

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de Probiótico Vaginal: Avaliação da Influência de Adjuvantes Tecnológicos e de Condições de Armazenamento sobre a Viabilidade e Propriedades do *Lactobacillus rhamnosus*

JULIANA BOEIRA DE BARCELOS

PORTO ALEGRE, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento de Probiótico Vaginal: Avaliação da Influência de Adjuvantes Tecnológicos e de Condições de Armazenamento sobre a Viabilidade e Propriedades do *Lactobacillus rhamnosus*

Dissertação apresentada por **Juliana Boeira de Barcelos** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani

Porto Alegre, 2013

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em Nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.05.2013 pela banca examinadora constituída por:

Profª Drª Leticia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª. Drª. Marilise Brittes Rott
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Barcelos, Juliana Boeira de
Desenvolvimento de probiótico vaginal: avaliação da influência de adjuvantes tecnológicos e de condições de armazenamento sobre a viabilidade e propriedades do *Lactobacillus rhamnosus*. / Juliana Boeira de Barcelos. -- 2013.
99 f.

Orientadora: Valquiria Linck Bassani.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Probiótico vaginal. 2. *Lactobacillus*. 3. Adjuvantes. 4. Propriedades probióticas. 5. Estabilidade. I. Bassani, Valquiria Linck, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos à empresa Geyer Medicamentos S.A. pelo apoio e disponibilização dos materiais necessários para a realização dos experimentos, e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela parceria na pesquisa voltada para o cenário industrial do país.

“Acredito profundamente no conhecimento como um instrumento libertador das pessoas, das organizações e da sociedade. Não existe outra maneira a não ser começar pelas pessoas.”

Vicente Falconi

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Valquiria Linck Bassani, pela confiança e, acima de tudo, pela valorização da pesquisa científica voltada para aplicação industrial.

Ao Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira, pelo exemplo acadêmico, disponibilidade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Mayorga Borges, pela oportunidade de ingressar como aluna especial do PPGCF.

Ao Diretor da Geyer Medicamentos S.A Carlos Alexandre Geyer, pelas oportunidades e pela valorização da pesquisa, desenvolvimento e inovação na Indústria Farmacêutica.

À farmacêutica e amiga Glaucia Porto Prates, pelo apoio pessoal e confiança depositada, pelo compartilhamento de sua experiência e constantes ensinamentos.

Ao farmacêutico e amigo César Augusto Braum, pelo exemplo de inovação e competência na concepção deste projeto, pelo convívio diário e colaboração na realização deste trabalho.

À Lígia Cristina Deresz e Marilene Boni, pelo suporte na execução dos experimentos.

A minha mãe, Evi, pelo apoio incondicional e por cultivar o estudo e dedicação como o melhor caminho para a realização profissional.

Ao meu irmão, Marcelo, pelo exemplo profissional e familiar.

Aos meus sobrinhos, Frederico e Felipe, pelo amor e alegria dos meus dias.

Ao meu amor Lucas, pelo apoio, respeito e valorização das minhas escolhas.

Aos meus amigos e familiares, pela força e incentivo, acreditando e me fazendo acreditar que tudo daria certo.

E, por fim, a Deus, pelas bênçãos diárias, constante renovação da fé e coragem para enfrentar os desafios.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi selecionar uma cepa do gênero *Lactobacillus* e avaliar a influência de adjuvantes e condições de armazenamento sobre sua estabilidade e propriedades, com vistas ao desenvolvimento de um medicamento probiótico destinado à via vaginal.

A complementação do resumo e o conteúdo das páginas 41 a 84, que contemplam as metodologias utilizadas, os resultados e conclusões obtidos, foram suprimidas desta versão, pelo seu caráter confidencial.

Palavras-chave: *Lactobacillus rhamnosus*, probiótico vaginal, cápsulas, maltodextrina, dióxido de silício coloidal, ácido ascórbico, viabilidade, armazenamento.

ABSTRACT

Development of Vaginal Probiotic: Evaluation of Technological Excipients and Storage Conditions on the Survival and Properties of *Lactobacillus rhamnosus*

The purpose of present work was to select a *Lactobacillus* strain and to evaluate the effect of excipients and storage conditions on its survival in order to develop a probiotic medicine for vaginal delivery.

The complementary information related to abstract and the content of pages 41 to 84, that include methodologies, results and conclusions obtained was suppressed, considering the confidential characteristic of its content.

Key Words: *Lactobacillus rhamnosus*, vaginal probiotic, capsules, maltodextrin, colloidal silicon dioxide, ascorbic acid, viability, storage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Valores de pH do meio antes e após incubação a $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, com e sem a incorporação do <i>L. rhamnosus</i> LGG ao meio (amostra e controle, respectivamente), em caldo MRS pH 4,0 (vaginal) e pH 6,5 (padrão caldo MRS).....	54
Figura 2.	Contagem em log UFC/mL do <i>L. rhamnosus</i> LGG em caldo MRS pH 4,0 (vaginal) e pH 6,5 (padrão caldo MRS), inicial e 24 horas a $37\pm 5^{\circ}\text{C}$	56
Figura 3.	Crescimento de <i>L. rhamnosus</i> e <i>C. albicans</i> em superfície de ágar MRS..	59
Figura 4.	Contagem em UFC/mL dos micro-organismos <i>L. rhamnosus</i> LGG e <i>C. albicans</i> em caldo MRS pH 6,5 (padrão caldo MRS) (A) ou em caldo MRS pH 4,0 (B), tempo inicial e após 24 horas de incubação à $37\pm 5^{\circ}\text{C}$..	60
Figura 5.	Unidades formadoras de colônia (log UFC/g) de <i>L. rhamnosus</i> LGG, após exposição do liofilizado às condições $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$, $30^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$ e refrigeração (5°C).....	63
Figura 6.	Atividade de água do liofilizado contendo o micro-organismo <i>L. rhamnosus</i> LGG, após exposição de 90 dias nas condições $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$, $30^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$ e refrigeração (5°C).....	65
Figura 7.	Fotomicrografias do liofilizado de <i>L. rhamnosus</i> inicial e após exposição de 90 dias nas condições 5°C , $30^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$ e $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$, nas ampliações de (A) x 30 e (B) x 500.....	67
Figura 8.	Contagem em log UFC/cápsula do <i>L. rhamnosus</i> LGG vinculado nas formulações F1, F2, F3 e F4 após 90 dias na condição $30^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$	73
Figura 9.	Contagem em log UFC/cápsula do <i>L. rhamnosus</i> LGG vinculado nas formulações F1 e C1 após exposição nas condições $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$, $30^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$ e refrigeração (5°C).....	74
Figura 10.	Atividade de água C1 após 30 dias a $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$, 90 dias a $30^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$ e refrigeração (5°C).....	75
Figura 11.	Atividade de água F1 após 30 dias a $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$, 90 dias a $30^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$ e refrigeração (5°C).....	76
Figura 12.	Micrografias do liofilizado de <i>L. rhamnosus</i> LGG e formulações F1 e C1 inicial (A) e após 30 dias na condição $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}$ (B).....	78
Figura 13.	Contagem em log UFC/mL <i>L. rhamnosus</i> LGG liofilizado e incorporado à formulação F1, ambos incubados em caldo MRS pH 4,0, no tempo zero e após incubação por 24 horas a $37\pm 5^{\circ}\text{C}$	79
Figura 14.	Valores de pH do meio, antes e após incubação a $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas do liofilizado de <i>L. rhamnosus</i> LGG e deste vinculado na formulação	

F1, em caldo MRS pH 4,0 (pH vaginal).....	80
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Exemplos representativos de estudos clínicos com probióticos vaginais no tratamento e prevenção de vaginose bacteriana e normalização da microbiota vaginal após tratamento convencional de vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal.....	31
Tabela 2.	Composição das formulações – variações nas concentrações de dióxido de silício coloidal e ácido ascórbico.....	47
Tabela 3.	Composição das formulações - presença ou ausência de dióxido de silício coloidal.....	48
Tabela 4.	Determinação de Peróxido de Hidrogênio nas colônias de <i>L. rhamnosus</i> crescidas em ágar MRS, inicial e após inoculação de 24 horas em pH 4,0 e 6,5.....	57
Tabela 5.	Determinação de Peróxido de Hidrogênio nas colônias de <i>L. rhamnosus</i> crescidas em ágar MRS com <i>C. albicans</i> , após inoculação em caldo MRS pH 4,0.....	62
Tabela 6.	Diferencial de crescimento do <i>L. rhamnosus</i> LGG em caldo MRS pH 4,0 em amostras recentemente preparadas e após armazenamento de 90 dias sob refrigeração.....	69
Tabela 7.	Diferencial de acidificação do caldo MRS pH 4,0 pelo <i>L. rhamnosus</i> LGG em amostras recentemente preparadas e após armazenamento de 90 dias sob refrigeração.....	69
Tabela 8.	Atividade de Água dos Diluentes.....	70
Tabela 9.	Estimativa de Distribuição do Tamanho de Partícula por Peneiras Analíticas – Maltodextrina MD10 aglomerada.....	71
Tabela 10.	Contagens do <i>L. rhamnosus</i> LGG liofilizado e vinculado na formulação F1, em caldo MRS pH 4,0, tempo zero e após incubação por 24 horas a 37±5°C.....	80
Tabela 11.	Valores de pH do caldo MRS pH 4,0 adicionado do <i>L. rhamnosus</i> na forma de liofilizado e incorporado à formulação F1, no tempo zero e após incubação por 24 horas a 37±5°C.....	81
Tabela 12.	Produção de peróxido de hidrogênio pelo <i>L. rhamnosus</i> liofilizado e incorporado à formulação F1, ambos incubados em caldo MRS pH 4,0 por 24 horas a 37±5°C.....	82

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REVISÃO DO TEMA	23
2.1	Doenças do Trato Vaginal.....	24
2.2	Microbiota Vaginal.....	25
2.3	Probióticos.....	26
2.4	Seleção do Micro-organismo.....	28
2.5	<i>Lactobacillus</i>	29
2.6	Mecanismo de Ação dos <i>Lactobacillus</i>	33
2.7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	34
2.8	Produtos probióticos.....	35
2.9	Prebióticos.....	38
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Materiais.....	42
3.2	Métodos.....	42
3.2.1	Micro-organismo <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	42
3.2.2	Propriedades do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> em pH Vaginal.....	43
3.2.3	Estudo de Estabilidade.....	45
3.2.4	Adjuvantes Farmacêuticos.....	46
3.2.5	Influência de Adjuvantes sobre a Viabilidade do <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	47
3.2.6	Efeito dos Adjuvantes nas Propriedades do <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	49
3.3	Análise Estatística.....	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Caracterização do <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	52
4.2	Propriedades do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> em pH Vaginal.....	53
4.3	Estudo de Estabilidade.....	63
4.4	Adjuvantes Farmacêuticos.....	70
4.5	Influência dos Adjuvantes nas Características do <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	72
5.	CONCLUSÕES	83
6.	REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

A composição da microbiota é um importante elemento de defesa contra infecções no trato vaginal (WITKIN *et al.*, 2007). Uma perturbação no equilíbrio da microbiota da região, colonizada, predominantemente, por lactobacilos (MASTROMARINO *et al.*, 2002; MIKELSAAR *et al.*, 2004; ZÁRATE *et al.*, 2005; ZÁRATE e NADER-MACIAS, 2006) pode levar ao crescimento exacerbado de patógenos e à ocorrência de infecções (KAEWSRICHAN *et al.*, 2006, VICARIOTTO *et al.*, 2012).

As doenças infecciosas mais comuns do trato vaginal são a vaginose bacteriana e a candidíase vaginal, acometendo cerca de um bilhão de mulheres em todo o mundo (REID *et al.*, 2004). Dados de prevalência variam de 20 a 30% para vaginose bacteriana (SANTOS *et al.*, 2006; SHOBEIRI e NAZARI, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2007; LAILA *et al.*, 2012) e de 10% a 17% para candidíase vulvovaginal (SHOBEIRI e NAZARI, 2006; BARCELOS *et al.*, 2008).

A farmacoterapêutica das doenças infecciosas urogenitais tem caráter curativo e consiste, basicamente, da administração de antibióticos e antifúngicos (SOBEL *et al.*, 1998; REID *et al.*, 2001; MITCHELL, 2004; NYIRJESY, 2008). Entretanto, estas terapias caracterizam-se pela possível ocorrência de efeitos adversos, desenvolvimento de resistência dos micro-organismos aos fármacos e suscetibilidade da microbiota vaginal normal (SOBEL *et al.*, 1998; REID *et al.*, 2004; SOBEL, 2007; NYIRJESY, 2008; MASTROMARINO *et al.*, 2009). Tais efeitos podem levar à recorrência das infecções pela persistência dos micro-organismos patogênicos no trato urogenital e ao não restabelecimento da microbiota dominante, os lactobacilos (WILSON, 2004; EHRSTROM *et al.*, 2010).

Os probióticos representam uma abordagem atual na terapia e prevenção de infecções do trato urogenital, que visa ao restabelecimento da microbiota vaginal normal, competitiva à colonização por patógenos (ELMER *et al.*, 1996), revelando-se uma promissora alternativa às terapias convencionais (REID *et al.*, 2001; MASTROMARINO *et al.*, 2002; REID *et al.*, 2004; ZÁRATE *et al.*, 2005; ZÁRATE e NADER-MACIAS, 2006). A reposição com probióticos no trato vaginal apresenta resultados satisfatórios na normalização da microbiota (REID *et al.*,

2004), sendo adequada para o tratamento sintomático local (REID e BURTON, 2002; BORBA e FERREIRA, 2003; VALENTA, 2005) e ausência de efeito de primeira passagem (REID e BURTON, 2002; TUKKER, 2002; VALENTA, 2005).

A seleção de um micro-organismo probiótico deve incluir a avaliação de suas características funcionais, como propriedades probióticas (KNORR, 1998; SAARELA *et al.*, 2000; HANSEN *et al.*, 2002), segurança, resistência ao local de ação, atividade antagonista e imunomoduladora (SAARELA *et al.*, 2000; KOSIN e RAKSHIT, 2006), assim como seus aspectos tecnológicos, como estabilidade durante processamento (HANSEN *et al.*, 2002) e estocagem (BARBÉS e BORIS, 1999; HANSEN *et al.*, 2002; ROUSSEAU *et al.*, 2005).

Os micro-organismos probióticos de escolha para o trato vaginal são os lactobacilos devido as suas propriedades probióticas já demonstradas e predominância na microbiota vaginal de mulheres saudáveis (BORIS *et al.*, 1998; AROUTCHEVA *et al.*, 2001; MASTROMARINO *et al.*, 2002; ALVAREZ-OLMOS *et al.*, 2004; MIKELSAAR *et al.*, 2004; REID *et al.*, 2004; ZÁRATE *et al.*, 2005; ZÁRATE e NADER-MACIAS, 2006; FALAGAS *et al.*, 2007).

Diante dessas considerações, o desenvolvimento de um medicamento probiótico contendo linhagens específicas de *Lactobacillus* para a prevenção e tratamento das infecções vaginais apresenta-se como uma alternativa vantajosa em relação aos tratamentos convencionais (NYIRJESY, 2008). A formulação de um probiótico deve cumprir quesitos tecnológicos e funcionais, liberando o micro-organismo da forma farmacêutica de modo satisfatório, em concentração suficiente e na sua forma ativa (ZÁRATE *et al.*, 2005), mantendo sua viabilidade e propriedades até o final do prazo de validade (REID *et al.*, 1998). Para isto, a seleção dos excipientes é uma etapa de grande importância, os quais devem proteger os lactobacilos da degradação e estimular o seu crescimento em detrimento dos patógenos no trato vaginal (REID *et al.*, 1998).

Neste contexto e considerando que as cepas bacterianas, embora de mesmo gênero e espécie, podem apresentar diferentes propriedades probióticas (ZÁRATE *et al.*, 2005; THOMAS, 2009), e que estas podem ser alteradas após veiculação da cepa numa forma farmacêutica, o presente trabalho tem por

objetivo caracterizar uma cepa de micro-organismo com relação às propriedades probióticas e estabilidade, e, posteriormente, avaliar a influência de adjuvantes sobre estas características, com vistas ao desenvolvimento de um medicamento destinado à via vaginal.

2. REVISÃO DO TEMA

2.1. Doenças do Trato Vaginal

A vaginose bacteriana é uma infecção vaginal de ocorrência comum (ALVAREZ-OLMOS *et al.*, 2004; FALAGAS *et al.*, 2007; YA *et al.*, 2010; SENOK *et al.*, 2013) e a de maior prevalência em mulheres em idade reprodutiva (LAILA *et al.*, 2012). Está relacionada a possíveis complicações ginecológicas e obstétricas, como doença inflamatória pélvica, nascimentos prematuros e aumento do risco de infecção pelo vírus HIV (ALVAREZ-OLMOS *et al.*, 2004; FALAGAS *et al.*, 2007; YA *et al.*, 2010; ODUYEBO *et al.*, 2013). É uma doença causada pelo aumento no número de patógenos presentes no meio vaginal, como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp, *Ureaplasma* e *Mycoplasma hominis*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* spp. ou outros micro-organismos anaeróbicos, muitos deles encontrados normalmente em pequenas quantidades na vagina (MIKELSAAR *et al.*, 2004; REID *et al.*, 2004; WILSON, 2004; AUSTIN *et al.*, 2005; FALAGAS *et al.*, 2007; SENOK *et al.*, 2013).

O crescimento populacional destas bactérias está associado a mudanças bioquímicas, como aumento da concentração de diaminas, poliaminas, ácidos orgânicos e várias enzimas. Os produtos destas alterações bioquímicas são responsáveis por alguns dos sintomas da doença, dentre eles o aumento no pH da região, odor desagradável no corrimento vaginal (ODUYEBO *et al.*, 2013) e alteração da microbiota vaginal normal (MASTROMARINO *et al.*, 2009; EHRSTROM *et al.*, 2010). A base da terapia da vaginose bacteriana são os antimicrobianos, tais como metronidazol, clindamicina, tinidazol, secnidazol (EHRSTROM *et al.*, 2010; ODUYEBO *et al.*, 2013).

A Candidíase vulvovaginal ocorre quando há um supercrescimento de leveduras do gênero *Candida* sp., que habitam normalmente o trato vaginal em baixas contagens (EHRSTROM *et al.*, 2010). Cerca de 75% das mulheres em idade reprodutiva apresentam pelo menos um episódio (SOBEL *et al.*, 1998; BAROUSSE *et al.*, 2001; MITCHELL, 2004; SOBEL, 2007), sendo a espécie *Candida albicans* a de maior ocorrência (SOBEL *et al.*, 1998; SOBEL, 2007; EHRSTROM *et al.*, 2010). O tratamento convencional da Candidíase vulvovaginal é realizado com a administração de antifúngicos do tipo azólicos pela via oral ou

intravaginal (EHRSTROM *et al.*, 2010; GEORGA *et al.*, 2013; MUNIRA *et al.*, 2013).

As terapias tradicionais da vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal caracterizam-se pela ocorrência de efeitos adversos (REID *et al.*, 2004; NYIRJESY, 2008; ODUYEBO *et al.*, 2013). Além disso, o desenvolvimento de resistência relacionado ao uso de antibióticos (REID e BURTON, 2002; MASTROMARINO *et al.*, 2009) e o prejuízo à microbiota vaginal normal (MASTROMARINO *et al.*, 2009) são fatores determinantes para a frequente recorrência destas infecções (REID *et al.*, 2004; SOBEL, 2007; MASTROMARINO *et al.*, 2009; EHRSTROM *et al.*, 2010). Em estudo relatado por BRADSHAW e colaboradores (2006), após 12 meses do término do tratamento com 400 mg metronidazol oral, 2 vezes ao dia, por 7 dias, 58% das 139 mulheres incluídas no estudo apresentaram recorrência de vaginose bacteriana e 69% recorrência de microbiota vaginal anormal. Noutro estudo, 119 mulheres de 18 a 45 anos com sintomas clínicos de vaginose bacteriana receberam clindamicina ou metronidazol vaginal. A resistência dos micro-organismos ao metronidazol foi de 0,3%, enquanto que, para a clindamicina, subpopulações resistentes do gênero *Prevotella* ainda persistiram no meio vaginal 90 dias após o tratamento (AUSTIN *et al.*, 2005). No caso de candidíase vulvovaginal, 5% a 8% das mulheres apresentam patologia recorrente (SOBEL, 2007).

2.2. Microbiota Vaginal

A composição da microbiota é considerada o mais importante mecanismo de defesa contra infecções no trato vaginal (WITKIN *et al.*, 2007). O metabolismo anaeróbico do glicogênio a ácido lático, pelos micro-organismos dominantes, confere à região um valor de pH na faixa de 3,5 a 4,5 (BOSKEY *et al.*, 2001; VALENTA, 2005). Esta característica ácida favorece o crescimento e sobrevivência dos micro-organismos acidófilos, principalmente os lactobacilos (MIKELSAAR *et al.*, 2004), e dificulta a proliferação da maioria dos patógenos (WITKIN *et al.*, 2007). Os baixos valores de pH favorecem a ligação dos lactobacilos à fibronectina, colaborando para a sua predominância na microbiota

vaginal saudável (MASTROMARINO *et al.*, 2002; MIKELSAAR *et al.*, 2004; ZÁRATE *et al.*, 2005; ZÁRATE e NADER-MACIAS, 2006) e colonização da região (NAGY *et al.*, 1992).

Diferentes espécies de *Lactobacillus* são encontradas no trato vaginal, e sua ocorrência varia de acordo com o local, fatores externos, geográficos, étnicos, individuais (MIKELSAAR *et al.*, 2004) e fase do ciclo menstrual (ONDERDONK *et al.*, 1986). Em sua totalidade, alcançam um número situado entre 10^8 e 10^9 UFC/mL (MIKELSAAR *et al.*, 2004) e estão em equilíbrio com diversos micro-organismos, aeróbicos ou anaeróbicos (BARBÉS e BORIS, 1999; VALENTA, 2005; VICARIOTTO *et al.*, 2012).

Assim como o valor de pH do meio, este equilíbrio é influenciado pelo uso de antimicrobianos, ocorrência de relações sexuais, uso de métodos contraceptivos, conteúdo de glicogênio das células epiteliais, níveis hormonais, pH do meio vaginal, idade e gravidez (MIKELSAAR *et al.*, 2004; VALENTA, 2005). Na gestação, por exemplo, é possível observar que a quantidade relativa de lactobacilos na microbiota vaginal aumenta na medida em que o período gestacional evolui, representando um mecanismo de proteção para o feto e neonato. Uma perturbação no equilíbrio fisiológico da microbiota vaginal pode levar ao supercrescimento de patógenos (ELMER *et al.*, 1996) e à ocorrência de infecções (KAEWSRICHAN *et al.*, 2006; VICARIOTTO *et al.*, 2012).

2.3. Probióticos

Probióticos são bactérias, especialmente do grupo do ácido láctico, e leveduras, que podem estar inseridas em alimentos, suplementos ou medicamentos (MARTEAU, 2003), definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (LEE *et al.*, 1999; REID *et al.*, 2003; MARTEAU, 2003; REID *et al.*, 2004; THOMAS, 2009; MORELLI e CAPURSO, 2012). Conforme diretrizes das organizações “World Health Organization” (WHO) e “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (FAO), quando relacionados à prevenção ou tratamento de doenças, devem ser tratados como agentes bioterapêuticos

(McFARLAND e ELMER, 1995; ELMER *et al.*, 1996; REID *et al.*, 2003; MORELLI e CAPURSO, 2012).

Os probióticos e agentes bioterapêuticos representam uma área de pesquisa em expansão (BROOKS e KALMOKOFF, 2012; FONTANA *et al.*, 2013), cujo foco inicial de prevenção e tratamento de distúrbios gastrointestinais tem se expandido para tratamento de vaginites (Ya, 2010; GEORGA *et al.*, 2013), infecções urinárias (SCHWENGER *et al.*, 2013), intolerância à lactose, melhora do sistema imune, regulação do colesterol, entre outros (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2009; BROOKS e KALMOKOFF, 2012; ALONSO e GUARNER, 2013).

Estimulando o crescimento da microbiota saudável com simultâneo reforço dos mecanismos de defesa do organismo (ANAL e SINGH, 2007), eles criam um ambiente desfavorável para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos (THOMAS, 2009) e, por isso, sua utilização na terapia e prevenção de infecções do trato vaginal tem despertado grande interesse nos últimos anos como uma promissora alternativa aos tratamentos convencionais (REID *et al.*, 2001; MASTROMARINO *et al.*, 2002; REID *et al.*, 2004; ZÁRATE *et al.*, 2005; ZÁRATE e NADER-MACIAS, 2006; REID *et al.*, 2009; EHRSTROM *et al.*, 2010; YA *et al.*, 2010; REID, 2012; GEORGA *et al.*, 2013).

A presença de múltiplos mecanismos de ação associados com organismos vivos é a principal vantagem da utilização dos probióticos sobre o tratamento farmacoterapêutico, cujo espectro de ação é mais restrito (McFARLAND e ELMER, 1995; GIL *et al.*, 2010). Esta característica, aliada ao menor potencial de efeitos adversos (MASTROMARINO *et al.*, 2009), tem sido apontada como uma vantagem em relação aos tratamentos padronizados, podendo minimizar o desenvolvimento de resistência por mutações pontuais dos agentes patogênicos (NICOLI *et al.*, 2003), que ocorrem principalmente em regimes de tratamento mais longos ou repetidos (MASTROMARINO *et al.*, 2009), e diminuir a recorrência das infecções (NYIRJESY, 2008).

Embora a literatura sugira que ainda são necessários mais estudos clínicos para estabelecer de forma conclusiva a eficácia e segurança dos

probióticos no tratamento e prevenção de vaginose bacteriana (BARRONS e TASSONE, 2008; ABIOLA *et al.*, 2011; ODUYEBO *et al.*, 2013) e candidíase vulvovaginal (ABAD e SAFDAR, 2009), os resultados dos estudos disponíveis até o momento sugerem um efeito benéfico da administração intravaginal de probióticos nas dosagens de cerca de $10^8 - 10^9$ UFC (ABIOLA *et al.*, 2011; ODUYEBO *et al.*, 2013). Estas dosagens dos estudos estão de acordo com a sugestão da literatura, de doses de aproximadamente 10^9 UFC para o efeito probiótico (DASH, 2005; ZÁRATE *et al.*, 2005).

As múltiplas interações dos micro-organismos entre si e destes com o hospedeiro contribuem para a versatilidade das propriedades probióticas, específicas de cada cepa (MARTEAU, 2003; MORELLI e CAPURSO, 2012). Os efeitos dos probióticos ou agentes bioterapêuticos podem ser diretos ou indiretos, sendo possíveis mecanismos a competição por nutrientes, promoção das defesas do hospedeiro (MARTEAU, 2003), produção de ácidos orgânicos ou outras substâncias antagonistas (MARTEAU, 2003; FARNWORTH, 2008) como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (OCAÑA *et al.*, 1999c), produção de biotensoativos, adesão e coagregação a patógenos (ROUSSEAU *et al.*, 2005).

2.4. Seleção do Micro-organismo

Para a adequada seleção de um micro-organismo probiótico, alguns critérios devem ser observados. A cepa, além de apresentar propriedades probióticas adequadas ao uso pretendido (KNORR, 1998; SAARELA *et al.*, 2000; HANSEN *et al.*, 2002), deve ter, preferencialmente, origem humana (KOSIN e RAKSHIT, 2006), considerada uma evidência de segurança de uso (SAARELA *et al.*, 2000; KOSIN e RAKSHIT, 2006). Outro importante critério de escolha do micro-organismo probiótico é a sua capacidade de colonização (SAARELA *et al.*, 2000; ALVAREZ-OLMOS e OBERHELMAN, 2001; CORCORAN *et al.*, 2004; KOSIN e RAKSHIT, 2006), característica relacionada à sobrevivência e capacidade de multiplicação da cepa nas condições específicas do local de ação (SAARELA *et al.*, 2000; KOSIN e RAKSHIT, 2006). Também são características desejáveis a um micro-organismo probiótico o antagonismo a patógenos e a

capacidade de estimulação do sistema imune do hospedeiro (SAARELA *et al.*, 2000; KOSIN e RAKSHIT, 2006).

Além da sua funcionalidade, devem ser considerados na seleção do micro-organismo os aspectos tecnológicos da cepa, tais como viabilidade de fornecimento da cultura em escala industrial (HANSEN *et al.*, 2002), resistência ao processamento (SAARELA *et al.*, 2000; KOSIN e RAKSHIT, 2006) e posterior estocagem (BARBÉS e BORIS, 1999; HANSEN *et al.*, 2002; ROUSSEAU *et al.*, 2005; KOSIN e RAKSHIT, 2006). Em produtos probióticos destinados ao trato vaginal, os micro-organismos mais comumente utilizados são os do gênero *Lactobacillus* (REID e BURTON, 2002; REID *et al.*, 2004; REID *et al.*, 2009; REID, 2012).

2.5. Lactobacillus

O gênero *Lactobacillus* é o maior dentre as Bactérias do Ácido Lático, capaz de produzir, principalmente, ácido lático a partir da fermentação de carboidratos (LEE, 1999; DASH, 2005). São micro-organismos gram-positivos, em formato de bacilos, anaeróbicos facultativos (MIKELSAAR *et al.*, 2004) ou obrigatórios (REID *et al.*, 2001), não esporulados e ácido-tolerantes (MIKELSAAR *et al.*, 2004), que incluem espécies de uma ampla variedade fenotípica, bioquímica e propriedades fisiológicas (SCHLEIFER e STACKEBRANDT, 1983).

Os *Lactobacillus* habitam a cavidade oral, o trato gastrintestinal e vaginal de humanos e animais, com o estabelecimento de importante relação simbiótica (THOMAS, 2009). A presença deste grupo bacteriano está associada à condição saudável da mulher (BRANCO, 2005), apresentando-se como uma forma não específica de defesa contra o supercrescimento de potenciais patógenos na vagina e manutenção do seu estado saudável (McLEAN e McGROARTY, 1996; OCAÑA e NADER-MACÍAS, 2002). O desequilíbrio populacional dos lactobacilos vaginais tem sido associado com um aumento de infecções genitais e urinárias (ZÁRATE *et al.*, 2005; ZÁRATE e NADER-MACIAS, 2006), como na relação inversa entre presença destes micro-organismos e a ocorrência de vaginose

bacteriana em adolescentes de 14 a 18 anos observada por ALVAREZ-OLMOS e colaboradores (2004). Em outro estudo, a porcentagem de lactobacilos na composição da microbiota vaginal foi de 29,8% nas 131 mulheres com vaginose bacteriana, frente aos 73,8% das 825 mulheres não diagnosticadas (HELLBERG *et al.*, 2001).

A eficácia probiótica da administração vaginal de lactobacilos tem sido avaliada em diversos estudos clínicos, conforme apresenta a tabela 1.

Tabela 1. Exemplos representativos de estudos clínicos com probióticos vaginais no tratamento e prevenção de vaginose bacteriana e normalização da microbiota vaginal após tratamento convencional de vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal.

Probiótico	Efeito observado	País	Referência
Cápsula intravaginal <i>L. rhamnosus</i> RG-1 <i>L.reuteri</i> RC-14 (10 ⁹ UFC)	Após 5 dias de tratamento, todas as mulheres relataram alívio nos sintomas, e, no trigésimo dia após início do tratamento, 64,7% do grupo tratado com probiótico foi curado para vaginose bacteriana, em comparação aos 33,3% do grupo tratado com metronidazol. O uso dos probióticos não foi associado a efeitos adversos.	Nigéria	ANUKAM <i>et al.</i> , 2006.
Cápsula intravaginal <i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> (8x10 ⁹ UFC)	Em mulheres com histórico de recorrência de vaginose bacteriana, a profilaxia com o probiótico resultou em menor taxa de recorrência frente ao grupo tratado com placebo, 15,8% versus 45%, e a incidência de <i>Gardnerella vaginalis</i> após 2 meses do término do tratamento foi de 3,5% e 18,3% no grupo tratado com probiótico e placebo, respectivamente. A porcentagem de mulheres que relataram novos diagnósticos de vaginose bacteriana do mês 2 até o mês 11 após o tratamento foi menor para o grupo tratado com probiótico, 10,6% versus 27,7% no grupo placebo. Não foram observados efeitos adversos.	China	WANG <i>et al.</i> , 2010.
Cápsula intravaginal	No final dos 6 meses, o grupo sem tratamento complementar com	Itália	MARCONE

<i>L. rhamnosus</i> (mínimo 4x10 ⁴ UFC)	probiótico demonstrou taxas de microbiota normal de 91%, 83% e 74% nos tempos 30, 90 e 180 dias. Esta queda na porcentagem de microbiota normal ao longo do tempo não foi observada no grupo tratado com probiótico, permanecendo próximo a 96%. A extensão da estabilização verificada com o uso do probiótico parece ser proporcional à duração do tratamento.		<i>et al.</i> , 2010.
Cápsula vaginal <i>L. gasseri</i> LN40 <i>L. fermentum</i> LN99 <i>L. rhamnosus</i> LN113 <i>P. acidilactici</i> LN23 (10 ⁸ a 10 ¹⁰ UFC)	Foi observada colonização vaginal por 1 ou 2 cepas presentes na cápsula em 89% das mulheres tratadas, após 1 a 3 dias de tratamento, permanecendo após menstruação. O grupo tratado apresentou corrimento de odor reduzido após administração do probiótico.	Suécia	EHRSTROM <i>et al.</i> , 2010.
Comprimido vaginal <i>L. rhamnosus</i> (10 ⁶ UFC)	Os valores de pH vaginal, que estavam acima de 4,5 em 36 das 40 pacientes na primeira visita, diminuíram significativamente aos 12 meses de tratamento (24 das 40 mulheres com pH<4,5) e ainda mais aos 24 meses de tratamento (32 das 40 mulheres com pH<4,5). O retorno gradual do pH fisiológico vaginal foi associado à redução das intensidades dos sintomas (coceira e queimação).	Itália	ROSSI <i>et al.</i> , 2010.

2.6. Mecanismo de Ação dos *Lactobacillus*

Diversas propriedades dos lactobacilos estão relacionadas ao seu efeito probiótico. Destacam-se a capacidade de agregação aos patógenos, que cria, ao redor destes, um ambiente no qual a concentração das substâncias inibidoras produzidas pelos lactobacilos está mais elevada (MASTROMARINO *et al.*, 2002), a adesão às células epiteliais, passo essencial para a colonização da mucosa vaginal (BORIS *et al.*, 1998; MASTROMARINO *et al.*, 2002), produção de ácidos orgânicos como o ácido lático, responsável pela redução do pH vaginal (MASTROMARINO *et al.*, 2002), produção de compostos antimicrobianos, incluindo peróxido de hidrogênio (ALVAREZ-OLMOS *et al.*, 2004), bacteriocinas (AROUTCHEVA *et al.*, 2001) e tensoativos (REID *et al.*, 2004; ZÁRATE *et al.*, 2005; ZÁRATE e NADER-MACIAS, 2006), e a atividade de modulação do sistema imune (ALVAREZ-OLMOS e OBERHELMAN, 2001; REID *et al.*, 2004). Alguns subprodutos dos lactobacilos também podem atuar na comunicação celular favorecendo a produção de muco, que atua como barreira aos patógenos, ou sinalizando para a produção de citocinas anti-inflamatórias (REID *et al.*, 2004).

Estas propriedades são responsáveis pela atividade antagonista dos probióticos frente aos micro-organismos patogênicos (BORBA e FERREIRA, 2003; REID *et al.*, 2004; MASTROMARINO *et al.*, 2009). O mecanismo por antagonismo é um dos mais citados para os probióticos e, aparentemente, o mais provável, sendo demonstrado por inúmeros trabalhos *in vitro* (NICOLI *et al.*, 2003). As substâncias inibitórias produzidas pelos lactobacilos parecem ser o mecanismo primário na manutenção do trato vaginal saudável, sendo muito provável que os 3 fatores, produção de bacteriocinas, H₂O₂ e ácidos orgânicos atuem sinergicamente (AROUTCHEVA *et al.*, 2001).

Entretanto, nem todas as cepas apresentam atividade probiótica ou mecanismos de ação semelhantes. Cada cepa deve ser avaliada especificamente (THOMAS, 2009), não sendo possível sugerir que benefícios de uma determinada cepa sejam semelhantes em outra, ainda que sejam estritamente relacionadas.

2.7. *Lactobacillus rhamnosus*

A espécie *Lactobacillus rhamnosus* é uma espécie comumente encontrada na microbiota vaginal (PETRICEVIC e WITT, 2008; ROSSI *et al.*, 2010). A cepa *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, LGG, especificamente, é um dos micro-organismos mais estudados clinicamente (BEGOVIC *et al.*, 2010) e com reconhecidos benefícios à saúde (CORCORAN *et al.*, 2004). Muito utilizada na terapia e profilaxia de distúrbios intestinais, como diarreia e colite (DUNNE *et al.*, 2001), suas propriedades probióticas intestinais fornecem indicativos de que esta cepa poderia colonizar, também, a região vaginal e reduzir o risco de infecções no local (GARDINER *et al.*, 2002).

Estudos anteriores revelam que a cepa *L. rhamnosus* LGG, de origem humana (JACOBSEN *et al.*, 1999), com conhecida capacidade de produção de peróxido de hidrogênio (McFARLAND e ELMER, 1995), atende também a outros critérios de seleção de um micro-organismo probiótico. Demonstrou, *in vitro*, capacidade de sobrevivência após 4 horas de incubação em meio ácido pH 2,5 e atividade antimicrobiana frente a patógenos como *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. flexneri* e *Y. enterocolitica*, sem entretanto, afetar outras espécies do gênero *Lactobacillus* (JACOBSEN *et al.*, 1999), característica interessante para o uso vaginal pretendido. Por não ter sido isolada do trato vaginal, a cepa poderia demonstrar dificuldade de colonização nesta região (BARBÉS e BORIS, 1999). Entretanto, em estudo realizado por GARDINER e colaboradores (2002), o *L. rhamnosus* LGG demonstrou permanecer no meio vaginal até 5 dias após o término do tratamento com cápsulas intravaginais de dose 1×10^{10} por 3 dias. Além disso, esta cepa apresenta superfície hidrofóbica, característica que promove a habilidade de auto-agregação (BARBÉS e BORIS, 1999).

A possibilidade de aplicação do *L. rhamnosus* LGG como probiótico vaginal foi evidenciada em estudo da utilização desta cepa no tratamento de vaginites recorrentes. Após a administração intravaginal de óvulos de glicerol na dose 10^9 UFC/óvulo, 2 vezes ao dia por 7 dias, todas as 28 mulheres avaliadas relataram melhora subjetiva dos sintomas de candidíase, como diminuição do eritema e do corrimento. Das 5 mulheres que apresentaram, no início do tratamento, além dos sintomas, cultura positiva para *Candida albicans*, 4

passaram a apresentar resultado de cultura negativo após a terapia (HILTON *et al.*, 1995). Por estas razões, o micro-organismo *L. rhamnosus* LGG tem sido apontado como candidato ao uso como probiótico vaginal.

2.8. Produtos Probióticos

A padronização das preparações comerciais é importante para o estabelecimento da dose, frequência e duração do tratamento, além de contribuir para a qualidade e segurança do produto (MARTEAU, 2003). A garantia de qualidade do produto probiótico final inicia com a correta identificação do micro-organismo (KOSIN e RAKSHIT, 2006), que envolve a caracterização polifásica da cepa empregada, combinando identificação fenotípica, bioquímica e genotípica (FARNWORTH, 2008). A eficácia e segurança do produto probiótico dependem, também, do controle do número de células viáveis e verificação das propriedades, tanto na matéria-prima ativa (GILLILAND e LARA, 1988; SAXELIN *et al.*, 1999) quanto no produto terminado (DUNNE *et al.*, 2001), com a garantia das especificações até o momento do uso pelo consumidor (KNORR, 1998; SAXELIN *et al.*, 1999; FARNWORTH, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Para isto, protocolos de testes *in vitro* devem ser adotados no Controle de Qualidade do produto probiótico (TUOMOLA *et al.*, 2001).

A avaliação da forma farmacêutica e estratégia de administração dos probióticos no meio vaginal representam uma importante etapa do processo de desenvolvimento do produto (VICARIOTTO *et al.*, 2012). A via vaginal é considerada a mais adequada para administração de um produto de atividade probiótica local (REID, 2000; REID e BURTON, 2002) por sua ação localizada (REID e BURTON, 2002; BORBA e FERREIRA, 2003; VALENTA, 2005; ZÁRATE *et al.*, 2005) e ausência de efeito de primeira passagem, favorecendo sua disponibilidade se comparada à administração via oral (REID e BURTON, 2002; TUKKER, 2002; VALENTA, 2005). A administração pela via intravaginal já é bem estabelecida como meio de liberação local de diversos fármacos, tais como antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, antivirais, antiinflamatórios e cicatrizantes (PRISTA *et al.*, 2003; VALENTA, 2005), principalmente no

combate às infecções do trato geniturinário feminino, no restabelecimento do estado normal da mucosa vaginal e na contracepção (ALLEN Jr *et al.*, 2007).

Os produtos probióticos disponíveis no mercado apresentam-se de diversas formas, como pós, comprimidos, cápsulas ou alimentos (BORA *et al.*, 2009). As principais formas farmacêuticas para administração de probióticos na via vaginal são os pós liofilizados em cápsulas de gelatina dura ou na forma de comprimidos vaginais (SANTIAGO *et al.*, 2009). Cápsulas probióticas vaginais são consideradas pelas pacientes, frente a cremes ou géis vaginais, uma opção de maior conforto e facilidade de uso (YA *et al.*, 2010). Em comparação com comprimidos, a vantagem das preparações na forma de cápsulas é que o seu enchimento é um processo mecânico de baixo impacto físico no material bacteriano, com menor prejuízo à viabilidade dos micro-organismos (VIERNSTEIN *et al.*, 2005).

Os probióticos são sensíveis à umidade, luz, temperatura e ao oxigênio (DASH, 2005; VIERNSTEIN *et al.*, 2005; PORUBCAN, 2006). Os micro-organismos apresentam diferentes características de estabilidade, que podem ser atribuídas ao seu comportamento cepa-dependente e às diferentes proporções de ácidos graxos da fração lipídica presente na membrana celular (TOMÁS *et al.*, 2004; ZÁRATE *et al.*, 2005). A perda de viabilidade dos micro-organismos está também relacionada ao aumento do conteúdo de água livre, que é influenciado pela exposição a condições de alta umidade (BORA *et al.*, 2009). Este parâmetro pode ser avaliado através da Atividade de Água, que avalia a porção de água não ligada e, portanto, disponível para reações químicas. Valores de atividade de água de 0,07, ou superiores, podem diminuir drasticamente a viabilidade dos micro-organismos (VIERNSTEIN *et al.*, 2005).

A sobrevivência do micro-organismo depende, também, das condições ambientais de armazenamento (DASH, 2005) e da composição do produto no qual está vinculado (MARTEAU e VESA, 1998). Por isto, a seleção dos componentes da formulação representa uma etapa de grande importância (REID *et al.*, 1998).

Um dos critérios mais importantes na seleção de adjuvantes de uma formulação probiótica é a atividade de água (CHAMPAGNE *et al.*, 1996; PICOT e LACROIX, 2004; VIERNSTEIN *et al.*, 2005; ROKKA e RANTAMÄKI, 2010). É sugerida, também, a mistura dos micro-organismos probióticos com excipientes de características adsorventes (PORUBCAN, 2006).

O dióxido de silício coloidal é um excipiente capaz de adsorver grandes quantidades de água (ROWE *et al.*, 2006, JALE *et al.*, 2007, BORA *et al.*, 2009), mantendo-a, preferencialmente, na forma ligada (BORA *et al.*, 2009). Por isso, é capaz de aumentar significativamente o seu conteúdo de umidade mantendo a atividade de água em níveis baixos (BORA *et al.*, 2009). Atua também como deslizante e promotor de fluxo, desintegrante de formas farmacêuticas sólidas e como agente de viscosidade em sistemas aquosos de pH menor que 7,5. É considerado um excipiente não irritante, relacionado pelo FDA como um ingrediente inativo em preparações vaginais (ROWE *et al.*, 2006). Como adsorvente em preparações destinadas ao trato vaginal a concentração máxima preconizada deste excipiente é de 0,5% (GARG *et al.*, 2001).

O ácido ascórbico é um agente antioxidante (CASTRO *et al.*, 1996; ROWE *et al.*, 2006; ZÁRATE e NADER-MACIAS, 2006) referido na literatura especializada como um importante excipiente em formulações probióticas. Sua atividade tem sido atribuída ao efeito preventivo sobre a oxidação dos lipídeos de membrana dos micro-organismos próbióticos (CASTRO *et al.*, 1996; ZÁRATE e NADER-MACIAS, 2006). ZÁRATE e colaboradores (2005) observaram o efeito protetor da inclusão de ácido ascórbico a 0,5% na formulação de óvulos variou entre as diferentes cepas testadas, tendo favorecido a estabilidade nas cepas *L. acidophilus* CRL 1259 e *L. paracasei* subsp. *paracasei* CRL 128. Na concentração de 2,5%, o ácido ascórbico, quando presente no meio de liofilização, isolado ou em combinação com 8% lactose, 6% de leite desnatado ou ambos, favoreceu a estabilidade, e sua associação com lactose favoreceu ainda mais no caso de cepas mais instáveis, como a *L. salivarius* CRL 1328. Não somente a viabilidade, mas as propriedades também são influenciadas pela presença de ácido ascórbico, como observado para *L. acidophilus* CRL 1259, que só manteve a produção de ácido láctico em quantidades suficientes para

inibir *E. coli* quando ácido ascórbico e lactose estavam presentes no meio, e para *L. paracasei* CRL 1289, cuja produção de H₂O₂ foi mantida até o final do estudo somente nos meios que continham ácido ascórbico.

A formulação de um probiótico deve cumprir os quesitos tecnológicos e funcionais, liberando o micro-organismo da forma farmacêutica de modo satisfatório, em concentração suficiente e na sua forma ativa (ZÁRATE *et al.*, 2005), mantendo sua viabilidade e propriedades até o final do prazo de validade (REID *et al.*, 1998; BORA *et al.*, 2009).

Considerando que o tempo de armazenamento pode interferir na habilidade dos micro-organismos em colonizar a vagina, é muito importante que os excipientes selecionados, além de proteger a estabilidade, também estimulem o crescimento dos lactobacilos de modo a manter suas propriedades (ZÁRATE e NADER-MACIAS, 2006). MASTROMARINO e colaboradores (2002), a partir de estudo de secagem de culturas de *Lactobacillus*, sugerem que a liofilização pode modificar a conformação da superfície bacteriana diminuindo sua adesividade, mas que, após cultivo, estas características são recuperadas. Além disso, o estímulo do crescimento após liberação no meio vaginal também é importante para garantir a colonização e normalização da microbiota (REID *et al.*, 1998).

2.9. Prebióticos

Os prebióticos são substâncias que estimulam, seletivamente, o crescimento ou atividade de bactérias desejáveis, com potencial de promoção da saúde do hospedeiro (KNORR, 1998; KOSIN e RAKSHIT, 2006). A interação entre o micro-organismo probiótico e a substância prebiótica, *in vivo*, pode ser favorecida por uma prévia adaptação entre eles antes do consumo ou utilização. Desta forma, a inclusão de uma matéria-prima prebiótica na formulação com o *Lactobacillus* representa uma vantagem em relação ao uso do probiótico em separado (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002).

À Maltodextrina, oligossacarídeo com propriedades prebióticas (YEO e LIONG, 2010), são atribuídas interações com componentes voláteis produzidos

pelo metabolismo dos *Lactobacillus* (CHAMPAGNE *et al.*, 1996), associados à perda de sua viabilidade (VINDEROLA *et al.*, 2002). A inclusão da maltodextrina como fonte de Carbono ao meio de crescimento de bactérias colônicas demonstrou maior produção de ácido láctico em relação às outras fontes de carbono dextrano e oligodextrano, sendo marcadamente maior em meio pH 5,5 do que em pH 6,2 e 7,1 (OLANO-MARTIN *et al.*, 2000). Outro estudo, que demonstrou, para a maltodextrina, um efeito prebiótico cepa-dependente, foi realizado por YEO e LIONG (2010), no qual foi observado o favorecimento do crescimento, particularmente, do *L. casei* ATCC 393 e *Bifidobacterium* FTDC 8943. Também foi observado significativo aumento ($p < 0,05$) na concentração de ácido láctico produzido pelas cepas *Lactobacillus* sp. FTDC 2113, *Lactobacillus acidophilus* FTDC 8033, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Bifidobacterium* FTDC 8943 e *Bifidobacterium longum* FTDC 8643.

O conteúdo das páginas 41 a 84, que contemplam as metodologias utilizadas, os resultados e conclusões obtidos, foram suprimidas desta versão pelo seu caráter confidencial.

3. REFERÊNCIAS

ABAD, C.L. and SAFDAR, N. The role of *Lactobacillus* probiotics in the treatment or prevention of urogenital infections: a systematic review (Structured abstract). *Journal of Chemotherapy*, v. 21, n. 3, p. 243-252, 2009.

ABE, F. et al. Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. *International Journal of Dairy Technology*, v.62, n. 2, p. 234-239, 2009.

ABIOLA, C. S. et al. Probiotics for the Treatment of Bacterial Vaginosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 04, p. 1-11, 2011.

ALANDER, M. et al. Persistence of Colonization of Human Colonic Mucosa by a Probiotic Strain, *Lactobacillus rhamnosus*GG, after Oral Consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 1, p. 351-354, 1999.

ALLEN Jr, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. cap. 12, p. 357-359.

ALONSO, V. R. and GUARNER, F. Linking the gut microbiota to human health. [*British Journal of Nutrition*](#), v. 109, suppl. S2, p. S21-S26, 2013.

AL-TABAKHA, M. M. HPMC Capsules: Current Status and Future Prospects. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 13, n. 3, p. 428 – 442, 2010.

ALVAREZ-OLMOS, M. I. and OBERHELMAN, R. A. Probiotics Agents and Infectious Diseases: A Modern Perspective on a Traditional Therapy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 32, p. 1567-1576, 2001.

ALVAREZ-OLMOS, M. I. et al. Vaginal Lactobacilli in Adolescents. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 31, n. 7, p. 393–400, 2004.

AMARAL, E. et al. Study of the Vaginal Tolerance to Acidform, an Acid-Buffering, Bioadhesive Gel. *Contraception*, v. 60, p. 361-366, 1999.

ANAL, A. K. and SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 240-251, 2007.

ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, v. 41, p. 184-193, 2008.

ANUKAM, K. C. et al. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes and Infection*, v. 8, p. 2772-2776, 2006.

AROUTCHEVA, A. et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 185, n. 2, p. 375-379, 2001.

AUSTIN, M.N. et al. Microbiologic Response to Treatment of Bacterial Vaginosis with Topical Clindamycin or Metronidazole. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 9, p. 4492-4497, 2005.

BARBÉS, C. and BORIS, S. Potential Role of Lactobacilli as Prophylactic Agents Against Genital Pathogens. *AIDS Patient Care and STDs*, v. 13, n. 12, p. 747, 751, 1999.

BARCELOS, M. R. B. et al. Infecções genitais em mulheres atendidas em Unidade Básica de Saúde: prevalência e fatores de risco. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 30, n. 7, p. 349-354, 2008.

BARRONS, R. and TASSONE, D. Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review (Structured abstract). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 30, n. 3, p. 453-468, 2008.

BAROUSSE, M. M. et al. Growth Inhibition of *Candida albicans* by Human Vaginal Epithelial Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 184, p. 1489-1493, 2001.

BEGOVIC, J. et al. Influence of carbohydrates on cell properties of *Lactobacillus rhamnosus*. *Central European Journal of Biology*, v. 5, n. 1, p. 103-110, 2010.

BERESWILL, S. et al. Identification of *Erwinia amylovora* by Growth Morphology on Agar Containing Copper Sulfate and by Capsule Staining with Lectin. *Plant Disease*, v. 82, n. 2, p. 158-164, 1998.

BORA, P. S.; PURI, V.; BANSAL, A. K. Physicochemical Properties and Excipient Compatibility Studies of Probiotic *Bacillus coagulans* Spores. *Scientia Pharmaceutica*, v. 77, p. 625-637, 2009.

BORBA, L. M. and FERREIRA, C. L. L. F. Probióticos em Bancos de Leite Humano. In: Ferreira, C. L. L. F.(Ed.) *Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção*. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2003, p. 104-105.

BORIS, S. et al. Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 5, p. 1985-1989, 1998.

BOSKEY, E. R. et al. Acid Production by Vaginal Flora In Vitro Is Consistent with the Rate and Extent of Vaginal Acidification. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 10, p. 5170-5175, 1999.

BOSKEY, E. R. et al. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction*, v. 16, p. 1809-1813, 2001.

BRADSHAW, C. S. et al. High Recurrence Rates of Bacterial Vaginosis over the Course of 12 Months after Oral Metronidazole Therapy and Factors Associated with Recurrence. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 193, p. 1478-1486, 2006.

BRANCO, K. M. G. R. *Bactérias do Gênero Lactobacillus Recuperadas de Pacientes com e sem Vaginose Bacteriana: Identificação Molecular e Produção de Substâncias Antagonistas*. 2005. 221 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia) – Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

BRANNAN, R. G. Effect of Grape Seed Extract on Physicochemical Properties of Ground, Salted, Chicken Thigh Meat during Refrigerated Storage at Different Relative Humidity Levels. *Journal of Food Science*, v. 73, n. 1, p. C36-C40, 2008.

BUDAVARI, S. et al. (Ed.). *The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Rahway: Merck & Co., Inc., 1989. p. 842.

BROOKS, S. P. J. and KALMOKOFF, M. L. Prebiotics and Probiotics: Some Thoughts on Demonstration of Efficacy Within the Regulatory Sphere. *Journal of AOAC International*, v. 95, n. 1, p. 2-4, 2012.

CASTRO, H.P.; TEIXEIRA, P.M.; KIRBY, R. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnology Letters*, v. 18, n. 1, p. 99-104, 1996.

CHA, K. E. and MYUNG, H. Cytotoxic Effects of Nanoparticles Assessed In Vitro and In Vivo. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.17, n. 9, p. 1573-1578, 2007.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Research International*, v. 29, n. 5-6, p. 555-562, 1996.

CHAMPAGNE, C. P. and FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 184-190, 2007.

CHANG, J. et al. In Vitro Cytotoxicity of Silica Nanoparticles at High Concentrations Strongly Depends on the Metabolic Activity Type of the Cell Line. *Environmental Science & Technology*, v. 41, n. 6, p. 2064-2068, 2007.

CORCORAN, B. M. et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, p. 1024-1039, 2004.

CRITTENDEN, R. et al. Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal Transit. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 3, p. 2280-2282, 2006.

DASH, S.K. *The Consumer's Guide to Probiotics*. Topanga: Freedom Press, 2005.

DING, W. K. and SHAH, N. P. An Improved Method of Microencapsulation of Probiotic Bacteria for Their Stability in Acidic and Bile Conditions during Storage. *Journal of Food Science*, v. 74, n. 2, p. M53-M61, 2009.

DUNNE, C. et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p. 386S–92S, 2001.

EHRSTROM, S. et al. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microbes and Infection*, v. 12, p. 691-699, 2010.

ELMER, G. W.; SURAWICZ, C. M.; McFARLAND, L. V. Biotherapeutic Agents - A Neglected Modality for the Treatment and Prevention of Selected Intestinal and Vaginal Infections. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, v. 275, p. 870-876, 1996.

FALAGAS, M.E.; BETSI, G.I.; ATHANASIOU, S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 13, p. 657-664, 2007.

FARNWORTH, E. R. The Evidence to Support Health Claims for Probiotics. *The Journal of Nutrition*, v. 138, p. 1250S–1254S, 2008.

FÁVARO-TRINDADE, C.S. and GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus*(La-05) and *B. lactis*(Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, n. 4, p. 485-494, 2002.

FELIS, G. E. and DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology*, v. 8, p. 44–61, 2007.

FONTANA, L. et al. Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, v. 109, p. S35–S50, 2013.

GARDINER, G. E. et al. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the Human Vagina as Demonstrated by Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 1, p. 92–96, 2002.

GARG, S. et al. *Compendium of Pharmaceutical Excipients for Vaginal Formulations*. Pharmaceutical Technology Drug Delivery, 2001.

GEORGA, C. et al. Treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis (thrush) (Protocol for a Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 2. Acesso em: 05 mai. 2013.

GIL, N. F. et al. Vaginal Lactobacilli as Potential Probiotics Against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 6-14, 2010.

GILLILAND, S. E. and LARA, R. C. Influence of storage at freezing and subsequent refrigeration temperatures on β -galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, p.898-902, 1988.

GOBBETTI, M. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, p. 267-274, 1998.

GOLDIN, B. R. et al. Survival of *Lactobacillus* Species (Strain GG) in Human Gastrointestinal Tract. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 37, n. 1, p. 121-128, 1992.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, p. 330-347, 2004.

GRAVER, M. A.; WADE, J. J. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 10, n. 8, 2011.

HANSEN, L. T. et al. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 35-45, 2002.

HASSLÖF, P. et al. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli - an *invitro* study. *BMC Oral Health*, v. 10, (July), p.1-6, 2010.

HELLBERG, D.; NILSSON, S.; MARDH, P. The Diagnosis of Bacterial Vaginosis and Vaginal flora Changes. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 265, n. 1, p. 11-15, 2001.

HILTON, E.; RINDOS, P.; ISENBERG, H. D. *Lactobacillus* GG Vaginal Suppositories and Vaginitis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 5, 1995.

HÖFLING, J. F. e GONÇALVES, R. B. *Microscopia de Luz em Microbiologia: Morfologia Bacteriana e Fúngica*. Porto Alegre: Artmed, 2008. p. 52. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books>> Acesso em: 20 abr. 2013.

HÜTT, P. et al. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, p. 1324-1332, 2006.

JACOBSEN, C. N. et al. Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, 1999.

JALES, S.T. et al. Formulation Technology of a Probiotic (*Zymomonasmobilis*) in Gelatinous Capsules. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 4, p. 553-557, 2007.

JONAT, S. et al. Mechanism of Glidants: Investigation of the Effect of Different Colloidal Silicon Dioxide Types on Powder Flow by Atomic Force and Scanning Electron Microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, n. 10, p. 2635-2644, 2004.

JUÁREZ TOMÁS, M. S.; BRU, E.; NADER-MACÍAS, M. E. Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 188, n. 1, p. 35-44, 2003.

KAWSRICHAN, J.; PEEYANANJARASSRI, K.; KONGPRASERTKIT, J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.48, p. 75-83, 2006.

KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, p. 295-306, 1998.

KOSIN, B. and RAKSHIT, S. K. Microbial and Processing Criteria for Production of Probiotics: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, n. 3, p. 371–379, 2006.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 3-13, 2003.

LAILA, H. et al. Vaginose Bacteriana em Mulheres em Idade Fértil e na Menopausa. In: *21º Congresso de Iniciação Científica, 4ª Mostra Científica, Universidade Federal de Pelotas, 2012, Pelotas*. Disponível em: <www.ufpel.edu.br/cic/2012/anais/pdf/CS/CS_00971.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2013.

LEE, Y. et al. *Handbook of Probiotics*. New York: John Wiley & Sons, 1999. 211 p.

LESLIE, S. B. et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 10, p. 3592-3597, 1995.

McFARLAND, L. V. and ELMER, G. W. Biotherapeutic Agents: Past, Present and Future. *Microecology and Therapy*, v. 23, p. 46-73, 1995.

McLEAN, N. W. and McGROARTY, J. A. Growth Inhibition of Metronidazole-Susceptible and Metronidazole-Resistant Strains of *Gardnerellavaginalis* by Lactobacilli In Vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 3, p. 1089-1092, 1996.

MANZONI, P. Use of *Lactobacillus casei* Subspecies *rhamnosus* GG and Gastrointestinal Colonization by *Candida* Species in Preterm Neonates. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 45, s. 3, p. S190-S194, 2007.

MARCONE, V. et al. Long-term vaginal administration of *Lactobacillus rhamnosus* as a complementary approach to management of bacterial vaginosis. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, v. 110, p. 223–226, 2010.

MARIANELLI, C.; CIFANI, N.; PASQUALI, P. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enteric* serovaryphimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Research in Microbiology*, v. 161, p. 673-680, 2010.

MARTEAU, P. and VESA, T. Pharmacokinetics of Probiotics and Biotherapeutic Agents in Humans. *Bioscience Microflora*, v. 17, n. 1, p. 1-6, 1998.

MARTEAU, P. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 17, n. 5, p. 725–740, 2003.

MARTY-TEYSSET, C.; TORRE, F.; GAREL, J. R. Increased Production of Hydrogen Peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* upon Aeration: Involvement of an NADH Oxidase in Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 262-267, 2000.

MASTROMARINO, P. et al. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 884-893, 2002.

MASTROMARINO, P. et al. Effectiveness of *Lactobacillus*-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 15, n. 1, p. 67-74, 2009.

MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 173-182, 2002.

MÄYRÄ-MÄKINEN, A. and BIGRET, M. Industrial Use and production of lactic Acid Bacteria. In: SALMINEN, S.; von WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Ed.). *Lactic Acid Bacteria – Microbiological and Functional Aspects*. 3.ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2004. p.182.

MIKELSAAR, M. et al. Human Lactic Acid Microflora and Its Role in the Welfare of the Host. In: SALMINEN, S.; von WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (Ed.). *Lactic Acid Bacteria – Microbiological and Functional Aspects*. 3.ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2004. p.455, 456, 460, 463, 486.

MITCHELL, H. Vaginal discharge - causes, diagnosis, and treatment. *ABC of sexually transmitted infections*, v. 328, p. 1306-1308, 2004.

MOMBELLI, B. and GISMONDO, M. R. The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 16, p. 531-536, 2000.

MORALES, D. K. and HOGAN, D. A. *Candida albicans* Interactions with Bacteria in the Context of Human Health and Disease. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 4, p. 1-4, 2010.

MORELLI, L. In Vitro Selection of Probiotic Lactobacilli: A Critical Appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, v. 1, n. 2, p. 59-67, 2000.

MORELLI, L. and CAPURSO, L. FAO/WHO Guidelines on Probiotics - 10 Years Later. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 46, suppl. 1, p. S1-S2, 2012.

MUNIRA, N. et al. Oral versus intra-vaginal imidazole and triazole anti-fungal treatment of uncomplicated vulvovaginal candidiasis (thrush). Cochrane Database of Systematic Reviews. In: *The Cochrane Library*, Issue 2, Art. No. CD002845. DOI: 10.1002/14651858.CD002845.pub1. Acessoem: 05 mai. 2013.

NAGY, E.; FRÖMAN, G.; MARDH, P. A. Fibronectin binding of *Lactobacillus* species isolated from women with and without bacterial vaginosis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 37, p. 38-42, 1992.

NICOLI, J.R. et al. Probióticos: Experiências com animais gnotobióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. (Ed.) *Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção*. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2003, p. 130.

NOVERR, M. C. and HUFFNAGLE, G. B. Regulation of *Candida albicans* Morphogenesis by Fatty Acid Metabolites. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 11, p. 6206-6210, 2004.

NYIRJESY, P. Vulvovaginal Candidiasis and Bacterial Vaginosis. *Infectious Diseases Clinics of North America*, v. 22, p. 637-652, 2008.

OCAÑA, V. S.; RUIZ HOLGADO, A. A. P.; NADER-MACÍAS, M. E. Characterization of a Bacteriocin-Like Substance Produced by a Vaginal *Lactobacillus salivarius* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 12, p. 5631-5635, 1999.

OCAÑA, V. S.; RUIZ HOLGADO, A. A. P.; NADER-MACÍAS, M. E. Selection of Vaginal H₂O₂-Generating *Lactobacillus* Species for Probiotic Use. *Current Microbiology*, v. 38, p. 279-284, 1999b.

OCAÑA, V. S. et al. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 45, p. 203-212, 1999c.

OCAÑA, V. S. and NADER-MACÍAS. Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregating ability. [British Journal of Biomedical Science](#), v. 59, n. 4, p. 183-190, 2002.

ODUYEBO, O. O.; ANORLU, R. I.; OGUNSOLA, F. T. The effects of antimicrobial therapy on bacterial vaginosis in non-pregnant women. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: *The Cochrane Library*, Issue 3, Art. No. CD006055. DOI: 10.1002/14651858.CD006055.pub3. Acesso em: 05 mai. 2013.

OLANO-MARTIN, E. et al. In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*, v. 83, n. 3, p. 247-255, 2000.

OLIVEIRA, A. C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, v. 24, n. 7, p. 685-693, 2007.

OLIVEIRA, R. P. S. et al. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 128, p. 467-472, 2009.

ONDERDONK, A. B. et al. Methods of quantitative and qualitative evaluation of vaginal microflora during menstruation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.51, n.2, p.333-339, 1986.

PELCZAR Jr, M. J. et al. *Microbiologia - Conceitos e Aplicações*, 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. p. 124, 126.

PETRICEVIC, L. and WITT, A. The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis. *BJOG An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 115, p. 1369–1374, 2008.

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, v. 71, p. 525-541, 1991.

PICOT, A. and LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, v. 14, p. 505-515, 2004.

PORUBCAN, R. S. *Formulations to increase in vivo survival of probiotic bacteria and extend their shelf-life*. US 7.122.370 B2, 22 dez.2003, 17 out. 2006. Disponível em: <http://www.google.com.br/patents>. Acesso em: 23 abr. 2013.

PRISTA, L. V. N. et al. *Tecnologia Farmacêutica*, v. 1. 6.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003, p. 156.

RABE, L. K. and HILLIER, S. L. Optimization of Media for Detection of Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 7, p. 3260–3264, 2003.

REID, G. et al. Effect of nutrient composition on the in vitro growth of urogenital lactobacilli and uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 44, p. 866-871, 1998.

REID, G. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM™ as a possible probiotic for the urogenital tract. *International Dairy Journal*, v. 10, p. 415-419, 2000.

REID, G. et al. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.32, p. 37-41, 2001.

REID, G. AND BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 319-324, 2002.

REID, G. et al. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 4, p. 658-672, 2003.

REID, G.; BURTON, J.; DEVILLARD, E. The Rationale for Probiotics in Female Urogenital Healthcare. *Medscape General Medicine*, v. 6, n. 1, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1140735/>>. Acesso: 06/07/11.

REID, G. The Importance of Guidelines in the Development and Application of Probiotics. *Current Pharmaceutical Design*, v. 11, p. 11-16, 2005.

REID, D. S. Water Activity: Fundamentals and Relationships. In: BARBOSA-CANOVAS, V. G. et al. *Water Activity in Foods*. Ames: IFT Press, Blackwell Publishing, 2007. p. 18-28.

REID, G.; DOLS, J.; MILLER, W. Targeting the vaginal microbiota with probiotics as a means to counteract infections. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 12, p. 583-587, 2009.

REID, G. Probiotic and Prebiotic Applications for Vaginal Health. *Journal of AOAC International*, v. 95, n. 1, p. 31-34, 2012.

RIBEIRO, A. A. et al. Agentes microbiológicos em exames citopatológicos: estudo de prevalência. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 39, n. 3, p. 179-181, 2007.

RICHARD, M. L. et al. *Candida albicans* Biofilm-Defective Mutants. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 8, p. 1493–1502, 2005.

ROKKA, S. and RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, v. 231, p. 1-12, 2010.

ROSSI, A. et al. The use of *Lactobacillus rhamnosus* in the therapy of bacterial vaginosis. Evaluation of clinical efficacy in a population of 40 women treated for

24 months. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v. 281, n. 6, p. 1065-1069, 2010.

ROUSSEAU, V. et al. Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. *Anaerobe*, v. 11, p. 145-153, 2005.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. (Ed.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 5.ed. London: Pharmaceutical Press, 2006, p. 188-191.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, v. 84, p. 197-215, 2000.

SAARELA, M. et al. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*, v. 112, p. 171-178, 2006.

SANTIAGO, G. L. S. et al. A pilot study evaluating the safety of vaginal administration of a multi-particulate pellet formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 73, p. 399-403, 2009.

SANTOS, R. C. V. et al. Prevalência de vaginoses bacterianas em pacientes ambulatoriais atendidas no Hospital Divina Providência, Porto Alegre, RS. *NewsLab*, 75.ed. p. 160-164, 2006.

SAXELIN, M.; PESSI, T.; SALMINEN, S. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* Strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *International Journal of Food Microbiology*, v.25, p. 199-203, 1995.

SAXELIN, M. et al. The technology of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, p. 387-392, 1999.

SCHLEIFER, K. H. and STACKEBRANDT, E. Molecular systematics of prokaryotes. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 37, p. 143-187, 1983.

SCHWENGER, E. M.; TEJANI, A. M.; LOEWEN, P. S. Probiotics for preventing urinary tract infections in adults and children (Protocol for a Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 2. Acessoem: 07 mai. 2013.

SENOK, A. C. et al. Probiotics for the Treatment of Bacterial Vaginosis. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: *The Cochrane Library*, Issue 2, Art. No. CD006289. DOI: 10.1002/14651858.CD006289.pub4. Acessoem: 05 mai. 2013.

SHARPE, M. E.; HILL, L. R.; LAPAGE, S. P. Pathogenic Lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology*, v. 6, p. 281-286, 1973.

SHIRTLIFF, M. E.; PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. A. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 299, n. 1, p. 1-8, 2009.

SHOBEIRI, F.; NAZARI, M.A Prospective Study of Genital Infections in Hamedan, Iran. *Literacy*, v. 37, suppl. 3, p. 174-177, 2006.

SIMARK-MATTSSON, C. et al. Final pH affects the interference capacity of naturally occurring oral *Lactobacillus* strains against mutans streptococci. *Archives of Oral Biology*, v. 54, p. 602-607, 2009.

SOBEL, J.D. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *American Journal Of Obstetrics and Gynecology*, v. 178, n. 2, p. 203-211, 1998.

SOBEL, J.D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, v. 369, p. 1961-1971, 2007.

STANIFORTH, J. Powder flow. In: Aulton, M.E. (ed.) *Pharmaceutics – The Science of Dosage Form Design*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002, p. 197.

STRUS, M. et al. The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, v. 13, n. 2, p. 69-75, 2005.

SU, L.; LIN, C.; CHEN, M. Development of an Oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. *International Journal of Dairy Technology*, v. 60, n. 1, p. 49-54, 2007.

SULTANA, K. et al. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, v. 62, p. 47-55, 2000.

TANAKA, V. A. et al. Perfil epidemiológico de mulheres com vaginose bacteriana, atendidas em um ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis, em São Paulo, SP. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 82, n. 1, p. 41-46, 2007.

THOMAS, J. G. *Probiotics – The Key to a Healthy Digestive and Immune System*. Sherman Oaks: Health Point Press, 2009.

TOMÁS, M. S. J.; OCAÑA, V. S.; NADER-MACÍAS, M. E. Viability of vaginal probiotic lactobacilli during refrigerated and frozen storage. *Anaerobe*, v. 10, p. 1-5, 2004.

TUKKER, J. Rectal and vaginal drug delivery. In: AULTON, M.E. *Pharmaceutics – The Science of Dosage Form Design*. 2.ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 2002.

TUOMOLA, E. et al. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73, p. 393S–8S, 2001.

VALENTA, C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, n. 57, p. 1692-1712, 2005.

VALLOR, A. C. et al. Factors Associated with Acquisition of, or Persistent Colonization by, Vaginal Lactobacilli: Role of Hydrogen Peroxide Production. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 184, p. 1431-1436, 2001.

VICARIOTTO, F. et al. Effectiveness of the Association of 2 Probiotic Strains Formulated in a Slow Release Vaginal Product, in Women Affected by Vulvovaginal Candidiasis - A Pilot Study. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 46, p. S73-S80, 2012.

VIERNSTEIN, H.; RAFFALT, J.; POLHEIM, D. Stabilisation of Probiotic Microorganisms - an overview of the techniques and some commercially available products. In: NEDOVIC, V.; WILLAERT, R. (Ed.). *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, v. 8B, p. 4. Dordrecht: Springer, 2005. p. 439-453.

VINDEROLA, C. G. et al. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.12, p. 579-589, 2002.

WANG, Y.; REIFER, C.; MILLER, L. E. Efficacy of vaginal probiotic capsules for recurrent bacterial vaginosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 203, n. 2, p. 120.e1-120.e6, 2010.

WARGO, M. J. and HOGAN, D. A. Fungal—bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, p. 359-364, 2006.

WEESE, J. S. and ANDERSON, M. E. C. Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 43, p. 771-774, 2002.

WESSELS, S. et al. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 10, p. 498-505, 2004.

WILKS, M. et al. Identification and H₂O₂ Production of Vaginal Lactobacilli from Pregnant Women at High Risk of Preterm Birth and Relation with Outcome. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 713-717, 2004.

WILSON, J. Managing recurrent bacterial vaginosis. *Sexually transmitted infections*, v. 80, p. 8-11, 2004.

WITKIN, S. S.; LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 21, n. 3, p. 347-354, 2007.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION. WGO Practice Guideline – Probiotics and Prebiotics. *Arabian Journal of Gastroenterology*, v. 10, n. 1, p. 33-42, 2009.

YA, W.; REIFER, C.; MILLER, L. E. Efficacy of vaginal probiotic capsules for recurrent bacterial vaginosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled

study. *American Journal of Obstetrics &Gynecology*, v. 203, p. 120.e1-120.e6, 2010.

YEO, S. and LIONG, M. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 90, p. 267-275, 2010.

YING, D. Y. et al. Tocopherol and Ascorbate Have Contrasting Effects on the Viability of Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 10556-10563, 2011.

YOUNG, G.; KRASNER, R. I.; YUDKOFISKY, P. L. Interactions of Oral Strains of *Candida albicans* and Lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, v. 72, n. 4, p. 525-529, 1956.

ZÁRATE, G.; TÓMAZ, M. S. J.; NADER-MACIAS, M. E. Effect of some pharmaceutical excipients on the survival of probiotic vaginal lactobacilli. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 6, p. 483–489, 2005.

ZÁRATE, G. and NADER-MACIAS, M.E. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. *Process Biochemistry*, v. 41.p. 1779-1785, 2006.