at 37 °C; the disintegration test ends when in each test chamber there is a soft residue of the tablets and it is completely impregnated and never is a non impregnated core [52-54].

Tablets' mechanical strength was determined by using an Erweka TBH 20 (Germany) tester and the tensile strength ( $\sigma$ ) was calculated by the following equation, where  $P$  is the measured crushing force (N),  $D$  is diameter and  $t$  is the thickness of the tablets [55]:

$$\sigma = 2P/\pi Dt$$

**Table 1 Probiotic tablets formulations.**

| Formulation | Probiotic bacteria (mg) | Sodiumalginate (mg) | Methocel <sup>®</sup> K-15 M EP (mg) | Cellulose acetate phthalate (mg) | Eudragit L-100 (mg) | EC (ethylcellulose) (mg) |
|-------------|-------------------------|---------------------|--------------------------------------|----------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 1           | 100                     | 100                 | 100                                  | -                                | -                   | -                        |
| 2           | 100                     | 100                 | 75                                   | 25                               | -                   | -                        |
| 3           | 100                     | 100                 | 50                                   | 50                               | -                   | -                        |
| 4           | 100                     | 100                 | 25                                   | 75                               | -                   | -                        |
| 5           | 100                     | 100                 | -                                    | 100                              | -                   | -                        |
| 6           | 100                     | 75                  | 100                                  | 25                               | -                   | -                        |
| 7           | 100                     | -                   | 100                                  | 100                              | -                   | -                        |
| 8           | 100                     | 100                 | 75                                   | -                                | 25                  | -                        |
| 9           | 100                     | 100                 | 50                                   | -                                | 50                  | -                        |
| 10          | 100                     | 100                 | 25                                   | -                                | 75                  | -                        |
| 11          | 100                     | 100                 | -                                    | -                                | 100                 | -                        |
| 12          | 100                     | 75                  | 100                                  | -                                | 25                  | -                        |
| 13          | 100                     | 50                  | 100                                  | -                                | 50                  | -                        |
| 14          | 100                     | 25                  | 100                                  | -                                | 75                  | -                        |
| 15          | 100                     | -                   | 100                                  | -                                | 100                 | -                        |
| 16          | 100                     | -                   | 100                                  | -                                | 95                  | 5                        |
| 17          | 100                     | -                   | 50                                   | -                                | 142.5               | 7.5                      |
| 18          | 100                     | -                   | 25                                   | -                                | 166.25              | 8.75                     |
| 19          | 100                     | -                   | 100                                  | -                                | 90                  | 10                       |
| 20          | 100                     | -                   | 50                                   | -                                | 135                 | 15                       |
| 21          | 100                     | -                   | 25                                   | -                                | 157.5               | 17.5                     |

“-”: Formulation does not contain the polymer.

Tablets' friability was measured by using a friabilator (Erweka GmbH, Germany) and mass uniformity test was realized with a precision balance (A&D Europe GmbH, Germany).

### 2.2.3 *In Vitro* Determination of Cell Release

Dissolution test was arranged according to our type of tablets with the aim of evaluating the release speed of probiotic microorganism and their gastric juice resistant by using the USP paddle method, with a paddle speed of 100 revolutions per minute (rpm) at 37 °C. Tablets were transferred into 600 mL of 0.04 N HCL acid (pH 1.7) during 2 h and then in PBS pH 6.8 for 4 h. At the end of the assay, the medium was removed and the viable cells inside tablets were determined. The test was realized in triplicate.

### 2.2.4 Viability of Cells Inside the Tablets: Microbiological Cultures

Each tablet was broken and dispersed in 50 mL of PBS pH 7. Tablets should be shaken during 1 h in an orbital shaker. After this time, a serial dilution of the suspension was made until a suitable cell density. Cell suspension was then spread onto MRS agar plates. These plates were incubated at 37 °C for 48 h. This procedure was carried out in duplicates. Colonies of bacteria were counted and converted to logCFU (colony forming units). The survival of probiotic cells was studied.

### 2.2.5 Stability of Probiotic Tablets

So as to perform stability testing, tablets were kept in hermetic containers at 4 °C, 25 °C and RT (room temperature) for one year. The stability of bacterial

cells in these tablets throughout the storage period was investigated. The method used to determine cell viability was the plating procedure described above.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Bacterial Viability after Tableting

With the aim of selecting the best formulations, the effects of compression force and polymers on probiotic viability, as well as the stability of probiotic tablets during the storage at different temperatures, were studied.

A screening of compression force was carried out with several tablets that contained probiotic cells (Table 2). The assay was carried out in triplicate with all formulations. On account of the results that we had obtained (Table 2), 15 kN of compression force was selected as the optimal since all tablets have similar technological properties and adequate viability. We prepared our tablets with 0.1 g of this lyophilized, so the theoretical viability inside the tablets should be  $1 \times 10^{10}$  CFU/tablet. As we can see in Table 3, the viability inside tablets after applying 15 kN of compression force ranged from  $2 \times 10^9$  to  $6 \times 10^9$  CFU. The lethal effect of compression may be attributable to shearing forces caused by interparticules movement and pore size reduction within the matrix, leading to mechanical damage and death of the cells [56]. Some authors recommend a probiotic dosage of 5 billion CFU for at least 5 days in order to improve huma's health [57]. Furthermore, Lara-Villoslada et al. [30] reported that a

**Table 2 Tablets compression force with probiotic bacteria ( $n = 3$ ). Results obtained after applying different compression forces (kN) during 30 s or 60 s to a powder mixture which contained probiotic bacteria.**

| Tablet processing condition |          | Results   |
|-----------------------------|----------|---|
| Compression force (kN)      | Time (s) |   |
| 5                           | 30       | The compression force isn't enough:<br>High friability and low tensile strength were observed |
|                             | 60       |   |
| 15                          | 30       | Optimal friability and tensile strength   |
|                             | 60       |   |
| 20                          | 30       | High tensile strength, unbreakable tablets  |
|                             | 60       |   |
| 25                          | 30       |   |
|                             | 60       |   |

dosage of  $2 \times 10^9$  CFU/day of *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 enhanced intestinal function and caused an increment in several immunological parameters. So, despite the loss of 1 log CFU during compression, this force of 15 kN assured an adequate probiotic survival and its beneficial effects, overcoming high compression forces issues.

### 3.2 Probiotic Bacteria Survival inside Tablets in Gastric Juice

In order to provide beneficial health effects for the host, probiotic bacteria must survive through the gastrointestinal tract, tolerating acid and then adhere to and colonize the intestinal epithelium [58]. Firstly, probiotic bacteria resistance in acid was studied with the aim of selecting those formulations with an optimal viability after their immersion for 2 h in acid (HCl 0.04 N). Table 3 shows cells viability of each formulation just after tableting and after their exposure to gastric conditions.

If we compare all formulations, viability after their exposure to gastric conditions was reduced by 1logCFU in most of them. However, Formulations 4 and 5 were more affected by acid and their decrease in viability was 2logCFU. According to Stadler and Viernstein [52], the decrease of 1log unit after 2 h of contact with acidic medium was a good achievement. As it is shown in Table 3, Formulations 10, 12 and 14 had the best acid resistance results. If we consider the combination of Eudragit L-100 and EC, Formulations 16 and 17 had also a good resistance. However, between both formulations we selected only Formulation 17 for further study because of its higher amount of Eudragit/EC (2.5%) according to Rujivipat and Bodmeier [50], who claims that the addition of ethylcellulose to the enteric Eudragit L decreases the release of water-soluble drugs at low pH; surprisingly, the addition of only 2.5% ethylcellulose prolonged the gastric resistance beyond 18 h. Increasing the ethylcellulose amount decreased the weight increase

**Table 3 Probiotic viability inside tablets after immersing 2 h in HCl 0.04 N (pH 1.8).**

| Formulation | Initial viability (CFU/tablet) after tableting* | Viability after 2 h in acid* (CFU/tablet) |
|-------------|---|---|
| 1           | $5 \times 10^9 \pm 3.32 \times 10^8$            | $1 \times 10^8 \pm 0.00$                  |
| 2           | $5 \times 10^9 \pm 2.50 \times 10^8$            | $6 \times 10^8 \pm 4.62 \times 10^7$      |
| 3           | $3 \times 10^9 \pm 4.27 \times 10^8$            | $1 \times 10^8 \pm 3.95 \times 10^6$      |
| 4           | $7 \times 10^9 \pm 3.56 \times 10^8$            | $2 \times 10^7 \pm 1.26 \times 10^6$      |
| 5           | $4 \times 10^9 \pm 8.16 \times 10^7$            | $4 \times 10^7 \pm 5.00 \times 10^6$      |
| 6           | $5 \times 10^9 \pm 3.70 \times 10^8$            | $3 \times 10^8 \pm 1.41 \times 10^6$      |
| 7           | $5 \times 10^9 \pm 0.00$                        | $1 \times 10^8 \pm 0.00$                  |
| 8           | $5 \times 10^9 \pm 0.00$                        | $3 \times 10^8 \pm 1.29 \times 10^7$      |
| 9           | $5 \times 10^9 \pm 1.25 \times 10^8$            | $6 \times 10^7 \pm 4.62 \times 10^6$      |
| 10          | $8 \times 10^9 \pm 2.63 \times 10^8$            | $5 \times 10^8 \pm 1.50 \times 10^7$      |
| 11          | $5 \times 10^9 \pm 3.70 \times 10^8$            | $2 \times 10^8 \pm 1.73 \times 10^7$      |
| 12          | $5 \times 10^9 \pm 3.32 \times 10^8$            | $5 \times 10^8 \pm 1.00 \times 10^7$      |
| 13          | $3 \times 10^9 \pm 1.41 \times 10^8$            | $2 \times 10^8 \pm 2.06 \times 10^7$      |
| 14          | $5 \times 10^9 \pm 1.50 \times 10^8$            | $5 \times 10^8 \pm 1.41 \times 10^6$      |
| 15          | $2 \times 10^9 \pm 0.00$                        | $2 \times 10^8 \pm 5.00 \times 10^7$      |
| 16          | $4 \times 10^9 \pm 1.73 \times 10^7$            | $5 \times 10^8 \pm 1.50 \times 10^7$      |
| 17          | $5 \times 10^9 \pm 0.00$                        | $5 \times 10^8 \pm 4.75 \times 10^6$      |
| 18          | $3 \times 10^9 \pm 9.57 \times 10^8$            | $1 \times 10^8 \pm 5.00 \times 10^7$      |
| 19          | $3 \times 10^9 \pm 1.40 \times 10^9$            | $1.5 \times 10^8 \pm 5.77 \times 10^7$    |
| 20          | $5 \times 10^9 \pm 0.00$                        | $1 \times 10^8 \pm 4.59 \times 10^7$      |
| 21          | $7.50 \times 10^9 \pm 4.79 \times 10^9$         | $1 \times 10^8 \pm 3.96 \times 10^7$      |

\*Values are mean ( $n = 3$ )  $\pm$  SD (standard deviation).

(swelling) in acid and decreased the weight loss and erosion in lag conditions, thus the acid uptakes were 42% and 3% for (Eudragit L):ethylcellulose blends of 95:5 and 90:10, respectively.

All of these formulations kept a viability of  $5 \times 10^8$  CFU/tablet after the assay, which is considered as therapeutic dosage [2]. Probably, tablets had improved the stability of the remaining bacteria in comparison with the lyophilized bacteria due to the reduction of the exchange surface with the environment after compression [59].

### 3.3 Technological Evaluation

Each of the four formulations previously selected,

were subjected to technological tests (mass uniformity, friability and tensile strength). Although disintegration test is not mandatory for this matrix tablets, it was carried out with the aim of studying the changes that tablets suffers through the gastrointestinal tract. After the disintegration assay, it was demonstrated the complete disintegration and the non-presence of tablets residues in the organism within 24 h (Figs. 1-4).

Mass uniformity was calculated as the mass average of 20 samples, whilst friability and tensile strength was calculated with 10 samples for each formulation. The results obtained (Table 4) showed that all formulations have an adequate hardness to an easy-manipulation (friability < 1%). Furthermore, tensile strength is

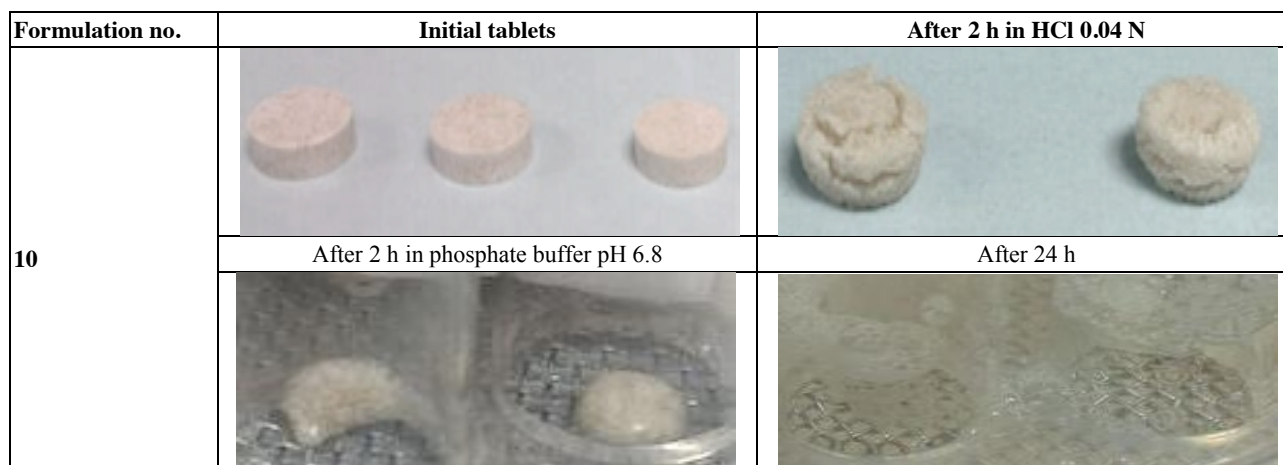


Fig. 1 Formulation 10 disintegration test (24 h) (n = 6). Tablets behavior and appearance after been immersed 2 h in HCl 0.04 N and Phosphate buffer pH 6.8 until 24 h.

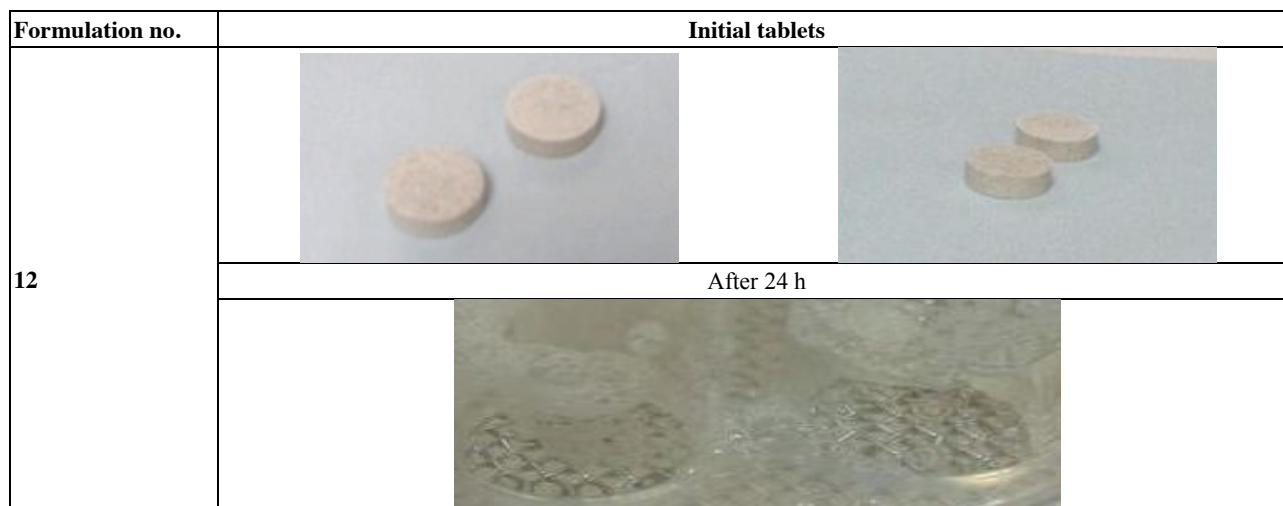
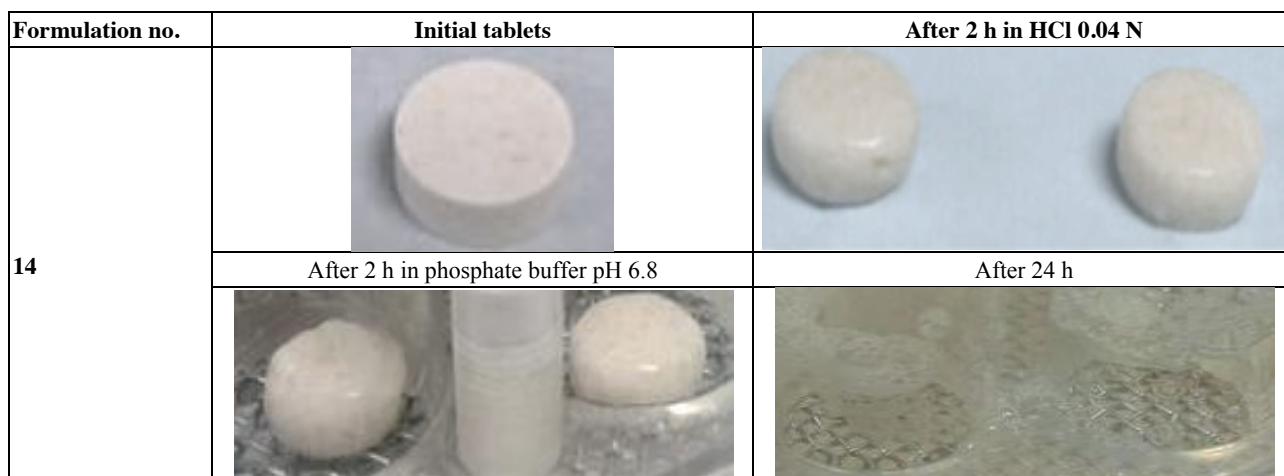
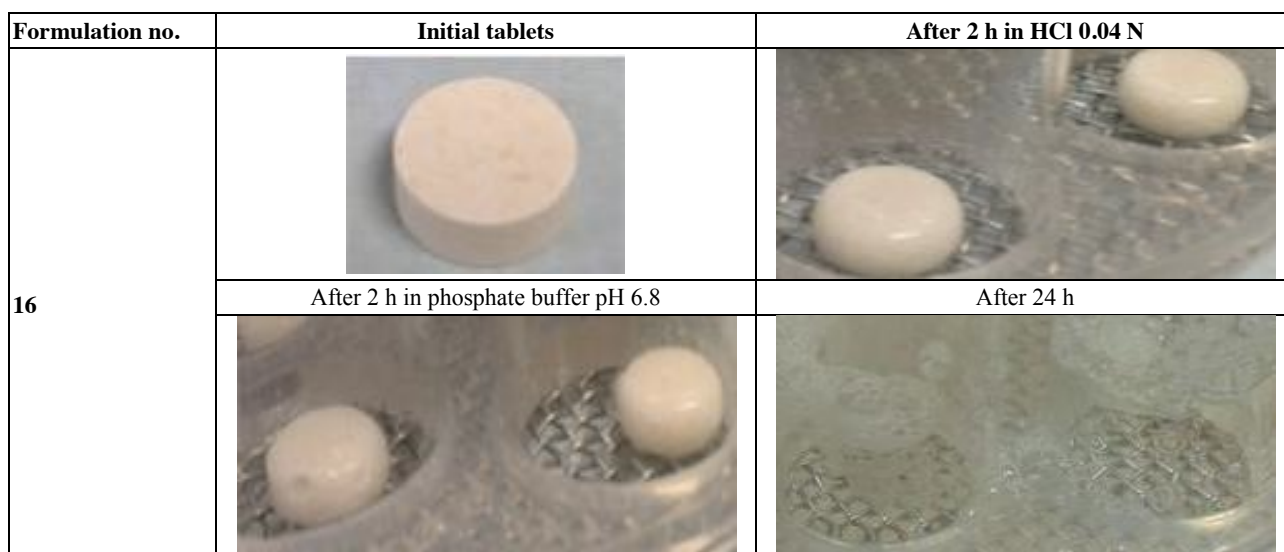


Fig. 2 Formulation 12 disintegration test (24 h) (n = 6). Tablets behavior and appearance after been immersed 2 h in HCl 0.04 N and Phosphate buffer pH 6.8 until 24 h.





**Fig. 3** Formulation 14 disintegration test (24 h) ( $n = 6$ ). Tablets behavior and appearance after been immersed 2 h in HCl 0.04 N and Phosphate buffer pH 6.8 until 24 h.



**Fig. 4** Formulation 16 disintegration test (24 h) ( $n = 6$ ). Tablets behavior and appearance after been immersed 2 h in HCl 0.04 N and Phosphate buffer pH 6.8 until 24 h.

**Table 4** Tablets technological tests. Formulations 10, 12, 14 and 16 were submitted to mass uniformity, friability and tensile strength test.

| Formulation | Mass uniformity (g)* | Friability* | Tensile strength (N/mm <sup>2</sup> )** |
|-------------|----------------------|-------------|---|
| 10          | 0.3189 ± 0.016       | < 1%        | 5.87 ± 0.30                             |
| 12          | 0.3165 ± 0.016       | < 1%        | 4.65 ± 0.62                             |
| 14          | 0.3190 ± 0.016       | < 1%        | 6.34 ± 0.42                             |
| 16          | 0.3165 ± 0.016       | < 1%        | 5.69 ± 0.58                             |

\*Values are mean ( $n = 20$ ) ± SD (standard deviation);

\*\*Values are mean ( $n = 10$ ) ± SD (standard deviation).

between  $4.65 \pm 0.62 \text{ N/mm}^2$  and  $6.34 \pm 0.42 \text{ N/mm}^2$ , which is optimal according to Muller et al. [59] who consider that pharmaceutical tablets should have a tensile strength  $\geq 1.5 \text{ N/mm}^2$ , otherwise, it will be necessary for the addition of excipient to increase the

cohesion.

### 3.4 In Vitro Determination of Cells Release

The low pH and pepsin can be considered as the main detrimental factors for probiotics viability in the

stomach. The pH of the stomach generally ranges from 2.5 to 3.5, but it can be as low as pH 1 or pH 2 at higher rates of gastric juice secretion or higher than pH 6 after food digestion. Having passed through the stomach, ingested probiotics are faced with surviving in the small intestinal environment, where they are exposed to pancreatin, bile salts and an alkalinity between pH 7~pH 8. Acid-bile tolerance and adhesive ability are essential considerations in evaluating the efficacy probiotic organisms [60]. It is important to consider the expression of the results and its interpretation; the best criterion is probably the concentration of probiotic at the target site [61, 62]. Table 5 and Fig. 5 show the results of the dissolution

test and the survival of the probiotic bacteria along gastrointestinal tract.

First of all, tablets had to pass through stomach (pH = 1~2.5) which takes 2 h. After that, the viability of each formulation is  $5 \times 10^8$  CFU/tablets. Then tablets will reach the small intestine (pH = 6.1~7.8) whose transit time until colon is about  $3.2 \pm 1.6$  h, so we continued the assay simulating these conditions for 4 h. After 2 h in small intestine, viability inside tablets has decreased in 1logCFU ( $10^7$  CFU/tablet). 4 h later, tablets would be in colon, which was the target. At this time, Formulations 10, 14 and 16 maintained the viability ( $10^7$  UFC/tablet), however, viability of Formulation 12 decreased in 1log ( $10^6$  CFU/tablet).

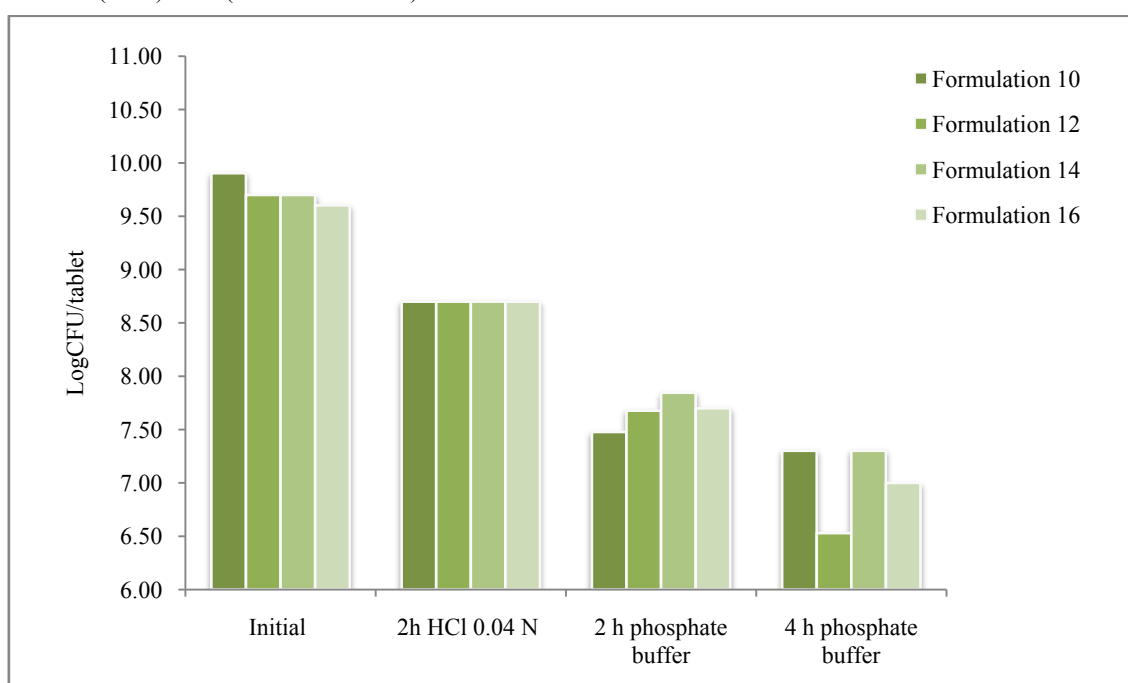
**Table 5** Dissolution test (6 h). Formulations 10, 12, 14 and 16 were submitted to a cell release test along gastrointestinal transit according to USP method.

| Formulation | Initial viability (CFU/tablet)       | Viability after 2 h in acid*         | Viability after 2 h in phosphate buffer** (CFU/tablet) | Viability after 4 h in phosphate buffer** (CFU/tablet) |
|-------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| 10          | $8 \times 10^9 \pm 2.63 \times 10^8$ | $5 \times 10^8 \pm 1.50 \times 10^7$ | $3 \times 10^7 \pm 0.00$                               | $2 \times 10^7 \pm 6.93 \times 10^6$                   |
| 12          | $5 \times 10^9 \pm 3.32 \times 10^8$ | $5 \times 10^8 \pm 1.00 \times 10^7$ | $4.75 \times 10^7 \pm 2.89 \times 10^6$                | $3.38 \times 10^6 \pm 7.22 \times 10^5$                |
| 14          | $5 \times 10^9 \pm 1.50 \times 10^8$ | $5 \times 10^8 \pm 1.41 \times 10^7$ | $7 \times 10^7 \pm 2.99 \times 10^6$                   | $2 \times 10^7 \pm 7.07 \times 10^6$                   |
| 16          | $4 \times 10^9 \pm 1.73 \times 10^8$ | $5 \times 10^8 \pm 1.50 \times 10^7$ | $5 \times 10^7 \pm 2.52 \times 10^6$                   | $1 \times 10^7 \pm 0.00$                               |

\*HCl 0.04 N, pH 1.8;

\*\*Phosphate buffer pH 6.8;

Values are mean ( $n = 3$ )  $\pm$  SD (standard deviation).



**Fig. 5** Probiotic bacteria survival along gastrointestinal tract ( $n = 3$ ). Viability of probiotic bacteria (logCFU/tablet) contained in Formulations 10, 12, 14 and 16 under simulated gastrointestinal conditions.

In accordance with Marteau et al. [61], Formulations 10, 14 and 16 with a viability of  $10^7$  UFC/tablet assured us an optimal number of CFU at the target site since the concentration of probiotics needed to obtain a clinical effect is often quoted as  $\geq 10^6$  CFU/g from the small bowel to the colon. Furthermore, the strain *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 showed a survival rate in acid of approximately 50% [29], so not all the cells released in stomach are destroyed by acid and a half of them could have healthy effects there. Even so, there is evidence showing that the

components of dead cells may be able to exert some anti-inflammatory responses [63]. Another important property of this strain is its strong adhesion to Caco-2 and HT-29 cells, which is higher than other strains like *L.rhamnosus* GG, *L.jhonsooni* La 1 and *L. casei* immunitass [29].

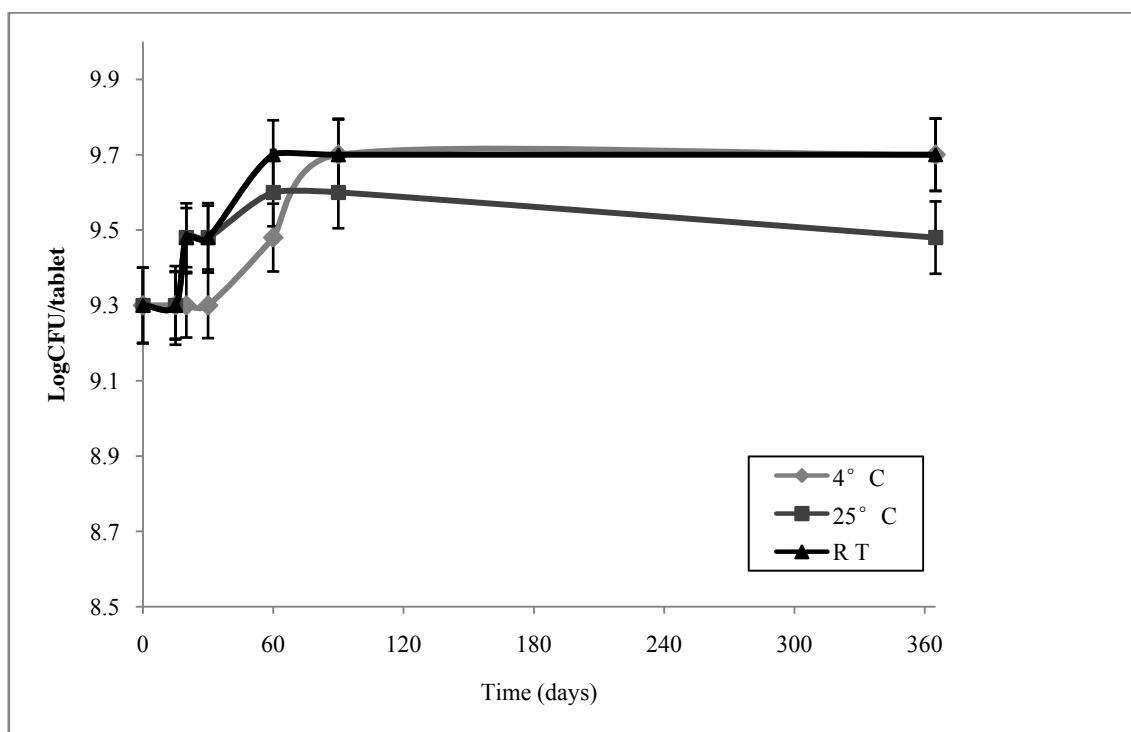
### 3.5 Stability of Probiotic Tablet

The stability of one of the optimized formulations had been tested (Formulation 14) (Table 6 and Fig. 6). This formulation was selected in accordance with

**Table 6** Formulation 14 storage stability and bacteria survival (CFU/tablet, CFU/g) during 365 days at different storage temperatures (4 °C, 25 °C and room temperature).

| Time (days) | Storage temperature                     |   |   |
|-------------|---|---|---|
|             | 4 °C (CFU/tablet)                       | 25 °C (CFU/tablet)                      | RT (room temperature) (CFU/tablet)      |
| 0           | $5.30 \times 10^9 \pm 1.03 \times 10^8$ | $5.30 \times 10^9 \pm 1.03 \times 10^8$ | $5.30 \times 10^9 \pm 1.03 \times 10^8$ |
| 15          | $2.50 \times 10^9 \pm 7.06 \times 10^8$ | $1 \times 10^9 \pm 1.15 \times 10^8$    | $2 \times 10^9 \pm 2.77 \times 10^8$    |
| 20          | $1.24 \times 10^9 \pm 3.39 \times 10^8$ | $3 \times 10^9 \pm 7.07 \times 10^7$    | $3 \times 10^9 \pm 1.27 \times 10^7$    |
| 30          | $2.35 \times 10^9 \pm 4.95 \times 10^8$ | $4 \times 10^9 \pm 1.41 \times 10^8$    | $3 \times 10^9 \pm 2.97 \times 10^8$    |
| 60          | $3.97 \times 10^9 \pm 9.97 \times 10^8$ | $3 \times 10^9 \pm 1.00 \times 10^8$    | $5 \times 10^9 \pm 1.43 \times 10^8$    |
| 90          | $5 \times 10^9 \pm 2.18 \times 10^8$    | $5.35 \times 10^9 \pm 3.32 \times 10^8$ | $5 \times 10^9 \pm 3.75 \times 10^7$    |
| 365         | $5 \times 10^9 \pm 4.04 \times 10^8$    | $3.50 \times 10^9 \pm 4.04 \times 10^7$ | $5 \times 10^9 \pm 4.04 \times 10^8$    |

Values are mean ( $n = 3$ )  $\pm$  SD (standard deviation).



**Fig. 6** Formulation 14 storage stability and bacteria survival (logCFU/tablet) during 365 days ( $n = 3$ ) at different storage temperatures (4 °C, 25 °C and room temperature).

Eudragit L-100 and Methocel® K-15 combination. As we have seen in Table 5, Eudragit L-100 has a great influence in probiotic protection, so Formulations 10 and 14 have the best acid resistance. However, Formulation 10 was refused because of its higher amount of sodium alginate since in a previous work we notify that pH of the medium may influence negatively the rheology of alginate gel [64], we can see this damage in Fig. 1. All in all, we studied the viability of Formulation 14 during 365 days; tablets were stored at different conditions of temperature (RT, 4 °C, 25 °C). In a previous reported work, we had a decrease in viability after 180 days [64], so the aim in this study was to enhance and improve the stability of our tablets.

As we can see in Table 6, the viability inside our tablets did not change throughout the study ( $10^9$  UFC/tablet) at the different temperatures. Owing to the results, we could confirm that the initial shock caused by the pressure had no effect on the remaining bacteria and did not make them more sensitive in storage conditions, thus the effect of both time and compression pressure on bacterial viability are independent [59]. Probiotics need to tolerate processing and storage conditions in order to be viable in a commercial product at the end of its shelf-life ( $> 10^6$  CFU/g) [65].

#### 4. Conclusions

Probiotics have a brilliant future; applications will be both in the food domain and in very specific disease situations, where they can play a truly therapeutic role. Success, however, will depend on a number of, mostly interlinked, conditions. The need arises to develop new formulations with them, which overcome problems associated with these microorganisms and assure their survival at the end of their shelf life in a suitable number of viable cells. Among the different matrix tablet formulations that were developed with *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, the combination of alginate sodium (25 mg), Methocel® K-15 M EP (100 mg) and Eudragit® L-100 (75 mg) had

the best technological and viability assays results, as well as good biocompatibility and biodegradability polymers properties. The viability inside tablets after compression was  $5 \times 10^9$  CFU/tablet, so tablets offer an amazing protection to probiotic cells during this process. Furthermore, once tablets had passed stomach acid medium, the viability decreased in  $1 \log_{10}$  CFU ( $5 \times 10^8$  CFU/tablet) but it is already an effective dosage. Thus, this tablet dosage form is certainly an interesting way to improve probiotic resistance in harsh conditions and allows the strain to reach the therapeutic target in adequate amounts.

Stability study confirmed a tablet viability of  $10^9$  during 365 days at different temperatures reaching our goals. If we consider all of these properties, the formulation proposed to *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 would be optimal for being marketed. While it is essential to refuse all false claims and prevent misleading information being distributed to the public, the possibility to communicate positively proven health benefits is necessary to promote the use of probiotics in a number of conditions that have the potential to reduce substantially the health care cost for society.

#### References

- [1] Preidis, G. A., and Versalovic, J. 2009. "Targeting the Human Microbiome with Antibiotics, Probiotics and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era." *Gastroenterology* 136: 2015-31.
- [2] Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., and Charalampopoulos, D. 2011. "Recommendations for the Viability Assessment of Probiotics as Concentrated Cultures and in Food Matrices." *International Journal of Food Microbiology* 149: 185-93.
- [3] Sanders, M. E., Heimbach, J. T., Pot, B., Tancredi, D. J., Lenoir-Wijnkoop, I., Lahteenmaki-Uutela, A., et al. 2011. "Health Claims Substantiation for Probiotic and Prebiotic Products." *Gut microbes* 2: 127-33.
- [4] Dubey, A. P., Rajeshwari, K., Chakravarty, A., and Famularo, G. 2008. "Use of VSL#3 in the Treatment of Rotavirus Diarrhea in Children: Preliminary Results." *Journal of Clinical Gastroenterology* 42 (Suppl. 3 Pt. 1): 126-9.
- [5] Elmer, G. W., and McFarland, L. V. 2001.

- “Biotherapeutic Agents in the Treatment of Infectious Diarrhea.” *Gastroenterology Clinics* 30: 837-54.
- [6] Hempel, S., Newberry, S. J., Maher, A. R., Wang, Z., Miles, J. N., and Shanman, R. 2012. “Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea: A Systematic Review and Meta-analysis.” *Journal of the American Medical Association* 307: 1959-69.
- [7] De Vrese, M., and Offick, B. 2010. *Bioactive Foods in Promoting Health*. Kiel: Institute of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Federal Dairy Research Center, 205-27.
- [8] Galvez, J., Comalada, M., and Xaus, J. 2010. “Prebiotics and Probiotics in Experimental Models of Rodent Colitis: Lessons in Treatment or Prevention of Inflammatory Bowel Diseases, Bioactive Foods in Promoting Health.” In *Probiotics and Prebiotics* 35: 589-610.
- [9] Meijer, B. J., and Dieleman, L. A. 2011. “Probiotics in the Treatment of Human Inflammatory Bowel Diseases.” *Journal of Clinical Gastroenterology* 45: 139-44.
- [10] Talaie, F., Atyabi, F., Azjardzadeh, M., Dinarvand, R., and Saadatzadeh, A. 2013. “Overcoming Therapeutic Obstacles in Inflammatory Bowel Diseases: A Comprehensive Review on Novel Drug Delivery Strategies.” *European Journal of Pharmaceutical Science and Research* 49: 712-22.
- [11] Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., and Testoni, P. A. 2000. “*Saccharomyces boulardii* in Maintenance Treatment of Crohn’s Disease.” *Digestive Diseases and Sciences* 45: 1462-4.
- [12] Montalto, M., Curigliano, V., Santoro, L., Vastola, M., Cammarota, G., Manna, R., et al. 2006. “Management and Treatment of Lactose Malabsorption.” *World Journal of Gastroenterology* 12: 187-91.
- [13] Gotteland, M., Brunser, O., and Cruchet, S. 2006. “Systematic Review: Are Probiotics Useful in Controlling Gastric Colonization by *Helicobacter pylori*?” *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 23: 1077-86.
- [14] Francavilla, R., Lionetti, E., Castellaneta, E. P., Magista, A. M., Maurogiovanni, G., Bucci, N., et al. 2008. “Inhibition of *Helicobacter Pylori* Infection in Humans by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and Effect of Eradication Therapy: A Pilot Study.” *Helicobacter* 13: 127-34.
- [15] Patel, A., Shah, N., and Prajapati, J. B. 2013. “Clinical Appliance of Probiotics in the Treatment of *Helicobacter Pylori* Infection—A Brief Review.” *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii* XX: 1-9.
- [16] Alexandre, Y., Le Blay, G., Boisramé-Gastrin, S., Le Gall, F., Héry-Arnaud, G., Gouriou, S., et al. 2014. “Probiotics: A New Way to Fight Bacterial Pulmonary Infections? Les Probiotiques: Une Nouvelle Armetherapeutique contre Les Infections Respiratoires?” *Médecine et Maladies Infectieuses* 44: 9-17.
- [17] Larsen, L. A., Raben, A., Haulrik, N., Hansen, A. S., Manders, M., and Astrop, A. 2000. “Effect of 8 Week Intake of Probiotic Milk Products on Risk Factors for Cardiovascular Diseases.” *European Journal of Clinical Nutrition* 54: 288-97.
- [18] Xiao, J. Z., Kondo, S., Takahashi, N., Miyaji, K., Oshida, K., Hiramatsu, S., et al. 2003. “Effects of Milk Products Fermented by *Bifidobacterium longum* on Blood Lipids in Rats and Healthy Adult Male Volunteers.” *Journal of Dairy Science* 86: 2452-61.
- [19] Nguyen, T. D., Kang, J. H., and Lee, M. S. 2007. “Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a Potential Probiotic Bacterium with Cholesterol-Lowering Effects.” *International Journal of Food Microbiology* 113: 358-61.
- [20] Tulika, A., Satvinder, S., and Kumar Sharma, R. 2013. “Probiotics: Interaction with Gut Microbiome and Antiobesity Potential.” *Nutrition* 29: 591-6.
- [21] Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F. et al. 2012. “A Metagenome-Wide Association Study of Gut Microbiota in Type 2 Diabetes.” *Nature* 490: 55-60.
- [22] Ozdemir, O. 2010. “Various Effects of Different Probiotic Strains in Allergic Disorders: An Update from Laboratory and Clinical Data.” *Clinical and Experimental Immunology* 160: 295-304.
- [23] Waligora-Dupriet, A. J., and Butel, M. J. 2012. “Microbiota and Allergy: From Dysbiosis to Probiotics, Allergic Diseases—Highlights in the Clinic, Mechanisms and Treatment.” *Rijeka* 21:413-34.
- [24] Bunselmeyer, B., and Buddendick, K. 2010. “Probiotics and Prebiotics—Prevention and Therapy in Atopic Eczema.” In *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics* 19: 279-92.
- [25] Zhu, Y., Luo, M., Jobin, C., and Young, H. 2011. “Gut Microbiota and Probiotics in Colon Tumorigenesis.” *Cancer Letters* 309: 119-27.
- [26] Serban, D. E. 2013. “Gastrointestinal Cancers: Influence of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics.” *Cancer letter* 345: 258-70.
- [27] Lannitti, T., and Palmieri, B. 2010. “Therapeutical Use of Probiotic Formulations in Clinical Practice.” *Clinical Nutrition* 29: 701-25.
- [28] Theodorakopoulou, M., Perros, E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., and Dimopoulos, G. 2013. “Controversies in the Management of the Critically Ill: The Role of Probiotics.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 42: 41-4.
- [29] Martín, R., Olivares, M., Marín, M. L., Xaus, J., Fernández, L., and Rodríguez, J. M. 2005. “Characterization of a Reuterin-Producing *Lactobacillus*

- coryniformis* Strain Isolated from a Goat's milk Cheese." *International Journal of Food Microbiology* 104: 267-77.
- [30] Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Martín, R., Delgado, S., Rodríguez, J. M., Olivares, M., et al. 2007. "Safety Assessment of Two Probiotic Strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT 5714." *Journal of Applied Microbiology* 103: 175-84.
- [31] Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Gómez, N., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Maldonado, J. A., et al. 2006. "The Consumption of Two Probiotic Strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT 5714, Boost the Immune System of Healthy Humans." *International Microbiology* 9: 47-52.
- [32] Martínez-Cañavate, A., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Romero, J., Maldonado, J. A., Boza, J., et al. 2009. "A Probiotic Dairy Product Containing *L. gasseri* CECT 5714 and *L. coryniformis* CECT 5711 Induces Immunological Changes in Children Suffering from Allergy." *Pediatric Allergy and Immunology* 20: 592-600.
- [33] Maggi, L., Mastromarino, P., Macchia, S., Brigidi, P., Pirovano, F., Matteuzzi, D., et al. 2000. "Technological and Biological Evaluation of Tablets Containing Different Strains of Lactobacilli for Vaginal Administration." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50:389-95.
- [34] Sanchez, M. T., Ruíz, M. A., and Morales, M. E. 2015. "Microorganismos Probióticos Salud." *Ars Pharmaceutica* 56: 45-59.
- [35] Alderman, D. A. 1984. "A Review of Cellulose Ethers in Hydrophilic Matrices for Oral Controlled-Release Dosage Forms." *International Journal of Pharmaceutical Technology & Product Manufacturer* 5: 175-9.
- [36] Colombo, P., Bettini, R., and Peppas, N. A. 1999. "Observation of Swelling Process and Diffusion Front Position during Swelling in Hydroxypropyl Methyl Cellulose (HPMC) Matrices Containing a Soluble Drug." *Journal of Controlled Release* 61: 83-91.
- [37] Siepmann, J., and Peppas, N. A. 2001. "Modelling of Drug Release from Delivery Systems Based on Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)." *Advanced Drug Delivery Review* 48: 139-57.
- [38] Vueba, M. L., Batista de Carvalho, L. A. E., Veiga, F., Sousa, J. J., and Pina, M. E. 2004. "Influence of Cellulose Ether Polymers on Ketoprofen Release from Hydrophilic Matrix Tablets." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58: 51-9.
- [39] Viridén, A., Wittgren, B., and Larsson, A. 2009. "Investigation of Critical Polymer Properties for Polymer Release and Swelling of HPMC Matrix Tablets." *European Journal of Pharmaceutical Science* 36: 297-309.
- [40] Shukla, R. K., and Tiwari, A. 2012. "Carbohydrate Polymers: Applications and Recent Advances in Delivering Drugs to the Colon." *Carbohydrate Polymers* 88: 399-416.
- [41] Siepmann, J., and Peppas, N. A. 2012. "Modeling of Drug Release from Delivery Systems Based on Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)." *Advanced Drug Delivery Review* 64: 163-74.
- [42] Celine, L., Lai, C., Ai, C., and Paul, H. 2006. "Evaluation of Sodium Alginate as Drug Release Modifier in Matrix Tablets." *International Journal of Pharmaceutics* 309: 25-37.
- [43] Sriamornsak, P., Thirawong, N., and Korkeid, K. 2007. "Swelling, Erosion and Release Behavior of Alginate-Based Matrix Tablets." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66: 435-450.
- [44] Ranga, K. V., and Padmalatha, D. K. 1988. "Swelling Controlled-Release Systems: Recent Developments and Applications." *International Journal of Pharmaceutics* 48: 1-13.
- [45] Colombo, P., Bettini, R., Santi, P., De Ascentiis, A., and Peppas, N. A. 1996. "Analysis of the Swelling and Release Mechanism from Drug Delivery Systems with Emphasis on Drug Solubility and Water Transport." *Journal of Controlled Release* 39: 231-7.
- [46] Colombo, P., Bettini, R., Santi, P., and Peppas, N. A. 2000. "Swellable Matrices for Controlled Drug Delivery: Gel-Layer Behavior, Mechanisms and Optical Performance." *Pharmaceutical Science & Technology* 3: 198-204.
- [47] Ferrero, C., Massuelle, D., Jeannerat, D., and Doelker, E. 2008. "Towards Elucidation of the Drug Release Mechanism from Compressed Hydrophilic Matrices Made of Cellulose Ethers. I. Pulse-Field-Gradient Spin-Echo NMR Study of Sodium Salicylate Diffusivity in Swollen Hydrogels with Respect to Polymer Matrix Physical Structure." *Journal of Controlled Release* 128: 71-9.
- [48] Maderuelo, C., Zarzuelo, A., and Lanao, J. M. 2011. "Critical Factors in the Release of Drugs from Sustained Release Hydrophilic Matrices." *Journal of Controlled Release* 154: 2-19.
- [49] Zahirul, M., Khan, I., Prebeg, Z., and Kurjakovic, N. 1999. "A pH-Dependent Colon Targeted Oral Drug Delivery System Using Methacrylic Acid Copolymers. Manipulation of Drug Release Using Eudragit L 100-55 and Eudragit S100 Combinations." *Journal of Controlled Release* 58: 215-22.
- [50] Rujivipat, S., and Bodmeier, R. 2010. "Improved Drug Delivery to the Lower Intestinal Tract with Tablets Compression-Coated with Enteric/Nonenteric Polymer Powder Blends." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 76: 486-92.
- [51] Fologné, B., Daniel, C., and Pot, B. 2013. "Probiotics from

- Research to Market: The Possibilities Risk and Challenges.” *Current Opinion of Microbiology* 16: 284-92.
- [52] Stadler, M., and Viernstein, H. 2003. “Optimization of a Formulation Containing Viable Lactic Acid Bacteria.” *International Journal of Pharmaceutics* 256: 117-22.
- [53] Klayraung, S., Viernstein, H., and Okonogi, S. 2009. “Development of Tablets Containing Probiotics: Effects of Formulation and Processing Parameters on Bacterial Viability.” *International Journal of Pharmaceutics* 370: 54-60.
- [54] Kotla, N. G., Gulati, M., Singh, S. K., and Shivapooja, A. 2014. “Facts, Fallacies and Future of Dissolution Testing of Polysaccharide Based Colon-Specific Drug Delivery.” *Journal of Controlled Release* 178: 55-62.
- [55] Kiekens, F., Zelko, R., and Remon, J. P. 2000. “Effect of Storing Conditions on the Tensile Strength of Tablets in Relation to the Enthalpy Relaxation of the Binder.” *Pharmaceutical Research* 17: 490-3.
- [56] Plumpton, E. J., Gilbert, P., and Fell, J. T. 1986. “The Survival of Microorganisms during Tableting.” *International Journal of Pharmaceutics* 30: 241-6.
- [57] Gupta, V., and Garg, R. 2009. “Probiotics.” *Indian Journal of Medical Microbiology* 27: 2015-31.
- [58] Huang, Y., and Adams, M. C. 2004. “In Vitro Assessment of the Upper Gastrointestinal Tolerance of Potential Probiotic Dairy Propionibacteria.” *International Journal of Food Microbiology* 91: 253-60.
- [59] Muller, C., Mazel, V., Dausset, C., Busignies, V., Bornes, S., Nivoliez, A., et al. 2014. “Study of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 Propertis after Compression and Proposition of a Model to Predict Tablet Stability.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 88: 787-94.
- [60] Senaka- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., and Baines, S. K. 2012. “In Vitro Analysis of Gastrointestinal Tolerance and Intestinal Cell Adhesion of Probiotics in Goat’s Milk Ice Cream and Yogurt.” *Food Research International* 49: 619-25.
- [61] Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y., and Rambaud, J. C. 1993. “Fate and Effects of Some Transiting Microorganisms in the Human Gastrointestinal Tract.” *World Review of Nutrition and Dietetics* 74: 1-21.
- [62] Marterau, P., and Shanahan, F. 2003. “Basic Aspects and Pharmacology of Probiotics: An Overview of Pharmacokinetics, Mechanisms of Action and Side-Effects.” *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17: 725-40.
- [63] Adams, C. A. 2010. “The Probiotic Paradox: Live and Dead Cells Are Biological Response Modifiers.” *Nutrition Research Reviews* 23: 37-46.
- [64] Villena, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., and Morales, M. E. 2015. “Development of Gastro-Resistant tablets for the Protection and Intestinal Delivery of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716.” *International Journal of Pharmaceutics* 487: 314-9.
- [65] Chaikham, P., Apichartsrangkoon, A., Jirattananangri, W., and Van de Wiele, T. 2012. “Influence of Encapsulated Probiotics Combined with Pressurized Longan Juice on Colon Microflora and Their Metabolic Activities on the Exposure to Simulated Dynamic Gastrointestinal Tract.” *Food Research International* 49: 133-42.





## **III.4. COMPRIMIDOS DE ADMINISTRACIÓN VAGINAL CON PROBIÓTICOS**

---



## **1. Formas farmacéuticas destinadas a la administración vaginal**

Los productos vaginales deben diseñarse de acuerdo a las necesidades femeninas. En los últimos años, ha surgido la necesidad de conocer los intereses y preferencias de las mujeres en cuanto a productos vaginales para garantizar la aceptabilidad del mismo y el cumplimiento terapéutico. La información de varias encuestas sugiere que una formulación vaginal debe poseer las siguientes características (Vermani & Garg; 2000):

- Sin efectos adversos durante el coito
- Inodoro e incoloro
- Posible aplicación varias horas antes del coito
- Sin fugas o sensación de plenitud e incomodidad
- Sin irritación, picazón, ardor o hinchazón
- Fácil de insertar y/o aplicar; preferiblemente sin depender de aplicador

Las formas farmacéuticas destinadas a la administración vaginal se clasifican en formas líquidas, semisólidas y sólidas. Durante su fabricación, envasado, almacenamiento y distribución se deben tomar medidas necesarias para garantizar su calidad microbiológica.

- Formas líquidas (soluciones, suspensiones y emulsiones vaginales)
- Formas semisólidas (geles, cremas, pomadas y espumas vaginales)
- Formas sólidas (óvulos, tampones, cápsulas y comprimidos vaginales)

Como se puede observar en el estudio realizado por nuestro grupo de investigación (Sánchez et al., 2015) (recogido en el Anexo I), los principales productos con microorganismos probióticos destinados a la administración vaginal disponibles en oficinas de farmacia son cápsulas, óvulos y tampones, todas ellas formas farmacéuticas

sólidas. La falta de formas farmacéuticas semisólidas como geles, cremas o pomadas que contengan probióticos, así como de formas farmacéuticas líquidas, viene determinada por la interacción negativa de los excipientes con las bacterias vehiculizadas, debido, generalmente, al elevado contenido hídrico que estas poseen y el efecto nefasto de la humedad sobre la viabilidad bacteriana. Un segundo problema asociado a la administración de estas formas farmacéuticas es el alto costo de envasado dado que estas deberían ir en aplicadores unidosis precargados para garantizar la ausencia de contaminación así como la protección y estabilidad de las bacterias frente a condiciones ambientales adversas como la humedad. El costo de estos aplicadores, incluso comprados en grandes cantidades, es relativamente alto (Garg et al., 2010).

De acuerdo con todo lo expuesto, y dado que las formas farmacéuticas sólidas son las más convenientes para la administración vaginal de probióticos, nos centraremos en su estudio.

## **1.1. Formas farmacéuticas sólidas de administración vaginal**

### **1.1.1 Óvulos vaginales**

Se trata de preparaciones sólidas unidosis. Son de formas variables, aunque generalmente se presentan en forma ovoide, presentando un volumen y una consistencia adecuados para la administración por vía vaginal. Contienen uno o más principios activos disueltos o dispersados en una base apropiada que puede fundirse a temperatura corporal o ser soluble o dispersable en los fluidos vaginales.

No son muy apreciados dado su gran tamaño y la producción de gran cantidad de líquido y fugas tras su administración.

### **1.1.2 Cápsulas vaginales**

Las cápsulas vaginales, también conocidas como óvulos encapsulados, son preparaciones sólidas unidosis. Generalmente son parecidas a las cápsulas gelatinosas blandas distinguiéndose de ellas principalmente en su forma y tamaño. En cuanto a la

forma, podemos encontrar formas variables, aunque principalmente son lisas, ovoides y con un aspecto uniforme en su exterior.

### **1.1.3 Tampones vaginales**

Son preparaciones unidosis, destinadas a ser introducidas en la vagina durante un período de tiempo limitado. Están compuestos por un material adecuado, como colágeno, celulosa o silicona, que se impregna con uno o más principios activos. Generalmente suelen liberar el contenido en principio activo al alcanzar la temperatura corporal.

El tiempo de permanencia en la vagina debe ser suficiente para asegurar que los microorganismos incluidos puedan colonizar la mucosa vaginal, lo que resulta un inconveniente. Además, de acuerdo con los productos disponibles en el mercado, deben administrarse al menos tres tampones al día lo que conlleva un mayor riesgo de incumplimiento terapéutico por parte del paciente.

### **1.1.4 Comprimidos vaginales**

Se incluyen en la categoría de comprimidos especiales ya que se administran por una vía distinta de la oral. Se pueden definir como preparaciones sólidas unidosis destinadas a disolverse y liberar el principio activo en la cavidad vaginal. Están ideados para ejercer bien una acción local sobre la mucosa, fundamentalmente en el tratamiento de infecciones con agentes probióticos, antibacterianos, antifúngicos, antisépticos o astringentes, o bien una acción sistémica, como en el caso de los esteroides. Presentan una serie de características:

- Son no recubiertos o con cubierta pelicular soluble o no soluble.
- Buena resistencia mecánica.
- Tamaño grande (600 mg-2 g) para advertir al paciente que su administración es por una vía diferente a la oral.
- Forma ovoide generalmente, aunque también puede ser esférica o alargada para facilitar su retención en la vagina.

- Bordes redondeados para favorecer su inserción en la cavidad vaginal.

Los comprimidos vaginales presentan numerosas ventajas, de ahí que sean más utilizados como forma vaginal que los óvulos:

- Producción a gran escala y de bajo costo.
- Envasado unidosis lo que facilita su portabilidad, dosificación exacta y almacenamiento.
- Favorecen la estabilidad de las bacterias en condiciones extremas de temperatura y humedad.
- Menos fugas y residuos vaginales.
- Mayor adhesión a la mucosa vaginal gracias al empleo de polímeros mucoadhesivos lo que facilita a las bacterias la colonización del epitelio vaginal.
- Pueden diseñarse para alcanzar una liberación controlada o modificada gracias al empleo de excipientes específicos.
- Su administración es cómoda e higiénica, no precisa de aplicadores.

A pesar de todas estas ventajas que presentan, los comprimidos no son la forma farmacéutica más extendida para la administración vaginal de probióticos (Sánchez et al., 2015). Esto puede ser debido a los diferentes retos que supone su formulación, entre ellos (Garg et al., 2010):

- Dificultad para garantizar la uniformidad del contenido, especialmente con dosis bajas de probiótico. Dado su gran peso ( $\leq 2$  g), garantizar la uniformidad del contenido cuando las dosis son bajas puede suponer un reto.
- Dificultades en la optimización de la formulación. Los comprimidos vaginales deberían desintegrarse rápidamente y formar dispersiones lisas, homogéneas, viscosas y bioadhesivas. Lograr estos objetivos puede ser difícil en comprimidos

que contienen cantidades relativamente grandes de excipientes ya que la cantidad de fluido vaginal disponible es limitada.

- Los comprimidos vaginales para uso humano son difíciles de aplicar en animales debido a su tamaño, esto perjudica el establecimiento de una correlación entre los estudios en animales y en humanos.

Su fabricación puede llevarse a cabo por cualquier técnica de compresión, no obstante, debemos tener presente algunas consideraciones en relación a su formulación. El diseño de la formulación tendrá, por tanto, un impacto en la biodisponibilidad del medicamento en términos de tiempo de disgregación del comprimido, dispersión y retención del contenido en la vagina. Deben usarse excipientes solubles con objeto de impedir que queden residuos en la mucosa vaginal. Algunas características de estos excipientes a resaltar son:

- **Diluyentes.** Se emplean azúcares, como la lactosa, la glucosa y la sacarosa. El primero es el más usado porque favorece la actuación de los lactobacilos que forman parte de la microbiota vaginal que transforman el glucógeno en ácido láctico, manteniendo un pH ácido en la mucosa que evita el desarrollo de otros microorganismos.
- **Disgregantes.** Son mezclas que provocan una ligera efervescencia que favorece la disgregación del comprimido en la pequeña cantidad de agua de la cavidad vaginal, además de aumentar la superficie de adsorción de las bacterias, al hacer que se disperse por todos los pliegues de la mucosa.
- **Humectantes.** Agentes tensioactivos no iónicos o anfóteros. Muchos de ellos son espumógenos, es decir, capaces de producir rápidamente espuma en la pequeña cantidad de agua de la mucosa vaginal.
- **Sustancias reguladoras del pH,** que debe mantenerse ácido. Para evitar la destrucción de la microbiota bacteriana.

- **Lubrificantes.** Polietilenglicoles sólidos o estearato de magnesio. Facilitan la fabricación e inserción de los mismos.

En relación a los controles de calidad realizados a comprimidos como forma farmacéutica, los comprimidos vaginales deben satisfacer el ensayo de disgregación mediante un método específico, descrito en la RFE, utilizando para ello el aparato de disgregación de supositorios y óvulos. A menos que estén destinados a una acción local prolongada, hay que examinar el estado de los comprimidos vaginales trascurridos 30 minutos de ensayo.

## **2. Diseño de un comprimido vaginal para la administración de bacterias probióticas**

Los sistemas convencionales para la administración vaginal de sustancias activas presentan algunas limitaciones como son un corto tiempo de residencia, fugas de residuos y expulsión de la cavidad, lo que causa confusión, molestias e inconvenientes que conducen al incumplimiento terapéutico del paciente y, por tanto, a la pérdida de eficacia terapéutica. Es por ello que la investigación en este campo se ha centrado en hallar nuevas estrategias orientadas a mejorar la administración y liberación de su contenido en la cavidad vaginal que aseguren potencia, eficacia y aceptabilidad. Un estudio realizado por Joglerkar y colaboradores (2006) para determinar la aceptabilidad de las diferentes formas farmacéuticas vaginales en las mujeres hindúes, muestra una mejor aceptación de los comprimidos vaginales, con una puntuación de 4.35/5, por lo que el 95 % de las mujeres informaron que el producto era fácil de usar y no afectaba el placer sexual.

Actualmente, ha aumentado el interés en dos tipos de comprimidos: por un lado, aquellos que presentan una rápida disgregación, diseñados para dispersarse a lo largo de la superficie de la mucosa vaginal y, por otro lado, comprimidos mucoadhesivos y de liberación controlada que pretenden liberar lentamente el contenido (Caramella et al., 2015).



Los comprimidos de disgregación rápida, además de diluyente, aglutinante, lubricante y excipientes tecnológicos usuales, también contienen un disgregante o mezcla efervescente. Estas mezclas efervescentes incluyen sustancias de carácter ácido y carbonatos o hidrogenocarbonatos que reaccionan rápidamente en presencia de agua desprendiéndose CO<sub>2</sub>. La retención de estos comprimidos en la vagina tras su disgregación puede aumentarse gracias al uso combinado de polímeros mucoadhesivos (Alam et al., 2007; Wang & Tang, 2008).

El interés en los comprimidos mucoadhesivos con liberación controlada está ligado a su mayor capacidad de retención en la vagina, así como una concentración de sustancia activa constante y prolongada en el lugar de aplicación. Todo ello permite reducir la dosis y la frecuencia de administración y, por tanto, aumentan la conformidad del paciente (Garg et al., 2007). Esta mucoadhesión es posible gracias al uso de polímeros cuyas cadenas penetran en la capa de moco, formándose enlaces polímero-mucina (principalmente enlaces de Van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas), y, además, permiten controlar la liberación de la sustancia activa. En general, estos polímeros presentan medio-alto peso molecular y grupos funcionales hidrofílicos. Entre los más utilizados en formulaciones vaginales se encuentran los derivados del ácido acrílico (poliacrilatos como carbomer o policarbophil), derivados de celulosa como HEC, HPC, HPMC y NaCMC, chitosan, ácido hialurónico y sus derivados, almidón, pectina, gomas naturales y alginato de sodio (Acarturk, 2009; Valenta, 2005).

Dado el gran auge de ambos tipos de comprimidos para la administración vaginal de sustancias activas junto con las numerosas ventajas que aportan los comprimidos como forma farmacéutica vaginal, en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el diseño, desarrollo y evaluación de comprimidos vaginales bicapa con *Lactobacillus fermentum* previamente microencapsulado, cuyos resultados se describen en el apartado III.5. Estos comprimidos están constituidos por una capa de disgregación rápida o efervescente, la cual liberará y dispersará el contenido probiótico por la cavidad vaginal en un tiempo inferior a 5 minutos, y una capa mucoadhesiva de liberación controlada gracias a la incorporación de materiales poliméricos. Dichos polímeros constituyen una matriz hidrofílica, la cual permitirá la liberación prolongada del contenido probiótico

favoreciendo, además, la adhesión del comprimido a la mucosa vaginal. Los polímeros seleccionados para su formulación han sido:

- **Carbopol® 934**

Polímero del ácido acrílico, también conocido como carbomer. Este polímero forma un hidrogel en contacto con fluidos acuosos y, además, presenta la ventaja adicional de ser ácido, permitiendo así la corrección y el mantenimiento del pH vaginal. Esto resulta útil como estrategia para evitar la proliferación de patógenos y promover la restauración de la microbiota vaginal. Gracias a su capacidad de formar hidrogeles, ha sido utilizado en formulaciones para hidratación vaginal orientadas a mujeres premenopáusicas que debido a una disminución de los niveles hormonales sufren sequedad y dolor vaginal (Valenta, 2005). Generalmente, dada su naturaleza iónica y su sensibilidad al pH del medio ( $\text{pH} < 6$  ó  $\text{pH} > 11$ ) se adiciona junto a otros polímeros, como chitosan, con objeto de formar complejos interpoliméricos que solventen este problema (Hyun Park et al., 2008).

- **Chitosan**

Es un copolímero policatiónico natural, obtenido a partir de la desacetilación parcial de quitina del exoesqueleto de crustáceos. Esta formado por unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina. Presenta propiedades muy valiosas como biomaterial puesto que es biocompatible, biodegradable y no tóxico. Se carga positivamente a pH ácido ( $\text{pH} < 6$ ), alcanzando su grado máximo de hinchamiento. Su capacidad de adhesión a la mucosa no solo deriva de su carácter catiónico, que permite la unión electrostática a mucinas cargadas negativamente debido a la presencia de residuos del ácido siálico, sino también a enlaces de hidrógeno (grupos OH y NH<sub>2</sub>) y enlaces hidrofóbicos (Sogias et al., 2008). Además, gracias a su atracción electrostática con polímeros de carga opuesta, por ejemplo, ácido algínico, carboximetilcelulosa sódica o Carbopol®, da lugar a la formación de complejos interpoliméricos, consiguiéndose una liberación prolongada durante mayor tiempo. Su inclusión en formulaciones vaginales antimicrobianas esta relacionada, además, con su actividad intrínseca antibacteriana, gracias a la interacción de los grupos

aminos protonados del polímero con las cargas negativas presentes en las paredes celulares bacterianas que dan lugar a cambios en la permeabilidad de membrana produciendo la fuga de constituyentes intracelulares (acción bactericida) (Tang et al., 2010; Liu et al., 2004) junto con la inhibición de la síntesis de ARNm y proteínas por la unión del quitosano al ADN (acción bacteriostática). Además, también inhibe el crecimiento de una gran variedad de hongos y levaduras, actuando por sí mismo contra algunos de los patógenos más comunes asociados a infecciones vaginales (Palmeira-de-Oliveira et al., 2010; Seyfarth et al., 2008).

- **Carboximetilcelulosa sódica**

La NaCMC es un derivado celulósico soluble en agua y biodegradable. Es el principal éter de celulosa producido industrialmente. Se trata de un polímero aniónico que destaca por sus excelentes propiedades mucoadhesivas. Forma soluciones viscosas estables en un pH comprendido entre 4-10, a pH < 4 el contraión  $\text{Na}^+$  será reemplazado por  $\text{H}^+$ , disminuyendo su solubilidad en agua, mientras que un pH > 10 disminuye la viscosidad debido a su degradación. Por sí mismo puede constituir una matriz hidrófila, sin embargo, su combinación con otros polímeros catiónicos, como ya ha sido mencionado, permite un mejor control en la liberación del contenido gracias a la formación de complejos electrolitos (Li et al, 2014).

Por otro lado, la capa de liberación rápida contiene una mezcla efervescente responsable de la disgregación inmediata y liberación de la carga probiótica. Esta mezcla efervescente está formada por un granulado obtenido por granulación húmeda, constituido por ácido adípico, lactosa y almidón de maíz, mezclado posteriormente con bicarbonato sódico y ácido ascórbico.

- **Ácido adípico, ácido ascórbico y bicarbonato sódico**

Dan lugar a la reacción de efervescencia en medio acuoso responsable de la disgregación de esta primera capa del comprimido mediante la producción de  $\text{CO}_2$ . El ácido ascórbico, además, ha demostrado ser beneficioso en el

tratamiento y prevención de infecciones vaginales (Petersen et al., 2011; Krasnopolsky et al., 2013). Esto se debe a que el tratamiento con vitamina C (250 mg/día) causa una disminución importante del pH vaginal, incluso una vez terminada la terapia, junto con un aumento de lactobacilos vaginales. Así, los resultados obtenidos en el tratamiento de vaginosis bacteriana con vitamina C fueron comparables y no inferiores a los obtenidos con metronidazol (Abbaspoor et al, 2010).

- **Almidón de maíz**

Se incorpora al granulado como aglutinante favoreciendo la adhesión y cohesión entre las partículas que lo constituyen. También actúa como disgregante, aumentando su volumen en contacto con fluidos acuosos, favoreciendo la separación de las partículas que constituyen el comprimido, incrementando la superficie específica y, en consecuencia, la velocidad de disolución.

- **Lactosa**

Incorporado como diluyente. También ha demostrado favorecer la restauración de la microbiota *in vitro* e *in vivo*, promoviendo el crecimiento de los lactobacilos vaginales (Palmeira-de-Oliveira et al.,2015).

**III. 5. A novel double-layer mucoadhesive tablet  
containing probiotic strain for vaginal  
administration**

---

**Un novedoso comprimido bicapa mucoadhesivo de administración  
vaginal con una cepa probiótica**



**A novel double-layer mucoadhesive tablet containing probiotic strain for vaginal administration.**

María Teresa Sánchez, María Adolfina Ruiz, Herminia Castán, María Encarnación Morales. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 112: 63-70. Factor de impacto (JCR)-Percentil (JCR): 3.756-79.183.

La candidiasis vulvovaginal causada por *Candida* spp. es la infección vaginal más prevalente en Europa y la segunda en EE.UU, por lo que se ha convertido en una importante preocupación femenina. Las bacterias probióticas han sido propuestas como un tratamiento alternativo con el objetivo de evitar los efectos adversos asociados a las terapias convencionales, incluidos los antibióticos y otros fármacos agresivos para la mucosa vaginal y la microbiota. El propósito de este trabajo fue diseñar y desarrollar un nuevo comprimido vaginal con *Lactobacillus* spp. como tratamiento contra infecciones vulvovaginales. Se propuso un total de 21 comprimidos vaginales de dos capas, que contenían diferentes proporciones poliméricas. Sin embargo, la formulación F4 (20 mg de NaCMC; 50 mg de Carbopol® 934; 20 mg de chitosan) se seleccionó como óptima de acuerdo con su capacidad de hinchamiento e índice de disolución/erosión. Los comprimidos F4 mostraron propiedades tecnológicas adecuadas para la administración vaginal, así como tiempo ( $24.36 \pm 0.88$  horas) y fuerza (0.0941 N) de mucoadhesión. El ensayo de disgregación en fluido vaginal simulado (SVF, pH 5.5) mostró que la capa efervescente desaparece en  $27.48 \pm 0.05$  segundos mientras que la capa matricial se gelificó por completo en 1 hora. Se lograron dos perfiles de liberación diferentes; por una parte, una liberación rápida debido a la disolución de la capa efervescente y la superficie de la capa matricial ( $1.10 \times 10^8$  CFU/g), por otro lado, una liberación prolongada de las bacterias restantes hasta las 24 horas ( $5.48 \times 10^7$  CFU/g). Para el estudio de estabilidad y almacenamiento, se encontró que la viabilidad de las bacterias fue constante hasta un total de 90 días en ambos modos de almacenamiento, en un desecador y a temperatura ambiente, con una dosis final de  $10^8$  UFC/g que se consideró apropiada para el tratamiento vaginal ( $10^8$ -  $10^{10}$  CFU/g).







# A novel double-layer mucoadhesive tablet containing probiotic strain for vaginal administration: Design, development and technological evaluation

María Teresa Sánchez, María Adolfinia Ruiz, Herminia Castán, María Encarnación Morales\*

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Vaginal tablet  
Double-layer tablet  
Mucoadhesion  
*Lactobacillus* spp.  
Vaginal infections treatment

## ABSTRACT

Vulvovaginal candidosis caused by *Candida* spp. is the most prevalent vaginal infection in Europe and the second one in EE.UU, so it has become a major female concern. Probiotics bacteria have been proposed as an alternative treatment with the aim of avoiding the adverse effects associated with conventional therapies including antibiotics and other aggressive drugs for the vaginal mucosa and microbiota. The purpose of this work was to design and develop a novel vaginal tablet that contained *Lactobacillus* spp. bacteria as a treatment against vulvovaginal infections. A total of 21 two-layers vaginal tablets, which contained different polymeric ratios, were proposed. However, formulation F4 (20 mg Na-CMC; 50 mg Carbopol® 934; 20 mg chitosan) was selected as optimal according to its swelling index and dissolution/erosion capability. F4 tablets showed suitable technological properties for vaginal administration as well as mucoadhesion time ( $24.36 \pm 0.88$  h) and force (0.0941 N). Disintegration assay in simulated vaginal fluid (SVF, pH 5.5) showed that effervescent layer disappeared in  $27.48 \pm 0.05$  s whilst matrix layer was totally gelled in 1 h. Two different release profiles were achieved; on the one hand, a promptly release due to the dissolution of both effervescent layer and matrix layer's surface ( $1.10 \times 10^8$  CFU/g), on the second hand, a prolonged released of the remaining bacteria until 24 h ( $5.48 \times 10^7$  CFU/g). For stability and storage study, it was found that bacteria viability was constant until 90 days in both ways of storage, in a desiccator and at room temperature, with a final dosage of  $10^8$  CFU/g which was considered appropriate for vaginal therapy ( $10^8$ – $10^{10}$  CFU/g).

## 1. Introduction

Vulvovaginal infections are so prevalent that they represent about 20% of women reason to seek medical assistance and gynecological consultation according to the Spanish Society of Obstetrics and Gynecology (Cancelo et al., 2013). They are a consequence of an imbalance in the vaginal ecosystem, caused by different exogenous or endogenous factors that affect the indigenous microbiota and produce a decrease in protective lactobacilli. Lactobacilli are the most numerous dominant microorganism, at  $10^7$  to  $10^8$  CFU of vaginal fluid in healthy premenopausal women, they are called Döderlein's bacilli or complex (Döderlein, 1982) They have the function of maintaining an environment that limits the growth of pathogenic microorganisms by the production of acids, hydrogen peroxide, bacteriocins and modulating local immunological response (IL-8, IL-10). The commonest vaginal infections are caused by bacteria, typically *Gardnerella vaginalis* (bacterial vaginosis –BV–), or by fungi such as *Candida* spp. (vulvovaginal candidosis –VVC–). About 75% of women experience an episode of vulvovaginal candidosis once in their lifetime and a 40–50% of them

usually suffer a second episode. It is the most prevalent vaginal infection in Europe and the second one in EE.UU. Although they are not associated with high mortality, their symptoms are related with anxiety and depressive mood, even affect to sexual relationships and quality of life (Palmeira-de-Oliveira et al., 2015). In accordance with the guidelines of the Spanish Society of Obstetrics and Gynecology and the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG, 1996) the usual therapy for BV is based on oral or intravaginal metronidazole or clindamycin whilst VVC is commonly treated with topical and systemic azoles or nystatin. Conventional therapies can produce adverse effects, emergence of drug-resistant strains and recurrence of symptoms. To minimize these undesirable effects it is very important try to develop different alternative treatments. With this aim, the use of specific probiotic products containing lactobacilli is the first choice to restore the physiological balance of vaginal ecosystem.

Probiotic bacteria are defined 'live microorganisms which, administered in adequate amounts, confer a beneficial physiological effect on the host' (FAO/WHO, 2001). Numerous authors have previously reported the beneficial effects that several probiotic lactobacilli strains

\* Corresponding author at: Department of Technology and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Campus de Cartuja s/n, University of Granada, Granada 18071, Spain.  
E-mail address: [maen@ugr.es](mailto:maen@ugr.es) (M.E. Morales).

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.006>

Received 28 July 2017; Received in revised form 20 October 2017; Accepted 6 November 2017

Available online 10 November 2017

0928-0987/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

have shown on BV and VVC (Abad and Saffdar, 2009; Barrons and Tassone, 2008; Ehrström et al., 2010; Falagas et al., 2006; Kovachev and Vatcheva-Dobrevska, 2015; Petricevic et al., 2008; Pirota et al., 2004). Up to date, probiotic formulations have been tested orally and locally, however the intravaginal route so far appears to be the first choice for probiotic administration. Some of its advantages are: a reduction in the severity of gastrointestinal enzymatic and acid effects, it overcomes the pain and tissue damage by other parenteral routes and it offers the possibility of self-insertion and removal of the dosage form (Vermani and Garg, 2000). These advantages allow a lower dosage, a less frequent administration and a high absorption of the bacteria not affected by gastrointestinal drawbacks. The dosage form and strategy adopted to deliver probiotic to the vaginal environment represent a detrimental point. The main technological challenge is to maintain the viability of lactobacilli until the end of their shelf life since probiotic bacteria should be delivered on the target side in a viable form. It is well known that moisture has a negative effect on bacteria survival; so vaginal probiotics have been traditionally commercialized in form of tablets, capsules, powders and suppositories/pessaries because of their low moisture contents (Nader-Macias et al., 2008; Pande et al., 2012). Tablets are comparatively more advantageous than other dosage forms: precise dosing, ease of storage, handling and administration as well as low costs thanks to large-scale production are some of their advantages. Furthermore, tablets can improve stability of bacteria at extremes of temperature and humidity (Garga et al., 2010). An assay carried out in India to study the acceptability of different vaginal formulations, tablets acceptability score was 4.35 out of 5, thus 95% of the women reported that the product was easy to use and did not affect sexual pleasure (Joglekar et al., 2006).

Currently, two categories of tablets for vaginal application are described in literature: fast disintegrating tablets and controlled release systems.

These concepts of drug delivery systems can be used in conjunction to design tablets which could both be dispersed rapidly and have a longer residence time in the vaginal cavity. On the one hand, disintegrating tablets usually contain an effervescent mixture, which allow getting dispersion or a gel in a quite short of time. On the other hand, controlled release tablets or matrix tablets formulation includes retarding polymers, which are able to hydrate and gel very slowly leading to a prolonged release of bacteria. It must be taken in account mucoadhesive properties of these polymeric excipients in order to get longer residence times. With this purpose, polyacrylic acid derivatives (carbomer), cellulose derivatives and chitosan are one of the most common retarding and mucoadhesive polymers preferred (Valenta, 2005). In addition, it has been reported an intrinsic antifungal and antibacterial activity of chitosan (Kim et al., 2003; Palmeira-de-Oliveira et al., 2010) as well as the acid-buffering capacity of Carbopol® that allow the correction and maintenance of the vaginal pH in BV (Donders et al., 2014; Wilson, 2004). Similar beneficial effects have also been reported on ascorbic acid (Krasnopolsky et al., 2013; Petersen and Magnani, 2004; Zodzika et al., 2013) and lactose (Reid et al., 1998), which have showed to be an effective treatment and prevention of recurrences in vaginal infections. Thus, different excipient could be added to vaginal dosage forms in order to enhance lactobacilli beneficial properties.

The objective of this work was to develop a vaginal tablet that contains probiotic lactobacilli bacteria previously microencapsulated and freeze-dried. As far as we are aware of there are no studies available on bi-layered vaginal tablets with microencapsulated probiotic bacteria obtained via emulsification/internal gelation. This tablet was divided into two layers: a fast- and slow-release layers. Both of them contain the same number of lactobacilli bacteria. The purpose of the first layer was to disperse the bacteria before 5 min after its contacts with vagina fluid whilst the second one should release lactobacilli by matrix diffusion as long as possible. Technological properties, vaginal behaviour as well as storage viability of tablets have been tested.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

*Lactobacillus* cells were kindly provided by Biotmicrogen S.L. (Granada). Lactose monohydrate, maize starch, ascorbic acid, stearic acid, sodiumcarboxymethyl-cellulose (Na-CMC 1500–4500), sodium citrate dehydrate, glucose anhydrous, talc, magnesium stearate, sodium chloride (NaCl) and urea were purchased from Guinama S.L.U. (Valencia, Spain). Adipic acid, sodium bicarbonate, Chitosan medium molecular weight, acetic acid, Carbopol® 934 and Bovine Serum Albumin were supplied by Sigma-Aldrich Co. (MO, USA). Potassium hydroxide (KOH), calcium hydroxide Ca (OH)<sub>2</sub>, glycerol were obtained from Fagron Ibérica S.A. (Barcelona, Spain). Lactic acid was purchased from Roig Farma S. A. (Terrasa, Spain).

### 2.2. Microencapsulation and Freeze-Dry Methods

*Lactobacillus* spp. was encapsulated into alginate microparticles by a modified emulsification/internal gelation technique, which was previously reported by our research group (Sánchez et al., 2017). Microparticles were then freeze-dried to assure bacteria survival during its storage.

### 2.3. Tablets Design and Preparation

The formulation designed for a fast-release of the bacteria contains a granulated base and an effervescent mixture to accelerate layer disintegration. The granulated base was prepared by mixing 74% (w/w) lactose, 11% (w/w) adipic acid and 15% (w/w) total maize starch. Previously, 2% (w/w) of the maize starch was taken apart to prepare a 10% (m/v) paste that was used to wet the granulate mixture. This wetted mass was forced through 710 µm mesh screen. Granules were dried in an oven at 37 °C until a constant weight. Once granules have dried, they were forced through 1000 µm mesh screen to make any agglomeration disappear. Sodium bicarbonate was added to enhance the effervescent quality.

Slow-release formulation contains retarding polymers, which assure a controlled bacteria release.

Tablets were prepared by using a manual hydraulic press (SPECAC SC-15011, Spain) with a 13 mm diameter die on a single-punch and a compression force of 1 tons for 30 s.

Single-layer tablets were designed for slow- and fast-release formulation to study them on separately. Then a double-layer tablet was produced as final dosage form by layering in sequence both formulations (slow-, fast-release) in press matrix before compression.

### 2.4. Technological Physical Characterization

Vaginal tablets were studied technologically in terms of diameter, thickness, mass uniformity and crushing strength.

Mass uniformity and crushing strength were analysed according to United States Pharmacopeia (USP 29). Mass uniformity was evaluated using a precision balance (A&D Europe GmbH, Germany), data is reported as an average of 20 measurements ± SD. Crushing strength was measured using a hardness tester (PharmTest, Germany), data shown is an average of 10 measurements ± SD.

### 2.5. Swelling Study

In order to evaluate swelling capacity, expressed as hydration percentage, single-layer tablets constituted by matrix polymers were weighted ( $W_1$ ) and placed into a pre-weighed stainless steel basket with 200-mesh aperture. Then, mesh containing each tablet was submerged into 25 mL simulated vaginal fluid (SVF) at 37 ± 0.1 °C in a glass beaker allowing tablets to swell. Baskets were removed from beakers

and reweighed at predetermined times ( $W_2$ ) after removing the excess water with a filter paper.

The experiment was carried out in triplicate and the final data for swelling index (%) and matrix dissolution (DS) were calculated as follows:

$$\text{Swelling (\%)} = (W_2 - W_1) \times 100 / W_2.$$

$DS = (W_1 - W_3) \times 100 / W_1$ , where,  $W_3$  is the swollen tablet weighed after drying at 60° C for 24 h in an oven and then 24 h in a desiccator.

Simulated vaginal fluid was prepared as described Owen and Katz (Owen and Katz, 1999): 3.5 g/L NaCl; 1.4 g/L KOH; 0.2 g/L  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ; 2.0 g/L lactic acid; 1.0 g/L acetic acid; 0.2 g/L glycerol; 0.4 g/L urea; 5.0 g/L glucose; 0.02 g/L bovine serum albumin. The mixture was adjusted to pH 5.5.

## 2.6. In vitro Mucoadhesion Study: Mucoadhesion Force and Residence Time

### 2.6.1. In vitro Mucoadhesion Force

Porcine vaginal tissues were obtained from a local slaughterhouse immediately after sacrifice of animals. They were cleaned with phosphate buffer solution (PBS, pH 6.8), taking care to maintain integrity of mucosa, and frozen at -20° C until their use.

Tablets' mucoadhesive strength (force required for tablets detachment from pig vaginal mucosa) was measured by using a dynamometer (Perioli and Pagano, 2013).

Vaginal tissues were thawed, washed with PBS and cut into pieces (2 cm × 2 cm). Vagina pieces were fixed with cyanoacrylate glue to the internal side of a beaker which contained SVF pH 5.5 to keep mucosal membrane moist. Tablets were attached on a support, connected to the dynamometer, by the use of cyanoacrylate glue. Then, the free side of the tablets were wetted with SVF and brought into contact by their matrix layer with the vaginal mucosa surface by applying a fingertip force for 20 s. A time of 2 min was required to allow formation of adhesive bond. Dynamometer measurements showed the bioadhesive strength of vaginal tablets in grams (g). Bioadhesive strength, force of adhesion (N) as well as the averages of three measurements was calculated.

$$\text{Adhesion Force (N)} = \text{bioadhesive strength (g)} \times 0.0098.$$

### 2.6.2. Residence Time

In vitro residence time was determined by using a locally modified USP 29 disintegration apparatus. Disintegration medium was 600 ml of SVF pH 5.5 at 37 ± 0.1 °C. Pig vagina was tied vertically to the disintegration apparatus. Tablets were wetted with SVF and brought in contact with vagina mucosa. The disintegration apparatus was started allowing mucosa moving down and up, so tablets were completely immersed in SVF and then were out respectively (Fig. 4). Tablets behaviour was monitored until their complete detachment (Biswal et al., 2014).

## 2.7. Vaginal Dosage Forms Disintegration

Disintegration assay was carried out according to Real Farmacopea Española (RFE) (5<sup>a</sup> ed.) in a properly modified suppositories and ovules disintegration apparatus (Pharmatest, Germany). Double-layer tablets were studied in order to determined time of effervescency and time required for tablets disintegration.

The experiment consisted of placing tablets on a perforated plate that allowed their contact with the medium at 37 ± 0.1 °C and covered them in the top by a glass plate. The tablets will be found inside a "chamber" that would keep the moisture.

## 2.8. In vitro Lactobacillus Release Study

The release of *Lactobacillus* bacteria from vaginal tablet was studied

using the USP 29 dissolution apparatus II with a paddle speed of 100 rpm. Dissolution medium consisted of 600 ml SVF (pH 5.5) at 37 ± 0.1 °C. *Lactobacillus* cells released along 8 h was determined by microbiological cultures in MRS Agar plates at established times (2 h, 4 h, 6 h and 8 h). Bacterial colonies were counted and converted to log CFU (colony forming units). This plating procedure was carried out in triplicates.

## 2.9. Storage and Viability Assay

Probiotic vaginal tablets were stored both in hermetic containers and in a desiccator at room temperature (RT) for 90 days. Silica gel was used as drying agent to preserve bacteria from humidity. Viability of cells inside tablets was evaluated along that period of time by microbiological cultures.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Tablets Pharmaceutical Formulation

With the aim of incorporating lyophilized microparticles into vaginal solid dosage forms, single- and double-layer tablets were formulated. The composition of fast- and slow-release layer of vaginal tablets is set forth in Table 1.

As we can see in Table 1, we studied 4 formulations of slow-release layer which were selected from a total of 21 formulations (data not shown) based on technological properties required for vaginal administration. It contains the mucoadhesive polymers (chitosan, Carbopol® 934, Na-CMC) in different proportions. Furthermore, chitosan had another important role in formulation due to its intrinsic antifungal and antibacterial activity against some of the most prevalent vaginal pathogens as *Candida* spp. (Rabea et al., 2003; Seyfarth et al., 2008). Along with chitosan, Vitamin C (ascorbic acid) also plays an important role since an amount of 250 mg of ascorbic acid contained in that formulation, is related to a reduction of pathogens bacteria and an increase of *Lactobacillus* cells (Petersen and Magnani, 2004). Other substances as lactose could be defined as prebiotics since it has the ability to promote growth of protective *Lactobacillus* microorganism (Reid et al., 1998).

Fast-release layer composition was the same for each formulations studied. Double-layer tablets were obtained for formulations 1 to 4, each one with a final weight of 1000 mg.

### 3.2. Swelling study

Because of the presence of swellable bioadhesive polymers in formulations, it was necessary to perform hydration studies in order to know tablets swelling capability, which is directly involved in mucoadhesion mechanism. Result for water-absorbing capacity of each formulation with the time is showed in Fig. 1. Besides Fig. 2 shown DS % tablets' matrix dissolution.

Swelling capacity of tablets and matrix dissolution made easy to select the formulation that presents an optimum technological behaviour for a vaginal administration. As selection criteria it was established that an ideal formulation should not lead to the detachment of small fragments of tablets whilst it should form an aqueous gel, which would have to disappear over time. Furthermore, its swelling capacity should be adequate to a comfortable stay in the vaginal cavity and to allow its mucoadhesion. It is necessary to mention here that once the optimum hydration point has been reached, an overhydrating leads to a decrease in the adhesion force due to disentanglement at the polymer/tissue interface.

In this assay it became apparent how chitosan/Carbopol® ratio is related to tablets' swelling property leading to the formation of a spongy matrix or a fluid gel. F1 and F2 with chitosan/Carbopol® ratio of 1/1 and 1/1.6 respectively showed an increase in volume as the

**Table 1**  
Tablet formulation (1–4) based on each slow- and fast-release layer composition.

| Slow- release layer                                 | Formulation (mg) |     |     |     |
|---|------------------|-----|-----|-----|
|   | 1                | 2   | 3   | 4   |
| Lyophilized <i>Lactobacillus spp</i> microparticles | 22               | 22  | 22  | 22  |
| Ascorbic acid                                       | 125              | 125 | 125 | 125 |
| Lactose   | 255              | 255 | 255 | 255 |
| Na- CMC   | 30               | 25  | 40  | 20  |
| Carbopol® 934                                       | 30               | 40  | 40  | 50  |
| Chitosan  | 30               | 25  | 10  | 20  |
| Talc  | 12               | 12  | 12  | 12  |
| Magnesium stearate                                  | 12               | 12  | 12  | 12  |
| Fast- release layer                                 | 1                | 2   | 3   | 4   |
| Lyophilized <i>Lactobacillus spp</i> microparticles | 22               | 22  | 22  | 22  |
| Granulated base                                     | 300              | 300 | 300 | 300 |
| Sodium bicarbonate                                  | 30               | 30  | 30  | 30  |
| Ascorbic acid                                       | 125              | 125 | 125 | 125 |
| Stearic acid  | 2                | 2   | 2   | 2   |
| Magnesium stearate                                  | 5                | 5   | 5   | 5   |
| <b>Weight of double- layer tablet</b>               | 1000             |     |     |     |

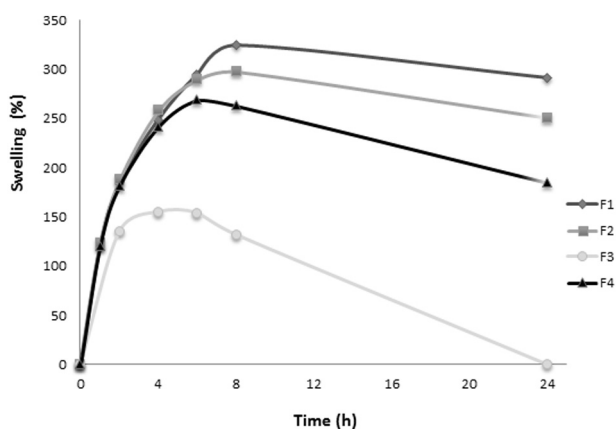


Fig. 1. Swelling index (%) of Formulations F1 to F4 (SVF, 37 °C, 24 h).

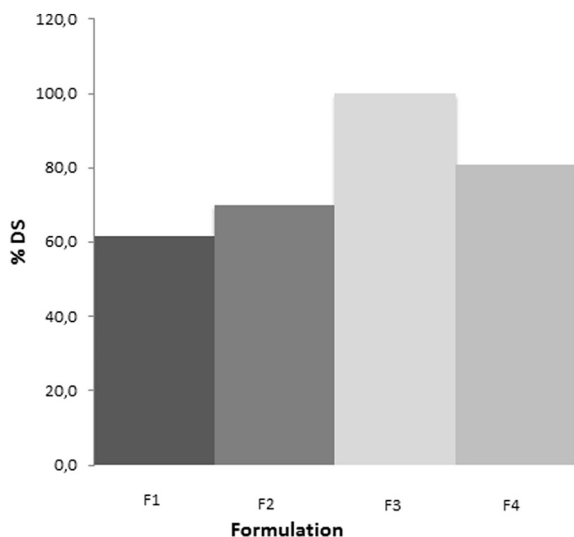


Fig. 2. Matrix dissolution/erosion (%) of Formulations F1 to F4.

hydration increased in the first 8 h of the assay, reaching there the maximum swelling and remaining until 24 h. Similar results were founded by Rossi et al. (2003), who reported that these ratios close to the chitosan/Carbopol® interaction product stoichiometry would present poor solubility properties. Furthermore, it is important to highlight the role of Carbopol® due to its high sensibility to the pH of the medium. According to other authors (Perioli et al., 2011), it was recognized that tablets hydration and erosion ability was also related and proportionally to Carbopol® content. So, as the amount of Carbopol® increased from F1 to F4, tablets hydration took place faster (Fig. 3) consequently tablets cannot keep further water and easily loses fragments because of hydrodynamic pressure effect exerted on the polymer network by water. Taking into account the selection requirements, F3 was discarded because its high rate of dissolution/erosion (Fig. 2) which was not enough to guarantee its mucoadhesion for an extended time. On the contrary, F1 and F2 were rejected because of their large increase in volume and space required. All in all, F4 was selected as ideal to following studies.

### 3.3. Technological Physical Characterization

Tablets F4 were technologically evaluated for diameter, thickness, mass uniformity and crushing strength. Results are given in Table 2.

In order to promote patient compliance, diameter and thickness of vaginal tablets were taken in special care and measured. Results showed in Table 2 allowed to hypothesize that this formulation could be easily inserted into the vagina without the need for an additional applicator, which facilitates patient. Furthermore, it would not cause pressure on vaginal walls or discomfort to the patient since vagina presents approximately 7–10 cm in length and 4 cm in width.

Tablets were submitted to hardness test because taking in account the application site, the formulation must show compactness and hardness to resist mechanical stress. As final result tablets had a hardness of  $23.3 \text{ N} \pm 4.42$ , which allowed them a high resistance during their handling throughout this research work. According to USP29 mass uniformity test, 20 tablets were weighted and mean were calculated  $0.99 \pm 0.01 \text{ g}$ ; any tablet weighted showed a deviation greater than 5% of the mean. Therefore, we could affirm that our selected formulation meets all the technological requirements for vaginal tablets.





|                       | F1  | F2  | F3   | F4  |
|-----------------------|---|---|--|---|
| <b>Chitosan (mg)</b>  | 30  | 25  | 10   | 20  |
| <b>Carbopol® (mg)</b> | 30  | 40  | 40   | 50  |
| <b>Matrix/Gel</b>     |  |  |  |  |

Fig. 3. Influence of chitosan and Carbopol® on tablets' behaviour. Images taken at 8 h of swelling study.

Table 2  
Tablets technological evaluation.

|    | Diameter (mm)<br><i>n</i> = 10 | Thickness (mm)<br><i>n</i> = 10 | Weight variation<br>(g) <i>n</i> = 20 | Crushing Strength<br>force (Newton, N)<br><i>n</i> = 10 |
|----|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|
| F4 | 13.10 ± 0.06                   | 5.94 ± 0.02                     | 0.99 ± 0.01                           | 23.3 ± 4.42   |

Values are expressed as mean ± SD.

### 3.4. Mucoadhesion Study: Mucoadhesion Force and Residence Time

Tablets' mucoadhesion is a very important aspect for maintaining high *Lactobacillus* levels at the site of administration and prevents from formulation expulsion.

Mucoadhesion force test was performed on triplicate and three tablets randomly selected were submitted to study each time, so a total of nine tablets were studied. Results of mucoadhesion strength and force of adhesion are expressed as the mean of three tablets measurements for each test realized (Table 3). In order to check whether the adhesion force achieved ensured the permanence of tablets inside the vagina until the complete release of the probiotic load, time of mucoadhesion was also studied; the assay was carried out with three different tablets and results were expressed as hours of adhesion (*h*) for each tablet individually and as mean of the three measurement (Table 3). Fig. 4 shows a schematic representation of the assay developed.

As can be seen in Table 3, similar results were obtained in the adhesion force test for each tablet studied. The second tablet tested showed a slightly lower adhesion force, this fact could be related to the state of the vaginal mucosa used since, in this case, it presented a more uniform and smooth surface. These results obtained did not differ much from those reported by Biswal et al. (2014) with a maximum of 0.0754 N.

With regard to the adhesion time assay, a mean of 24.36 ± 0.88 h was achieved. This result suggested that this dosage forms could be administrated once daily, it supposed an advantage and therapeutic compliance by patients which was our main goal.

F4 tablets included a high Carbopol® 934 content and it is well known that this polymer has good mucoadhesion properties (Baloglu et al., 2003; Valenta, 2005; Wang and Tang, 2008). Its presence in

Table 3  
Mucoadhesion strength, force and time.

| Test number | Mucoadhesion strength (g)* | Force of adhesion (N) | Mucoadhesion time (h) | Mucoadhesion time (h)* |
|-------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 1           | 9.60 ± 0.12                | 0.0941                | 23.20                 | 24.36 ± 0.88           |
| 2           | 7.80 ± 0.23                | 0.0764                | 24.36                 |                        |
| 3           | 9.60 ± 0.31                | 0.0941                | 24.92                 |                        |

\* (*n* = 3; values are expressed as mean ± SD).

formulation provided higher bioadhesive strength. This may be due to fact that carboxylic groups on surface of Carbopol® 934 could lead to form hydrogen bonds with mucin chains. Even there are some authors like Perioli et al. (2011) came to affirm that Carbopol®, included together with cellulose derivatives was the main responsible for mucosa adhesion. By the way, it has been reported that those formulation containing Na-CMC as a secondary polymer increased force of mucoadhesion. This could be attributed to the hydrophilic character of cellulose derivatives which favors water penetration into matrix promoting the relaxation of Carbopol® chains and increasing the availability of ionizable functional groups for mucoadhesion (Iman and Nidhal, 2014). Moreover, chitosan has also showed a surprisingly strong interaction with mucus glycoprotein or mucosal surface proportional to its concentration in formulation. Even, Rossi et al. (2003) demonstrated the importance of avoiding a chitosan/Carbopol® ratio close to 1/1 since this supposes the complete neutralization of charges involved in mucoadhesion.

It is important taking on account the negative effect that effervescence could have on mucoadhesion. The influence of effervescent on adhesion has been previously reported by different authors who related the appearance of tiny bubbles during the effervescence with a decrease of the adhesion force (Wang and Tang, 2008). This negative effect was accentuated as the effervescent mixture content increased.

So, we performed a previous study in order to select that amount of optimum effervescent mixture included in the fast-release layer of the tablet (data not shown) that would allow the dissolution of this layer before 5 min without affecting tablets' mucoadhesion properties.

All in all, we could affirm that the obtained adhesion force was optimal to ensure the permanence of the tablets inside the vagina until the total release of the probiotic load, mainly thanks to the contribution of each of the polymers included in F4.

### 3.5. Disintegration

Double-layer tablets of F4 were submitted to disintegration assay, results are shown in Fig. 5. As expected, the disintegration time of the fast-release layer was less than 5 min; exactly it was 27.48 ± 0.05 s (s).

After 30 min, it was possible to see the formation of a gel on the surface of the matrix tablets. It was possible to notified two different parts in these tablets: an external gelled layer and a non-hydrated inner zone containing polymers in a glassy state. When matrix tablets were placed in contact with the medium, it was created a diffusion/erosion front that made possible the release of the lyophilized bacteria to the medium.

As the test progressed, we could observe how this compact gelled layer was dissolved gradually in medium without evident fragment loss.

Finally, after 1 h, medium penetration was evident. As can be seen in Fig. 5D, tablets were pierced with a punch in the central zone in order to verify that there was no inner core and the whole tablets were



Fig. 4. Experimental device used to evaluate residence time (600 mL SVF pH 5.5 at  $37 \pm 0.1$  °C).

in a gelled state. At this point, the tablets were completely gelled and had lost their original shape.

### 3.6. *In vitro* Lactobacillus Release Study

The release of *Lactobacillus* cells from vaginal tablet was described as a function of time (Fig. 6). Viability of initial tablets was  $1.65 \times 10^8$  CFU/g considering *Lactobacillus* bacteria included in both tablets' layers. Analysing results obtained, at 2 h in SVF it had been released a total amount of  $1.10 \times 10^8$  CFU/g. This was a result of the total release of probiotic bacteria contained in fast-release layer, which disintegrated in few seconds as we have seen in disintegration test, and a large amount of probiotic content of the slow-release layer. It still remained in tablets approximately  $5.48 \times 10^7$  CFU/g, which would be released slowly in small amounts. At 8 h, it had been released  $1.49 \times 10^8$  CFU/g. The release of these bacteria would continue progressively until 24 h, when we found residues of a gel completely depleted. Analysing results obtained, we could verify a prompt release at 2 h and then a sustained release until 24 h reaching our proposed objectives. Borges et al. (2013) reported similar results for vaginal tablets with *Pediococcus pentosaceus* SB83, with a maximum release of  $10^8$  CFU/g that occurred in the early hour of contact with SVF.

Bi-layered tablets without probiotic bacteria were used as negative control in order to discard bacterial growth due to contamination of the medium. Furthermore, as positive control, freeze-dried bacteria were studied, showing no viability after the first hour in SVF (data not shown). This result allowed us to corroborate the protection granted by the designed tablet.

Although Carbopol® has many advantages as good mucoadhesion properties and high gelling ability; it has a disadvantage due to its high sensibility to the pH of the medium as it has been announced above. This fact supposed a difficulty to control *Lactobacillus* bacteria release and to assure an extended-release from tablets and was taken into account to design and select the formulations under study, so we considered the formation of an interpolymer complex (IPC) formed by the interaction of Carbopol® and chitosan. This IPC solved the problem of the pH dependency of Carbopol® because of its carboxyl group are complexed with protonated amine group of chitosan, consequently there is a reduction on pH-dependent drug release and it let us to get this controlled release.

Even, it should be taken into account that this bioadhesive formulation proposed in our research work could be used without a therapeutic agent to treatment dry vagina thanks to its moisturizing properties.

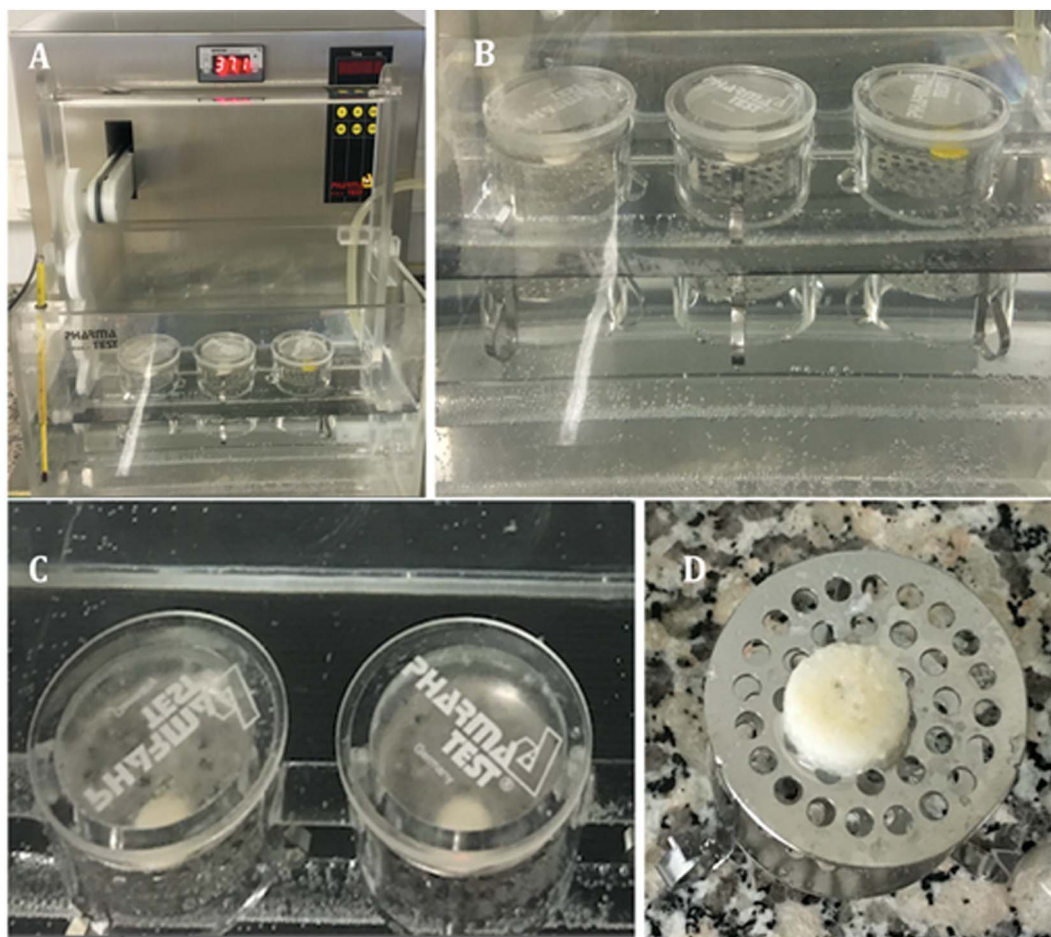


Fig. 5. Experimental device used to evaluate tablets' disintegration. (A) Suppositories and ovules disintegration apparatus. (B) Three tablets submitted to test inside each "chamber". (C) Glass plates that covered each tablet and prevented from medium evaporation. (D) Tablet at the end of the assay constituted by a soft matrix with marks on its surface of having been pierced by punch.

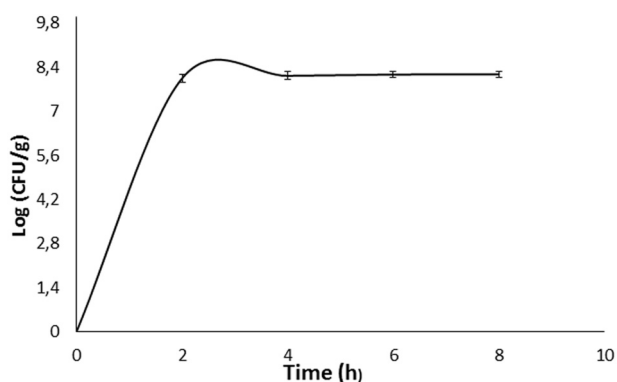


Fig. 6. Release profile of *Lactobacillus* bacteria from vaginal tablets tested in SVF pH 5.5 at  $37 \pm 0.1$  °C for 8 h ( $n = 3$ , all points are expressed as mean  $\pm$  SD).

### 3.7. Storage and Viability Assay

The evolution of *Lactobacillus* viable cells in vaginal tablets throughout 90 days at RT and in a desiccator is displayed in Fig. 7.

Initial viability of the vaginal tablets containing the encapsulated bacteria was.

$9.04 \pm 0.02$  log CFU/g. Similar results of bacteria viability were obtained from both storage conditions. Viability decreased barely 0.4 log units until 30 days of storage. At 60 days, viability of tablets at RT and in desiccator was  $8.42 \pm 0.01$  log CFU/g and  $8.43 \pm 0.05$  log CFU/g respectively. This bacteria viability remained

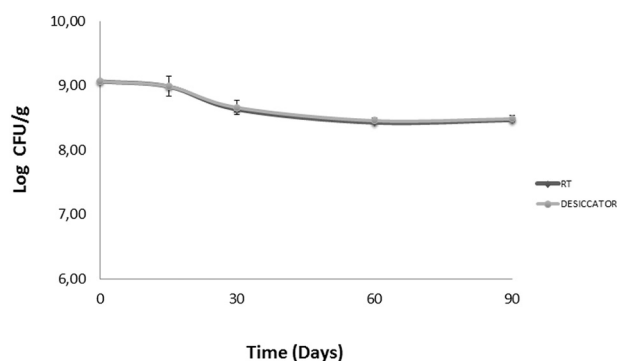


Fig. 7. Storage and viability assay for 90 days at Room Temperature (RT) and in a desiccator. ( $n = 3$ , all points are expressed mean  $\pm$  SD).

stable from then on with a viability decrease of 0.62 log units over the period of storage tested (90 days). Despite the loss of 0.62 log units, vaginal tablets assured high survival rates throughout the 90 days of storage with viable numbers above  $10^8$  CFU/g which supposed an optimal probiotic quantity for vaginal therapy ( $10^8$ – $10^{10}$  CFU/g) (Borges et al., 2013).

*Lactobacillus* microparticles incorporated into these vaginal tables, which were previously reported (Sánchez et al., 2017), showed no reduction in bacteria viability throughout the 150 days stability assay under the same conditions. However, encapsulated bacteria survival in acid medium was lower with a loss of 5 log units after 2 h in acid, hence

our aim of conditioning them into a secondary pharmaceutical form in order to avoid that inconvenience. If we analyze vaginal tablets results (Section 3.6), we can detect a decrease of only 1 log unit bacteria that was released to the medium after 2 h in acid, ensuring the achievement of our objective. In the same way, Stadler and Viernstein (2003) considered as optimal a bacteria decrease of 1 log unit after being immersed 2 h in acid environment.

#### 4. Conclusions

In this research work, double-layers vaginal tablets that contain microencapsulated *Lactobacillus* spp. bacteria have been developed. Formulation F4 was selected as optimal for further studies. It becomes clear the importance of chitosan/Carbopol® 934 ratio in formulation, since hydration capability depended on it. F4 met both technological and mucoadhesion requirements of the vaginal dosage forms. Furthermore, disintegration assay showed that effervescent layer disappeared in  $27.48 \pm 0.05$  s whilst matrix layer was totally gelled in 1 h. This gelled phase was homogeneous and solubilized in SVF progressively with no fragment loss. That fact together with long period of residence time contributed to a greater acceptance of the patient and greater therapeutic compliance. Dissolution study confirmed two different release profiles according to the proposed tablet design, a promptly bacteria released of the effervescent layer, and a prolonged release until 24 h associated to the matrix layer. Stability study revealed that bacteria viability was constant until 90 days in both ways of storage, in a desiccator and at RT, with a final dosage optimal for vaginal therapy ( $10^8$ – $10^{10}$  CFU/g).

The overall results of this investigation suggested that this vaginal tablets designed had ideal technological and pharmaceutical properties, making them a novel dosage form for effective and convenient treatment of vaginal infections for improving women's health.

#### Acknowledgments

We want to thank BiotMicrogen S.L. (Granada, Spain) for the kind supply of probiotics.

#### References

- Abad, C.L., Safdar, N., 2009. The role of lactobacillus probiotics in the treatment or prevention of urogenital infections – a systematic review. *J. Chemother.* 21, 243–252.
- ACOG, 1996. Technical bulletin. Vaginitis. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 54, 293–302.
- Baloglu, E., Ozyazici, M., Hizarcioglu, S.Y., Karavana, H.A., 2003. An *in vitro* investigation for vaginal bioadhesive formulations: bioadhesive properties and swelling states of polymer mixtures. *Farmaco* 58, 391–396.
- Barrons, R., Tassone, D., 2008. Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clin. Ther.* 30, 453–468.
- Biswal, B., Karna, N., Bhavsar, B., 2014. Formulation and evaluation of reglinide buccal tablet: *ex vivo* bioadhesion study and *ex vivo* permeability study. *J. Appl. Pharm. Sci.* 4, 096–103.
- Borges, S., Costa, P., Silva, J., Teixeira, P., 2013. Effects of processing and storage on *Pediococcus pentosaceus* SB83 in vaginal formulations: lyophilized powder and tablets. *Biomed. Res. Int.* 2013, 680–767.
- Cancelo, M.J., Beltrán, D., Calaf, J., Campillo, F., Cano, A., Guerra, J.A., Neyro, J.L., 2013. The protocol of the Spanish Society of Obstetrics and Gynecology for the diagnosis and treatment of vulvovaginal infection. *Prog. Obstet. Gynecol.* 56, 278–284.
- Döderlein, A., 1982. Das scheidensekret und seine bedeutung fur puerperalfieber. *Zentralbl. Bakteriol.* 11, 699–701.
- Donders, G.G., Zozzika, J., Rezeberga, D., 2014. Treatment of bacterial vaginosis: what we have and what we miss. *Expert. Opin. Pharmacother.* 15, 645–657.
- Ehrström, S., Daroczy, K., Rylander, E., Samuelsson, C., Johannesson, U., Anzén, B., Pahlson, C., 2010. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microbes Infect.* 12, 691–699.
- Falagas, M.E., Betsi, G.I., Athanasiou, S., 2006. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 266–272.
- FAO/WHO, 2001. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report Available at: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).
- Garga, S., Goldman, D., Krumme, M., Rohan, L.C., Smoot, S., Friend, D.R., 2010. Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets. *Antivir. Res.* 88, S19–S29.
- Iman, S.J., Nidhal, K.M., 2014. Formulation and *in vitro* evaluation of buccal mucoadhesive tablets of promethazine HCl. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 24, 61–69.
- Joglekar, N.S., Joshi, S.N., Navlakha, S.N., Katti, U.R., Mehendale, S.M., 2006. Acceptability of Praneem polyherbal vaginal tablet among HIV-uninfected women & their male partners in Pune India – phase I study. *Indian J. Med. Res.* 123, 547–552.
- Kim, K.W., Thomas, R.L., Lee, C., Park, H.J., 2003. Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and O-carboxymethylated chitosan. *J. Food Prot.* 66, 1495–1498.
- Kovachev, S.M., Vatcheva-Dobrevska, R.S., 2015. Local probiotic therapy for vaginal *Candida albicans* infections. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 7, 38–44.
- Krasnopolsky, V.N., Pripleskaya, V.N., Polatti, F., Zarochentseva, N.V., Bayramova, G.R., Caserini, M., Palmieri, R., 2013. Efficacy of vitamin C vaginal tablets as prophylaxis for re-current bacterial vaginosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Clin. Med. Res.* 5, 309–315.
- Nader-Macias, M.E., Silva-Ruiz, C., Ocana, V., Juarez, M.S., 2008. Advances in the knowledge and clinical applications of lactic acid bacteria as probiotics in the urogenital tract. *Curr. Women's Health Rev.* 4, 240–257.
- Owen, D.H., Katz, D.F., 1999. A vaginal fluid stimulant. *Contraception* 59, 91–95.
- Palmeira-de-Oliveira, A., Ribeiro, M.P., Palmeira-de-Oliveira, R., Gaspar, C., Costa-de-Oliveira, S., Correia, I.J., Pina Vaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., Queiroz, J.A., Rodrigues, A.G., 2010. Anti-Candida activity of a chitosan hydrogel: mechanism of action and cytotoxicity profile. *Gynecol. Obstet. Investig.* 70, 322–327.
- Palmeira-de-Oliveira, R., Palmeira-de-Oliveira, A., Martinez-de-Oliveira, J., 2015. New strategies for local treatment of vaginal infections. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 92, 105–122.
- Pande, R., Bagad, M., Dubey, V., Ghosh, A.R., 2012. Prospectus of probiotics in modern age diseases. *Asian Pac. J. of Trop. Biomed.* S1963–S1974.
- Perioli, L., Ambrogi, V., Pagano, C., Massetti, E., Rossi, C., 2011. New solid mucoadhesive systems for benzydamine vaginal administration. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 84, 413–420.
- Perioli, L., Pagano, C., 2013. Preformulation studies of mucoadhesive tablets for carbamazepine sublingual administration. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 102, 915–922.
- Petersen, E.E., Magnani, P., 2004. Efficacy and safety of Vitamin C vaginal tablets in the treatment of non-specific vaginitis. A randomised, double blind, placebo-controlled study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 117, 70–75.
- Petricevic, L., Unger, F.M., Viernstein, H., Kiss, H., 2008. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral lactobacilli to improve the vaginal flora of post-menopausal women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 141, 54–57.
- Pirotta, M., Gunn, J., Chondros, P., Grover, S., O'Malley, S., Hurley, S., Garland, S., 2004. Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ* 329, 548.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E., Stevens, C.V., Smaghe, G., Steurbaut, W., 2003. Chitosan as anti-microbial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4, 1457–1465.
- Reid, G., Soboh, F., Bruce, A.W., Mittelman, M., 1998. Effect of nutrient composition on the *in vitro* growth of urogenital lactobacilli and uropathogens. *Can. J. Microbiol.* 44, 866–871.
- Rossi, S., Sandri, G., Ferrari, F., Bonferoni, M.C., Caramella, C., 2003. Development of films and matrices based on chitosan and polyacrylic acid for vaginal delivery of acyclovir. *S.T.P. Pharma Science.* 13, 183–190.
- Sánchez, M.T., Ruiz, M.A., Lasserrot, A., Hormigo, M., Morales, M.E., 2017. An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus* spp. bacteria: protection, survival and stability study. *Food Hydrocoll.* 69, 67–75.
- Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P., Hipler, U.C., 2008. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligo-saccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *Int. J. Pharm.* 353, 139–148.
- Stadler, M., Viernstein, H., 2003. Optimization of a formulation containing viable lactic acid bacteria. *Int. J. Pharm.* 256, 117–122.
- Valenta, C., 2005. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1692–1712.
- Vermani, K., Garg, S., 2000. The scope and potential of vaginal drug delivery. *Pharm. Sci. Technol. Today* 3, 359–364.
- Wang, L., Tang, X., 2008. A novel ketoconazole bioadhesive effervescent tablet for vaginal delivery: design, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Int. J. Pharm.* 350, 181–187.
- Wilson, J., 2004. Managing recurrent bacterial vaginosis. *Sex. Transm. Infect.* 80, 8–11.
- Zozzika, J., Rezeberga, D., Donders, G., Vedmedovska, N., Vasina, O., Pundure, I., Bite, R., Silberga, I., Socenova, J., Melngailė, O., 2013. Impact of vaginal ascorbic acid on abnormal vaginal microflora. *Arch. Gynecol. Obstet.* 288, 1039–1044.



## **III.6. BIBLIOGRAFÍA**

---



Abbaspoor Z, Fateme G, Abbaspoor M. Comparison of the effectiveness of vitamin C vaginal tablet with metronidazole vaginal gel in the treatment of bacterial vaginosis, *Afr J Pharm Pharmacol.* 2010; 4: 484-489.

Acarturk F. Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2009; 3: 193-205.

Alam MA, Ahmad FJ, Khan ZI, Khar RK, Ali M. Development and evaluation of acid-buffering bioadhesive vaginal tablet for mixed vaginal infections. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2007; 58: 407-419.

Calinescu C, Mateescu MA. Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 70: 582–589.

Carmella CM, Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Giuseppina S. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; 92: 39-52.

Colombo P, Bettini R, Santi P, Peppas NA. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optical performance. *Pharm. Sci. Technol.* 2000; 3:198-204.

EFSA. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on the maintenance of the QPS list of microorganisms intentionally added to food or feed. *The EFSA Journal.* 2008; 923: 1-48.

García MJ, Santos D. Capítulo 2: Formas Sólidas Orales. En: Vila Jato JL (Ed). *Tecnología Farmacéutica Volumen I: Aspectos Fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas.* España: Síntesis; 2001. pp. 87-145.

Garg S, Goldman D, Krumme M, Rohan LC, Smoot S, Friend DR. Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets. *Antiviral Res.* 2010; 88: 19–29.

Garg S, Jambu L, Vermani K. Development of Novel Sustained release bioadhesive vaginal tablets of Povidone Iodine. *Drug Dev Ind Pharm.* 2007; 33: 1340-1349.

Govender M, Choonara YE, Van Vuuren S, Kumar P, du Toit LC, Pillay V. A gastro-resistant ovalbumin bi-layered mini-tablet-in-tablet system for the delivery of *Lactobacillus acidophilus* probiotic to simulated human intestinal and colon conditions. *J Pharm Pharmacol.* 2015; 67(7): 939-950

Joglekar NS, Joshi SN, Navlakha SN, Katti UR, Mehendale SM. Acceptability of Praneem polyherbal vaginal tablet among HIV-uninfected women & their male partners in Pune India – phase I study. *Indian J Med Res.* 2006; 123, 547-552.

Klayraung S, Viernstein H, Okonogi S. Development of Tablets Containing Probiotics: Effects of Formulation and Processing Parameters on Bacterial Viability. *Int J Pharm.* 2009; 370: 54-60.

Krasnopolsky VN, Prilepskaya VN, Polatti F, Zarochentseva NV, Bayramova GR, Caserini M, Palmieri R. Efficacy of vitamin C vaginal tablets as prophylaxis for recurrent bacterial vaginosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Clin Med Res.* 2013; 5: 309–315.

Lara-Villoslada F, Sierra S, Martín R, Delgado S, Rodríguez JM, Olivares M, Xaus J. Safety assessment of two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714. *J Appl Microbiol.* 2007; 103: 175-184.

Li L, Wang L, Li J, Jiang S, Wang Y, Zhang X, Ding J, Yu T, Mao S. Insights into the mechanisms of chitosan–anionic polymers-based matrix tablets for extended drug release. *Int J Pharm.* 2014; 476: 253–265.

Liu N, Chen XG, Park HJ, Liu CG, Liu CS, Meng XH. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydr Polym.* 2006; 64: 60–65.

Maderuelo C, Zarzuelo A, Lanao JM. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *J Control Release.* 2011; 154: 2–19.

Martín R, Olivares M, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *Int J Food Microbiol.* 2005; 104: 267– 277.

Martín-Villena MJ, Lara-Villoslada F, Ruíz MA, Morales ME. Development of Gastro-Resistant tablets for the Protection and Intestinal Delivery of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716. Int J Pharm. 2015; 487: 314-319.

Miller-Chou BA, Koenig JL. A review of polymer dissolution. Prog Polym Sci. 2003; 28: 1223-1270.

Muller C, Mazel V, Dausset C, Busignies V, Bornes S, Nivoliez A, Tchoreloff P. Study of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 Propertis after Compression and Proposition of a Model to Predict Tablet Stability. Eur J Pharm Biopharm. 2014; 88: 787-794.

Nagashima AI, Pansiera PE, Baracat MM, Hernán- Castro RJ. Development of effervescent products, in powder and tablet form, supplemented with probiotics *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces boulardii*. Food Sci Technol (Campinas); 2013: 33; 605-611.

Olivares M, Díaz-Roperó MP, Gómez N, Lara- Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J. The consumption of two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT 5714, boost the immune system of healthy humans. Int Microbiol. 2006; 9 (1): 47-52.

Palmeira-de-Oliveira A, Ribeiro MP, Palmeira-de-Oliveira R, Gaspar C, Costa- de-Oliveira S, Correia IJ, Pina Vaz C, Martinez-de-Oliveira J, Queiroz JA, Rodrigues AG. Anti-*Candida* activity of a chitosan hydrogel: mechanism of action and cytotoxicity profile. Gynecol Obstet Investig. 2010; 70: 322-327.

Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, Martínez-de- Oliveira J. New strategies for local treatment of vaginal infection. Adv Drug Deliv Rev. 2015; 92: 105-122.

Petersen EE, Genet M, Caserini M, Palmieri R. Efficacy of vitamin C vaginal tablets in the treatment of bacterial vaginosis: a randomised, double blind, placebo controlled clinical trial. Arzneimittelforschung. 2011; 61: 260-265.

Poulin JF, Caillard C, Subirade M.  $\beta$ -Lactoglobulin tablets as a suitable vehicle for protection and intestinal delivery of probiotic bacteria. Int J Pharm. 2011; 405: 47-54.

Rathore AS, Jat RC, Sharma N, Tiwari R. An overview: matrix tablet as controlled drug delivery system. *Int J Res Dev Pharm Life Sci.* 2013; 2: 482-492.

Real Farmacopea Española 5a ed., AEMPS, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2015.

Sánchez MT, Ruiz MA, Morales ME. Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharm.* 2015; 56: 45-59.

Seyfarth F, Schliemann S, Elsner P, Hipler UC. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligo-saccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *Int J Pharm.* 2008; 353: 139-148.

Siepmann J, Peppas NA. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 48: 139-157.

Sogias IA, Williams AC., Khutoryanskiy VV. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 2008; 9: 1837-1842.

Stadler M, Viernstein H. Optimization of a Formulation Containing Viable Lactic Acid Bacteria. *Int J Pharm.* 2003; 256: 117-22.

Sung-Hyun P, Myung- Kwan C, Hoo-kyun C. Preparation of an extended- release matrix tablets using chitosan/Carbopol interpolymers complex. *Int J Pharm.* 2008; 347: 39-49.

Suñé JM. Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración. Barcelona 2003.

Tang H, Zhang P, Kieft TL, Ryan SJ, Baker SM, Wiesmann Snezna Rogelj WP. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against gram-negative bacteria. *Acta Biomater.* 2010; 6: 2562-2571.

Valenta C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57: 1692-1712.

Vermani K, Garg S. The scope and potential of vaginal drug delivery. Pharm Sci Technolo. 2000; 3: 359-364.

Wang L, Tang X. A novel ketoconazole bioadhesive effervescent tablet for vaginal delivery: design, “*in vitro*” and “*in vivo*” evaluation. Int J Pharm. 2008; 350: 181-187.





## **CONCLUSIONES**

---



El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el diseño y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas sólidas portadoras de microorganismos probióticos pertenecientes al género *Lactobacillus*. De este modo, se persigue la protección de los mismos frente a las condiciones ambientales adversas que puedan presentarse durante su desarrollo, almacenamiento y administración. Al mismo tiempo, dichas formas farmacéuticas deben facilitar la llegada de las bacterias al lugar de acción en número suficiente para ejercer sus efectos beneficiosos. Fruto del trabajo realizado han sido publicados tres artículos JCR, en los cuales se abordan los objetivos planteados en esta Tesis, quedando aún pendiente de publicación un cuarto artículo en el que se recogen conclusiones parciales imprescindibles para el avance de esta investigación. Teniendo en cuenta todo lo anterior, cabe resaltar las siguientes conclusiones:

### **1. Relativas a la microencapsulación de *Lactobacillus fermentum***

- 1.1. La gelificación iónica interna en el seno de una emulsión ha sido seleccionada como técnica para la encapsulación de nuestras bacterias probióticas, utilizando como agente encapsulante el alginato sódico. Para ello, se ha realizado una modificación del método hasta ahora utilizado, la cual consiste en reemplazar, parcial o totalmente, el agua que constituye la fase acuosa de la emulsión por caldo MRS inoculado con las bacterias.
- 1.2. El análisis de las micropartículas obtenidas muestra que aquellas en cuya síntesis la fase acuosa esta constituida en su totalidad por caldo MRS inoculado con las bacterias presentan una mayor estabilidad.
- 1.3. Dichas micropartículas presentan una eficacia de encapsulación de  $100.66 \pm 0.58$  % y su tamaño medio es de  $53.64 \mu\text{m}$ , lo que favorece su incorporación en alimentos funcionales y preparaciones farmacéuticas.
- 1.4. La liofilización de las micropartículas obtenidas utilizando como crioprotector leche descremada (20 %) aumenta la viabilidad de las bacterias durante su conservación a diferentes temperaturas, alcanzándose una tasa de supervivencia del 100 % tras 150 días de estudio a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

1.5. El proceso de microencapsulación protege a las bacterias respecto a aquellas no microencapsuladas durante su exposición a medio ácido. Este resultado puede mejorarse mediante su inclusión en formas farmacéuticas secundarias.

## **2. Relativas al diseño y desarrollo de comprimidos de administración oral con *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711**

2.1. Se han seleccionado comprimidos matriciales como forma farmacéutica para la administración oral de microorganismos probióticos con objeto de conseguir una liberación prolongada, así como otorgar protección a las bacterias durante el proceso tecnológico, a lo largo del tránsito gastrointestinal y durante su almacenamiento hasta el final de su vida útil.

2.2. A tenor de los resultados obtenidos en los ensayos tecnológicos y en el estudio de viabilidad, se selecciona como óptima la formulación constituida por la combinación de los polímeros Methocel<sup>®</sup> K15 M EP (100 mg), Eudragit<sup>®</sup> L-100 (75 mg) y alginato sódico (25 mg).

2.3. La formulación seleccionada cumple los criterios tecnológicos exigidos según USP (USP 29) y RFE (RFE 3<sup>a</sup> Ed) en relación a uniformidad de masa, friabilidad, resistencia a rotura y disgregación.

2.4. Dichos comprimidos otorgan protección a las bacterias durante el proceso de compresión. Así mismo, tras ser sometidos a condiciones gastrointestinales, se mantiene una viabilidad de  $5 \times 10^8$  UFC/comprimido, alcanzando el intestino un número de bacterias suficiente para ejercer sus efectos beneficiosos.

2.5. El estudio de estabilidad a lo largo del tiempo revela una excelente supervivencia de las bacterias tras 365 días de ensayo, alcanzándose una viabilidad final del orden de  $10^9$  UFC a temperatura ambiente, 25 °C, 4 °C.

---

### 3. Relativas al diseño y desarrollo de comprimidos mucoadhesivos de administración vaginal con *Lactobacillus fermentum*

- 3.1. Se han diseñado comprimidos vaginales bicapa, constituidos por una capa efervescente de liberación inmediata y por una capa matricial de liberación prolongada. *Lactobacillus fermentum* previamente microencapsulado y liofilizado se encuentra incluido en ambas capas.
- 3.2. La formulación constituida por chitosan (20 mg), Carbopol<sup>®</sup> (50 mg) y NaCMC (20 mg) presenta los mejores resultados de hinchamiento, mucoadhesión y disolución/erosión para la administración vaginal.
- 3.3. Dicha formulación presenta una fuerza de adhesión a la mucosa vaginal de 0.0941 N y un tiempo de adhesión de  $24.36 \pm 0.88$  horas. Además, el ensayo de disgregación muestra que la capa matricial gelifica por completo en 1 hora de forma homogénea y progresiva sin pérdida de fragmentos o fugas. Todo ello favorece la aceptación por parte del paciente y un mayor cumplimiento terapéutico.
- 3.4. El estudio de disolución muestra dos perfiles de liberación distintos para ambas capas. Mientras la capa efervescente libera su contenido probiótico en  $27.48 \pm 0.05$  segundos, la capa matricial permite una liberación prolongada de las bacterias durante 24 horas.
- 3.5. Tras 90 días de conservación a temperatura ambiente, la viabilidad de las bacterias permanece constante, alcanzándose una dosis final adecuada para terapia vaginal ( $10^8$  UFC/g).



*ANEXO I*

---

**Microorganismos probióticos y salud**





## Microorganismos probióticos y salud.

María Teresa Sánchez, María Adolfina Ruiz, María Encarnación Morales.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada (España).

### Special Article

#### Artículo Especial

#### Correspondence/Correspondencia:

Dra. María Adolfina Ruiz.  
Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Facultad Farmacia, Universidad de Granada.  
Campus Cartuja, s/n  
18071, Granada, España.  
E-mail: adolfina@ugr.es

#### Competing interest / Conflicto de intereses:

Undeclared

#### Fundings / Financiación:

Undeclared

Received: 17.06.2014

Accepted: 10.11.2014

### RESUMEN

**Objetivo:** Mostrar los beneficios de los microorganismos probióticos sobre la salud y su aceptación por parte del consumidor, así como hacer una recopilación de todos los productos probióticos disponibles en el mercado farmacéutico.

**Material y métodos:** Se realizó un estudio del mercado farmacéutico en relación a las formas farmacéuticas con microorganismos probióticos existentes y su evolución en los últimos años. La clasificación de todos los productos probióticos se llevó a cabo en función de la forma farmacéutica en la que se presentan; cada producto irá acompañado de la dosis de microorganismos probióticos que contiene, expresada como Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

**Resultados:** Es cada vez mayor el número de cepas probióticas aisladas y los beneficios mostrados sobre la salud del hombre. Encontramos gran diversidad de productos probióticos disponibles en oficinas de farmacia como consecuencia de una demanda cada vez mayor por parte del consumidor; no obstante, cabe resaltar el hecho de que muchos de ellos carecen en envase de información necesaria, por ejemplo, la dosis contenida.

**Conclusiones:** El interés por parte de la industria farmacéutica en lanzar nuevas formas farmacéuticas contenidas en microorganismos probióticos será cada vez mayor e irá ligado a la necesidad de una reglamentación específica para estos productos. Muchos de ellos no contienen la dosis mínima requerida para obtener un efecto beneficioso en la salud lo que supone una publicidad engañosa para el consumidor, por tanto, deberían ser retirados del mercado, publicitando únicamente aquellos que contengan una dosis terapéutica y cuyos efectos estén avalados por diferentes ensayos clínicos.

**PALABRAS CLAVE:** Beneficios en salud, Presentaciones farmacéuticas, Probióticos.

### ABSTRACT

**Aims:** Show the benefits of the probiotic microorganisms on health and its acceptance by the consumer. As well as collect those probiotic products available in pharmaceutical market.

**Materials and methods:** A study of the pharmaceutical market in relation to the existing dosage forms with probiotic microorganisms and their evolution in recent years was made. Classifying probiotic products was conducted according to the dosage form in which they are presented; each product must be accompanied by the dose of probiotic-containing, expressed as Colony Forming Units (CFU).

**Results:** It is increasing the number of probiotic strains isolated and the benefits that its shown on human health. We found a diversity of probiotic products available in pharmacies as a result of an increasing demand by consumers; it is important to note that many of them lack necessary information on packaging, for example, the dose contained.

**Conclusions:** The interest of the pharmaceutical industry in develop new dosage forms contained in probiotic microorganisms will be growing and will be linked to the need for a specific regulation for these products. Many of them do not contain the required dose to obtain a beneficial effect on health which is misleading advertising to consumers, therefore, they should be removed from the market, advertising only those products which contain a therapeutic dose and whose effects are endorsed by various clinical trials.

**KEY WORDS:** Health, Pharmaceutical Preparations, Probiotic.

## INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemoriales se ha atribuido a los microorganismos un papel predominante en el entorno de nuestra vida, formando parte de todos los ecosistemas en los que nos movemos cotidianamente y ejerciendo una importante labor en nuestro organismo. En 1908, Elia Metchnikoff postuló por primera vez la importancia del consumo de leche fermentada con la especie *Lactobacillus* en la longevidad de los pastores de los Balcanes, mediante la supresión de las bacterias putrefactivas de la microbiota intestinal. Actualmente, tras numerosas redefiniciones, la FAO/OMS (2001) define probiótico como “microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada”. Esta cantidad varía de un país a otro en función de su legislación; sin embargo, generalmente un producto probiótico debería contener  $>10^6$ -  $10^8$  CFU/g ó  $>10^8$ -  $10^{10}$  UFC/dosis de células viables<sup>1</sup>. Además, los probióticos son definidos como seguros según el acrónimo inglés “GRAS” (“generally recognized as safe”).

Los avances científicos de los últimos años respecto a la correlación existente entre la microbiota humana y el estado de salud del individuo avalan la necesidad de los mismos. Son numerosos autores los que tratan de evidenciarlos efectos beneficiosos que ejercen estos microorganismos sobre diferentes patologías, tales como:

- Diarrea: infantil<sup>2</sup>, diarrea asociada a antibióticos<sup>3</sup>, diarrea del viajero<sup>4</sup>.
- Enfermedad inflamatoria intestinal (EII): colitis ulcerosa<sup>5</sup> y enfermedad de Crohn<sup>6</sup>.
- Intolerancia a la lactosa<sup>7</sup>.
- Úlcera gastroduodenal<sup>8</sup>.
- Infecciones del tracto respiratorio<sup>9</sup>.
- Reducción de los niveles de colesterol<sup>10,11</sup>.
- Efectos contra la obesidad<sup>12</sup> y diabetes<sup>13</sup>.
- Alergias<sup>14,15</sup>, enfermedades de la piel y eczemas<sup>16</sup>.
- Cáncer<sup>17</sup>.
- Vaginitis y enfermedades urogenitales<sup>18</sup>.

Las cepas probióticas comúnmente usadas pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *E.coli*Nissle1917 y *Saccharomycesboulardii*. No todos los probióticos poseen las mismas propiedades beneficiosas. Además, cuando se adscribe un efecto beneficioso a una cepa, este no se puede extrapolar a las restantes cepas de la misma especie. Se han realizado ensayos clínicos usando diferentes cepas y formulaciones, obteniéndose como conclusión final que no sólo hay que tener en cuenta la especificidad de la cepa o la localización de la enfermedad diana; sino que

la dosis, ruta, duración y frecuencia de administración también deben considerarse cuidadosamente<sup>19</sup>. Así, para obtener beneficios sobre la salud, es recomendada una dosis de 5 mil millones de unidades formadoras de colonias (UFC) durante al menos 5 días ( $5 \times 10^9$ UFC / día)<sup>20</sup>. Puesto que la principal vía de administración de los microorganismos probióticos es la vía oral, con objeto de proporcionar estos efectos beneficiosos en el hospedador, las bacterias probióticas deben sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal, tolerar el ácido, la bilis y las enzimas a nivel gástrico y, posteriormente, adherirse al epitelio intestinal<sup>21</sup>; es por ello que deben administrarse incluidos en formas farmacéuticas o bien en alimentos que le otorguen protección frente a esas condiciones adversas. Estos productos probióticos, además, deben garantizar la supervivencia de los microorganismos en forma viable durante el almacenamiento hasta el final de vida útil ( $>10^6$  UFC/g)<sup>22</sup>. El interés comercial de los probióticos se ve acrecentado de forma paulatina, según se avanza en el conocimiento acerca de la relación existente entre ellos y la microbiota intestinal, su interacción y el desencadenamiento de una serie de efectos positivos sobre el individuo, por tanto, abren una alternativa muy esperanzadora tanto en el ámbito de la alimentación funcional como en la mejora y profilaxis de determinadas patologías.

Por todo ello, el objetivo fundamental del presente trabajo ha sido realizar una exhaustiva revisión de las formas farmacéuticas portadoras de bacterias probióticas existentes en nuestro país, así como de sus ventajas, inconvenientes, dosis y efectividad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En primer lugar, se pretende analizar la evolución y relevancia de los productos probióticos en el sector farmacéutico durante los últimos años, así como la demanda esperada para tiempos futuros. Con este fin, se utilizaron las páginas Web *PubMed*, *ScienceDirect* y la revista electrónica *El probiótico* como principales fuentes para la búsqueda de los trabajos de investigación más interesantes publicados sobre la materia. Por otro lado, se realizó un estudio de mercado, con objeto de especificar todas aquellas modalidades farmacéuticas que podemos encontrar en oficinas de farmacia a disposición del consumidor. Para ello, fue imprescindible la información aportada por el Centro de Información del Medicamento, contrastada con los datos facilitados por los laboratorios implicados. La información así obtenida fue cuidadosamente analizada, resaltando aquellos resultados más relevantes en cuanto al desarrollo de nuevas formas farmacéuticas con microorganismos probióticos y sus exigencias.

**Tabla 1. Medicamentos con microorganismos probióticos disponibles en oficinas de farmacia.**

| MEDICAMENTOS PROBIÓTICOS |              |                                 |   |
|--------------------------|--------------|---------------------------------|---|
| CÓDIGO NACIONAL          | NOMBRE       | PRESENTACIÓN                    | CFU*/ F. farmacéutica   |
| 7771029                  | CASENFILUS   | 2 G 10 SOBRES                   | <i>L. acidophilus</i><br>(2,4*10 <sup>8</sup> CFU/sobre)  |
| 7791164                  | LACTEOL      | 10 SOBRES POLVO                 | <i>L. acidophilus</i> (muertos),<br><i>L. fermentum</i> ,<br><i>L. delbrueckii</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/sobre) |
| 7770862                  | LACTOFILUS   | 20 G POLVO ORAL                 | <i>L. acidophilus</i><br>(1,2*10 <sup>8</sup> CFU/g)  |
| 8207879                  | SALVACOLON   | SOLUCION ORAL 1 FRASCO 120 ML   | <i>Bacillus subtilis</i><br>(2*10 <sup>9</sup> CFU/ vial)   |
| 6291962                  | SALVACOLON   | SOLUCION ORAL 50 FRASCOS 120 ML | No comercializado   |
| 6949191                  | INFLORAN     | 20 CAPSULAS                     | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. biphidus</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/cápsula)                                       |
| 7791249                  | LACTEOL      | 10 CAPSULAS                     | <i>L. acidophilus</i> (muertos),<br><i>L. fermentum</i> ,<br><i>L. delbrueckii</i><br>(1*10 <sup>10</sup> CFU/caps) |
| 8416271                  | ULTRA LEVURA | 20 CAPSULAS                     | <i>Saccharomyces boulardii</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 9368722                  | ULTRA LEVURA | 50 CAPSULAS                     | <i>Saccharomyces boulardii</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |

\*CFU (Unidades formadoras de colonias)<sup>24, 25, 26,27</sup>**Tabla 2. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (viales)**

| PROBIÓTICOS EN COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS |  |                 |   |
|--|--|-----------------|---|
| CÓDIGO NACIONAL                          | NOMBRE                                 | PRESENTACIÓN    | CFU*/F. farmacéutica  |
| 1617477                                  | +DEFENS                                | 10 VIALES       | <i>L.acidophilus</i> , <i>L.plantarum</i> ,<br><i>L.bulgaricus</i> , <i>L.rhamnosus</i><br>(7*10 <sup>8</sup> CFU/ vial)  |
| 1617484                                  | +DEFENS JUNIOR                         | 10 VIALES       | <i>L.acidophilus</i> , <i>L.plantarum</i> ,<br><i>L.bulgaricus</i> , <i>L.rhamnosus</i><br>(3,5*10 <sup>8</sup> CFU/ vial)  |
| 1530813                                  | FLORAMAX 6000                          | 10 VIALES 10 ML | <i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> ,<br><i>L. bulgaricus</i> , <i>B. bifidus</i> ,<br><i>B. longum</i> ,<br><i>S. thermophilus</i> , <i>S. faecium</i><br>(6*10 <sup>9</sup> CFU/ vial) |
| 1586780                                  | IMMUNILFLOR                            | 12 VIALES       | Fermentos lácticos<br>tindalizados (no vitales):<br><i>L. casei</i> ,<br><i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. plantarum</i> ,<br><i>S. thermophilus</i><br>(2*10 <sup>9</sup> CFU/ vial)                                  |
| 1522016                                  | LACTOFLORA PROTECTOR INTESTINAL NIÑOS  | 5 VIALES FRESA  | <i>B. lactis</i> BI-04<br><i>L. acidophilus</i> La-14,<br><i>L. plantarum</i> Lp115,<br><i>L. paracasei</i> Lpc37<br>(25*10 <sup>9</sup> CFU/ vial)   |
| 1545657                                  | LACTOFLORA PROTECTOR INTESTINAL ADULTO | 7 VIALES        | <i>B. lactis</i> BI-04<br><i>L. acidophilus</i> La-14,<br><i>L. plantarum</i> Lp115,<br><i>L. paracasei</i> Lpc37<br>(1*10 <sup>11</sup> CFU/ vial)   |

\*CFU (Unidades formadoras de colonias)<sup>24, 25, 26,27</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El creciente interés de mercado en promover la salud de forma natural ha intensificado la investigación en este área. Un análisis global reciente acerca del mercado de probióticos estimó un crecimiento anual del 7%, impulsado principalmente por un aumento de petición por parte de los consumidores asiáticos y europeos, con un pronóstico de 48 billones de dólares en los próximos 5 años (GlobalIndustryAnalysisReport 2012). Asimismo, podemos encontrar probióticos bajo diferentes modalidades farmacéuticas como especialidades farmacéuticas de administración oral, suplementos dietéticos, soluciones de rehidratación oral, preparados para lactantes y especialidades de uso urogenital; así como incluidos en una gran variedad de alimentos. Mientras que estos alimentos se relacionan con el mantenimiento del funcionamiento normal del organismo o con la reducción de los riesgos de enfermedad en un amplio núcleo de población tanto sanos como no tan sanos; las modalidades farmacéuticas son consideradas como una solución terapéutica primaria en una situación de enfermedad específica <sup>23</sup>.

Como resultado de un exhaustivo análisis del mercado farmacéutico en España, encontramos que las diferentes modalidades farmacéuticas contenidas en microorganismos probióticos disponibles en oficinas de farmacia son las siguientes (Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10).

Como podemos observar, la mayor parte de los productos comercializados son en forma de cápsulas o sobres mientras que los comprimidos disponibles son mínimos. La falta de comprimidos con probióticos y el solapamiento con otras formas farmacéuticas, mayoritariamente cápsulas, ha ido en detrimento de la dosis de bacterias administrada por forma farmacéutica, la cual debe

**Tabla 3. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (líquidos).**

| PROBIÓTICOS EN COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS |                   |                 |   |
|--|-------------------|-----------------|---|
| CÓDIGO NACIONAL                          | NOMBRE            | PRESENTACIÓN    | CFU*/F. farmacéutica  |
| 151911                                   | ENTERUM           | 10 FRASCOS      | <i>Bacillus coagulans</i> , esporas vivas (2*10 <sup>9</sup> CFU/frasco)  |
| 1603029                                  | IMMUNIFLOR JUNIOR | JARABE 200 ml   | Fermentos lácticos tinalizados: <i>L.casei</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>S.thermophilus</i> (1*10 <sup>9</sup> unidades/200ml) |
| 1576873                                  | MICROFLORANA      | 150 ml          | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Bifidobacterium</i> (6,4*10 <sup>9</sup> CFU/100ml)   |
| 1576880                                  | MICROFLORANA      | 500 ml          |   |
| 1614339                                  | REUTERIN          | GOTAS 5 ml      | <i>L. reuteri Protectis</i> (20*10 <sup>6</sup> CFU/gota)   |
| 1807991                                  | ROTAGERMINE       | 10 FRASCOS 8 ml | <i>L.rhamnosus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>S.thermophilus</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>L.bulgaricus</i> (3,5*10 <sup>9</sup> CFU/ frasco)          |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24</sup>

ser suficiente para generar un efecto satisfactorio sobre la salud del paciente. Así, las condiciones tecnológicas empleadas para la obtención de cápsulas son menos agresivas, por tanto, la supervivencia de las bacterias será muy alta y permitirá un menor coste de producción. Por el contrario, la compresión requiere de presiones altas que conlleva la pérdida de una gran parte de las bacterias.

Sin embargo, son múltiples las ventajas que nos aportan los comprimidos y no las cápsulas, como puede ser el permitirnos alcanzar una liberación controlada o modificada del principio activo. En estos últimos años, la investigación en el diseño de formas farmacéuticas se ha centrado en la búsqueda de sistemas que permitan controlar el momento, lugar y velocidad

**Tabla 4. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (sobres).**

| PROBIÓTICOS EN COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS |   |                     |   |
|--|---|---------------------|---|
| CÓDIGO NACIONAL                          | NOMBRE                                      | PRESENTACIÓN        | CFU*/ F. farmacéutica   |
| 1567024                                  | ARKOPROBIOTICS FLORA Y BIENESTAR INTESTINAL | SOBRES              | <i>L. acidophilus</i> La-14, <i>L. plantarum</i> Lp-115, <i>L. paracasei</i> Lpc-37, <i>L. rhamnosus</i> (5*10 <sup>10</sup> CFU/ sobre)  |
| 1625694                                  | AXIBOULARDI JUNIOR                          | SOBRES              | <i>Saccharomyces boulardii</i> I-3799 (5*10 <sup>9</sup> CFU/ sobre)  |
| 1553058                                  | AXIDOPHILUS JUNIOR                          | SOBRES 1,5 GR       | <i>L. casei</i> LC-1, <i>B. lactis</i> BI-04 (1*10 <sup>9</sup> CFU/ sobre)   |
| 1503565                                  | BACILAC INFANTIL                            | SOBRES              | <i>L. rhamnosus</i> GG <i>B.lactis</i> Bb-12 (3,3*10 <sup>9</sup> CFU/ sobre)   |
| 1631725                                  | BIVOS                                       | 10 MINISOBRES 1.5 G | <i>L. rhamnosus</i> GG (6*10 <sup>9</sup> CFU/ sobre)   |
| 3465229                                  | CASENBIOTIC                                 | 10 SOBRES 4 G       | <i>L. reuteri</i> (1*10 <sup>8</sup> CFU/ sobre)  |
| 2545649                                  | DIETA VIVA LACTULINE                        | 15 SOBRES 30 G      | <i>Lactobacillus</i> sp, <i>Bifidobacterium</i> sp (12*10 <sup>7</sup> CFU/g)   |
| 1502582                                  | DASYM PASCOE®                               | 50 BOLSITAS 2 G     | <i>L. acidophilus</i> , <i>B.bifidum</i> KBE (2*10 <sup>7</sup> CFU/ sobre)   |
| 1571892                                  | DON REGULO VIENTRE PLANO                    | 10 SOBRES 5 G       | <i>S.thermophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L.bulgaricus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. rhamnosus</i> (2*10 <sup>8</sup> CFU/ sobre) |
| 005279                                   | ERGYPHILUS NIÑOS                            | 14 SOBRES           | <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. fermentum</i> , <i>B.infantis</i> (3*10 <sup>9</sup> CFU/ sobre)  |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24,30,31</sup>

Tabla 4. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (sobres) (Continuación).

|         |   |                               |  |
|---------|---|-------------------------------|--|
| 1701213 | FARMAVITAL PLUS PROBIOTICO                      | 20 SOBRES                     | <i>L. rhamnosus</i> (N.d)  |
| 1707710 | FOS COMPLEX                                     | 250 GR                        | <i>L.bulgaricus</i> , <i>L.acidophilus</i> ,<br><i>S.thermophilus</i> ,<br><i>B. bifidum</i><br>(2,25*10 <sup>5</sup> CFU/ 250gr en momento de fabricación)  |
| 1686039 | INELDEA PEDIKID PROBIOTICOS 5M FLORA INTESTINAL | 10 SOBRES                     | <i>B. lactis</i><br>(5*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)  |
| 1718471 | KALEIDON 60                                     | 12 SOBRES<br>BUCODISPERSABLES | <i>L. rhamnosus</i> GG<br>(3*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)  |
| 1662743 | KALLERGEN TH                                    | 30 SOBRES                     | <i>B. lactis</i> BS0,<br><i>L. rhamnosus</i> LR05<br>(2*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)   |
| 1595867 | LACTIBIANE ENFANT PILEJE                        | 30 SOBRES<br>1G               | <i>B. longum</i> LA 101,<br><i>L. acidophilus</i> LA 102,<br><i>Lactococcus lactis</i> LA 103,<br><i>S. thermophilus</i> LA 104,<br><i>L. rhamnosus</i> GG LA 801.<br>(4*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)  |
| 1597380 | LACTIBIANE IKI PILEJE                           | 30 SOBRES                     | <i>B. lactis</i> LA 304<br><i>L. acidophilus</i> LA 201<br><i>L. salivarius</i> LA 302<br>(4*10 <sup>10</sup> CFU/sobre)   |
| 1533593 | LACTIBIANE REFERENCE PILEJE                     | 30 SOBRES<br>2,5 G            | <i>B. longum</i> LA 101,<br><i>L. acidophilus</i> LA102,<br><i>Lactococcus lactis</i> LA 103,<br><i>S.thermophilus</i> LA 104<br>(1*10 <sup>10</sup> CFU/ sobre)   |
| 1595843 | LACTIBIANE TOLERANCE PILEJE                     | 30 SOBRES<br>2,5 G            | <i>B. longum</i> LA 101,<br><i>L. acidophilus</i> LA 102,<br><i>Lactococcus lactis</i> LA 103,<br><i>S. thermophilus</i> LA 104,<br><i>L. rhamnosus</i> GG LA 801<br>(1*10 <sup>10</sup> CFU/ sobre)   |
| 1673244 | LACTIFLOR + KIDS                                | 10 SOBRES                     | <i>L.helveticus</i> ,<br><i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> ,<br><i>B. longum</i> , <i>L.acidophilus</i> ,<br><i>L. bulgaricus</i> ,<br><i>S.thermophilus</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)   |
| 1598325 | LAVIPROBIOTIC                                   | 14 SOBRES                     | <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> ,<br><i>B. longum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>L. salivarius</i> (MEGAFLORA 9®)<br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/g) |
| 1587671 | NEO-LACTOFILUS JUVENTUS                         | 10 SOBRES<br>2 G              | <i>L. acidophilus</i> R0052<br>(8*10 <sup>8</sup> CFU/sobre)   |
| 2334625 | ORSADIN PROBIOTIC MONODOSIS                     | 20 SOBRES<br>5 G              | <i>L. rhamnosus</i> GG<br>(2*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)  |
| 1689542 | PEGASTRESS                                      | 18 SOBRES<br>1,5 G            | <i>L. helveticus</i> , <i>B. longum</i> .<br>(3*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)   |
| 1672438 | POLAGEN MONODOSIS                               | 30 SOBRES<br>3 G              | <i>L. acidophilus</i> NCFM,<br><i>B. lactis</i> BL-04<br>(5*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)   |
| 1608833 | PRE PROBIOTICO                                  | 15 SOBRES                     | <i>L.bulgaricus</i> , <i>L.paracasei</i> ,<br><i>B.Lactis</i> , <i>S.thermofilus</i> ,<br><i>L.Rhamosus</i> , <i>B.bifidum</i> ,<br><i>B.Longum</i> , <i>L. Fermentum</i> ,<br><i>L. plantarum</i><br>(2,7*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)                    |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24,30,31</sup>

Tabla 4. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (sobres) (Continuación).

|         |                                      |                                   |  |
|---------|--------------------------------------|-----------------------------------|--|
| 1586360 | PRODEFEN                             | 10 SOBRES                         | <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> ,<br><i>S. thermophilus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)   |
| 1572592 | PRO-DIGEST                           | 20 SOBRES<br>2,6 G                | <i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i> ,<br><i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i><br>(N.d)  |
| 1700919 | SANDOZ BIENESTAR BIFIDUS             | 10 SOBRES                         | <i>L. acidophilus</i> LA-5,<br><i>Bifidobacterium</i> BB-12<br>(1*10 <sup>12</sup> CFU/sobre)  |
| 3003612 | SIKEN FORM VIENTRE PLANO             | 20 SOBRES<br>8 G                  | <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> ,<br><i>B. longum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> ,<br><i>L. salivarius</i> , <i>L. lactis</i><br>(N.d)   |
| 1634139 | STARDEFENSE PROBIOTICS PLUS          | 30 SOBRES                         | <i>L. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i><br>(1*10 <sup>10</sup> CFU/sobre)   |
| 1587237 | SYMBIOLACT COMP                      | 30 SOBRES<br>2 G                  | <i>L. paracasei</i> ,<br><i>L. acidophilus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>B. lactis</i><br>(2*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)  |
| 1566522 | SYMBIORAM                            | 12 SOBRES<br>2,5 G                | <i>L. rhamnosus</i><br><i>L. helveticus</i><br>(6*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)   |
| 3452328 | VITANATUR SIMBIOTICS G               | 14 SOBRES<br>2,5 G                | <i>B. lactis</i> Nizo 3680,<br><i>B. lactis</i> Nizo 3882,<br><i>B. animalis</i> Nizo 3884,<br><i>E. faecium</i> Nizo 3886,<br><i>L. faecium</i> Nizo 3891,<br><i>L. acidophilus</i> Nizo 3887,<br><i>L. casei</i> Nizo 3889,<br><i>L. plantarum</i> Nizo 3673,<br><i>L. rhamnosus</i> Nizo 3689,<br><i>L. salivarius</i> Nizo 3675<br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/g) |
| 1675477 | VITANATUR SIMBIOTICS L               | 7 SOBRES DUPLO                    |  |
| 2520240 | VSL#3                                | 10 SOBRES GRANULADOS<br>MONODOSIS | <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i><br><i>bulgaricus</i> , <i>B. longum</i> ,<br><i>B. brevis</i> , <i>B. infantis</i> ,<br><i>S. thermophilus</i><br>(4,5*10 <sup>11</sup> CFU/sobre)  |
| 1604095 | YOBALEX DIGESTIVE BALANCE POLVO ORAL | 14 SOBRES/DOSIS<br>50 G           |  |
| 1604200 | YOBALEX DIGESTIVE BALANCE POLVO ORAL | 30 SOBRES/DOSIS                   | <i>L. gasseri</i> K5, <i>B. bifidum</i><br>G9-1, <i>B. longum</i> MM-2<br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/sobre o dosis)  |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24,30,31</sup>

de liberación del principio activo tras su administración. Las razones, entre otras, se derivan del deseo de alcanzar la liberación prolongada de los compuestos altamente solubles en agua, alcanzar velocidades de liberación que responden a un objetivo dado, disminuir el número de administraciones diarias y reducir al mínimo efectos secundarios. Es por ello, que se plantea como centro de las investigaciones futuras el diseño y desarrollo de comprimidos probióticos que supongan una gran innovación en el sector y que aporten un control en la liberación del probiótico contenido.

La disponibilidad de microorganismos probióticos en gran

diversidad de alimentos, complementos alimenticios y especialidades farmacéuticas está proporcionando cambios para el consumidor y personal sanitario en cuanto a la elección del producto óptimo para una adecuada aplicación en la persona indicada.

El problema principal asociado al comercio de estos productos reside en la carencia de información suficiente en el etiquetado de muchos de ellos (UFC/uda/ g, cepas contenidas, ensayos clínicos realizados que avalen su eficacia...) siendo esto un motivo de desconfianza por parte del consumidor acerca de los beneficios sobre su

**Tabla 5. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (unidosis)**

| PROBIÓTICOS EN COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS |  |              |  |
|--|--|--------------|--|
| CÓDIGO NACIONAL                          | NOMBRE   | PRESENTACIÓN | CFU*/F. farmacéutica   |
| 1550170                                  | ARKOBIOTICS DEFENSAS ADULTOS                         | 7 UNIDOSIS   | <i>B.lactis</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> (1*10 <sup>10</sup> CFU/unidosis) |
| 1550163                                  | ARKOBIOTICS DEFENSAS NIÑOS                           | 7 UNIDOSIS   | <i>B.lactis</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> (5*10 <sup>9</sup> CFU/unidosis)  |
| 1562838                                  | ARKOPROBIOTICS ENERGIA Y DEFENSAS JALEA REAL ADULTOS | 7 UNIDOSIS   | <i>B.lactis</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> (1*10 <sup>10</sup> CFU/unidosis) |
| 1562845                                  | ARKOPROBIOTICS ENERGIA Y DEFENSAS JALEA REAL NIÑOS   | 7 UNIDOSIS   | <i>B.lactis</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> (5*10 <sup>9</sup> CFU/unidosis)  |
| 1562869                                  | ARKOPROBIOTICS VIT Y DEFENSAS ADULTOS                | 7 UNIDOSIS   | <i>B.lactis</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> (1*10 <sup>10</sup> CFU/unidosis) |
| 1562852                                  | ARKOPROBIOTICS VIT Y DEFENSAS NIÑOS                  | 7 UNIDOSIS   | <i>B.lactis</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> (5*10 <sup>9</sup> CFU/unidosis)  |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24,30</sup>**Tabla 6. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (stick).**

| PROBIÓTICOS EN COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS |  |                           |  |
|--|--|---------------------------|--|
| CÓDIGO NACIONAL                          | NOMBRE                                   | PRESENTACIÓN              | CFU*/ F. farmacéutica  |
| 1640598                                  | AQUILEA PROBIOMAX FLORA INTESTINAL NIÑOS | 7 STICKS                  | <i>L. acidophilus</i> LA02, <i>L. plantarum</i> LP01 (3*10 <sup>9</sup> CFU/stick)   |
| 1593320                                  | BACILAC INSTANT                          | 28 STICK                  | <i>L. rhamnosus</i> GG (5*10 <sup>9</sup> CFU/stick)   |
| 1617248                                  | CUME ENFANT                              | 10 STICK 1 G              | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> . (5*10 <sup>9</sup> CFU/stick) |
| 1617231                                  | CUME ENFANT                              | 30 STICKS 1 G             |  |
| 1617286                                  | CUME ENFANT PLUS                         | 30 STICKS 1 G + 60 CAPS   |  |
| 1617262                                  | CUME FLORA                               | 10 STICKS 2,5 G           | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> (10*10 <sup>9</sup> CFU/stick)   |
| 1617255                                  | CUME FLORA                               | 30 STICKS 2,5 G           |  |
| 1617279                                  | CUME FLORA PLUS                          | 30 STICKS 2,5 G + 60 CAPS |  |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24,32</sup>**Tabla 7. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (gominolas).**

| PROBIÓTICOS EN COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS |                         |              |   |
|--|-------------------------|--------------|---|
| CÓDIGO NACIONAL                          | NOMBRE                  | PRESENTACIÓN | CFU*/F. farmacéutica                            |
| 1619990                                  | CHEWY VITES PROBIOTICAS | 60 UNIDADES  | <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> (N.d) |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24</sup>

salud que ofertan. El interés por parte de la Industria Farmacéutica en el desarrollo de nuevas especialidades contenientes en microorganismos probióticos deberá ir ligado al establecimiento de una regulación para los mismos con objeto de presentar aquella información asociada a disposición del consumidor.

## CONCLUSIÓN

En base a lo anteriormente expuesto, parece claro que la utilización de microorganismos probióticos como potenciadores de la salud constituye una herramienta prometedora en el avance de diversos campos como el alimentario o el farmacéutico y con ello surge la necesidad de desarrollar nuevas especialidades farmacéuticas y otros productos portadores de los mismos. El éxito de estos microorganismos depende del medio que se utilice para administrarlos, es por ello que se debe resaltar la importancia que tienen las formas farmacéuticas en asegurar la protección de estos microorganismos en todo momento permitiendo la llegada de estos en un número suficiente al lugar de acción. Solo así se garantizará la obtención de los efectos positivos sobre la salud del consumidor, puesto que es recomendada una dosis de al menos 5 mil millones de unidades formadoras de colonias durante mínimo 5 días (5 x 10<sup>9</sup> UFC / día).

Como se ha dicho anteriormente, la demanda de estos productos probióticos está en alza, lo cual plantea un reto para la industria farmacéutica, que deberá seleccionar aquellos procesos tecnológicos y condiciones de producción adecuados a el fin de solventar los problemas asociados

Tabla 8. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (cápsulas).

| PROBIÓTICOS EN COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS |  |              |   |
|--|--|--------------|---|
| CÓDIGO NACIONAL                          | NOMBRE                                     | PRESENTACIÓN | CFU*/F. farmacéutica  |
| 3445023                                  | ACTIVECOMPLEX FLORA                        | 60 CÁPSULAS  | <i>L. acidophilus</i> (La-2),<br><i>B. animalis lactis</i> (Bb-12)<br>(4*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1706928                                  | AIRBIOTIC PROBIOTRAVEL                     | 30 CÁPSULAS  | <i>B. bifidum</i> PXN 23,<br><i>B. breve</i> PXN 25,<br><i>L. acidophilus</i> PXN 35,<br><i>L. delbrueckii ssp. Bulgaricus</i> PXN 39,<br><i>L. plantarum</i> PXN 47,<br><i>L. rhamnosus</i> PXN 54,<br><i>Saccharomyces boulardii</i> I-3799,<br><i>S. thermophilus</i> PXN 66<br>(1*10 <sup>10</sup> CFU/caps en momento fabricación) |
| 1583154                                  | AQUILEA INTIMUS                            | 30 CÁPSULAS  | <i>L. reuteri</i> RC-14,<br><i>L. rhamnosus</i> GR-1<br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1640604                                  | AQUILEA PROBIOMAX DEFENSAS ADULTOS         | 10 CÁPSULAS  | <i>L. plantarum</i> LP02,<br><i>B. lactis</i> BS01,<br><i>L. rhamnosus</i> LR04<br>(12*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1640628                                  | AQUILEA PROBIOMAX FLORA INTESTINAL ADULTOS | 10 CÁPSULAS  | <i>L. paracasei</i> LPC00,<br><i>L. rhamnosus</i> LR04<br>(6*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1609335                                  | ARKOPROBIOTICS FLORA VAGINAL               | 20 CÁPSULAS  | <i>L. acidophilus</i> La-14,<br>(2*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1520708                                  | AXIBOULARDI                                | 12 CÁPSULAS  | <i>Saccharomyces boulardii</i><br>(6*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1520685                                  | AXIDOPHILUS                                | 30 CÁPSULAS  | <i>L. lactis</i> R-1058, <i>L. casei</i> R-215,<br><i>L. acidophilus</i> R-52,<br><i>B. bifidum</i> R-71<br>(3*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1503558                                  | BACILAC FORTE                              | 30 CÁPSULAS  | <i>L. rhamnosus</i> GG,<br><i>B. lactis</i> Bb-12<br>(3,3*10 <sup>9</sup> CFU/caps)   |
| 1564238                                  | BACTOLIFE                                  | 60 CÁPSULAS  | <i>S. thermophilus</i> , <i>S. faecium</i> , <i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> ,<br><i>L. bulgaricus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i><br>(5*10 <sup>9</sup> CFU/caps)   |
| 1704603                                  | BILAMBIL                                   | 30 CÁPSULAS  | <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> ,<br><i>B. longum</i> , <i>E. faecium</i> ,<br><i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> ,<br><i>L. plantarum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. lactis</i> .<br>(MEGAFLORA 9®)<br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/g)  |
| 1520678                                  | CANDINORM                                  | 40 CÁPSULAS  | <i>Saccharomyces boulardii</i><br>I-3799, <i>L. acidophilus</i><br>LA-14<br>(6,5*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 3055482                                  | DRENAQUA                                   | 30 CÁPSULAS  | <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i><br>(N.d)  |
| 1665263                                  | DIGES CARE                                 | 30 CÁPSULAS  | <i>B. Infantis</i> 35624<br>(N.d)   |
| 1571908                                  | DON REGULO VIENTRE PLANO                   | 45 CÁPSULAS  | <i>S. thermophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. bulgaricus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> ,<br><i>L. rhamnosus</i><br>(2*10 <sup>8</sup> CFU/caps)  |
| 1673862                                  | DON REGULO VIENTRE PLANO MUJER             | 45 CÁPSULAS  | <i>Lactobacillus</i> sp.<br>(N.d)   |
| 1613264                                  | ENTERIC ECOL                               | 10 CÁPSULAS  | <i>Sacharomyces boulardii</i> ,<br><i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> ,<br><i>B. bifidum</i><br>(N.d)  |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36</sup>



Tabla 8. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (cápsulas) (Continuación).

|         |  |   |  |
|---------|--|---|--|
| 1665669 | ESENCIALIS                               | 60 CÁPSULAS   | <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-3799<br>(2,5*10 <sup>9</sup> CFU/caps)   |
| 005278  | ERGYPHILUS CONFORT                       | 60 CÁPSULAS   | <i>L. plantarum</i> ,<br><i>L. rhamnosus</i> GG,<br><i>B. longum</i> ,<br><i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i><br>(6*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 004579  | ERGYPHILUS PLUS                          | 30/60 CÁPSULAS                                      | <i>L. rhamnosus</i> GG,<br><i>L. paracasei</i> ,<br><i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidus</i><br>(6*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1652522 | FLORAGEN                                 | 30 CÁPSULAS   | <i>L. plantarum</i> F2004<br>(1,2*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1714640 | FLORALACTO ZENTRUM<br>CAPSULAS VEGETALES | 30 CÁPSULAS   | <i>L. plantarum</i><br>(12*10 <sup>12</sup> CFU/caps)  |
| 1597021 | FLORINTESTIN                             | 30 CÁPSULAS   | <i>L. rhamnosus</i> ,<br><i>L. acidophilus</i> , <i>B. longum</i><br>(N.d)   |
| 1543059 | ILITIA FLORAE                            | 30 CÁPSULAS   | <i>Lactobacillus</i> sp.<br><i>Bifidobacterium</i> sp<br>(7,5*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1586773 | IMMUNIFLOR                               | 30 CÁPSULAS   | Fermentos tinalizados (no vitales):<br><i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. plantarum</i><br><i>S.thermophilus</i><br>(2*10 <sup>9</sup> CFU/caps)   |
| 1665584 | IMMUNIUM                                 | 20 CÁPSULAS   | <i>L. rhamnosus</i><br>(1*10 <sup>8</sup> CFU/caps)  |
| 1661562 | INNEOV DIET PARTNER<br>FASE REDUCTORA    | 30 CÁPSULAS   | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LPR<br>(N.d)  |
| 1685131 | KYODOPHILUS CON<br>ENZIMAS               | 15 CÁPSULAS   | <i>L. gasseri</i> , <i>B. bifidum</i> G9-1, <i>B. longum</i><br>MM-2<br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/caps)<br><i>L. gasseri</i> , <i>B. bifidum</i> G9-1, <i>B. longum</i><br>MM-2<br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/caps) |
| 1632777 | KYODOPHILUS CON<br>ENZIMAS               | 30 CÁPSULAS   |  |
| 1685148 | KYODOPHILUS CON<br>ENZIMAS               | 60 CÁPSULAS   |  |
| 1667175 | KYODOPHILUS ONE PER<br>DAY               | 30 CÁPSULAS   | <i>L. gasseri</i> , <i>B. bifidum</i> G9-1, <i>B. longum</i><br>MM-2   |
| 1692313 | LACTANZA HEREDITUM                       | 28 CÁPSULAS   | <i>L. fermentum</i> Lc40<br>(3*10 <sup>9</sup> CFU/caps)   |
| 1631503 | LACTIBIANE PROTECT                       | 12 CÁPSULAS   | <i>L. rhamnosus</i> GG<br>(6*10 <sup>9</sup> CFU/caps)   |
| 1595874 | LACTIBIANE CANDISIS 5M<br>PILEJE         | 40 CÁPSULAS   | <i>L. helveticus</i> LA 401<br>(5*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1659552 | LACTIBIANE DEFENSAS                      | 30 CÁPSULAS   | <i>L. acidophilus</i> LA 201<br>(1*10 <sup>10</sup> CFU/caps)  |
| 1659569 | LACTIBIANE HPY                           | 14 CÁPSULAS<br>BLANCAS +<br>14 CÁPSULAS<br>MARRONES | <i>L. plantarum</i> LA 301<br><i>L.salivarius</i> LA 302<br>(1*10 <sup>10</sup> CFU/caps)  |
| 1595836 | LACTIBIANE REFERENCE<br>PILEJE           | 30 CÁPSULAS<br>2,5 G                                | <i>B. longum</i> LA 101<br><i>L.acidophilus</i> LA 102<br><i>Lactococcus lactis</i> LA 103S. <i>thermophilus</i> LA 104<br>(1*10 <sup>10</sup> CFU/caps)   |
| 1595850 | LACTIBIANE TOLERANCE<br>PILEJE           | 30 CÁPSULAS<br>2,5 G                                | <i>L. acidophilus</i> LA 201<br><i>L. plantarum</i> LA 301<br><i>L. salivarius</i> LA 302<br><i>B. lactis</i> LA 303<br><i>B. lactis</i> LA 304<br>(1*10 <sup>10</sup> CFU/caps)                             |
| 1685018 | LACTIBIANE VOYAGE                        | 14 CÁPSULAS   | <i>L. acidophilus</i> LA 201<br><i>L. casei</i> LA 205<br><i>L. plantarum</i> LA 301<br>(2*10 <sup>10</sup> CFU/caps)  |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36</sup>

Tabla 8. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (cápsulas)(Continuación).

|         |                                    |             |  |
|---------|------------------------------------|-------------|--|
| 1673237 | LACTIFLOR +                        | 30 CÁPSULAS | <i>L.bulgaricus</i><br><i>L.acidophilus</i><br><i>B.bifidum</i><br><i>B. infantis</i><br><i>B.longum</i><br><i>S.hermophilus</i><br>(4,5*10 <sup>9</sup> CFU/caps)   |
| 1679741 | LACTOFLORA PROTECTOR INMUNITARIO   | 30 CÁPSULAS | <i>L.plantarum</i> CECT 7315 y CECT 7316 (N.d)   |
| 1673183 | LACTOFLORA PROTECTOR INTIMO        | 20 CÁPSULAS | <i>L. rhamnosus</i> LCR 35 (1*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1587626 | OENOBIOLO CONFORT DIGESTIF         | 20 CÁPSULAS | <i>L. plantarum</i> LPo1,<br><i>B. breve</i> BRo3<br>(5*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1556608 | ORTHO COMPLEXE 013 BIFLORIUM       | 60 CÁPSULAS | <i>L.rhamnosus</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>B.bifidum</i> ,<br><i>L.casei</i> mínimum, <i>L.plantarum</i><br>(12*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1576811 | PEARLS ACIDOPHILUS                 | 10 CÁPSULAS | <i>L. acidophilus</i><br><i>B. longum</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1576828 | PEARLS ACIDOPHILUS                 | 30 CÁPSULAS |  |
| 1576835 | PEARLS IC                          | 10 CÁPSULAS | <i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. rhamnosus</i> , <i>B.longum</i> ,<br><i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> ,<br><i>B. lactis</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1576842 | PEARLS IC                          | 30 CÁPSULAS |  |
| 1582232 | PEARLS WINTER+                     | 10 CÁPSULAS | <i>L. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i><br><i>L. plantarum</i> , <i>B. longum</i> , (1*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1582249 | PEARLS WINTER+                     | 30 CÁPSULAS |  |
| 1582218 | PEARLS YB                          | 10 CÁPSULAS | <i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. plantarum</i><br><i>L. rhamnosus</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1582225 | PEARLS YB                          | 30 CÁPSULAS |  |
| 1672308 | PLAN H ( CHOQUE )                  | 20 CÁPSULAS | <i>L. acidophilus</i><br>(5*10 <sup>7</sup> CFU/caps)  |
| 1630582 | PRIMACOL LACTOBACILLUS AB LIFE     | 30 CÁPSULAS | <i>Lactobacillus</i> AB-Life (combinación 3 cepas<br><i>L. plantarum</i> )<br>(N.d)  |
| 1594136 | PROBIO-MIX                         | 60 CÁPSULAS | <i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. bulgaricus</i> , <i>L. paracasei</i> ,<br><i>L.thermophilus</i> , <i>L. bifidus</i><br>(6,2*10 <sup>9</sup> CFU/caps)   |
| 1544827 | PROTRANSITUS LP                    | 10 CÁPSULAS | <i>L. plantarum</i> 299v<br>(1*10 <sup>10</sup> CFU/caps)  |
| 1702760 | SANDOZ BIENESTAR LACTASA           | 30 CÁPSULAS | <i>Bacillus subtilis</i><br>(N.d)  |
| 1702739 | SANDOZ BIENESTAR LACTOBACILLUS     | 20 CÁPSULAS | <i>L. acidophilus</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1605481 | SIMBIOLINE VIENTRE PLANO           | 60 CÁPSULAS | <i>L. acidophilus</i> LA-5 <i>Bifidobacterium</i> BB-12<br>(2*10 <sup>9</sup> CFU/caps)  |
| 1647542 | SIMBIOTICO NM UNIDOSIS             | 20 CÁPSULAS | <i>Saccharomyces boulardii</i><br>(5*10 <sup>9</sup> CFU/caps)   |
| 1506894 | VSL#3                              | 10 CÁPSULAS | <i>L. casei</i> , <i>L.acidophilus</i> , <i>L.plantarum</i> ,<br><i>L.delbrueckii bulgaricus</i> , <i>B.longum</i> , <i>B.brevis</i> ,<br><i>B.infantis</i> , <i>S.thermophilus</i><br>(4,5*10 <sup>11</sup> CFU/caps) |
| 1715067 | YOBALOX DIGESTIVE BALANCE CAPSULAS | 20 CÁPSULAS | <i>L. gasseri</i> K5, <i>B. bifidum</i> G9-1, <i>B. longum</i> MM-2<br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/ dosis)  |
| 1715074 | YOBALOX DIGESTIVE BALANCE CAPSULAS | 30 CÁPSULAS |  |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36</sup>

Tabla 9. Complementos alimenticios con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia (comprimidos).

| PROBIÓTICOS EN COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS |  |                               |  |
|--|--|-------------------------------|--|
| CÓDIGO NACIONAL                          | NOMBRE   | PRESENTACIÓN                  | CFU*/F. farmacéutica   |
| 1580191                                  | ACTIDIGEST   | 40 COMPRIMIDOS                | <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. longum</i><br><i>L. acidophilus</i> ,<br>(3*10 <sup>11</sup> CFU/g)  |
| 1640581                                  | AQUILEA PROBIOMAX<br>DEFENSAS NIÑOS                    | 16 GRAGEAS                    | <i>L. rhamnosus</i> GG<br>(1,5*10 <sup>9</sup> CFU/gragea)   |
| 1562883                                  | ARKOPROBIOTICS TRANSITO<br>INTESTINAL                  | 80 COMPRIMIDOS                | <i>L. acidophilus</i> La-14<br><i>B. bifidum</i> (N.d)   |
| 1562876                                  | ARKOPROBIOTICS VIT 7<br>MINERALES DEFENSAS<br>PROPOLIS | 30 COMPRIMIDOS TRICAPA        | <i>L. acidophilus</i> ,<br><i>L. rhamnosus</i> , <i>B. longum</i><br>(1*10 <sup>7</sup> CFU/comp en el<br>momento fabricación)   |
| 153357                                   | BION ACTIVATE  | 30 COMPRIMIDOS                | <i>L. gasseri</i> , <i>B. bifidum</i><br><i>B. longum</i><br>(1*10 <sup>7</sup> CFU/comp)  |
| 462940                                   | BION JUNIOR  | 30 COMPRIMIDOS                |  |
| 151926                                   | BION PROTECT   | 30 COMPRIMIDOS                |  |
| 1520678                                  | CASENBOTIC   | 10 COMPRIMIDOS LIMÓN          | <i>L. reuteri</i><br>(1*10 <sup>8</sup> CFU/comp)  |
| 1591920                                  | CASENBOTIC   | 10 COMPRIMIDOS FRESA          |  |
| 1591937                                  | CASENBOTIC   | 30 COMPRIMIDOS LIMÓN          |  |
| 1529817                                  | DONNA PLUS MULTIFLORA-<br>11                           | 30 COMPRIMIDOS                | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> ,<br><i>L. plantarum</i> ,<br><i>L. salivarius</i> , <i>L. lactis</i> ,<br><i>Enterococcus faecium</i> , <i>B. infantis</i> ,<br><i>B. lactis</i> ,<br><i>B. longum</i> , <i>L. sporogenes</i><br>(11*10 <sup>9</sup> CFU/ comp) |
| 151912                                   | ENTERUM  | 20 COMPRIMIDOS<br>MASTICABLES | <i>Bacillus coagulans</i> , esporas vivas<br>(2*10 <sup>9</sup> CFU/comp)  |
| 3053563                                  | GUM PERIOBALANCE                                       | 30 COMPRIMIDOS                | <i>L. Reuteri Prodentis</i><br>(2*10 <sup>8</sup> CFU/ comp)   |
| 1537270                                  | INUCIL TABLETS   | 30 COMPRIMIDOS                | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> ,<br><i>B. bifidum</i> (N.d)   |
| 2651333                                  | LACTOSPORE   | 30 COMPRIMIDOS                | <i>L. sporogenes</i><br>(3*10 <sup>8</sup> esporas/comp)   |
| 1660619                                  | NUTROBAL   | 30 COMPRIMIDOS                | <i>L. sporogenes</i><br>(1*10 <sup>9</sup> CFU/comp)   |
| 1513779                                  | SIMBIOTICO NM  | 20 COMPRIMIDOS                | <i>L. bulgaricus</i> ,<br><i>S. thermophilus</i> (N.d)   |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24, 25,30, 32, 37</sup>

a la sensibilidad de estos microorganismos probióticos; garantizando finalmente una dosis óptima en cada forma farmacéutica. Se debe plantear el desarrollo de formas farmacéutica innovadoras, que supongan un avance en este ámbito, con la finalidad de controlar la liberación de la carga probiótica contenida.

No obstante, se necesita una regulación específica que establezca parámetros de seguridad, dosis y etiquetado. La regulación sobre cuestiones nutricionales y de salud existente en Europa, se espera que ayude a poner orden en las alegaciones de los productos, si bien no debería impedir el desarrollo y la innovación en el sector; debería eliminar del mercado aquellos productos que no cumplan con la definición o que reivindican beneficios sobre la salud no fundamentados permitiendo a los productos

farmacéuticos obtener el reconocimiento que merecen, basado en investigaciones realizadas.

#### AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la Farmacia Josefina Tarifa, La Rábida (Granada) por la ayuda prestada en la consecución de este trabajo.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol.* 2011; 149: 185-193.
2. Dubey AP, Rajeshwari K, Chakravarty A, Famularo G. Use

Tabla 10. Productos con microorganismos probióticos en oficinas de farmacia con aplicación urogenital.

| PROBIÓTICOS DE APLICACIÓN UROGENITAL |                       |                                       |   |
|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|---|
| CÓDIGO NACIONAL                      | NOMBRE                | PRESENTACIÓN                          | CFU*/F. Farmacéutica  |
| 168378                               | GINEGEA CANDIDA       | 5 SOBRES (STICK) + 5 FRASCOS PLÁSTICO | <i>L. fermentum</i> LF 11 <i>L. salivarius</i> CRL 1328 (1*10 <sup>9</sup> CFU/sobre)     |
| 166513                               | GYNOCAPS VAGINAL      | 14 CÁPSULAS                           | <i>Lactobacillus casei</i> variedad <i>rhamnosus</i> Döderlein (N.d)                      |
| 165249                               | GYNOPHILUS            | 14 CÁPSULAS                           | <i>Lactobacillus casei</i> variedad <i>rhamnosus</i> Döderlein (1*10 <sup>9</sup> CFU/gr) |
| 313919                               | ISADIN ALFA BARCILLUS | 6 CÁPSULAS VAGINALES                  | <i>L. plantarum</i> P17630 (N.d)  |
|                                      | LACTINEX              | 6 - 12 ÓVULOS                         | <i>L. acidophilus</i> (10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup> CFU/óvulo)                        |
| 154973                               | LACTONORM             | 10 CÁPSULAS VAGINALES                 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> CH-3 y CH-5 (N.d)  |
| 156955                               | MUVAGYN               | 10 CÁPSULAS                           | <i>L.gasseri</i> EB01<br><i>L. rhamnosus</i> PB01 (2*10 <sup>8</sup> CFU/caps)            |
| 160855                               | MUVAGYN PROBIOTICO    | 12 TAMPONES REGULAR                   | <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. gasseri</i> (Lacto Naturel® mezcla probiótica) (N.d)          |
| 160854                               | MUVAGYN PROBIOTICO    | 14 TAMPONES MINI                      |   |
| 160856                               | MUVAGYN PROBIOTICO    | 8 TAMPONES SUPER                      |   |

\*CFU (Unidades Formadoras de Colonias)<sup>24</sup>

- of VSL#3 in the treatment of rotavirus diarrhea in children: preliminary results. *J Clin Gastroenterol.* 2008; 42 (Suppl. 3 Pt 1): 126-129.
- Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, Wang Z, Miles JN, Shanman R. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2012; 307:1959-69.
  - De Vrese M, Offick B. Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics.* 2010; Chapter 14.
  - Meijer BJ, Dieleman LA. Probiotics in the treatment of human inflammatory bowel diseases. *J ClinGastroenterol.* 2011; 45: 139-144.
  - Guslandi M et al. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 2000; 45: 1462-1464.
  - Montalto M, Curigliano V, Santoro L et al. Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:187-191.
  - Gotteland M, Brunser O, Cruchet S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 23: 1077-1086.
  - Alexandre Y, Le Blay G, Boisramé-Gastrin S, Le Gall F, Héry-Arnaud G, Gouriou S, Vallet S, Le Berre R. Probiotics: A new way to fight bacterial pulmonary infections? Les probiotiques: une nouvelle armetherapeutique contre les infections respiratoires?. *Med Mal Infect.* 2014; 44: 9- 17.
  - Larsen LA, Raben A, Haulrik N, Hansen AS, Manders M, Astrop A. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr.* 2000; 54: 288-297.
  - Xiao JZ, Kondo S, Takahashi N et al. Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J Dairy Sci.* 2003; 86 (7): 2452-2461.
  - Tulika A, Satvinder S, Kumar Sharma R. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. *Nutrition.* 2013; 29: 591-596.
  - Qin J, Li Y, Cai Z, Li S et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012; 490:55-60.
  - Waligora-Dupriet AJ, Butel MJ. Microbiota and allergy: from dysbiosis to probiotics. En: Pereira C, editor. *Allergic diseases-highlights in the clinic, mechanisms and treatment.* 2012;p 413-434.
  - Ozdemir O. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. *ClinExp Immunol.* 2010; 160:295-304.
  - Bunselmeyer B, Buddendick K. Probiotics and Prebiotics—Prevention and Therapy in Atopic Eczema. *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics.* 2010
  - Serban DE. Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer letter.* 2013; 345: 258-270.
  - Iannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic

- formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition*. 2010; 29:701-725.
19. Theodorakopoulou M, Perros E, Giamarellos-Bourboulis EJ, Dimopoulos G. Controversies in the management of the critically ill: the role of probiotics. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 42S: S41-S44.
  20. Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol*. 2009; 136: 2015-2031.
  21. Huang Y, Adams MC. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int J Food Microbiol*. 2004; 91(3): 253-260.
  22. Chaikham P, Apichartsrangkoon A, Jirattananangrasi W, Van de Wiele T. Influence of encapsulated probiotics combined with pressurized longan juice on colon microflora and their metabolic activities on the exposure to simulated dynamic gastrointestinal tract. *Food Res Int*. 2012; 49: 133-142.
  23. Foligné B, Daniel C, Pot B. Probiotics from research to market: the possibilities risk and challenges. *Curr Opin Microbiol*. 2013; 16: 284-292.
  24. CIM (Centro Información Medicamento).
  25. <https://www.casenfleet.com> [consulta 10/03/2014]
  26. <https://www.salvatbiotech.com> [consulta 10/03/2014]
  27. <https://www.suplements.com> [consulta 10/03/2014]
  28. <https://www.stada.es> [consulta 10/03/2014]
  29. <https://www.sorianatural.es> [consulta 10/03/2014]
  30. <https://www.arkopharma.es> [consulta 11/03/2014]
  31. <https://www.pileje.es> [consulta 11/03/2014]
  32. <https://www.aquilea.com> [consulta 11/03/2014]
  33. <https://www.nutergia.es> [consulta 12/03/2014]
  34. <https://www.inneov.es> [consulta 12/03/2014]
  35. <https://www.dhu.es> [consulta 13/03/2014]
  36. <https://www.bayer.es> [consulta 13/03/2014]
  37. <https://www.ordesa.es> [consulta 14/03/2014]
  38. Brandy LJ, Gallaher DD, Busta FF. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J Nutr*. 2000; 130 (suppl. 2S): 410S-414S.
  39. Chen CC, Louie S, Shi HN, Walker WA. Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. *Pediatr Res*. 2005; 58: 1185-1191.
  40. De Vrese M, Offick B. Bioactive Foods in Promoting Health. Institute of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Federal Dairy Research Center, Kiel, Germany. 2005; 205- 227.
  41. Elmer GW, McFarland LV. Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. *Gastroenterol Clin*. 2001; 30: 837-854.
  42. Furré E. Probiotics and allergy. *Proc Nutr Soc*. 2005; 64:465-469.
  43. Galvez J, Comalada M, Xaus J. Prebiotics and Probiotics in Experimental Models of Rodent Colitis: Lessons in Treatment or Prevention of Inflammatory Bowel Diseases. *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*. 2010; Chapter 35.
  44. Ghadimi D, Fölster-Holst R, de Vrese M, Winkler P, Heller KJ, Scherenmeier J. Effect of probiotic bacteria and their genomic DNA on Th1/ Th2- cytokine production by peripheral blood mononuclear cells of healthy and allergic subjects. *Inmunobiology*. 2008; 213: 677-692.
  45. Guarino A, Canani NB, Spagnuolo MI. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997; 25:516-519.
  46. Homayoni A, Vaghef E, Alipoor B, Vaghef L, Javadi M. Do probiotics act more efficiently in foods than in supplements? *Nutrition*. 2012; 28: 733-736.
  47. Kalliomaki MA, Isolauri E. Probiotics and down regulation of the allergic response. *Inmunol Allergy Clin North Am*. 2004 ;24: 739-752.
  48. Kieran M, Hollie M, Chris W, Glann R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *DDT*. 2003; 8: 692- 700.
  49. Lara-Villoslada F, Olivares M, Xaus J. Safety of probiotic bacteria. *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*. 2010; 4: 47-58.
  50. Lievin L, Peiffer V, Hudault I et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*. 2000; 47: 646-652.
  51. Lin MY, Yen CL, Chen SH. Management of lactose maldigestion by consuming milk containing Lactobacilli. *Dig Dis*. 1998; 43: 133-137.
  52. López C, De la Cruz J, Urbanos C. Uso potencial de los probióticos. *FMC*. 2006; 13(10): 622-627.
  53. Madsen K, Cornish A, Soper P et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2001; 121: 580-591.
  54. Marteau P, Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003; 17: 725-740.
  55. McFarland LV. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic associated diarrhea. *Dig Dis*. 1998; 16: 292-307.
  56. Morrison D J, Mackay WG, Edwards CA et al. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: What is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br J Nutr*. 2006; 96: 570-577.
  57. Nguyen TD, Kang JH, Lee MS. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int J Food Microbiol*. 2007;

- 113: 358-361.
58. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002; 82: 279-289.
59. Patel A, Shah N, Prajapati JB. Clinical appliance of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection- a brief review. *MikrobiolZh*. 2013; XX: 1-9.
60. Podolsky DK. Inflammatory Bowel Disease. *NEnglJ Med*. 2002; 347 (6): 417-421.
61. Preidis GA, Versalovic J. Targeting the human Microbiome with antibiotics, probiotics and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology*. 2009; 136:2015-2031.
62. Ramos A, Monteoliva M, Nader FE, editores. Probióticos y salud. Parte segunda: Probióticos y Salud Humana. Capítulos 3, 4, 7, 8, 9, 15, 21, 24, 25, 26.
63. Sanders ME, Heimbach JT, Pot B et al. Health claims substantiation for probiotic and prebiotic products. *Gut microbes*. 2011; 2: 127-133.
64. Schultz M, Linde HJ, Lehn N et al. Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. *J Dairy Res*. 2003; 70: 165-173.
65. Talaie F, Atyabi F, Azjdarzadeh M, Dinarvand R, Saadatzaheh A. Overcoming therapeutic obstacles in inflammatory bowel diseases: A comprehensive review on novel drug delivery strategies. *Eur J Pharm Sci*. 2013; 49: 712-722.
66. Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci*. 2000; 81: 2336-2340.
67. Zhu Y, Luo M, Jobin C, Young H. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Letters*. 2011; 309: 119-127.
68. Zyrek A A, Cichon C, Helms S et al. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol*. 2007; 9: 804-816.

