

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

LEANDRA SÁ DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E AVALIAÇÃO DE  
ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO VAGINAL DE  
DIFERENTES CEPAS DE *LACTOBACILLUS* SPP.**

BRASÍLIA - DF  
2022

LEANDRA SÁ DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO VAGINAL DE DIFERENTES CEPAS DE *LACTOBACILLUS* SPP.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas, Universidade de Brasília.

**Orientadora:** Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

**Co-orientador:** Profa. Dra. Lívia Custódio Pereira

BRASÍLIA - DF  
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sd	<p>Sá de Lima, Leandra DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO VAGINAL DE DIFERENTES CEPAS DE LACTOBACILLUS SPP. / Leandra Sá de Lima; orientador Yanna Karla de Medeiros Nóbrega; co orientador Livia Custódio Pereira. -- Brasília, 2022. 96 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado - Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de Brasília, 2022.</p> <p>1. Lactobacillus spp.. 2. formas farmacêuticas vaginais. 3. probióticos. 4. cápsula vaginal. 5. probiótico vaginal. I. Karla de Medeiros Nóbrega, Yanna, orient. II. Custódio Pereira, Livia, co-orient. III. Título.</p>
----	--

LEANDRA SÁ DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES PARA APLICAÇÃO VAGINAL DE DIFERENTES CEPAS DE *LACTOBACILLUS* SPP.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília.

Aprovada em 23 de maio de 2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega (UnB) - Presidente

---

Profa. Dra. – Tanise Vendruscolo Dalmolin (UnB) - Membro Interno

---

Prof. Dr. Killarney Ataíde Soares (HFAB) – Membro Externo

---

Profa. Dra. Perola de Oliveira\ Magalhães Dias Batista - Suplente

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu marido Rusbek e aos meus filhos Lorenzo e Rhanna, maiores incentivadores do meu desenvolvimento pessoal e profissional. Sem eles, talvez me faltasse a coragem de sair de tantas zonas de conforto.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a tantas pessoas que me impulsionaram ao longo da vida.

Agradeço por cada desafio que contribuiu para o meu desenvolvimento.

Agradeço por ter a curiosidade por tudo que é novo.

Mais objetivamente, agradeço à:

Dra Lívia Custódio Pereira por ter aguçado minha curiosidade no campo dos probióticos e me apresentado à Prof Yanna Nóbrega, e aqui estamos...

Agradeço à Prof. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega pelo carinho e atenção incansáveis durante todo o processo. Uma sorte ter uma orientadora dessa estirpe.

Agradeço à Dra. Rosane Mansan Almeida, a quem carinhosamente chamamos de Rô, pela padronização e suporte na execução das técnicas realizadas, sem ela a viabilidade do trabalho seria muito difícil.

Agradeço à Farmacotécnica, na pessoa de seu diretor Rogério Tokarski, pelo apoio e patrocínio a esta pesquisa, mas principalmente pelo incentivo em realizá-la.

Também preciso agradecer a inúmeros colaboradores desta empresa pela gentileza e dedicação que demonstraram em diferentes momentos da condução dos trabalhos.

## EPÍGRAFE

“As coisas tangíveis tornam-se insensíveis à palma da mão.  
Mas as coisas findas, muito mais que lindas, essas ficarão”.

Carlos Drumond de Andrade  
Poeta e Farmacêutico

## RESUMO

*Lactobacillus* spp. são os micro-organismos predominantes na microbiota vaginal e se configuram como uma possibilidade para correção das disbioses vaginais. A utilização de probióticos vaginais tem motivado o desenvolvimento de produtos para esta finalidade, que demandam a manutenção da viabilidade das cepas utilizadas para favorecer a efetividade terapêutica das formulações. Com o objetivo de avaliar a estabilidade e a viabilidade de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp., e quantificar o percentual de recuperação dessas cepas foram testadas 24 diferentes formulações contendo cinco espécies catalogadas de *Lactobacillus* spp. distribuídas em quatro diferentes formas farmacêuticas de aplicação vaginal – cápsulas vaginais, pomada vaginal, óvulos gelatinosos e óvulos cerosos. As cepas veiculadas foram: *L. crispatus* LCr86, *L. johnsonii* LJ-G55-81, *L. gasseri* LG08, *L. reuteri* LR-G100, *L. rhamnosus* LRa05 e uma composição das cinco cepas anteriores, chamada Fórmula L5. As formas farmacêuticas avaliadas, com exceção dos óvulos gelatinosos, permitiram a recuperação dos micro-organismos em concentrações que variaram de  $10^7$  a  $10^9$  UFC nos tempos da cinética estudada. Essa concentração recuperada permite a efetivação do efeito biológico da forma farmacêutica, o que viabiliza o uso e garante um prazo de validade de 60 dias destas formulações. Dos excipientes estudados, a lactose apresentou melhor estabilidade demonstrando ação prebiótica para as cepas. Embora o desenho do estudo não tenha permitido a observação de relações de competição ou sinergia entre espécies veiculadas na Fórmula L5, confirmou-se que há diversos fatores interferentes em cada preparação farmacêutica analisada, e que podem servir de subsídio para o desenvolvimento de formas farmacêuticas vaginais. Dentre as espécies estudadas *L. reuteri* e *L. rhamnosus* permitiram melhores taxas de recuperação de UFC. A pomada de *L. johnsonii*, as cápsulas de *L. gasseri* e nos óvulos de *L. crispatus*, foram verificados os piores percentuais de recuperação. As cápsulas vaginais permitiram a melhor viabilidade para *L. crispatus*, *L. rhamnosus* e para a Fórmula L5. Os óvulos cerosos favoreceram *L. johnsonii*, *L. gasseri* e *L. reuteri*. A pomada permitiu viabilidade, porém com resultados de viabilidade inferiores às cápsulas e ao óvulo ceroso. O presente estudo também corroborou a necessidade de padronização das cepas utilizadas em produtos farmacêuticos magistrais de modo a garantir sua efetividade. Novos estudos são necessários para avaliar a viabilidade de outras cepas, a utilização de outros adjuvantes técnicos, veículos ou diferentes instruções de conservação que favoreçam a atividade de probióticos, entretanto a fórmula farmacêutica de cápsula vaginal demonstra ter efetividade e ser uma excelente candidata a formulação para uso vaginal, garantindo sobrevida de *Lactobacillus* spp. veiculados.

**Palavras-Chaves:** *Lactobacillus* spp., cápsula vaginal, óvulo vaginal, probióticos, fórmula magistral



## ABSTRACT

*Lactobacillus* spp. is the predominant microorganisms in the vaginal microbiota and is configured as a possibility for the correction of vaginal dysbiosis. The use of vaginal probiotics has motivated the development of products for this purpose, which demand the maintenance of the viability of the strains used to favor the therapeutic effectiveness of the formulations. In order to evaluate the stability and also the viability of different strains of *Lactobacillus* spp., and to quantify the percentage of recovery of these strains, 24 different formulations containing five cataloged species of *Lactobacillus* spp., they were distributed in 4 different pharmaceutical forms for vaginal application: vaginal capsules, vaginal ointment, gelatinous ovules, and waxy ovules. The transmitted strains were: *L. crispatus* LCr86, *L. johnsonii* LJ-G55-81, *L. gasseri* LG08, *L. reuteri* LR-G100, *L. rhamnosus* LRa05, and a composition of the five previous strains, called Formula L5. Except for gelatinous ovules, the pharmaceutical forms evaluated allowed the recovery of microorganisms at concentrations ranging from  $10^7$  to  $10^9$  CFU at the times of the kinetics studied. This recovered concentration enables the effectiveness of the biological effect of the pharmaceutical form, which makes the use possible and guarantees a validity period of 60 days for these formulations. Of the excipients studied, lactose showed better stability, demonstrating prebiotic action for the strains. Although the study design did not allow the observation of competition or synergy relationships between species conveyed in Formula L5, it was confirmed that there are several interfering factors in each pharmaceutical preparation analyzed, and that may serve as a subsidy for the development of vaginal dosage forms. Among the studied species, *L. reuteri* and *L. rhamnosus* allowed better recovery rates of CFUs. The ointment of *L. johnsonii*, the capsules of *L. gasseri* and in the vaginal suppositories of *L. crispatus*, were verified the worst percentages of recovery. The vaginal capsules allowed the best viability for *L. crispatus*, *L. rhamnosus* and for Formula L5. The waxy ovules favored *L. johnsonii*, *L. gasseri* and *L. reuteri*. The ointment allowed viability, but with lower viability results than all other pharmaceutical forms. The present study also corroborated the need to standardize the strains used in compounding pharmaceutical products in order to guarantee their effectiveness. New studies are needed to evaluate the viability of other strains, the use of other technical adjuvants, vehicles, or different conservation instructions that favor the activity of probiotics. Vaginal use, ensuring the survival of *Lactobacillus* spp. aired

**Keywords:** *Lactobacillus* spp., vaginal capsule, vaginal ovule, probiotics, magistral formula

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabólitos biologicamente ativos produzidos pelos probióticos	18
Figura 2 – Classificação da microbiota vaginal	20
Figura 3 – Pesagem e Tamisação das cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. liofilizadas	40
Figura 4 – Processo de Encapsulação	41
Figura 5 – Processador Estatístico de Fórmulas Magistrais	43
Figura 6 - Relatório da análise realizada pelo Processador Estatístico de Fórmulas Magistrais	45
Figura 7 – Fluxograma de Certificação de Viabilidade das Cepas	48
Figura 8 – Ensaio de viabilidade das cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. recuperadas das formulações vaginais	49
Figura 9 – Fluxograma de Ensaios Microbiológicos Realizados	50
Figura 10 – Percentual de recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp. a partir da formulação de Cápsula vaginal	56
Figura 11 – Percentual de recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp. a partir da formulação de Pomada vaginal	58
Figura 12 – Percentual de recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp. a partir da formulação de Óvulo Ceroso	60
Figura 13 – Percentual de recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp. a partir da formulação de Óvulo Gelatinoso	61
Figura 14 – Percentual de recuperação de <i>L. crispatus</i> em todas as formas farmacêuticas	62
Figura 15 - Percentual de recuperação de <i>L. johnsonii</i> em todas as formas farmacêuticas	63
Figura 16 – Percentual de recuperação de <i>L. gasseri</i> em todas as formas farmacêuticas	64
Figura 17 - Percentual de recuperação de <i>L. reuteri</i> em todas as formas farmacêuticas	65
Figura 18 - Percentual de recuperação de <i>L. rhamnosus</i> em todas as formas farmacêuticas	66
Figura 19 – Percentual de recuperação da Fórmula L5 em todas as formas farmacêuticas	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação das cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. utilizadas nas formulações vaginais	37
Tabela 2 – Composição em UFCs das cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. veiculadas em cada forma farmacêutica	38
Tabela 3 – Composição das Formas Farmacêuticas Vaginais	39
Tabela 4 – Resumo dos resultados da avaliação de peso médio das cápsulas vaginais em estudo	52
Tabela 5 – Resumo dos resultados do tempo médio de desintegração das cápsulas vaginais a 37° C	53
Tabela 6 – Resultados da avaliação das características organolépticas das pomadas vaginais	53
Tabela 7 – Resultados do teste de desintegração dos óvulos cerosos	54
Tabela 8 – Resultados do teste de desintegração dos óvulos gelatinosos	55
Tabela 9 – Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL na formulação Cápsula Vaginal durante a cinética de tempo estudada	55
Tabela 10 – Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL na formulação Pomada Vaginal durante a cinética de tempo estudada	57
Tabela 11 – Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL na formulação Óvulo Ceroso durante a cinética de tempo estudada	59
Tabela 12 – Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL na formulação Óvulo gelatinoso durante a cinética de tempo estudada	60
Tabela 13 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL de <i>Lactobacillus crispatus</i> no tempo 0 a partir da forma farmacêutica cápsula vaginal em diferentes concentrações veiculadas.	68
Tabela 14 – Percentual de recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp. a partir da formulação de Cápsula Vaginal	94
Tabela 15 – Percentual de recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp. a partir da formulação de Pomada Vaginal	94
Tabela 16 – Percentual de recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp. a partir da formulação de Óvulo Ceroso	94
Tabela 17 – Percentual de recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp. a partir da formulação de Óvulo Gelatinoso	94
Tabela 18 – Percentual de recuperação de <i>L. crispatus</i> em cada formulação	94
Tabela 19 – Percentual de recuperação de <i>L. johnsonii</i> em cada formulação	95
Tabela 20 – Percentual de recuperação de <i>L. gasseri</i> em cada formulação	95

Tabela 21 – Percentual de recuperação de <i>L. reuteri</i> em cada formulação	95
Tabela 22 – Percentual de recuperação de <i>L. rhamnosus</i> em cada formulação	95
Tabela 23 – Percentual de recuperação de <i>Lactobacillus spp.</i> da Fórmula L5 em cada formulação	95
Tabela 24 – Recuperação de UFC/mL de <i>L. crispatus</i> em cada formulação	95
Tabela 25 - Recuperação de UFC/mL de <i>L. johsonii</i> em cada formulação	96
Tabela 26 - Recuperação de UFC/mL de <i>L. gasseri</i> em cada formulação	96
Tabela 27- Recuperação de UFC/mL de <i>L. reuteri</i> em cada formulação	96
Tabela 28 - Recuperação de UFC/mL de <i>L. rhamnous</i> em cada formulação	96
Tabela 29 - Recuperação de UFC/mL de <i>Lactobacillus spp.</i> da Fórmula L5 em cada formulação	96

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Limites de variação de peso médio toleráveis para cápsulas manipuladas	44
Quadro 2 – Avaliação de Validade das Fórmulas com a declaração de 1 Bilhão de UFC por dose	69
Quadro 3 – Avaliação de Validade para maior Percentual de Recuperação de UFC das Fórmulas Estudadas	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CST	<i>Community States Types</i>
CVV	Candidíase Vulvovaginal
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ISAAP	<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
MBV	Microbiota Vaginal
MRS	Meio de cultura Man Rogosa & Sharpe
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTC	<i>Over the Counter</i>
Óv.	Óvulos
TGU	Trato Gênito Urinário
UFC	Unidades Formadora de Colônia
VB	Vaginose bacteriana
VID	Vaginite Inflamatória Descamativa

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1. Probióticos e suas funções biológicas .....	16
1.2. Microbiota Vaginal Normal (Eubiose) e Disbiose .....	18
1.3. Aplicabilidade ginecológica de probióticos .....	24
1.4. Importância Econômica e Legislação.....	28
1.5. Considerações Farmacotécnicas .....	30
1.6. Formas Farmacêuticas de aplicação vaginal .....	32
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
2.1. Objetivo geral .....	36
2.2. Objetivos específicos.....	36
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
3.1. Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. utilizadas nas formulações vaginais e condições éticas .....	37
3.2. Farmacotécnica .....	38
3.2.1. Formulações Vaginais estudadas .....	38
3.3.1. Meio de cultivo de <i>Lactobacillus</i> spp.....	47
3.4 Cálculo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas por forma farmacêutica a partir do percentual recuperado.....	50
35. Análise dos dados .....	51
<b>4.RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
4.1. Avaliação Farmacotécnica das formulações Vaginais .....	52
4.1.1. Cápsulas Vaginais .....	52
4.1.2. Avaliação Organoléptica da Pomada Vaginal .....	53
4.1.3. Análise de Desintegração dos Óvulos.....	54
4.2. Avaliação Microbiológica das formulações Vaginais .....	55
4.2.1. Cápsulas Vaginais .....	55
4.2.2. Pomada Vaginal .....	56
4.2.3. Óvulo Ceroso.....	58
4.2.3. Óvulo Gelatinoso .....	60
4.3. Percentual de recuperação de <i>Lactobacillus</i> spp. por cepa em todas as formas farmacêuticas	

<b>avaliadas .....</b>	<b>61</b>
4.3.1. Percentual de recuperação de <i>L. crispatus</i> em todas as formas farmacêuticas .....	61
4.3.2. Percentual de recuperação de <i>L. johnsonii</i> em todas as formas farmacêuticas .....	62
4.3.3. Percentual de recuperação de <i>L. gasseri</i> em todas as formas farmacêuticas .....	63
4.3.4. Percentual de recuperação de <i>L. reuteri</i> em todas as formas farmacêuticas .....	64
4.3.5. Percentual de recuperação de <i>L. rhamnosus</i> em todas as formas farmacêuticas.....	65
Figura 15- Percentual de recuperação de <i>L. rhamnosus</i> em todas as formas farmacêuticas .....	66
4.3.6. Percentual de recuperação da Fórmula L5 em todas as formas farmacêuticas .....	66
<b>4.4. Avaliação do Crescimento de <i>L. crispatus</i> .....</b>	<b>67</b>
<b>4.5. Verificação de Validade Potencial das Formas Farmacêuticas Estudadas .....</b>	<b>68</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>79</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>8. APÊNDICE .....</b>	<b>94</b>



## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1. Probióticos e suas funções biológicas

A palavra probiótico é de origem grega e significa “para a vida”. O russo Eli Metchnikoff em sua Teoria da Longevidade (1907), observou a correlação entre juventude prolongada, velhice saudável e o consumo de leite fermentado na dieta de camponeses Balcãs. A pesquisa lhe rendeu o Prêmio Nobel em 1908 (KUMAR *et al.*, 2022).

Segundo *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO/ OMS) probióticos são "Micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro" (HILL *et al.*, 2014). Uma revisão de 2013 organizada pela *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) esclareceu o termo, definindo quatro características fundamentais para o enquadramento de produtos farmacêuticos como probiótico: a cepa deve estar isolada, devidamente caracterizada, viável e demonstrar benefícios à saúde (HILL *et al.*, 2014).

Um dos gêneros mais estudados entre todos os probióticos é o gênero *Lactobacillus*. Descrito pela primeira vez em 1901, o gênero *Lactobacillus* integra naturalmente micro-organismos presentes no corpo humano, agrupa mais de 260 espécies particularmente no sistema digestório e no canal vaginal. São exemplos de espécies bastante conhecidas: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri*, entre outras. Considerando outros gêneros de micro-organismos que apresentam ação probiótica, são também importantes: *Bacillus coagulans*, *Enterococcus faecium* e *Sacharomyces boulardi* (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015)

Nas últimas décadas, diversos estudos vêm demonstrando a importância da presença de probióticos em diferentes sistemas do corpo humano e seu papel na manutenção da saúde em diferentes fases da vida (DEV *et al.*, 2019; SARAF *et al.*, 2021; VERSTRAELEN *et al.*, 2022).

Muitos produtos comerciais, incluindo produtos alimentícios de várias categorias, contendo probióticos surgem diariamente no mundo, podendo conter apenas uma cepa ou a mistura de várias delas. Cada cepa possui características específicas e promove diferentes benefícios à saúde, podendo a mistura delas originar benefícios diversos

(PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015; SALMINEN *et al.*, 2021).

Diferentes funções biológicas dos probióticos estão correlacionadas aos seus benefícios, como o estímulo à microbiota natural do hospedeiro, modulação da imunidade e capacidade de favorecer a saúde intestinal (YADAV *et al.*, 2022).

Algumas das áreas de atuação beneficiadas pelos probióticos, reportados na literatura, incluem: manejo de diarreia (AGAMENNONE *et al.*, 2019; FOX *et al.*, 2015; WENUS *et al.*, 2008), intolerância à lactose (LIN; SAVAIANO; HARLANDER, 1991; PAKDAMAN *et al.*, 2016; ROŠKAR *et al.*, 2017; VITELLIO *et al.*, 2019), alergias (DEL GIUDICE *et al.*, 2017; TANIUCHI *et al.*, 2005; VAN DER AA *et al.*, 2011), constipação (IBARRA *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2020; YOON *et al.*, 2018), infecções genitais e urinárias (DONDEERS *et al.*, 2020; REID *et al.*, 2001; SANTIAGO *et al.*, 2009; STRUS *et al.*, 2012), infecção por *Helicobacter pylori* (TANG *et al.*, 2021; VIAZIS *et al.*, 2022) e parâmetros relacionados à síndrome metabólica (FEIZOLLAHZADEH *et al.*, 2017; RAZMPOOSH *et al.*, 2019; YADAV *et al.*, 2022). De tais aplicações, as que melhor estão documentadas são a capacidade intrínseca desses micro-organismos em modular a imunidade e a saúde intestinal (MIN *et al.*, 2019; SHENOY; GOTTLIEB, 2019).

Uma vez que colonizam diferentes sistemas do hospedeiro, como trato digestório, genital e urinário, os probióticos também exercem importante função de inibição do crescimento de patógenos, atividade que se dá pela produção de uma série de metabólitos ativos conhecidos como pós-bióticos. Ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e ácidos orgânicos são exemplos desses metabólitos ativos (ABD EL-GHANY; QUESNELL; SAKAI, 2022; AMMOR *et al.*, 2006; TERRAF *et al.*, 2012; THARMARAJ; SHAH, 2009).

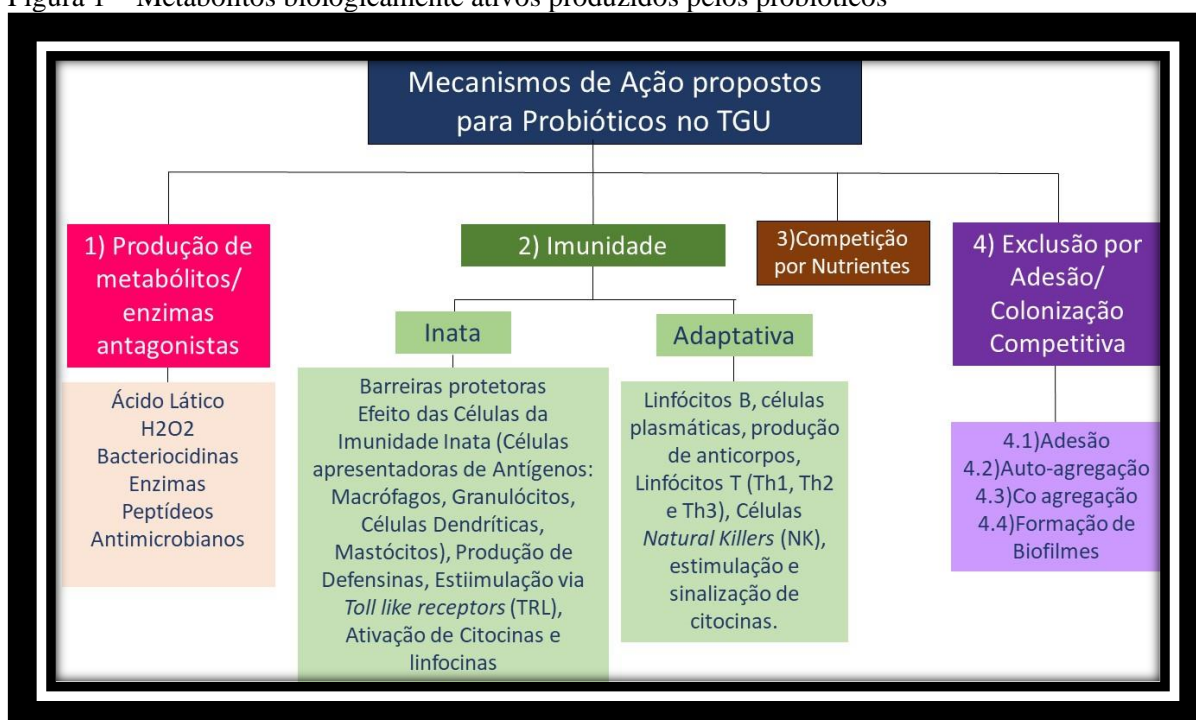
Além da produção desses metabólitos com importante função na inibição do crescimento de patógenos, outros mecanismos de ação, particularmente importantes para o trato geniturinário (TGU), vêm sendo descritos em diversas publicações, são eles: produção de biossurfactantes e enzimas (AMMOR *et al.*, 2006; DE GREGORIO *et al.*, 2020a); adesão às células epiteliais (DE GREGORIO *et al.*, 2020a; TERRAF *et al.*, 2014, 2017); composição de muco ou matriz extracelular; auto agregação e coagregação com consequente formação de biofilme na mucosa vaginal (DE GREGORIO *et al.*, 2014b; TERRAF *et al.*, 2012, 2014, 2016); exclusão competitiva tanto pela competição por nutrientes (MOON; REINBOLD, 1976; PAN *et al.*, 2020; SERVIN; COCONNIER, 2003) quanto pela adesão (NADER-MACÍAS; DE GREGORIO; SILVA, 2021; YADAV

*et al.*, 2022).

Segundo Spormann *et al* (2004), biofilmes são comunidades bacterianas estabelecidas e diferenciadas envolvidas por uma matriz protetora e adesiva (SPORMANN *et al.*, 2004). As teorias mais atuais demonstram que os biofilmes estruturados com dominância de *Lactobacillus* spp. impedem a adesão de outros micro-organismos aos tecidos e consequente desenvolvimento de patogenicidade (NADER-MACÍAS; DE GREGORIO; SILVA, 2021).

A figura 1, resume os principais mecanismos de ação propostos para os probióticos no trato geniturinário.

Figura 1 – Metabólitos biologicamente ativos produzidos pelos probióticos



Fonte: Adaptado de Nader-Macias; De Gregório; Silva, 2021

## 1.2. Microbiota Vaginal Normal (Eubiose) e Disbiose

Os micro-organismos que compõe a microbiota, específica para diferentes regiões do corpo, convivem em mutualismo com o hospedeiro, de onde obtêm nutrientes e um ambiente propício ao seu desenvolvimento enquanto o protegem de uma variedade de patógenos atuando como primeira linha de defesa contra micro-organismos invasores (MARCHESI; RAVEL, 2015; RAVEL *et al.*, 2011; SARAF *et al.*, 2021;

VERSTRAELEN *et al.*, 2022)

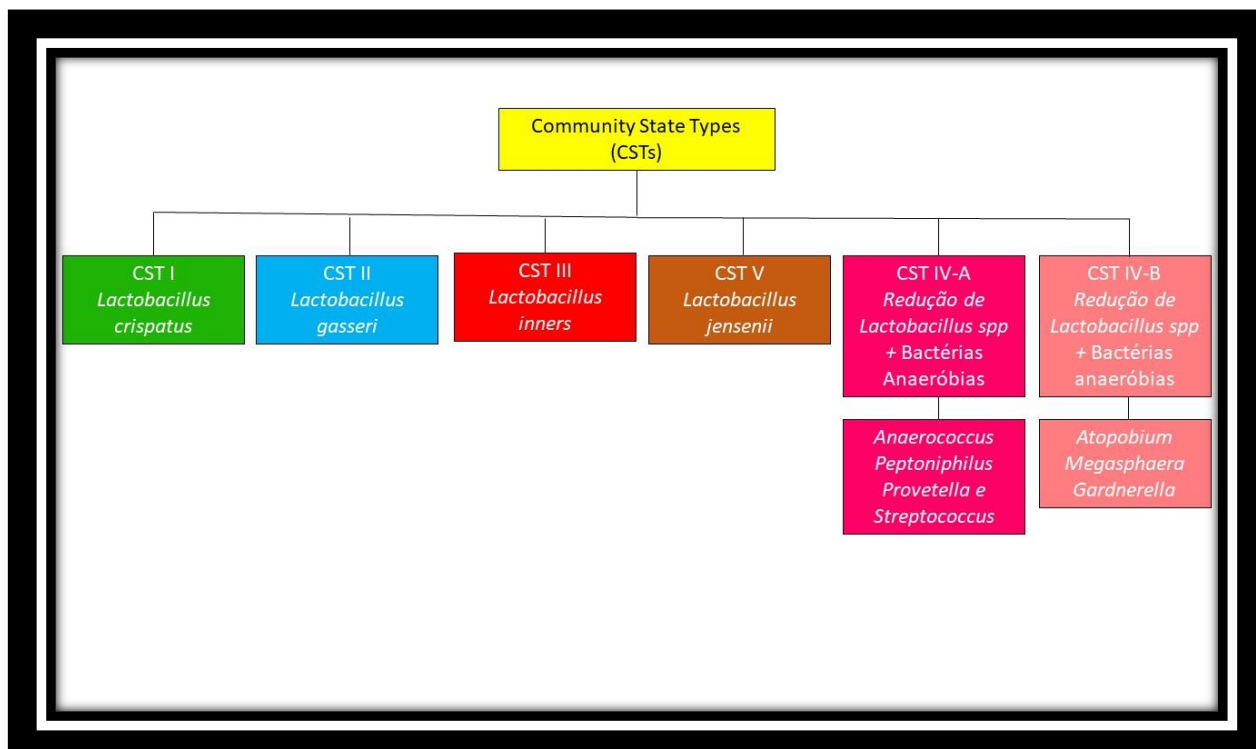
Estima-se que a microbiota vaginal corresponda a aproximadamente 9% de toda a microbiota humana (SIROTA; ZAREK; SEGARS, 2014) e desempenhe um papel fundamental neste microambiente, com capacidade de regular suas características bioquímicas e imunológicas, reagindo de diferentes maneiras frente às modificações no ambiente vaginal.

Entre as funções biológicas mais importantes da microbiota vaginal, há que se destacar a atuação como fator protetor contra as Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) e neoplasias do trato genital, principalmente aquelas induzidas pelo HPV (BROTMAN *et al.*, 2014; DI PAOLA *et al.*, 2017; MITRA *et al.*, 2016) e a manutenção do equilíbrio favorável à função reprodutiva (VERSTRAELEN *et al.*, 2022).

Nas últimas duas décadas muitos estudos utilizando técnicas moleculares foram realizados, no intuito de caracterizar a microbiota vaginal, o que demonstrou a importância de espécies anteriormente negligenciadas. As técnicas de sequenciamento genético trouxeram velocidade, acurácia e descrição compreensiva das comunidades microbianas (NADER-MACÍAS; DE GREGORIO; SILVA, 2021; VERSTRAELEN *et al.*, 2022).

Ravel *et al.* (2011) avaliaram um grupo de 396 mulheres norte americanas assintomáticas representativas de quatro grupos étnicos. O estudo formalizou a classificação de cinco grupos de acordo com os *clusters* observados. Quatro grupos eram dominados por *Lactobacillus inners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* ou *L. jensenii* respectivamente. Um grupo apresentava pequenas quantidades de *Lactobacillus* spp. e alta proporção de organismos estritamente anaeróbicos. Além da proposição da classificação (figura 2), ficaram também documentadas diferenças étnicas em relação à composição da microbiota, bem como variações estatisticamente significativas de pH do meio vaginal (RAVEL *et al.*, 2011).

Figura 2 - Classificação da microbiota vaginal



Fonte: Adaptado de (BROTMAN *et al.*, 2014; MITRA *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2021; RAVEL *et al.*, 2011)

Na Fig. 2 é resumida a atual classificação vigente dos tipos de microbiotas comuns. De acordo com a classificação da CSTs temos que CST I, II, e V correspondem a microbiota considerada saudável. CST III, dominada por *L. inners*, configura um estado indicativo de possível disbiose em evolução. Isso se deve ao fato de que *L. inners* produz pequena quantidade de ácido láctico, o que eleva o pH do meio, reduzindo o papel protetor da microbiota local. Ambas as classificações de CST IV, muitas vezes presentes em mulheres assintomáticas, configuram um estado disbiótico favorável a consequências indesejáveis (BROTMAN *et al.*, 2014; MITRA *et al.*, 2016; RAVEL *et al.*, 2011).

A Classificação CST só foi possível a partir do avanço nas técnicas analíticas moleculares, com as quais é possível identificar e quantificar o número de microorganismos presentes na microbiota vaginal. Enquanto não é ainda uma técnica de fácil acesso diagnóstico em todo mundo, outras técnicas diagnósticas continuam sendo usadas. A coloração de Gram em esfregaços vaginais frescos é por exemplo a técnica mais utilizada para avaliação de Vaginose Bacteriana (VB).

A interpretação da leitura do Gram foi substancialmente melhorada pela avaliação dos resultados pelo sistema Nugent. A avaliação consiste em avaliar 3 morfotipos bacterianos presentes na amostra: bacilos Gram positivos, pequenos cocobacilos Gram

variáveis e bacilos curvos Gram negativos. De acordo com o número de cada morfotipo encontrado, atribui-se uma pontuação. Escores maiores ou iguais a 7,0 configuram a VB (NUGENT; KROHN; HILLIER, 1991).

Atualmente é reconhecido que, embora as espécies citadas componham a microbiota vaginal das mulheres predominantemente caucasianas, diferenças étnicas são notáveis podendo-se observar variações na composição qualitativa de *Lactobacillus* spp. presentes na microbiota vaginal de mulheres de subpopulações regionais (PETROVA *et al.*, 2015; VERSTRAELEN *et al.*, 2022).

Nas revisões mais atuais, embora o modelo proposto continue válido, considera-se que a microbiota vaginal é variável durante as fases da vida da mulher e do próprio período do ciclo menstrual em que ela se encontra. A menstruação se configura como o maior fator perturbador da composição da microbiota vaginal, com redução das quantidades de *Lactobacillus* spp. A microbiota dominada por *Lactobacillus* spp. é considerada como estado desejável, favorecendo a saúde íntima da mulher (VERSTRAELEN *et al.*, 2022).

Dentre as espécies de *Lactobacillus* spp. presentes na microbiota vaginal, o *L. inners* comporta-se como um marcador de transição, pois quando em predomínio, por ter menor capacidade de produção de ácido láctico, promove um aumento do pH local, sendo assim, menos eficiente em impedir o desenvolvimento de patógenos. Uma população predominante em *L. inners* é facilmente encontrada no período menstrual ou nas Vaginoses e/ou Vaginites Bacterianas (VB). Outros 25 a 30% das mulheres apresentam uma MBV dominada por bactérias ácido lácticas não descritas na literatura (PETROVA *et al.*, 2015; VERSTRAELEN *et al.*, 2022).

Além das modificações observadas durante o ciclo menstrual, a microbiota vaginal também muda com a idade. Na fase pré-puberal observa-se o domínio por microorganismos anaeróbicos que evolui para um ambiente dominado por *Lactobacillus* spp. na fase reprodutiva, e retorna à redução de variedade e número após a menopausa (AL-MEMAR *et al.*, 2020; BROWN *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2018; PETRICEVIC *et al.*, 2014).

Na gravidez, os estudos têm demonstrado que uma microbiota vaginal estável, com predominância de *Lactobacillus* spp., parece favorecer o sucesso da gravidez, ao passo que em casos de aborto observa-se instabilidade na microbiota vaginal, com aumento da diversidade de espécies indesejáveis (AL-MEMAR *et al.*, 2020; BROWN *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2018; PETRICEVIC *et al.*, 2014). Embora ainda não haja

consenso, estudos recentes utilizando técnicas moleculares apontam no sentido de que a utilização de probióticos pode favorecer a microbiota vaginal de modo a contribuir com a gestação por diferentes técnicas de implantação de embriões e contribuir com a manutenção de um ambiente favorável ao desenvolvimento do feto em diferentes fases (ABBASI *et al.*, 2021).

Também foram documentadas diferenças significativas na microbiota de diferentes compartimentos do sistema genital feminino, atualmente a hipótese da esterilidade do útero foi modificada e são reconhecidas diferenças importantes na microbiota de mulheres saudáveis em relação à microbiota de mulheres com endometriose (CHANG *et al.*, 2022; SARAF *et al.*, 2021; WEI *et al.*, 2020).

A microbiota vaginal com predomínio de *Lactobacillus* spp. (tipos I, II e V, segundo classificação de Ravel, 2011) é marcador de saúde reprodutiva, haja visto que *Lactobacillus* spp. exercem importantes funções biológicas, sendo as mais citadas na literatura: produção de ácido lático, o que confere um pH ácido ao meio vaginal, competição com patógenos por nutrientes e por locais de adesão, produção de biosurfactantes que diminuem a adesão de espécies de *Candida* spp. e outros patógenos; produção de peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e ácidos graxos de cadeia curta (NADER-MACÍAS; DE GREGORIO; SILVA, 2021).

Embora a classificação *Community States Types* (CST) ateste a existência de mulheres assintomáticas com microbiota vaginal dominada por espécies anaeróbicas (CST-IV), ainda se observa que a dominância de *Lactobacillus* spp. na microbiota vaginal confere proteção a este microambiente e está relacionada com saúde vaginal. Por outro lado a redução dessas bactérias lácteas e predomínio de outras bactérias é fator de risco para doenças infecciosas, neoplasias e complicações ligadas ao ciclo gravídico puerperal e função reprodutiva (HAN; LIU; CHEN, 2021; LEV-SAGIE *et al.*, 2022; LEWIS; BERNSTEIN; ARAL, 2017).

Esse estado de desequilíbrio, no qual há diminuição da microbiota protetora e aumento de micro-organismos patogênicos, é definido como disbiose. Conquanto considera-se disbiótica uma microbiota vaginal depletada de *Lactobacillus* spp., a identificação precisa de disbiose vaginal é dificultada pela mudança observada na microbiota vaginal com a idade, com as diferenças étnicas e durante o ciclo reprodutivo por influência hormonal (HAN; LIU; CHEN, 2021; LEV-SAGIE *et al.*, 2022; MEI *et al.*, 2022; SARAF *et al.*, 2021).

No contexto da compreensão da microbiota vaginal, pode-se afirmar que as

vaginites são manifestações clínicas de desequilíbrio entre micro-organismos patogênicos e *Lactobacillus* spp., ou seja, são a expressão clínica da disbiose vaginal. Dentre as vaginites, a VB é a mais frequente, com uma prevalência que varia entre 22 e 50% dos casos, seguida pela candidíase vulvovaginal (CVV) estimada entre 17 e 39% dos casos (Sobel, 2022).

Nos Estados Unidos foi bem documentada a diferença de prevalência de VB em diferentes grupos étnicos. Uma prevalência maior foi verificada em afro-americanos e menor em brancos não hispânicos e asiáticos. Nos diferentes grupos foi observada maior tendência a determinados micro-organismos que em outros (LEV-SAGIE *et al.*, 2022; SARAF *et al.*, 2021).

A VB é a principal causa de corrimento vaginal com grande alteração da microbiota vaginal. Afeta milhares de mulheres na fase reprodutiva e traz consigo graves consequências como risco de gestação pré-termo, doença pélvica inflamatória, endometrite, neoplasia intraepitelial cervical além de favorecer a aquisição de diferentes ISTs (LEV-SAGIE *et al.*, 2022; SARAF *et al.*, 2021).

Admite-se hoje, a transmissão sexual nas VBs haja visto alguns aspectos relacionados ao comportamento sexual que configuram fatores de risco, como multiplicidade de parceiros sexuais e não uso de preservativo. Além desses, também são elencados como fatores de risco para VB: duchas vaginais, tabagismo, dispositivos intrauterinos, uso de sabonetes antissépticos e histórico prolongado de infecções vaginais (BRADSHAW *et al.*, 2014; HOLZMAN *et al.*, 2001; LEV-SAGIE *et al.*, 2022; SOBEL, 2021).

Além da *Gardnerella vaginalis*, mais conhecido agente etiológico da VB, a ruptura do equilíbrio da microbiota vaginal favorece o crescimento de outras espécies anaeróbicas como: *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp. and *Porphyromonas* spp. A redução de *Lactobacillus* spp. prejudica os mecanismos de proteção natural, elevando o pH acima das condições fisiológicas como resultado da deficiência na produção de ácido láctico (SARAF *et al.*, 2021).

Também considerada como disbiose, a Candidíase Vulvovaginal (CVV) é a infecção fúngica mais prevalente e tem patogênese que envolve a resposta imune, desencadeada a partir da adesão da *Candida* spp. ao epitélio formando hifas que penetram o tecido levando à liberação de uma série de mediadores de resposta inflamatória, entre eles a Interleucina 6 (IL – 6) e Interleucina 8 (IL-8) (DE SETA *et al.*, 2022; HAN; LIU;



CHEN, 2021).

Outro fator importante a ser considerado na patogênese da CVV é a imunidade do hospedeiro, o que explica o fato de que diferentes espécies de *Candida* spp. podem estar presentes na microbiota vaginal de mulheres assintomáticas e saudáveis (CHEE; CHEW; THAN, 2020; DE SETA *et al.*, 2022).

Além da vaginite bacteriana onde há predomínio de micro-organismos anaeróbios e da CVV, outras causas de disbiose vaginal são hoje melhor compreendidas: a vaginite citolítica e as vaginites inflamatórias descamativas. Na vaginite citolítica, caracterizada por ardência, irritação, dispaneuрия, disúria e corrimento vaginal, observa-se como componente chave o crescimento desordenado e exacerbado de *Lactobacillus* spp., a ponto de ser também denominada como Lactobacilose. Também é possível observar a redução das espécies de *Fusobacterium* spp. e redução da diversidade de *Lactobacillus* spp., com predomínio exacerbado de *Lactobacillus crispatus* (CIBLEY; CIBLEY, 1991; LEV-SAGIE *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2019).

Tal alteração promove acidificação excessiva do meio ambiente vaginal com drástica redução de pH, o que favorece a citólise e causa os sintomas descritos. Embora a etiologia desta manifestação não esteja totalmente elucidada, sugere-se que a progesterona tenha um papel preponderante no seu desenvolvimento, pois notadamente os sintomas são mais frequentes na fase lútea do ciclo, durante a gestação ou na perimenopausa (VIEIRA-BAPTISTA; BORNSTEIN, 2019).

Por outro lado, a Vaginite Inflamatória Descamativa (VID) é uma condição inflamatória que pode cursar com sintomas irritativos e corrimento e foi descrita pela primeira vez em 1968 (GARDNER, 1968). Mais tarde foi descrita por Donders em 2002, como uma forma grave de vaginite aeróbia, tendo origem a partir de um desequilíbrio da microbiota vaginal, com aumento de micro-organismos aeróbios comensais do intestino, como as Enterobacterias e *Streptococcus agalactiae* do grupo B, em detrimento da diminuição do número de *Lactobacillus* spp. (DONDEERS *et al.*, 2005, 2002). A reação inflamatória ocorre em vários graus e pode ser caracterizada pela quantidade de leucócitos presentes no esfregaço vaginal e também pela presença de leucócitos com grânulos tóxicos (DONDEERS; SOBEL, 2017).

### **1.3. Aplicabilidade ginecológica de probióticos**

Conforme apresentado anteriormente, as evidências científicas favorecem o

entendimento de que o equilíbrio da microbiota vaginal confere proteção na medida em que proporciona maior resistência às doenças infecciosas mais comuns ou ao desenvolvimento de doenças inflamatórias. Diversos estudos buscam elucidar os mecanismos e ação e fatores interferentes relativos às cepas de *Lactobacillus* spp. e sua efetividade na prevenção e tratamento das vaginites.

A descrição de casos clínicos de sucesso com transplante de microbiota vaginal para pacientes com VBrecorrente intratável (LEV-SAGIE *et al.*, 2019) favorece as hipótese de que o povoamento da vagina por *Lactobacillus* spp. é condição muito desfavorável à ocorrência das vaginites. Apenas alguns anos após a demonstração da efetividade do transplante de microbiota fecal de indivíduos saudáveis para outros pacientes em tratamento recorrente para *Clostridium difficile* (LEV-SAGIE *et al.*, 2019; VAN NOOD *et al.*, 2013), o estudo demonstrou a capacidade de regularização da microbiota vaginal em quatro pacientes. Para o procedimento foram selecionadas doadoras saudáveis sem relato de ocorrência de VB nos últimos 5 anos. A coleta foi realizada a fresco, a partir do sétimo dia do ciclo menstrual. O fluido coletado foi diluído em 1 mL de solução salina e transferido em até 60 minutos para as pacientes (LEV-SAGIE *et al.*, 2019).

O aprimoramento do conhecimento a respeito da microbiota vaginal tem permitido o desenvolvimento de novas estratégias não farmacológicas para tratamento das infecções vaginais, onde se observa destaque especial para a utilização de *Lactobacillus* spp.

A busca por novas alternativas coadjuvantes de tratamento deve-se ao reconhecimento de que os tratamentos clássicos disponíveis para as infecções vaginais, com uso de antibióticos e antifúngicos, apresentam falhas terapêuticas, com desenvolvimento de resistência microbiana, efeitos adversos e recorrência nas infecções fúngicas ou bacterianas, ou mesmo mistas, mantendo assim o estado de disbiose (SUPERTI; DE SETA, 2020; TOMÁS *et al.*, 2020).

Observa-se que tanto a administração oral quanto a administração intravaginal de *Lactobacillus* spp, em combinação com antibióticos e/ou antifúngicos têm sido avaliadas para o tratamento ou a prevenção de infecções vaginais. Enquanto a aplicação vaginal se configura como uma estratégia de balanceamento da microbiota local, a administração oral representa uma rota indireta para repovoamento e colonização (TOMÁS *et al.*, 2020).

Das possíveis vias de administração de probióticos, a via intravaginal vem demonstrando ser a mais favorável para aplicação de *Lactobacillus* spp. para correção da

microbiota vaginal (LÓPEZ-MORENO; AGUILERA, 2021; TOMUSIAK *et al.*, 2015).

No entanto, alguns autores utilizam-se da via oral como objetivo de recompor a microbiota vaginal, com base na observação de que os patógenos migram do intestino para o sistema urogenital e que cepas administradas por via oral puderam ser recuperadas na vagina (STRUS *et al.*, 2012).

Além disso, estudos demonstram que as bactérias podem exercer efeito imunomodulador sistêmico, o que também contribui com a melhora do quadro clínico (DEV *et al.*, 2019; SHIMIZU; OJIMA; OGURA, 2021).

Entre as espécies mais estudadas para o tratamento de VB pode-se citar *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. salivarius*, *L. plantarum* e *L. acidophilus*. (MASTROMARINO; VITALI; MOSCA, 2013). Doses entre 10 milhões e bilhões de UFC de *Lactobacillus* spp. exógenos pela via oral ou vaginal, vem demonstrando maior efetividade, o que sugere que a quantidade de *Lactobacillus* spp. aplicados pode ter um papel importante na eficácia das formulações (XIE *et al.*, 2013).

Observando os estudos populacionais, nota-se que *Lactobacillus crispatus* configura a espécie probiótica mais abundante dentre os grupos estudados (RAVEL *et al.*, 2011; SARAF *et al.*, 2021) e sua aplicação intravaginal é estudada como alternativa na prevenção ou tratamento coadjuvante das infecções vaginais.

Bohbot *et al.* (2018) conduziram um estudo multicêntrico na França utilizando cápsulas vaginais de *L. crispatus* (IP 174178) após o tratamento oral por 7 dias com metronidazol 500 mg 2 x ao dia, sendo realizadas uma ou duas intervenções de 14 dias de *L. crispatus* 10 Bilhões de UFC intravaginal após o ciclo menstrual e após a verificação da cura clínica avaliada pelo índice de Nugent. Foi verificado que o grupo tratamento apresentou a metade de episódios de recorrência que o grupo placebo e um tempo maior para o surgimento da recorrência ao longo de 16 meses (BOHBOT *et al.*, 2018).

Rostok *et al.* (2019) demonstraram que cepas específicas de *L. crispatus* administradas oralmente tiveram performances distintas sobre a microbiota vaginal de mulheres consideradas saudáveis reduzindo o índice de Nugent e a contagem de *Gardnerella vaginalis* (ROSTOK *et al.*, 2019).

Outra espécie bastante estudada, *Lactobacillus rhamnosus* vêm demonstrando potencial aplicabilidade. Palma *et al.* (2018) demonstraram que a inclusão de cápsulas vaginais contendo *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 (NORMOGIN 100 Milhões de UFC por comprimido) utilizados após o tratamento medicamentoso com fluconazol ou metronidazol em pacientes HPV positivas que simultaneamente apresentavam infecção

bacteriana ou fúngica ativas, aumentou a taxa de *clearance* do HPV após 6 meses de tratamento (PALMA *et al.*, 2018).

No mesmo estudo foi avaliado o uso dos probióticos vaginais por 3 meses, que obteve resposta inferior ao período longo (PALMA *et al.*, 2018). A cepa mencionada foi incluída em vários estudos clínicos que no total envolveram cerca de 3.000 pacientes e vem demonstrando não apenas a capacidade de reduzir as recorrências de VB após tratamento, como também promovem a restauração da eubiose no ambiente vaginal dessas mulheres (BALDACCI; BALDACCI; BERTINI, 2020).

Em relação à atividade antifúngica, quando testadas, cepas específicas de algumas espécies de *Lactobacillus* spp. apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra diferentes espécies *Candida* spp., foram avaliadas: *L. crispatus* (B1 a BC8), *L. gasseri* (BC9 a BC14) e *L. vaginalis* (BC 15 a BC17). Todas as cepas foram capazes de produzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lactato. Foi avaliada a atividade fungicida e fungistática das cepas contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. lusitaniae* pelo método de microdiluição em caldo. O melhor espectro de ação foi observado para *L. crispatus* (BC1, BC4, BC5) e *L. vaginalis* BC15 contra *C. albicans* e *C. lusitaniae*. A maioria das cepas demonstrou capacidade de reduzir a adesão de *C. albicans* por diferentes mecanismos (PAROLIN *et al.*, 2015).

Revisão sistemática publicada em 2017 incluiu 10 ensaios clínicos randomizados e, embora tenha ressaltado a baixa qualidade das evidências, onde trabalhos adicionais poderão alterar a percepção dos resultados, verificou-se que o uso de probióticos como terapia adjuvante pode aumentar a taxa de cura clínica e micológica de curto prazo e diminuir a taxa de recaída em um mês. O uso de probióticos parece não aumentar a frequência de eventos adversos. Os autores ressaltaram a importância de estudos mais bem desenhados, utilizando metodologias padronizadas, com maior tamanho de amostragem e por tempo maior (XIE *et al.*, 2013).

Embora as evidências ainda não sejam ideais, atualmente é aceito que o efeito dos probióticos na candidíase oral e vulvovaginal depende das características do probiótico, inclusive da cepa usada, do modo de administração e da frequência de uso, bem como de características do próprio paciente (PAROLIN *et al.*, 2015).

Também nas vaginoses bacterianas há evidências favoráveis para a ação de *Lactobacillus* spp. (HOMAYOUNI *et al.*, 2014; VIEIRA-BAPTISTA; BORNSTEIN, 2019). O uso de probióticos pode ser interessante para determinados grupos de pacientes como idosos, pacientes com risco aumentado para candidíase e para complementar

terapias antifúngicas convencionais em pacientes com candidíase vaginal recorrente (KOVACHEV; VATCHEVA-DOBREVSKA, 2015; PAROLIN *et al.*, 2015; VIEIRA-BAPTISTA; BORNSTEIN, 2019).

A importância do reestabelecimento da microbiota vaginal vem ganhando destaque ao longo dos anos e estimulado a realização de novas pesquisas que contribuam com o reestabelecimento da saúde vaginal nas mulheres acometidas por doenças infecciosas ou não, favorecendo sua qualidade de vida.

#### 1.4. Importância Econômica e Legislação

A partir do crescente número de estudos publicados sobre probióticos, e da ampla divulgação para o público leigo, produtos alimentícios enriquecidos com esses microorganismos têm alcançado interesse especial. Além de alimentos acrescidos de probióticos, a suplementação também tem sido utilizada, tanto através de formas farmacêuticas convencionais quanto por formas alternativas, como gomas e chocolates (BARTKIENE *et al.*, 2018; BRUNO *et al.*, 2020; HOSSAIN *et al.*, 2021; SAXELIN, 2008; SHI; ZHONG, 2015; VASUDHA; MISHRA, 2013).

Embora a via oral seja mais frequentemente utilizada para administração de probióticos, outras vias de administração têm sido desenvolvidas, como supositórios para aplicação retal ou cremes e loções para aplicação tópica (NADER-MACÍAS; DE GREGORIO; SILVA, 2021; SHENOY; GOTTLIEB, 2019).

Na mesma vertente, aplicações vaginais de probióticos tem estimulado o desenvolvimento de apresentações específicas para esta região, como óvulos, cremes e filmes vaginais. A própria indústria cosmética e de higiene tem trazido diferentes produtos enriquecidos com probióticos, como absorventes, loções higienizantes, óleos lubrificantes dentre outros (NADER-MACÍAS; DE GREGORIO; SILVA, 2021; SHENOY; GOTTLIEB, 2019).

Quanto ao uso de probióticos por via vaginal, várias cepas vêm sendo utilizadas, há cerca de 48 anos surgiram os primeiros estudos nesse sentido (PUEBLA-BARRAGAN; REID, 2019) e desde então, a administração de *Lactobacillus* spp. na forma de óvulos e supositórios vaginais vem sendo explorada (PUEBLA-BARRAGAN *et al.*, 2021).

O interesse pelos probióticos, impulsionou a indústria farmacêutica a estudar este

mercado, com a perspectiva de alcance de um faturamento de U\$ 57,4 bilhões até 2020 e uma taxa de crescimento anual de 7,7% entre 2016 e 2022 (KARIYAWASAM; LEE; PAIK, 2021).

Segundo Aslam Shaikh, analista sênior de pesquisa do *Markets and Markets*, para o *Dairy Reporter* em 06 de abril de 2018, desde 2016, houve um aumento de mais de 30% nas vendas de bebidas probióticas refrigeradas e sucos, incluindo iogurte, sucos, leite de amêndoa, águas flavorizadas, chás e até mesmo cafés. Além dos produtos alimentícios, outras aplicabilidades também são de interesse econômico, estima-se, por exemplo, que o mercado de cosméticos contendo probióticos cresça a uma taxa aproximada de 12% nos próximos dez anos na América do Norte (PUEBLA-BARRAGAN; REID, 2021).

No Brasil, o mercado de probióticos ainda é incipiente, a regulação da comercialização desses produtos é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), incluindo cosméticos. Segundo a legislação Brasileira, “*Produtos Cosméticos, de Higiene Pessoal e Perfumes, são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado*” (ANVISA; MS, 2008).

A classificação de um produto como cosmético permite o registro de produtos para utilização nos órgãos genitais externos, desde que se destinem à limpeza, correção de odor ou proteção. Outras aplicações genitais, com alegação de propriedade para tratamento de doenças, classificam o produto como medicamento, com outras exigências de registro de maior complexidade que aquela estabelecida para regularização de cosméticos (ANVISA, 2017).

Em diferentes países do mundo existe a aprovação legal da aplicação de probióticos em produtos de uso vaginal, podendo estes serem amplamente comercializados como tampões íntimos ou cremes veiculados de *Lactobacillus* spp. Entre as opções disponíveis, produtos para reduzir o mau odor genital têm despertado interesse, pois a condição afeta negativamente a qualidade de vida das mulheres. (PUEBLA-BARRAGAN; REID, 2021).

A alegada razão pela qual os probióticos podem atuar no controle do odor corporal, se deve ao fato de que os metabólitos gerados por estes micro-organismos podem degradar ou neutralizar compostos malcheirosos. A regularização desses produtos

varia em diferentes países, de acordo com a natureza do produto pode haver necessidade de registro como medicamento *over the counter* (OTC) – produto livre de prescrição e não como cosmético (PUEBLA-BARRAGAN; REID, 2021).

No Brasil, ainda não existem produtos industrializados contendo probióticos para uso vaginal e a legislação vigente dificulta a entrada de novos produtos, tanto para uso vaginal como para uso oral. Os produtos para uso oral podem ser enquadrados como alimentos funcionais e necessitam de aprovação da ANVISA antes da comercialização (ANVISA, 2018a). A Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 241 de 18 de Julho de 2018, estabelece os requisitos gerais que são esclarecidos pelo Guia N° 21 da própria ANVISA (ANVISA, 2018b). No ato do registro do alimento são avaliados três elementos primordiais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico (ANVISA, 2018b, 2019b).

Quanto às formulações para aplicação vaginal, apenas as farmácias de manipulação têm atuado, disponibilizando para a prescrição magistral apresentações com cepas isoladas ou em associação de diferentes espécies. Como existe grande interesse público na utilização de probióticos, uma quantidade substancial de pesquisas sobre o tema tem sido publicada (CAMILLETTI *et al.*, 2018; DONDERS *et al.*, 2020; MACHADO *et al.*, 2013; POLOVA; ALEINYK; KAZAK, 2020). Nesse sentido, é necessário que a legislação acompanhe o desenvolvimento científico afim de assegurar que sejam comercializados produtos eficazes e seguros

### **1.5. Considerações Farmacotécnicas**

Com o avanço dos estudos da microbiota vaginal e a verificação do predomínio de *Lactobacillus* spp. como marcador de eubiose e com as perspectivas favoráveis à aplicação de diferentes cepas no controle de vaginites, o desenvolvimento de formas farmacêuticas adequadas ao uso ganha importância crucial (CHEE; CHEW; THAN, 2020; ROSTOK *et al.*, 2019).

Notadamente observa-se que a terapêutica tradicionalmente empregada nas diferentes infecções vaginais apresenta falhas, especialmente em casos recorrentes, o que gera um elevado custo de tratamento, que além do aspecto econômico, impacta a qualidade de vida das mulheres (CAMILLETTI *et al.*, 2018; TOMÁS *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de formas farmacêuticas com probióticos para aplicação vaginal configura importante ferramenta para o tratamento e prevenção de infecções

vaginais. Em países desenvolvidos se encontram disponíveis uma série de produtos para esta finalidade. Das apresentações farmacêuticas mais comumente usadas estão os óvulos, pós, duchas e cápsulas/comprimidos vaginais. Algumas delas, entretanto apresentam um potencial irritante, com desconforto no uso e sensação de vazamento local, o que torna os óvulos as formas farmacêuticas de maior adesão entre as usuárias (CAMILLETTI *et al.*, 2018).

Apesar do avanço nos estudos e no entendimento das diversas funções biológicas dos probióticos, a estabilidade dos micro-organismos em preparações comerciais ainda persiste como um desafio. Diferentes autores vêm demonstrando a importância da caracterização da cepa, pois variações fenotípicas da mesma espécie podem influenciar tanto na ação observada quanto na estabilidade do micro-organismo em diferentes preparações comerciais. Observa-se cada dia mais especificidade na capacidade de exercer determinada ação e tem-se observado maior resistência das cepas autóctones aos processos tecnológicos de produção (HILL *et al.*, 2014; NADER-MACÍAS; DE GREGORIO; SILVA, 2021; POLOVA; ALEINYK; KAZAK, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

A preparação de formas farmacêuticas contendo probióticos enfrenta alguns desafios tecnológicos como: processamento, temperatura, conteúdo de oxigênio, pH e temperatura externa. Cabe ressaltar que o desejável para essas formulações é que tenham capacidade de manter a viabilidade das UFC durante todo o período de validade das formulações (VASUDHA; MISHRA, 2013; ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006).

Estudos têm demonstrado que a temperatura de armazenamento dos produtos e proporção de glicerol nas fórmulas são potenciais causadores de redução da viabilidade de *Lactobacillus* spp. Camilletti *et al.* (2018) demonstraram que o conteúdo máximo de glicerol entre 16 e 30% foi o mais adequado para preservar a viabilidade de *Lactobacillus* spp. O estudo também demonstrou que o processo de fusão utilizado na preparação dos óvulos não afetou negativamente a viabilidade dos *Lactobacillus* spp., mantendo as condições ideais do produto por 180 dias (CAMILLETTI *et al.*, 2018).

Independente da aplicação dos probióticos, seja por via oral, vaginal, para finalidade alimentícia ou de saúde, os fatores envolvidos na sensibilidade desses micro-organismos precisam ser considerados. Em relação às formas farmacêuticas de uso vaginal, é necessário alcançar não só a sobrevivência de *Lactobacillus* spp., mas também a manutenção inalterada de suas propriedades probióticas durante a preparação e o armazenamento por todo o prazo de validade do produto (SILVA *et al.*, 2020).

Polova *et al.* (2020) desenvolveram óvulos de *Lactobacillus casei* IMB B-7280



em base emulsionada não iônica composta por Novata® BPH, polioxietilglicóis (Polyoxyethylene glycols – PEGs) 1500 e/ou 4000, Polissorbato 80 (Polysorbate 80) e água e demonstraram estabilidade da preparação por 6 meses (POLOVA; ALEINYK; KAZAK, 2020).

Estudo publicado em 2020 avaliou a influência de altas temperaturas em diferentes cepas de probióticos. Foram selecionadas cepas com comprovada ação metabólica, a saber: *L. gasseri* (CRL 1307), *L. reuteri* (CRL 1324), *L. salivarius* (CRL 1328), *L. paracasei* (CRL 1512), *L. rhamnosus* (CRL 1511), *L. mucosae* (CRL 1508) (POLOVA; ALEINYK; KAZAK, 2020).

Das cepas elencadas, as espécies autóctones apresentaram maior resistência à temperatura durante o processo e durante o armazenamento. Como método de obtenção, o *Spray Dryer* (secagem com ar quente com jato de ar uniforme direcionado por ventiladores) favoreceu a resistência das cepas à temperatura. Também foi observado que diferentes cepas da mesma espécie apresentaram comportamentos completamente diferentes, o que demonstra a importância do fenótipo de cada micro-organismo na atividade biológica de cada cepa. Foram resistentes à temperatura as espécies *L. reuteri* (CRL 1324), *L. rhamnosus* (CRL 1511), *L. mucosae* (CRL 1508) (POLOVA; ALEINYK; KAZAK, 2020).

São inúmeros os desafios de desenvolvimento de preparações vaginais contendo probióticos. A escolha da cepa adequada, a comprovação de efetividade através da via a que se destina, sua habilidade de sobrevivência, a manutenção de sua capacidade de adesão e de geração de metabólitos ativos, são aspectos fundamentais para garantir a elaboração de produtos capazes de atuar na vagina. O primeiro aspecto a ser considerado é a viabilidade da cepa inserida no produto durante todo o prazo de validade, o que dará subsídio para que as outras funções de *Lactobacillus* spp. sejam realizadas (CAMILLETTI *et al.*, 2018; POLOVA; ALEINYK; KAZAK, 2020; ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006; ZÁRATE; TOMÁS; NADER-MACIAS, 2005).

## **1.6. Formas Farmacêuticas de aplicação vaginal**

Segundo a Farmacopeia Brasileira, “*Forma farmacêutica é o estado final de apresentação dos princípios ativos farmacêuticos após uma ou mais operações farmacêuticas executadas com a adição ou não de excipientes apropriados a fim de facilitar a sua utilização e obter o efeito terapêutico desejado, com características*

*apropriadas a uma determinada via de administração”* (ANVISA, 2019a).

Podem ser classificadas em sólidas, líquidas, semissólidas e gasosas e se destinam a facilitar a administração de medicamentos e obter o maior efeito terapêutico desejado. O tipo de forma farmacêutica depende da via de administração a ser usada e pode favorecer a adesão do paciente ao tratamento proposto. Também chamadas de preparações, as formas farmacêuticas de interesse para a via vaginal são: forma semissólida, sólida ou líquida. São exemplos de formas farmacêuticas de uso vaginal os óvulos, os cremes, as soluções ou suspensões, filmes muco-adesivos e as cápsulas vaginais (ANVISA, 2019a).

Os cremes e pomadas são formas farmacêuticas extensivamente usadas para aplicação vaginal. Podem ter diferentes características quanto à solubilidade e apresentam o inconveniente de sensação de escorrimento ao longo do dia. Devem ser aplicados preferencialmente à noite para permitir o tempo de contato suficiente para a ação do fármaco (ANVISA, 2019a).

Considerando a influência negativa da atividade de água ( $A_w$ ) de preparações contendo probióticos na preservação da viabilidade das cepas, a escolha de um veículo completamente anidro parece favorecer a estabilidade e intervir o mínimo possível no meio (PUEBLA-BARRAGAN *et al.*, 2021). Como tal o petrolato configura-se como um candidato interessante e apresenta uma longa história de aplicação na dermatologia, datando do ano de 1800 com segurança avaliada (DRAELOS, 2018; PUEBLA-BARRAGAN *et al.*, 2021).

Óvulos são formas farmacêuticas sólidas, de dose única, contendo um ou mais princípios ativos dispersos ou dissolvidos em uma base adequada que tem vários formatos, usualmente ovoide, e que possuem a capacidade de fundirem-se à temperatura do corpo (ANVISA, 2019a).

Para preparação de óvulos, pode-se utilizar diferentes componentes que podem ter características lipo ou hidrossolúveis. Entre os ingredientes de características oleosas estão: a Manteiga de Cacau, a Cera de Abelhas, a base Novata ou Suppocire® (Gatefossé, Saint-Priest, França). Quanto aos óvulos hidrossolúveis, podem ser constituídos por diferentes tipos de polietilenoglicóis ou mesmo pela tradicional base de gelatina glicerinada. A escolha da base para o óvulo deve levar em consideração o efeito pretendido para o fármaco, se sistêmico ou local, a compatibilidade dos ingredientes e o conforto das pacientes (ANVISA, 2019a).

Há ainda duas formas farmacêuticas promissoras, são as cápsulas vaginais e os

filmes muco-adesivos. Os filmes muco-adesivos constituem lâminas formadas por espessantes formadores de filmes que possuem a capacidade de aderir à mucosa vaginal, favorecendo tanto a ação sistêmica quanto a ação local (MACHADO *et al.*, 2013).

As cápsulas vaginais são moldadas a partir de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), uma gelatina de origem vegetal compatível com a administração vaginal. Utiliza a lactose como excipiente pelo fato de este carboidrato ser compatível e favorecer o desenvolvimento das UFC (CHAROO, 2020; OSMAŁEK *et al.*, 2021; SANTIAGO *et al.*, 2009). Apresentam vantagens em relação a administração vaginal de ingredientes ativos: uma aplicação extremamente simples para a usuária, garante exatidão de dosagem, sem desconforto com longo tempo de retenção na região. Além disso não proporcionam sensação de umidade aumentada após a aplicação. Deve-se evitar o uso no caso de ressecamento vaginal intenso, pois tais formas demandam umidade na região para que se dissolva completamente (MARAZZO, 2006).

Dentre os excipientes utilizados nas cápsulas vaginais, a lactose configura grande potencial. Este carboidrato simples derivado do leite, apresenta baixo custo e boas características de escoamento, liberação e biodisponibilidade de fármacos (CHAROO, 2020). Sua aplicabilidade em cápsulas vaginais vem sendo estudado pela possibilidade de favorecer a estabilidade de probióticos em formulações sólidas (PINGITORE *et al.*, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2009).

Pela sua característica higroscópica, ao absorver água a lactose atua como um agente de plasticidade e cria estruturas cristalinas amorfas estáveis (AFRASSIABIAN; GUESSASMA; SALEH, 2019). Lactose atua ainda como um excelente agente de proteção durante a desidratação de probióticos pelo método de *spray dryer*, uma vez que o seu grupo hidroxila interage com grupos fosfatos presentes nas superfícies das bicamadas lipídicas das células microbianas, substituindo as pontes de hidrogênio que se romperam com a retirada da água do ambiente (VAESSEN *et al.*, 2019).

A aplicação vaginal de probióticos pretende a ação local, sem absorção sistêmica, de tal modo que o veículo utilizado deverá apenas manter a viabilidade das cepas, a possibilidade de aplicação confortável e um efeito emoliente na região. Com tais características desejáveis, tanto as bases hidrofílicas quanto as lipofílicas tem potencial favorável à veiculação de probióticos (ZÁRATE; TOMÁS; NADER-MACIAS, 2005).

A escolha da forma farmacêutica de determinada preparação, deve considerar o conforto e a adesão do paciente ao tratamento, a melhor capacidade de entrega e utilização dos ingredientes ativos, bem como a manutenção de sua estabilidade e da segurança para

o paciente. No caso da aplicação vaginal de probióticos, os desafios anteriormente apresentados precisam ser adequadamente superados para o benefício esperado (CAMILLETTI *et al.*, 2018; PUEBLA-BARRAGAN *et al.*, 2021; ZÁRATE; TOMÁS; NADER-MACIAS, 2005).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a viabilidade e estabilidade das formas farmacêuticas contendo cepas de *Lactobacillus* spp., isoladas ou associados na mesma formulação.

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar a estabilidade e a viabilidade de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp., quando veiculadas em diferentes formas farmacêuticas: cápsula, pomada e óvulos vaginais de diferentes composições.

Quantificar o percentual de recuperação das cepas de *Lactobacillus* spp., obtidas a partir das diferentes fórmulas farmacêuticas, na cinética de tempo estudada.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Cepas de *Lactobacillus* spp. utilizadas nas formulações vaginais e condições éticas

Foram selecionadas cinco cepas de *Lactobacillus* spp. para serem empregadas nas formulações vaginais (Tabela 1). As cepas foram gentilmente cedidas pela Farmacotécnica Instituto de Manipulações Farmacêuticas Ltda.

Como a pesquisa foi realizada *in vitro* empregando cepas comerciais e certificadas, não necessita de aprovação ética.

**Tabela 1- Identificação das cepas de *Lactobacillus* spp. utilizadas nas formulações vaginais**

	Cepa	Lote	Fabricante
<i>Lactobacillus crispatus</i>	LCr86	Wk20200908004	Active Pharmaceutica
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	LJ-G55-81	IK2004	OrganicCompounding
<i>Lactobacillus gasseri</i>	LG08	WK20201021001	Active Pharmaceutica
<i>Lactobacillus reuteri</i>	LR-G100	IL2301	LemmaSolutions
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LRa05	WK20200321012	Active Pharmaceutica

As espécies foram escolhidas pelos seguintes critérios: *L. crispatus*, *L. johnsonii* e *L. gasseri* foram selecionadas por serem espécies dominantes nas microbiotas vaginais saudáveis segundo a classificação das CSTs. *L. reuteri* e *L. rhamnosus* são espécies bastante estudadas em diferentes tipos de ensaios, incluindo ensaios clínicos. (CAMILLETTI *et al.*, 2018; DE GREGORIO *et al.*, 2020b, 2014a; HUSAIN *et al.*, 2020; REID, 2001).

As formulações estudadas foram manipuladas de forma individualizada na Farmacotécnica Inst. de Man. Farmacêuticas Ltda, farmácia de manipulação de Brasília. As técnicas de preparo seguiram as exigências legais e a técnica adequadas.

*Lactobacillus* spp. foram veiculados em três formas farmacêuticas: cápsula vaginal, pomada vaginal e óvulos. Na forma de óvulos foram testados dois excipientes diferentes, um de massa gelatinosa de característica hidrofílica e outro óvulo de massa cerosa com característica lipofílica.

Em todas as quatro apresentações foram veiculados cada um dos probióticos separadamente na concentração de um bilhão de UFC/unidade da forma farmacêutica, e uma associação de um bilhão de UFC de cada cepa, chamada de Fórmula L5, que continha 5 Bilhões de UFC/unidade (Tabela 2). As doses foram escolhidas levando em

consideração uma possível perda de viabilidade durante o armazenamento, bem como as pesquisas atuais, que consideram a dose mínima terapêutica reportada entre  $10^7$  e  $10^9$  UFC de micro-organismos viáveis por dose aplicada.

No total, foram testadas 24 diferentes combinações de *Lactobacillus* spp. e formulações farmacêuticas (Tabela 2). Todas as combinações foram testadas em uma cinética de tempo de 0 (zero), 30 e 60 dias, para avaliação da estabilidade e da capacidade de recuperação dos *Lactobacillus* spp. a partir da formulação, em duplicata técnica e biológica.

Tabela 2 – Composição em UFCs das cepas de *Lactobacillus* spp. veiculadas em cada forma farmacêutica

Formulações vaginais	Pomada vaginal	Cápsula vaginal	Óvulo Gelatinoso	Óvulo Ceroso	Total
<i>Lactobacillus crispatus</i>	1 Bilhão UFC/g	1 Bilhão UFC/cáps.	1 Bilhão UFC/óv.	1 Bilhão UFC/óv.	4
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	1 Bilhão UFC/g	1 Bilhão UFC/cáps.	1 Bilhão UFC/óv.	1 Bilhão UFC/óv.	4
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1 Bilhão UFC/g	1 Bilhão UFC/cáps.	1 Bilhão UFC/óv.	1 Bilhão UFC/óv.	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	1 Bilhão UFC/g	1 Bilhão UFC/cáps.	1 Bilhão UFC/óv.	1 Bilhão UFC/óv.	4
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1 Bilhão UFC/g	1 Bilhão UFC/cáps.	1 Bilhão UFC/óv.	1 Bilhão UFC/óv.	4
Fórmula L5	5 Bilhões UFC/g	5 Bilhões UFC/cáps.	5 Bilhões UFC/óv.	5 Bilhões UFC/óv.	4
Total	6	6	6	6	24

\* Cáps: Cápsula; Óv: Óvulo

## 3.2. Farmacotécnica

### 3.2.1. Formulações Vaginais estudadas

A tabela a seguir resume a composição de todas as formulações testadas com as

concentrações empregadas de cada excipiente.

Tabela 3 – Composição das Formas Farmacêuticas Vaginais

Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.	Quantidade UFC em cada forma farmacêutica	Composição e Excipientes			
		Cápsula Vaginal	Óvulo Gelatinoso	Óvulo Ceroso	Pomada vaginal
<i>L.crispatus</i>	1 Bilhão de UFC	1 cápsula gelatinosa	1 óvulo q.s.p. 3g (Gelatina pó	1 óvulo q.s.p. 3g (Cera de	Petrolatum q.s.p. 1g
<i>L.gasseri</i>	1 Bilhão de UFC	Lactose	14,3%, Sorbato de	Abelhas <i>Appis</i>	
<i>L.johnsonii</i>	1 Bilhão de UFC	q.s.p.	Potássio 0,02%,	<i>melífera</i>	
<i>L.reuteri</i>	1 Bilhão de UFC	500mg	água purificada	Linnaeus5,0%	
<i>L.rhamnosus</i>	1 Bilhão de UFC		43%, Glicerina	e Manteiga de	
Fórmula L5	5 Bilhões de UFC		vegetalqsp 100%)	<i>Theobroma cacao</i> 95,0%)	

q.s.p (quantidade suficiente para), Cera de Abelhas *Appis melífera* Linnaeus (BeesWax), Manteiga de *Theobroma cacao* (Manteiga de cacau)

### 3.2.1.1. Cápsulas vaginais: Composição e Processo de Manipulação

Foram utilizadas cápsulas gelatinosas duras elaboradas com gelatina vegetal, que foram produzidas com um polissacarídeo hidrossolúvel, obtido a partir da fécula ou goma extraída da *Manioht esculenta* (mandioca), cujo nome popular é “tapioca”. O polissacarídeo é obtido através de um processo de fermentação natural, e as cápsulas possuem fabricação 100% orgânica. As cápsulas apresentam como característica, a rápida desintegração quando em contato com ambientes aquosos, e possuem a vantagem de poderem ser utilizadas para em diferentes vias de administração: oral, sublingual, vaginal e tópica.

Para o preparo das formulações vaginais em cápsulas, cada um dos ingredientes foi pesado em balança de precisão certificada. Após a pesagem, foi realizada a tamisação dos pós antes da homogeneização (Figura 3).



Figura 3 – Pesagem e tamisação das cepas de *Lactobacillus* spp. liofilizadas

A-Pesagem, B- Tamisação

As fórmulas são homogeneizadas em seguida, e posteriormente encapsuladas empregando uma Encapsuladora semiautomática (Figura 4). A manipulação da fórmula foi realizada de forma individualizada, considerando a aplicação de fatores de correção de UFC de cada *Lactobacillus* spp. antes da pesagem.

Os cálculos de pesagem dos Ingredientes Farmacêuticos Ativos (IFA) foi realizado automaticamente pelo sistema informatizado Fórmula Certa, que leva em consideração o peso, a densidade dos pós e o volume aparente da cápsula selecionada para manipulação para sugerir o peso do excipiente a ser utilizado.

Figura 4 – Processo de Encapsulação



A-Encapsuladora semi-automática, B-Fechamento das cápsulas

### 3.2.1.2. Pomada Vaginal: Composição e Processo de Manipulação

O excipiente escolhido para a formulação da pomada vaginal para veiculação das cepas *Lactobacillus* spp. foi o Petrolato (Petrolatum - CAS: 8009-03-8). Os probióticos foram pesados e tamisados para evitar a formação de grumos e otimizar a homogeneidade das pomadas preparadas. A incorporação dos ativos foi realizada por espatulação em superfície de vidro, até completa homogeneização.

### 3.2.1.3. Óvulo Vaginal Ceroso: Composição e Processo de Manipulação

O excipiente do óvulo vaginal ceroso foi elaborado utilizando Cera de Abelhas *Apis mellifera* Linnaeus e Manteiga de *Theobroma cacao* (manteiga de cacau). Este excipiente foi escolhido para testar a estabilidade das diferentes cepas na ausência de água. O inconveniente da preparação é a necessidade de manutenção sob refrigeração para evitar a fusão da fórmula provocada pelas altas temperaturas ambientais no Brasil.

Para a preparação das fórmulas, *Lactobacillus* spp. foram pesados e tamisados para garantir a uniformidade das partículas. Os componentes da massa do óvulo foram

pesados e transferidos para um recipiente de inox sanitário e levados a banho-maria para a completa fusão, sob temperatura controlada, não devendo exceder 60° C e misturados até completa homogeneização.

Após completa fusão do excipiente os probióticos foram adicionados e homogeneizados. Ainda na forma líquida foram envasados em formas de polipropileno descartáveis para óvulos, sob pesagem individualizada.

As formas foram levadas à refrigeração e após completa solidificação foram seladas em seladora automática.

#### 3.2.1.4. Óvulo Vaginal Gelatinoso: Composição e Processo de Manipulação

O excipiente do óvulo vaginal gelatinoso foi elaborado utilizando ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) dissódico, Glicerina Vegetal, Gelatina em pó, Sorbato de Potássio e Água. Este excipiente foi escolhido para testar a estabilidade das diferentes cepas na presença de água. Trata-se de uma formulação com aparência agradável, homogênea, resistente à temperatura ambiente.

Para a preparação das fórmulas, *Lactobacillus* spp. foram pesados e tamisados para garantir a uniformidade das partículas. Os componentes da massa do óvulo foram pesados e transferidos para um recipiente de inox sanitário e levados a banho-maria até completa fusão, sob temperatura controlada, não devendo exceder 60° C e misturados até completa homogeneização.

Após completa fusão do excipiente os probióticos foram adicionados e homogeneizados. Ainda na forma líquida foram envasados em formas descartáveis de polipropileno para óvulos, sob pesagem individualizada, e após completa solidificação foram seladas em seladora automática.

#### 3.2.1.4. Análises Farmacotécnicas nas Cápsulas Vaginais

##### 3.2.1.4.1. Análise de Peso Médio

Após a preparação das Cápsulas Vaginais, cada formulação foi submetida à análise de peso médio através do processador estatístico Farma SP 5000 (Figura 5) fabricada pela Gehaka (São Paulo - SP, Brasil).

Figura 5 – Processador Estatístico de Fórmulas Magistrais



O Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (2ª edição) adaptou um método para avaliação de peso médio em cápsulas magistrais, uma vez que o ensaio farmacopeico para determinação do peso médio de cápsulas estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (6ª edição) é na prática inviável, pelo fato de não ser um método aplicável a fórmulas individualizadas (ANVISA, 2019a; BRASIL; MS; ANVISA, 2012).

O método descrito no Formulário Nacional (2ª edição) consiste em pesar individualmente 20 unidades de cápsulas íntegras manipuladas e determinar o peso médio em gramas, e quando a quantidade de cápsulas manipuladas para atendimento da

prescrição for inferior a 20 unidades, deve-se pesar, individualmente, todas as unidades manipuladas (BRASIL; MS; ANVISA, 2012).

Os limites de variação tolerados para o peso médio das cápsulas manipuladas (PMédio) são apresentados no quadro a seguir (Quadro 1).

Quadro 1– Limites de variação de peso médio toleráveis para cápsulas manipuladas

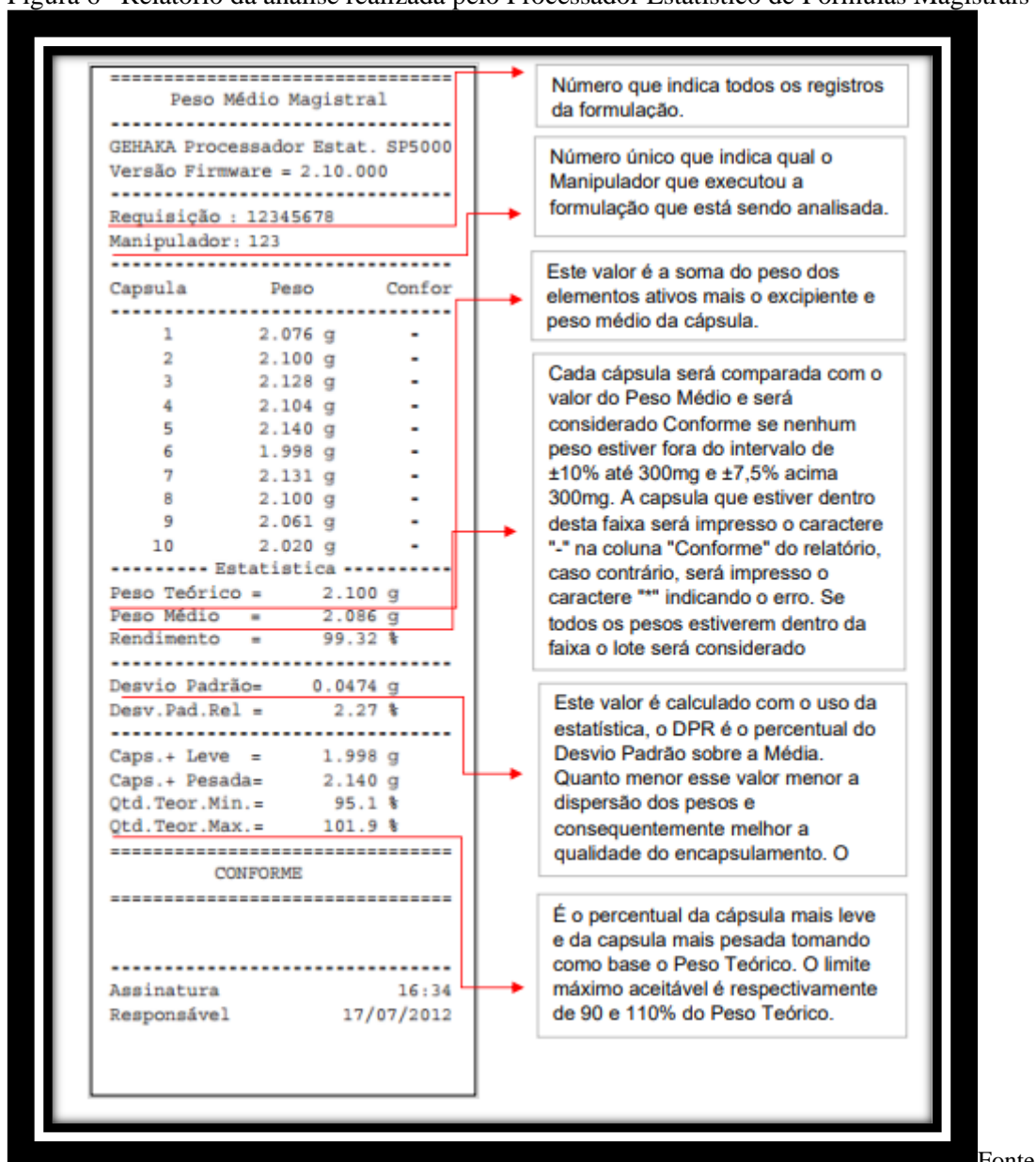
Critérios de avaliação para cápsulas duras	
PESO MÉDIO	LIMITES DE VARIAÇÃO
Menos que 300 mg	± 10,0%
300 mg ou mais	± 7,5 %

Fonte:(BRASIL; MS; ANVISA, 2012)

O Formulário Nacional também determina que além do peso médio das cápsulas manipuladas, do desvio padrão e do desvio padrão relativo, também seja verificada a variação do conteúdo teórico (BRASIL; MS; ANVISA, 2012).

A fórmula será considerada CONFORME se nenhuma das cápsulas estiver fora do intervalo de  $\pm 10\%$  (até 300mg) ou  $\pm 7,5\%$  (acima 300mg). É considerada NÃO CONFORME quando alguns dos parâmetros acima não estiverem de acordo (BRASIL; MS; ANVISA, 2012). Para uma análise criteriosa, detalhamos as análises realizadas pelo Processador Estatístico de Fórmulas Magistrais (Figura 6).

Figura 6– Relatório da análise realizada pelo Processador Estatístico de Fórmulas Magistrais



Fonte:

Processador Estatístico Farma SP 5000 fabricado pela Gehaka (São Paulo - SP, Brasil).

### 3.2.1.4.2. Teste de Desintegração de Óvulos e Cápsulas vaginais

O procedimento para este teste foi adaptado da Farmacopeia Brasileira 6ª Edição, que analisa o processo de desintegração das seguintes formas farmacêuticas: supositórios, óvulos e comprimidos (ANVISA, 2019a). O objetivo deste teste é avaliar a capacidade dessas formas farmacêuticas de amolecerem ou se desagregarem em meio líquido, no espaço de tempo prescrito.

Foi considerada desintegração completa para efeito das formulações testadas quando a cápsula ou óvulo apresentou: a) dissolução completa; b) separação completa de

seus componentes, acumulando-se substâncias graxas fundidas na superfície do líquido ou depositando-se os pós insolúveis no fundo do recipiente e dissolvendo-se os componentes solúveis da amostra, ou c) ruptura da cápsula gelatinosa, permitindo liberação de seus componentes.

O teste foi adaptado da metodologia original por ausência do equipamento de dissolução. Foi empregado um banho-maria com temperatura estabilizada em 37° C. Cada forma farmacêutica foi adicionada a um Erlenmeyer contendo 100 mL de água a 37° C e agitadas em banho-maria contabilizando-se o tempo de dissolução. Foram avaliadas 3 unidades de cada forma farmacêutica. O tempo de desintegração de nenhuma das formas farmacêuticas testadas poderia ultrapassar 30 minutos (ANVISA, 2019a).

#### 3.2.1.5. Análises Farmacotécnicas na Pomada Vaginal

Foram realizadas avaliações organolépticas de cada formulação, observando aspecto, uniformidade e ausência de grumos. Os veículos anidros não permitem a realização de testes de pH ou outro tipo de avaliação.

#### 3.2.1.6. Análises farmacotécnicas realizadas Óvulo Vaginal Ceroso

As análises realizadas foram as mesmas descritas no item 3.2.1.2.2. Teste de Desintegração de Óvulos e Cápsulas vaginais

#### 3.2.1.7. Análises farmacotécnicas realizadas Óvulo Vaginal Gelatinoso

As análises realizadas foram as mesmas descritas no item 3.2.1.2.2. Teste de Desintegração de Óvulos e Cápsulas vaginais

### 3.3 Ensaio Microbiológicos:

#### 3.3.1. Meio de cultivo de *Lactobacillus* spp.

*Lactobacillus* spp. foram cultivados em meio de cultura Lactobacilli MRS broth Acumedia® (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil). Este meio é assim conhecido por ter sido inicialmente formulado por Man, Rogosa e Sharpe em 1960 (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960). O caldo do meio MRS utilizado é composto por: digestão enzimática de tecido animal 1%, extrato de carne 1%, extrato de levedura 0,5%, dextrose 2%, acetato de sódio 0,5%, polissorbato 80 0,1%, fosfato de dissódio 0,2%, citrato de amônio 0,2%, sulfato de magnésio 0,01% e sulfato de manganês 0,005%. O pH do meio líquido foi mensurado e ajustado para obtenção de um pH final de 6,5 ( $\pm 2$ ) em pHmetro (GEHAKA® PG2000, São Paulo, Brasil).

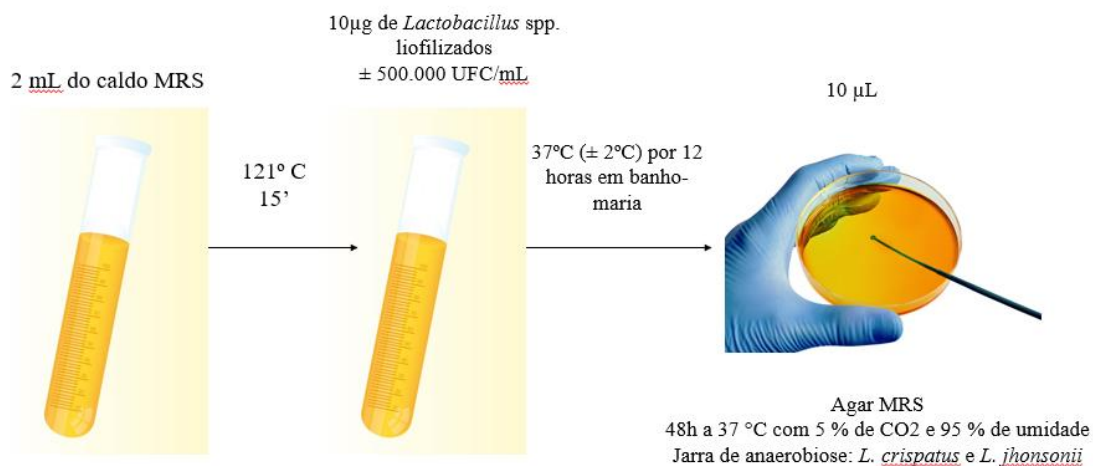
##### 3.3.1.1. Ensaio de certificação de viabilidade das cepas de *Lactobacillus* spp.

Um cultivo preliminar *in vitro* foi realizado para avaliar a viabilidade dos *Lactobacillus* spp. empregados nas formulações. O meio foi suspenso em água destilada e distribuído em tubos de ensaio contendo 2 mL do caldo MRS Acumedia® (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil), que foram esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave. Nos tubos estéreis, foram adicionados 10µg de cada cepa de *Lactobacillus* spp. liofilizados, o que corresponde a aproximadamente 500.000 UFC/mL, segundo as recomendações de cada fabricante. Após a inoculação de uma amostra por tubo, foi realizado uma incubação a 37°C ( $\pm 2$ °C) por 12 horas em banho-maria. Para certificação de crescimento microbiano, após este período, 10 µL de cada cepa de *Lactobacillus* spp. foram plaqueados em MRS ágar, cultivados por 48h em estufa a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade, e em jarra de anaerobiose nas mesmas condições de incubação para



*L. crispatus* e *L. jhonsonii*.

Figura 7- Fluxograma de Certificação de Viabilidade das Cepas



### 3.3.1.2. Ensaio de viabilidade das cepas de *Lactobacillus* spp. recuperadas das formulações vaginais

O meio foi suspenso em água destilada e distribuído em tubos cônicos descartáveis e estéreis contendo 30 mL do caldo MRS, e em seguida foram esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave. A cada tubo estéril foi adicionada uma unidade das formulações farmacêuticas íntegras: 3g de pomada vaginal, um óvulo gelatinoso e um óvulo ceroso, ambos pesando aproximadamente 3g, uma unidade de cápsula vaginal pesando aproximadamente 500mg. A proporção de 1g para cada 10mL de meio MRS foi adaptada de Camiletti et al. (2018). A concentração de 1 Bilhão de UFC ( $\sim 10^9$ ) de cada cepa de *Lactobacillus* spp. foi mantida para todas as formulações, com exceção da Fórmula e da pomada vaginal.

A Fórmula L5 continha 1 Bilhão de UFC de cada cepa de *Lactobacillus* spp., o que totaliza 5 Bilhões de UFC em cada unidade. Neste caso, a quantidade de caldo MRS (30mL) foi mantida. Para a pomada vaginal, como foram empregadas 3g para cada 30mL de meio MRS, e cada 1g de pomada continha 1 bilhão UFC/g, os cálculos foram ajustados para esta concentração. Essa quantidade de pomada vaginal foi usada por duas razões: a primeira para equivalência de peso com óvulos vaginais, e a segunda para aproximar ao uso fisiológico empregado no tratamento.

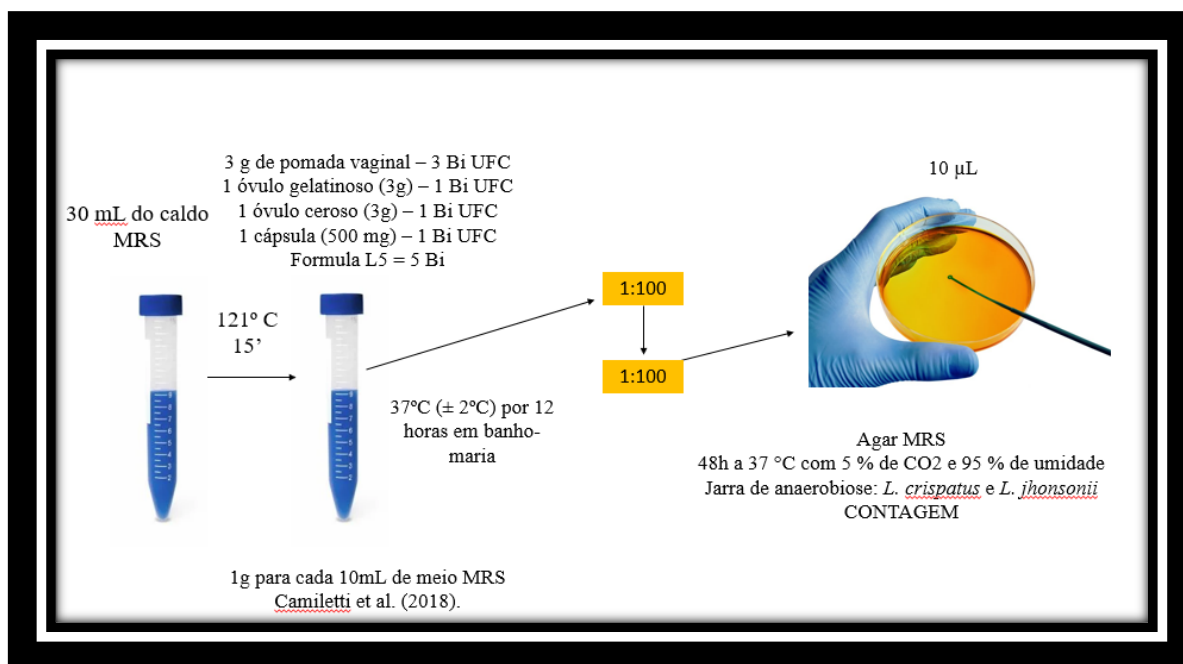
Após adicionar cada forma farmacêutica vaginal nas quantidades acima mencionadas, os tubos foram incubados a 37°C (± 2°C) por 12 horas em banho-maria,

para simular o evento fisiológico geralmente prescrito para uso vaginal. Ao final desse tempo, os tubos foram colocados à temperatura ambiente e foram realizadas duas diluições 1:100.

Como na incubação inicial foram colocados  $1 \times 10^9$  UFC/mL em um volume de 30mL, a concentração final teórica após a incubação foi aproximadamente  $0,3 \times 10^8$  UFC/mL. Após uma diluição de 1:100 em cloreto de sódio 0,9% a concentração reduziu para  $0,3 \times 10^6$  UFC/mL, e uma nova diluição 1:100 reduziu essa concentração para  $0,3 \times 10^4$  UFC/mL, totalizando uma diluição final de 1:10.000, que possibilita a contagem de UFC.

Para plaquear e realizar a contagem de UFC, 10 $\mu$ L da segunda diluição foram semeados com pérolas de vidro em placas de Petri de 90 mm, contendo Ágar MRS fabricado por Merck (Millipore®, Darmstadt, Alemanha). Após a semeadura, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % de umidade, e em jarra de anaerobiose nas mesmas condições de incubação para *L. crispatus* e *L. jhonsonii*, por 48h. Após esse tempo de incubação, as contagens de UFC foram realizadas.

Figura 8 - Ensaio de viabilidade das cepas de *Lactobacillus* spp. recuperadas das formulações vaginais



### 3.3.1.3. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias recuperadas das formulações vaginais

Após 48h de incubação, foram contadas as quantidades de colônias individuais

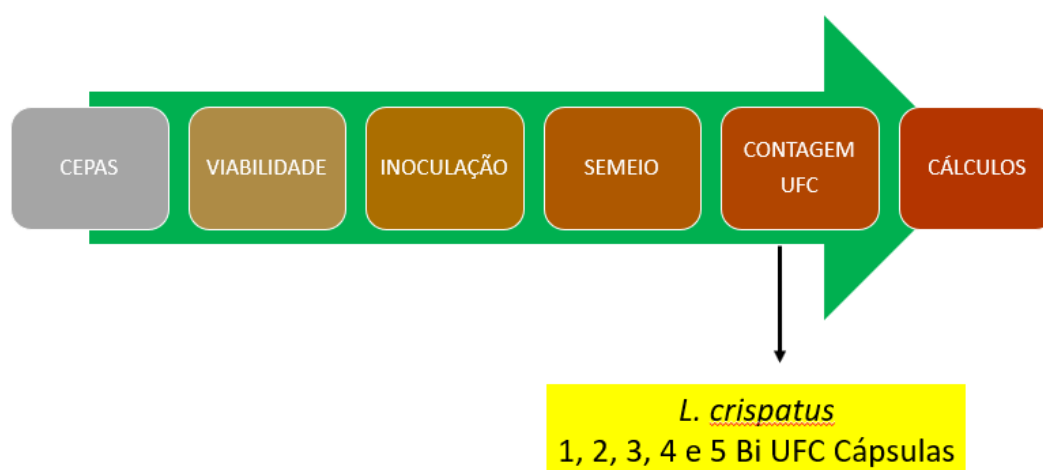
crecidas em todas as placas semeadas. Este valor representa o número de UFC na diluição 1:10.000, da qual foi utilizada uma alíquota de 10µL, quando multiplicamos a diluição por esse valor, obtemos um valor corrigido de 100, na diluição. O passo seguinte foi multiplicar o número de UFC da diluição por esse valor, 100 ou  $10^2$ , para obter o valor real de UFC/mL na amostra original.

#### 3.3.1.4 Estudo em paralelo: avaliação de *L. crispatus*:

Durante todo o experimento a cepa de *L. crispatus* foi a mais fastidiosa. Em todas as formas farmacêuticas seu comportamento de recuperação foi bastante difícil, com manejo mais sensível. Foi necessária a incubação em condições de anaerobiose para possibilitar a recuperação de UFC/mL.

Considerando a importância fisiológica desta espécie na manutenção da saúde vaginal, foi realizada uma investigação paralela ao estudo principal. Foram preparadas 5 diferentes concentrações do probiótico nas cápsulas vaginais, a saber: um, dois, três, quatro e cinco bilhões de UFC por cápsula respectivamente. O intuito desta investigação foi avaliar uma possível correção de dose de modo a proporcionar uma maior taxa de recuperação de UFC/mL da espécie em questão no tempo zero do experimento.

Figura 9 – Fluxograma de Ensaio Microbiológicos Realizados



#### 3.4 Cálculo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas por forma farmacêutica a partir do percentual recuperado

Para verificação da quantidade de UFC recuperadas em cada forma farmacêutica

estudada, foi aplicado o percentual de recuperação na quantidade total veiculada em cada uma delas.

Cada óvulo contendo aproximadamente 3 g de peso continha 1 Bilhão de UFC de cada cepa e 5 Bilhões de UFC da Fórmula L5. Aplicando-se o percentual de recuperação encontrado foi possível definir quanto de micro-organismos viáveis foram recuperados para cada cepa inserida em cada forma farmacêutica. Este cálculo foi fundamental para estabelecimento de um prazo de validade.

### **35. Análise dos dados**

Os dados coletados foram introduzidos em planilhas de *Microsoft Office Excel* (Microsoft) e foram calculados UFC e percentuais. As figuras foram construídas empregando o *software GraphPad Prism version 7.00* para Windows (La Jolla, Califórnia, Estados Unidos), e representam o percentual médio de dois experimentos independentes com duplicata biológica.

## 4.RESULTADOS

### 4.1. Avaliação Farmacotécnica das formulações Vaginais

#### 4.1.1. Cápsulas Vaginais

##### 4.1.1.1. Peso médio das Cápsulas Vaginais

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL; MS; ANVISA, 2012), o limite de peso médio de cápsulas manipuladas acima de 300mg pode variar até 7,5%. Considerando que as cápsulas manipuladas apresentaram peso médio em torno de 0,500g ou 500mg, a variação aceitável representa aproximadamente 37,5 mg que poderiam ser acrescidas ou reduzidas no peso final das cápsulas. A variação observada entre as cápsulas de cepas diferentes provavelmente se deve à variabilidade de densidade dos pós e cepas de *Lactobacillus* spp. liofilizadas.

Como se pode observar na Tabela 4, o peso médio das cápsulas vaginais manteve-se dentro dos parâmetros exigidos, em conformidade para a formulação manipulada.

Tabela 4 – Resumo dos resultados da avaliação de peso médio das cápsulas vaginais em estudo

Cápsulas Vaginais	Peso		Desvio Padrão	Peso Total	Percentual de Rendimento	Peso Médio	Resultado
	Máximo	Mínimo					
<i>L. crispatus</i>	0,543g	0,508g	0,012	0,511g	103,3%	<b>0,528g</b>	Conforme
<i>L. johnsonii</i>	0,528g	0,506g	0,007	0,528g	97,7%	<b>0,516g</b>	Conforme
<i>L. gasseri</i>	0,529g	0,509g	0,006	0,519g	99,9%	<b>0,518g</b>	Conforme
<i>L. reuteri</i>	0,535g	0,508 g	0,009	0,517 g	100,0%	<b>0,517g</b>	Conforme
<i>L. rhamnosus</i>	0,529g	0,515g	0,005	0,516 g	101,4%	<b>0,523g</b>	Conforme
Fórmula L5	0,549g	0,495g	0,016	0,549g	96,8%	<b>0,531g</b>	Conforme

##### 4.1.1.2. Resultados do Teste de Desintegração de Cápsulas Vaginais

O tempo médio de desintegração das cápsulas vaginais foi inferior a cinco minutos para todas as cápsulas de *Lactobacillus* spp., incluindo a fórmula. Durante o procedimento foi possível observar a existência de um sedimento esbranquiçado depositado no fundo de cada *Erlenmeyer*, que turvou levemente a solução quando homogeneizada, após o tempo de desintegração. O invólucro que forma a cápsula também se dissolveu por completo durante o período observado e contabilizado (Tabela 5).

Tabela 5 – Resumo dos Resultados do tempo médio de desintegração das cápsulas vaginais a 37°C

Cápsulas Vaginais	Tempo de Desintegração a 37°C (Min)			
	Cápsula 1	Cápsula 2	Cápsula 3	Tempo Médio ( $\pm$ DP)
<i>L. crispatus</i>	4	5	4	4,3 $\pm$ 0,6
<i>L. johnsonii</i>	4	4	3	3,6 $\pm$ 0,6
<i>L. gasseri</i>	4	3	5	4,0 $\pm$ 1,0
<i>L. reuteri</i>	4	5	5	4,6 $\pm$ 0,6
<i>L. rhamnosus</i>	3	3	4	3,3 $\pm$ 0,6
Fórmula L5	5	4	4	4,3 $\pm$ 0,6
<b>Média</b>	4	4	4,2	<b>4,1 <math>\pm</math> 0,6</b>

#### 4.1.2. Avaliação Organoléptica da Pomada Vaginal

Considerando a importância da distribuição uniforme dos *Lactobacillus* spp. em todo o conteúdo da Pomada Vaginal, a avaliação das características organolépticas demonstrou que as fórmulas em estudo apresentaram uniformidade na distribuição visual, sem grânulos perceptíveis a olho nu e impalpáveis sob espatulação. Não existem outras análises passíveis de aplicação para este tipo de composição.

Tabela 6 – Resultados da avaliação das características organolépticas das pomadas vaginais

Pomada Vaginal	Características Organolépticas Observadas
<i>L. crispatus</i>	Forma farmacêutica semissólida, branco leitoso com característica untuosa. Aspecto homogêneo, sem grânulos perceptíveis a olho nu e impalpável sob espatulação.
<i>L. johnsonii</i>	Forma farmacêutica semissólida, branco leitoso com característica untuosa. Aspecto homogêneo, sem grânulos perceptíveis a olho nu e impalpável sob espatulação.
<i>L. gasseri</i>	Forma farmacêutica semissólida, branco leitoso com característica untuosa. Aspecto homogêneo, sem grânulos perceptíveis a olho nu e impalpável sob espatulação.
<i>L. reuteri</i>	Forma farmacêutica semissólida, branco leitoso com característica untuosa. Aspecto homogêneo, sem grânulos perceptíveis a olho nu e impalpável sob espatulação.
<i>L. rhamnosus</i>	Forma farmacêutica semissólida, branco leitoso com característica untuosa. Aspecto homogêneo, sem grânulos perceptíveis a olho nu e impalpável sob espatulação.
Fórmula L5	Forma farmacêutica semissólida, branco leitoso com característica untuosa. Aspecto homogêneo, sem grânulos perceptíveis a olho nu e impalpável sob espatulação.

### 4.1.3. Análise de Desintegração dos Óvulos

#### 4.1.3.1. Desintegração Óvulos Cerosos

O tempo médio de desintegração dos óvulos cerosos foi inferior a 12 minutos para todos os óvulos avaliados, incluindo a Fórmula L5. A desintegração do Óvulo Ceroso atendeu às especificações farmacopeicas, entretanto com maior tempo de dissolução do que aquele observado nas cápsulas vaginais. Durante o procedimento foi possível observar a fusão completa da fórmula com a formação de um sobrenadante oleoso em cada *Erlenmeyer*, que não se misturou à água contida no interior da vidraria após completa desintegração (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados do teste de desintegração dos óvulos cerosos

Óvulo Ceroso	Tempo de Desintegração (min)			
	Óvulo 1	Óvulo 2	Óvulo 3	Tempo médio ( $\pm$ DP)
<i>L. crispatus</i>	11	10	11	10,6 $\pm$ 0,6
<i>L. johnsonii</i>	11	12	12	11,6 $\pm$ 0,6
<i>L. gasseri</i>	10	9	10	9,6 $\pm$ 0,6
<i>L. reuteri</i>	11	10	11	10,6 $\pm$ 0,6
<i>L. rhamnosus</i>	10	12	11	11,3 $\pm$ 1,0
Fórmula L5	11	12	10	11 $\pm$ 1,0
<b>Média</b>	10,7	10,7	10,8	<b>10,8 <math>\pm</math> 0,7</b>

#### 4.1.3.2. Desintegração de Óvulos Gelatinosos

A desintegração dos óvulos gelatinosos começou a ser observada em seis minutos e não ultrapassou 24 minutos em nenhum dos óvulos avaliados, incluindo a Fórmula. O tempo médio atende ao preconizado no Formulário Nacional, garantindo a conformidade, porém configura o maior tempo de dissolução dentre as três formas farmacêuticas sólidas estudadas. Durante o procedimento foi possível observar a fusão completa do óvulo com a solubilização quase completa dos componentes do excipiente. Não foi observada formação de sobrenadantes ou turvação do meio após completa desintegração (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultados do teste de desintegração dos óvulos gelatinosos

Óvulo Ceroso	Tempo de Desintegração (min)			
	Óvulo 1	Óvulo 2	Óvulo 3	Tempo médio ( $\pm$ DP)
<i>L. crispatus</i>	6	10	8	8 $\pm$ 2,0
<i>L. johnsonii</i>	12	12	17	13,6 $\pm$ 2,9
<i>L. gasseri</i>	12	15	12	13 $\pm$ 1,7
<i>L. reuteri</i>	24	23	24	23,3 $\pm$ 0,6
<i>L. rhamnosus</i>	23	24	23	23,3 $\pm$ 0,6
Fórmula L5	24	24	22	23,3 $\pm$ 1,2
<b>Média</b>	16,8	18,0	17,7	17,5 $\pm$ 1,5

## 4.2. Avaliação Microbiológica das formulações Vaginais

### 4.2.1. Cápsulas Vaginais

#### 4.2.1.1. Recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir de cápsula vaginal

Durante a recuperação de UFC/mL das cepas veiculadas em cápsulas vaginais, na cinética de tempo estudada, todas as cepas de *Lactobacillus* spp. foram recuperadas, tanto nas cápsulas contendo cepas individuais de *Lactobacillus* spp. como na Fórmula L5.

Em uma análise geral das cepas de *Lactobacillus* spp., observa-se que a cepa de *L. rhamnosus* apresenta maior capacidade de recuperação e estabilidade ao longo do tempo, e pouco modifica sua capacidade de recuperação nesta formulação. Em contrapartida, a cepa de *L. johnsonii* apresenta baixa recuperação de UFC/mL a partir da cápsula vaginal, reduzindo essa recuperação ao longo da cinética de tempo, nesta forma farmacêutica (Tabela 9).

Tabela 9 – Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL na formulação Cápsula Vaginal durante a cinética de tempo estudada

Cinética de Tempo (dias)	Cápsula vaginal (UFC/mL)					Fórmula L5
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
0	310 x 10 <sup>2</sup>	55 x 10 <sup>2</sup>	25 x 10 <sup>2</sup>	419 x 10 <sup>2</sup>	425 x 10 <sup>2</sup>	183 x 10 <sup>2</sup>
30	159 x 10 <sup>2</sup>	99 x 10 <sup>2</sup>	253 x 10 <sup>2</sup>	338 x 10 <sup>2</sup>	491 x 10 <sup>2</sup>	351 x 10 <sup>2</sup>
60	498 x 10 <sup>2</sup>	35 x 10 <sup>2</sup>	480 x 10 <sup>2</sup>	172 x 10 <sup>2</sup>	454 x 10 <sup>2</sup>	1108 x 10 <sup>2</sup>

#### 4.2.1.2. Percentual de Recuperação de *Lactobacillus* spp. da Cápsula Vaginal

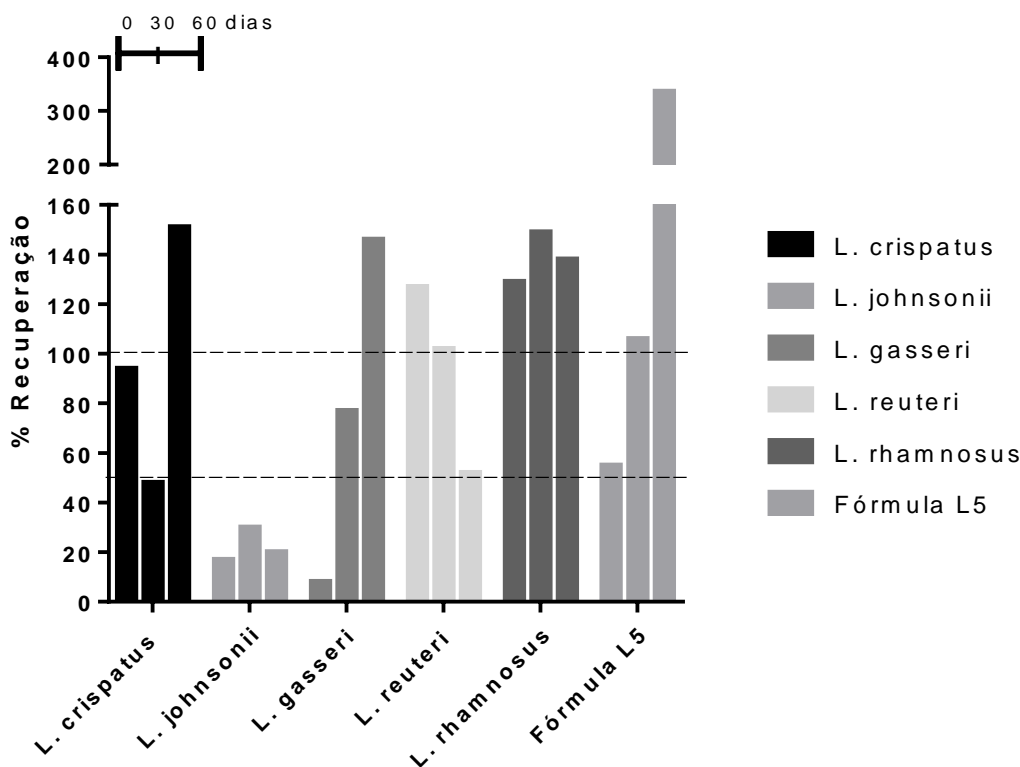
Na análise de percentual de recuperação, os resultados confirmam-se, a cepa de *L. johnsonii* apresenta menor percentual de recuperação na cinética de tempo, sendo inferior a 50% em toda a cinética de tempo estudada. Enquanto a cepa de *L. rhamnosus*



apresentou percentual de recuperação superior a 100% em todos os tempos da cinética.

As demais cepas de *Lactobacillus* estudada, *L. crispatus*, *L. reuteri* e *L. gasseri* (exceto no tempo zero da cinética), e a Fórmula L5, todas apresentam percentual de recuperação igual ou superior a 50% em toda a cinética de tempo estudada

Figura 10 – Percentual de recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir da formulação de Cápsula vaginal



#### 4.2.2. Pomada Vaginal

##### 4.2.2.1. Recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir de Pomada vaginal

A recuperação de UFC/mL das cepas veiculadas em Pomada Vaginal, na cinética de tempo estudada, demonstrou que, sob esta forma farmacêutica, todas as cepas de *Lactobacillus* spp. foram recuperadas individualmente e na Fórmula L5. Destacam-se com maior crescimento *L. crispatus*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e a Fórmula L5, e com menor crescimento as cepas de *L. johnsonii* e *L. gasseri*, em todos os tempos estudados (Tabela 10).

Avaliando a recuperação de cada uma das cepas, podemos apontar que *L. gasseri* foi a cepa com maior estabilidade de UFC/mL ao longo do tempo, embora com baixa taxa

de recuperação. O veículo selecionado pode apontar para a necessidade da determinação de uma validade mais curta para todas as formulações, passível de ser aplicada a formulações extemporâneas para atender alguns pacientes com necessidades especiais, como mulheres que apresentem ressecamento vaginal intenso, cujo veículo hidrófobo semissólido apresenta maior conforto na aplicação. Embora para a cepa de *L. johnsonii*, o petrolato parece não ser um veículo adequado para a veiculação desta espécie.

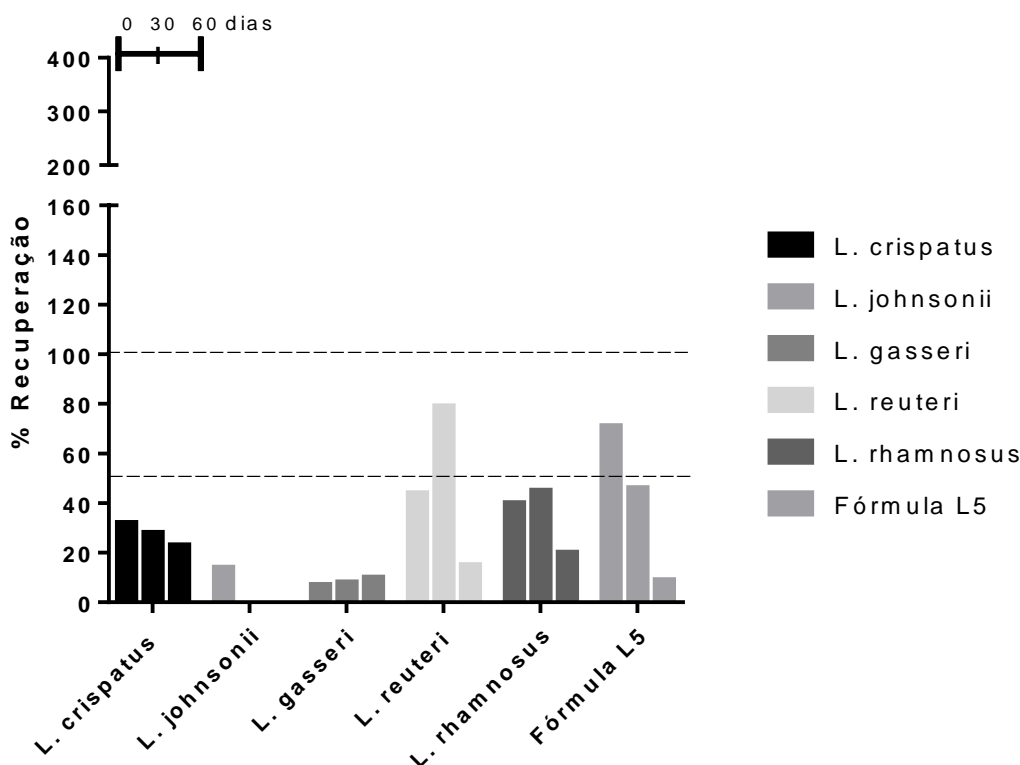
Tabela 10– Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL na formulação Pomada Vaginal durante a cinética de tempo estudada

Cinética de Tempo (dias)	Pomada vaginal (UFC/mL)					Fórmula L5
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
0	105 x 10 <sup>2</sup>	47 x 10 <sup>2</sup>	23 x 10 <sup>2</sup>	144 x 10 <sup>2</sup>	129x 10 <sup>2</sup>	233x 10 <sup>2</sup>
30	91 x 10 <sup>2</sup>	0	28 x 10 <sup>2</sup>	262 x 10 <sup>2</sup>	148x 10 <sup>2</sup>	151x 10 <sup>2</sup>
60	77 x 10 <sup>2</sup>	0	32 x 10 <sup>2</sup>	45 x 10 <sup>2</sup>	67x 10 <sup>2</sup>	29x 10 <sup>2</sup>

#### 4.2.2.2. Percentual de Recuperação de *Lactobacillus* spp. da Pomada Vaginal

A partir das cepas recuperadas, pode-se verificar que as espécies de *L. johnsonii* e *L. gasseri* apresentam menor percentual de recuperação em todos os tempos da cinética. *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e a Fórmula L5, apresentaram percentual de recuperação maior, mas todas as cepas apresentam percentual de recuperação inferior a 50%, exceto pelas cepas de *L. reuteri* (30 dias) e Fórmula L5 (tempo zero), que apresentam pontualmente percentual de recuperação próximo a 80%.

Figura 11 – Percentual de recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir da formulação de Pomada vaginal



#### 4.2.3. Óvulo Ceroso

##### 4.2.3.1. Recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir de Óvulo Ceroso

Pode-se observar que o óvulo ceroso proporcionou a recuperação de UFC/mL de todas as espécies veiculadas, incluído a Fórmula L5, em todos os tempos estudados. Apenas *L. crispatus* não foi recuperado após 60 dias de sua preparação. Esta cepa também apresentou declínio na contagem de UFC/mL a partir de 30 dias de sua preparação.

A Fórmula L5 proporcionou maior recuperação no tempo zero, com declínio posterior. As cepas *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* apresentaram maior recuperação após 30 dias da data da manipulação. *L. gasseri* e *L. reuteri* continuaram a crescer ao longo do tempo, com maior recuperação aos 60 dias de manipulação. *L. johnsonii* e, mais notadamente, *L. rhamnosus*, reduzem a quantidade de UFC/mL recuperada aos 60 dias (Tabela 11).

O comportamento dessa forma farmacêutica mostrou-se muito variável entre as diferentes cepas, nos três tempos, sem apresentar alguma linearidade ou proporcionalidade, mesmo as cepas com maior estabilidade em outras formas

farmacêuticas.

Tabela 11 – Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL na formulação Óvulo Ceroso durante a cinética de tempo estudada

Cinética de Tempo	Óvulo Ceroso (UFC/mL)					Fórmula L5
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
0	98 x 10 <sup>2</sup>	82 x 10 <sup>2</sup>	62 x 10 <sup>2</sup>	177 x 10 <sup>2</sup>	127 x 10 <sup>2</sup>	475 x 10 <sup>2</sup>
30	15 x 10 <sup>2</sup>	170 x 10 <sup>2</sup>	159 x 10 <sup>2</sup>	237 x 10 <sup>2</sup>	523 x 10 <sup>2</sup>	114 x 10 <sup>2</sup>
60	0	152 x 10 <sup>2</sup>	338 x 10 <sup>2</sup>	254 x 10 <sup>2</sup>	158 x 10 <sup>2</sup>	33 x 10 <sup>2</sup>

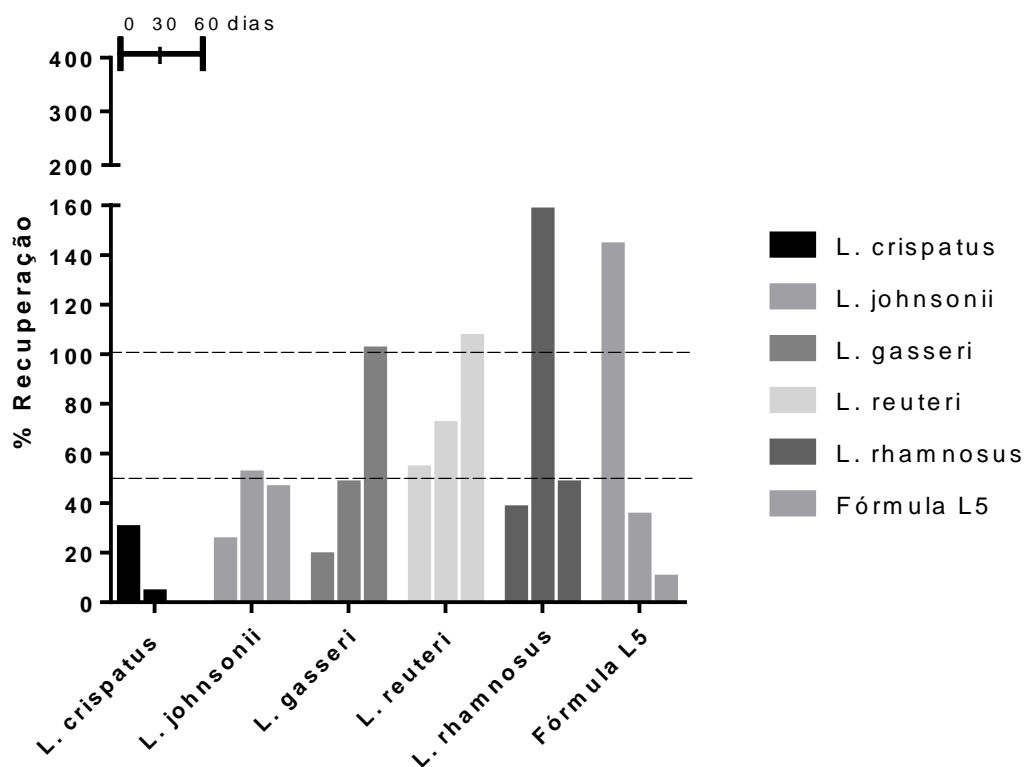
#### 4.2.3.2. Percentual de Recuperação de *Lactobacillus* spp. do Óvulo Ceroso

No tempo zero, apenas a Fórmula L5 apresentou percentual de recuperação acima de 100%, ocorrendo redução deste percentual de forma linear nos outros tempos avaliados. *L. crispatus* teve baixo percentual de recuperação a partir de 30 dias e não foi recuperado ao final do tempo do estudo.

Em 30 dias *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e a Fórmula L5, apresentaram um percentual de recuperação de *Lactobacillus* spp. variando de 35 a 150%.

*L. gasseri* e *L. reuteri* atingiram percentuais superiores a 100% em 60 dias, mostrando que ambas as cepas foram aumentando seu percentual de recuperação na amostra ao longo do tempo. O contrário ocorreu com a Fórmula L5, onde houve declínio de recuperação das cepas ao longo da cinética de tempo.

Figura 12 – Percentual de recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir da formulação de Óvulo Ceroso



#### 4.2.3. Óvulo Gelatinoso

##### 4.2.3.1. Recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir de Óvulo Gelatinoso

Os dados apresentados na Tabela 12 demonstram claramente que a forma Óvulo Gelatinoso foi completamente inadequada para a recuperação das cepas veiculadas, não havendo recuperação de nenhuma das espécies em nenhuma proporção.

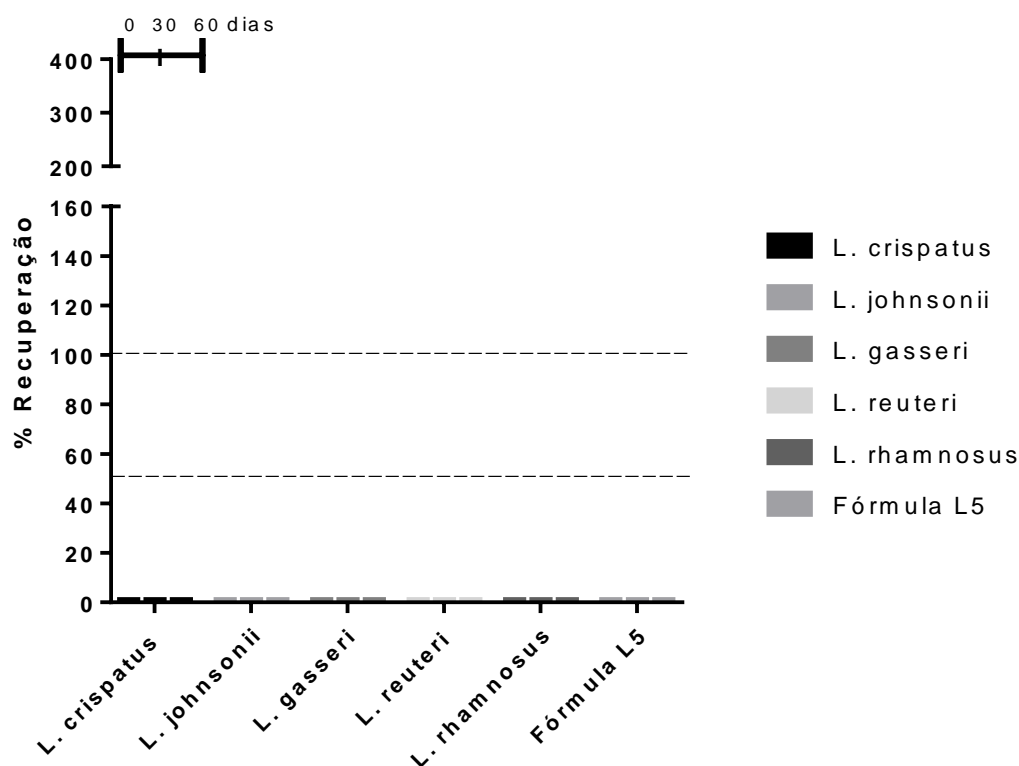
Tabela 12 – Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL na formulação Óvulo gelatinoso durante a cinética de tempo estudada

Cinética de Tempo	Óvulo Gelatinoso (UFC/mL)					
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	Fórmula L5
0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0

#### 4.2.3.2. Percentual de Recuperação de *Lactobacillus* spp. do Óvulo Gelatinoso

Considerando que nenhuma das cepas de *Lactobacillus* spp. foi recuperada a partir do Óvulo Gelatinoso, o percentual de recuperação foi zero em todos os tempos.

Figura 13 – Percentual de recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir da formulação de Óvulo Gelatinoso



#### 4.3. Percentual de recuperação de *Lactobacillus* spp. por cepa em todas as formas farmacêuticas avaliadas

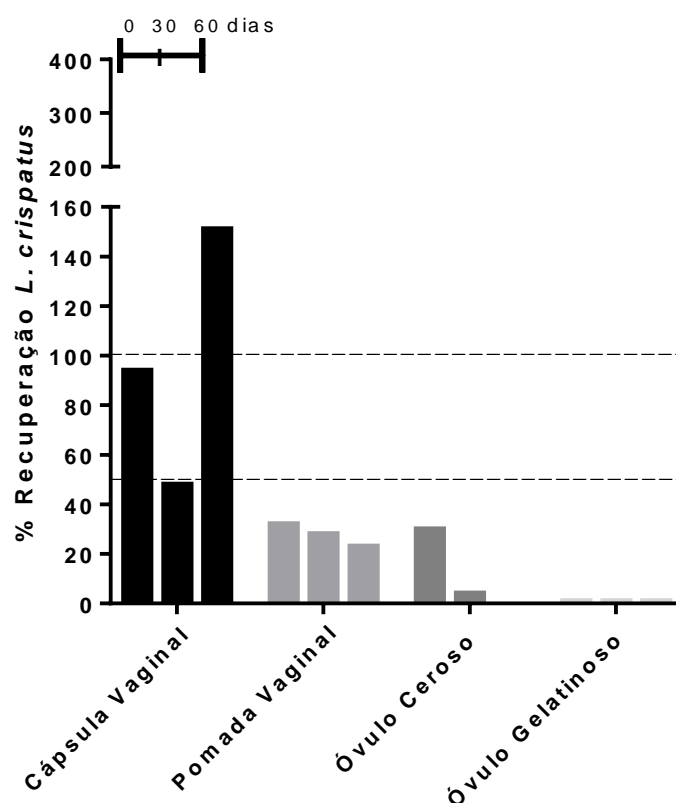
Para que os resultados possam ser analisados por um prisma diferente, o percentual de recuperação dos *Lactobacillus* spp. foi aqui separado por cepa, e seu comportamento em todas as formas farmacêuticas estudadas pode ser mais criteriosamente avaliada.

##### 4.3.1. Percentual de recuperação de *L. crispatus* em todas as formas farmacêuticas

As cápsulas vaginais apresentaram percentual de recuperação superior a 50% em todos os tempos avaliados na pesquisa. Nas formas farmacêuticas pomada vaginal e óvulo

ceroso foi observada recuperação inferior a 50% em todos os tempos da cinética estudada. E o óvulo gelatinoso não permitiu a recuperação de *L. crispatus* (Figura 11).

Figura 14 – Percentual de recuperação de *L. crispatus* em todas as formas farmacêuticas

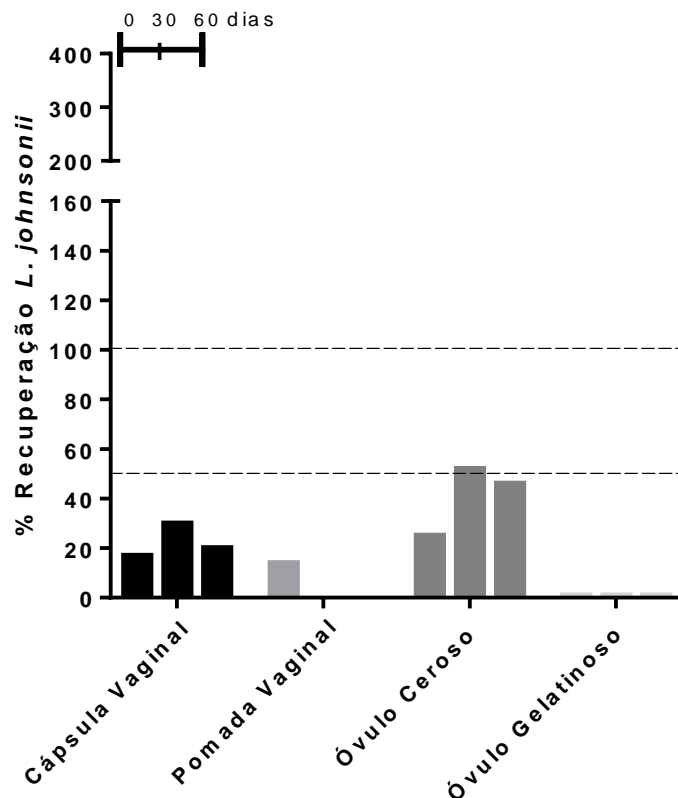


#### 4.3.2. Percentual de recuperação de *L. johnsonii* em todas as formas farmacêuticas

A cepa de *L. johnsonii* utilizada no estudo apresentou baixa recuperação, inferior a 50% em todos os tempos da cinética avaliada e em todas as formas farmacêuticas estudadas. Isso pode demonstrar que talvez a cepa selecionada não apresente bom potencial de crescimento e recuperação, embora mais estudos sejam necessários para

responder esta hipótese, empregando talvez cepas diferentes de *L. johnsonii* (Figura 12)

Figura 15- Percentual de recuperação de *L. johnsonii* em todas as formas farmacêuticas



#### 4.3.3. Percentual de recuperação de *L. gasseri* em todas as formas farmacêuticas

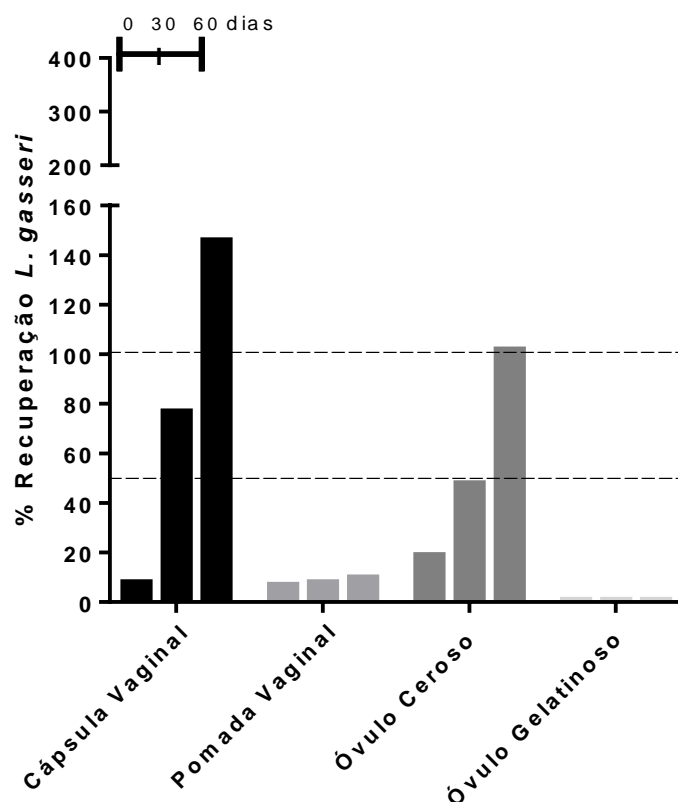
A cepa de *L. gasseri* apresentou bom percentual de recuperação nas cápsulas vaginais e óvulo ceroso, sendo superior a 50% no tempo de 30 dias e maior que 100% com 60 dias. O comportamento da cepa se reproduz em formas farmacêuticas distintas, demonstrando que essa parece ser uma característica individual da cepa de *L. gasseri* estudada.

Importante também observar que para a forma farmacêutica pomada vaginal, essa cepa e de forma mais comedida esta espécie de *Lactobacillus* spp., não apresenta boa



recuperação empregando esse veículo de pomada vaginal.

Figura 16 – Percentual de recuperação de *L. gasseri* em todas as formas farmacêuticas

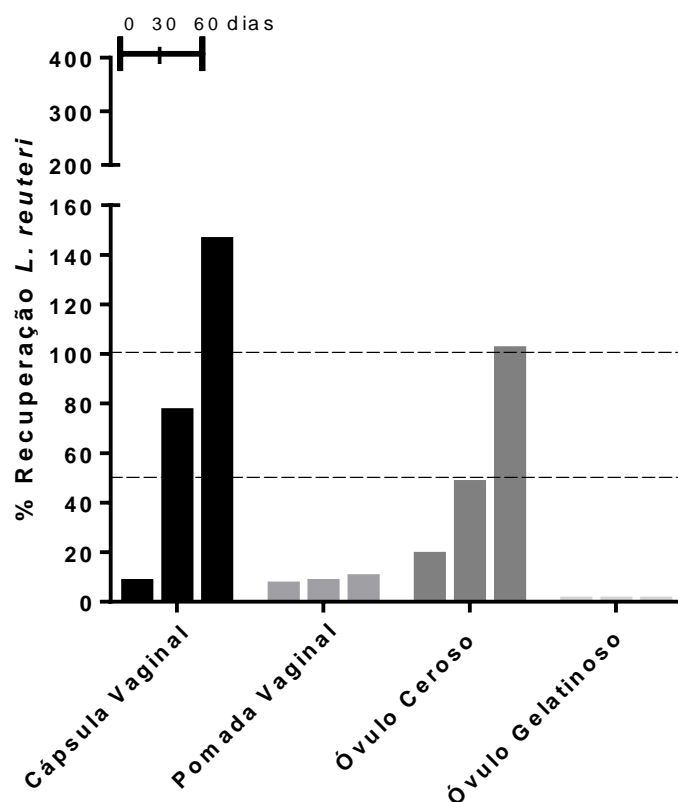


#### 4.3.4. Percentual de recuperação de *L. reuteri* em todas as formas farmacêuticas

Comportamento semelhante apresentou a cepa de *L. reuteri*, com percentual de recuperação nas cápsulas vaginais e óvulo ceroso igual ou superior a 50% no tempo de 30 dias e maior que 100% com 60 dias. O comportamento da cepa se reproduz em formas farmacêuticas distintas, demonstrando que essa parece ser uma característica individual da cepa de *L. reuteri* estudada.

Importante também observar que para a forma farmacêutica pomada vaginal, essa cepa e de forma mais comedida esta espécie de *Lactobacillus* spp., não apresentando bom percentual de recuperação (10%) empregando esse veículo de pomada vaginal.

Figura 17- Percentual de recuperação de *L. reuteri* em todas as formas farmacêuticas

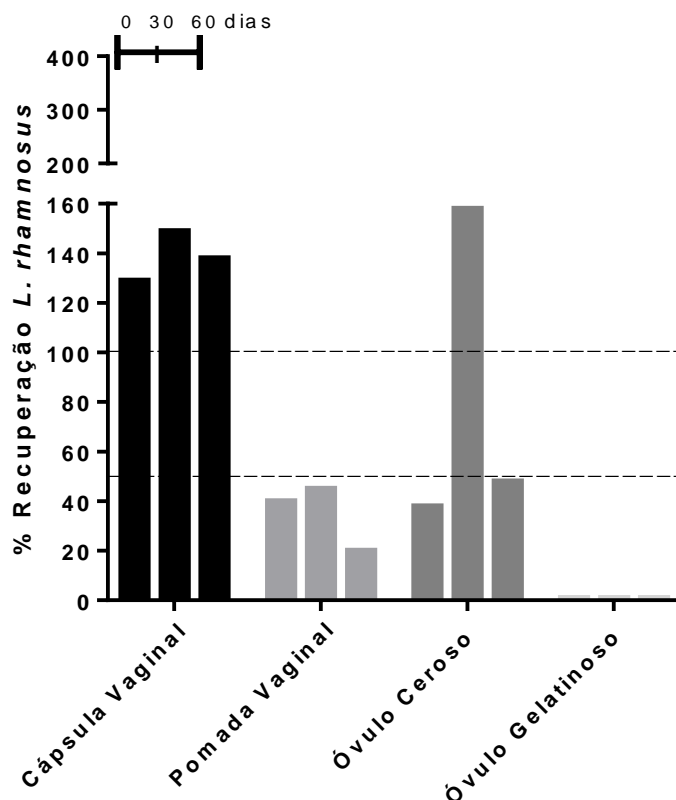


#### 4.3.5. Percentual de recuperação de *L. rhamnosus* em todas as formas farmacêuticas

Esta cepa de *L. rhamnosus* apresentou excelente desempenho de recuperação na forma farmacêutica cápsula vaginal, cujo percentual foi superior a 100% em todos os tempos da cinética estudada, o que parece demonstrar estabilidade da cepa nessa forma farmacêutica.

Nas formas farmacêuticas de pomada vaginal e óvulo ceroso (exceto no tempo de 30 dias), o percentual de recuperação foi inferior a 50%.

Figura 18- Percentual de recuperação de *L. rhamnosus* em todas as formas farmacêuticas



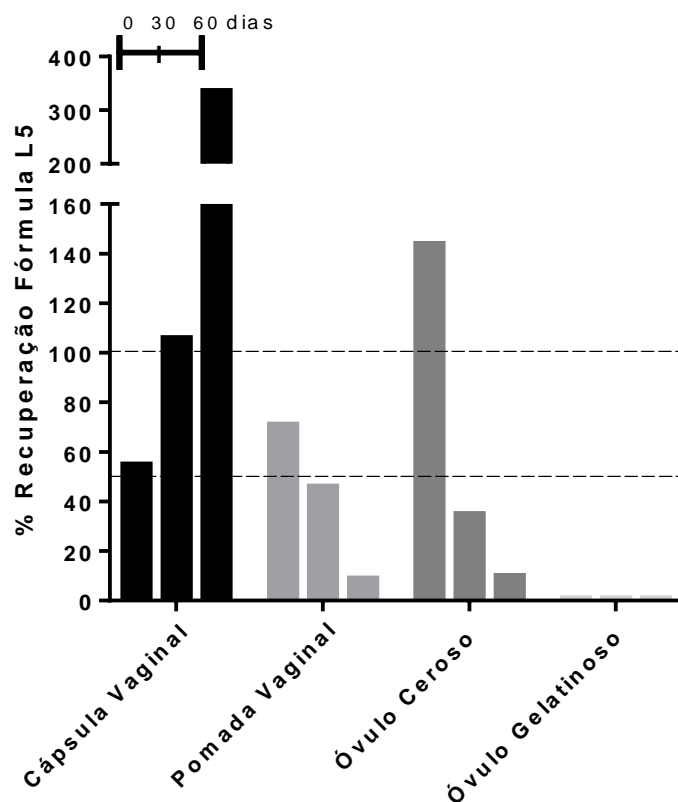
#### 4.3.6. Percentual de recuperação da Fórmula L5 em todas as formas farmacêuticas

Quando avaliamos a Fórmula L5, que contém todas as espécies de *Lactobacillus* spp. estudadas, observamos comportamentos diferentes para as formulações farmacêuticas estudadas.

Para as cápsulas vaginais o percentual de recuperação no tempo zero da cinética foi superior a 50%, com 30 dias foi superior a 100%, e com 60 dias foi superior a 300%.

Comportamento distinto foi observado para a pomada vaginal e óvulo ceroso, que no tempo zero apresentaram percentual de recuperação de 70 e 150%, respectivamente, e no final da cinética de tempo apresentaram percentual de recuperação de apenas 10%. E na forma farmacêutica óvulo gelatinoso não houve recuperação da cepa.

Figura 19 – Percentual de recuperação da Fórmula L5 em todas as formas farmacêuticas



#### 4.4. Avaliação do Crescimento de *L. crispatus*

A tabela 13 resume as quantidades de UFC recuperadas a partir das cápsulas vaginais preparadas com diferentes concentrações de *L. crispatus*.

Como resultado foi obtido um crescimento semelhante para as concentrações de 1, 2 e 3 bilhões de UFC por cápsula. Inesperadamente, as concentrações maiores, com 4 e 5 bilhões de UFC apresentaram menor recuperação de UFC/mL do que as concentrações inferiores.

Tabela 13 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL de *Lactobacillus crispatus* no tempo 0 a partir da forma farmacêutica cápsula vaginal em diferentes concentrações veiculadas.

Cinética de Tempo	Cápsulas Vaginais (UFC/mL)				
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>L. crispatus</i>
	1 Bi UFC	2 Bi UFC	3 Bi UFC	4 Bi UFC	5 Bi UFC
0	309x 10 <sup>2</sup>	296x 10 <sup>2</sup>	349x 10 <sup>2</sup>	167x 10 <sup>2</sup>	135x 10 <sup>2</sup>

#### 4.5. Verificação de Validade Potencial das Formas Farmacêuticas Estudadas

Com base nos resultados encontrados, pode-se verificar qual a validade mais indicada para cada uma das formulações estudadas, após análise em tempo real. O quadro 2 demonstra a validade que cada cepa na forma farmacêutica estudada poderia apresentar, considerando a concentração inicial de manipulação (1 bilhão de UFC) e a cinética de tempo avaliada.

Embora todas as cápsulas vaginais, a pomada vaginal e o óvulo ceroso tenham permitido a recuperação de todas as cepas, nem todas as formas farmacêuticas tiveram estabilidade suficiente para manter a concentração disponível de 1 Bilhão de UFC ao longo do tempo.

No Quadro 2 pode-se observar que apenas uma das 18 formulações manteve a concentração declarada até 60 dias e em todos os tempos da cinética: Cápsulas Vaginais de *L. rhamnosus*. As cápsulas vaginais de *L. reuteri* mantiveram a dose inicial por 30 dias e as cápsulas vaginais com *L. crispatus*, *L. gasseri* e a Fórmula L5 tiveram aumento do número de cepas recuperadas com o passar do tempo. Nenhuma das outras formulações foi capaz de manter a concentração mínima inicialmente veiculada (1 Bilhão de UFC para as espécies isoladas e 5 Bilhões de UFC para a fórmula L5), quando foi considerado o tempo zero, embora algumas cepas apresentaram resultados superiores nos demais tempos da cinética do estudo. Os óvulos gelatinosos foram excluídos do Quadro 1 por não terem apresentado viabilidade.

Tal cuidado se deve ao fato de que as exigências legais atuais definem que a concentração declarada deve ser minimamente passível de detecção em qualquer tempo

dentro do prazo de validade declarado.

Quadro 2 – Avaliação de Validade das Fórmulas com a declaração de 1 Bilhão de UFC por dose

<b>Forma Farmacêutica</b>	<b>Probiótico</b>	<b>UFC declarada</b>	<b>Validade em tempo real</b>
Cápsulas Vaginais	<i>L. crispatus</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. johnsonii</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. gasseri</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. reuteri</i>	1 Bi UFC	30 dias
	<i>L. rhamnosus</i>	1 Bi UFC	60 dias
	Fórmula L5	1 Bi UFC	Inviável
Pomada Vaginal	<i>L. crispatus</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. johnsonii</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. gasseri</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. reuteri</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. rhamnosus</i>	1 Bi UFC	Inviável
	Fórmula	1 Bi UFC	Inviável
Óvulo Ceroso	<i>L. crispatus</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. johnsonii</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. gasseri</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. reuteri</i>	1 Bi UFC	Inviável
	<i>L. rhamnosus</i>	1 Bi UFC	Inviável
	Fórmula	1 Bi UFC	Inviável

Entretanto, poderia ser declarada uma concentração menor para todas as formas farmacêuticas. Na tabela abaixo, resumimos a maior concentração passível de declaração no tempo em que cada micro-organismo demonstrou viabilidade.

Consideramos viável de alegação apenas aqueles que se mantiveram dentro da faixa de UFC entre  $10^7$  e  $10^9$ , que é a faixa de variação onde se demonstram efeitos fisiológicos no ser humano (HOMAYOUNI *et al.*, 2014; NADER-MACÍAS; DE GREGORIO; SILVA, 2021; POLOVA; ALEINYK; KAZAK, 2020; REID *et al.*, 2001; REID; DOLS; MILLER, 2009; REID; KIM; KOHLER, 2006; ZÁRATE; TOMÁS; NADER-MACIAS, 2005).

Pode-se verificar no Quadro 3 que *L. crispatus* em óvulo ceroso e *L. gasseri* em cápsulas vaginais mantiveram a estabilidade por 30 e 60 dias respectivamente com  $10^7$  UFC, apresentando-se como os menores resultados em concentração e em validade. *L. johnsonii* em pomada vaginal se mostrou inviável. E todas as demais apresentações ficaram na casa de  $10^8$  UFC por unidade posológica no tempo de 60 dias.

Quadro 3 – Avaliação de Validade para maior Percentual de Recuperação de UFC das Fórmulas Estudadas

<b>Forma Farmacêutica</b>	<b>Probiótico</b>	<b>UFC declarada</b>	<b>Validade em tempo real</b>
Cápsulas Vaginais	<i>L. crispatus</i>	1 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	<i>L. johnsonii</i>	1 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	<i>L. gasseri</i>	1 x 10 <sup>7</sup> UFC	60 dias
	<i>L. reuteri</i>	5 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	<i>L. rhamnosus</i>	1 x 10 <sup>9</sup> UFC	60 dias
	Fórmula	5 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
Pomada Vaginal	<i>L. crispatus</i>	2 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	<i>L. johnsonii</i>	0 a partir de 30 dias	Inviável
	<i>L. gasseri</i>	1 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	<i>L. reuteri</i>	1 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	<i>L. rhamnosus</i>	2 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	Fórmula	1 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
Óvulo Ceroso	<i>L. crispatus</i>	1 x 10 <sup>7</sup> UFC	30 dias
	<i>L. johnsonii</i>	2 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	<i>L. gasseri</i>	2 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	<i>L. reuteri</i>	4 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	<i>L. rhamnosus</i>	3 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias
	Fórmula	3 x 10 <sup>8</sup> UFC	60 dias

## 5. DISCUSSÃO

Para que um micro-organismo probiótico promova algum benefício para a saúde, é necessário que seja administrado na quantidade suficiente e na forma ativa no local de aplicação a que se destina. Para tanto, os *Lactobacillus* spp. devem resistir aos processos tecnológicos necessários à preparação de formas farmacêuticas adequadas ao uso pretendido, e manter sua viabilidade durante todo o tempo de validade estabelecido (ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006; ZÁRATE; TOMÁS; NADER-MACIAS, 2005).

Sabidamente a escolha da forma farmacêutica de maior conforto posológico favorece a adesão do paciente ao tratamento e a viabilidade dos probióticos pode se comportar de maneira completamente diversa, dependendo do meio em que se encontra veiculado (SILVA *et al.*, 2020). Os adjuvantes necessários à preparação de cada forma farmacêutica podem alterar completamente a sobrevivência e a posterior atividade do probiótico.

No presente estudo, foram selecionadas 4 formas farmacêuticas convenientes para utilização de probióticos intravaginais: cápsulas vaginais gelatinosas duras, elaboradas com gelatina vegetal; pomada vaginal tendo como excipiente o petrolato; óvulo vaginal ceroso tendo como excipiente cera de abelhas e manteiga de cacau; e óvulo vaginal gelatinoso. As cápsulas, a pomada vaginal e os óvulos cerosos permitiram a recuperação das cepas em maior ou menor grau, porém os óvulos gelatinosos não favoreceram a viabilidade de nenhuma das composições.

Na forma de cápsulas vaginais gelatinosas todas as cepas puderam ser recuperadas em maior ou menor proporção, o que sugere que a utilização dessa forma farmacêutica pode levar ao aumento da colonização vaginal por *Lactobacillus* spp. Corroborando esses achados, De Gregorio *et al.* (2020) publicaram ensaio clínico randomizado duplo-cego que avaliou a segurança das cápsulas de gelatina contendo probióticos administradas por via vaginal em mulheres saudáveis e sexualmente ativas.

As participantes foram randomizadas em três grupos recebendo 7 cápsulas, cada, para serem administradas 1 vez ao dia, cada grupo recebeu as cápsulas contendo o seguinte: grupo A: *Lactobacillus reuteri* (CRL1324), *Lactobacillus gasseri* (CRL1263 e CRL1307); grupo B: *Lactobacillus rhamnosus* (CRL1332), *L. gasseri* (CRL1256 e CRL1320); e grupo C: placebo. Nova abordagem clínica, realizada 3-10 dias após o fim da aplicação, incluiu: colposcopia, bacterioscopia de secreção vaginal para avaliação de



índice de Nugent, e cultura para isolar *Lactobacillus* spp.

Os principais resultados obtidos foram uma redução do índice de Nugent após as intervenções nos grupos A e B, mas não no grupo C, e um aumento nos *Lactobacillus* spp. cultiváveis. Nenhum evento adverso grave foi detectado. As cápsulas com *Lactobacillus* spp. foram bem toleradas pelas pacientes, e foram consideradas uma alternativa para restaurar a microbiota vaginal (DE GREGORIO *et al.*, 2020b). Estes dados de cultivo de *Lactobacillus* spp. recuperados *in vitro* corroboram os resultados obtidos nesta pesquisa usando cápsulas vaginais gelatinosas, mas em um ensaio clínico.

Essa forma farmacêutica de cápsula gelatinosa, apresenta várias características interessantes para administração de probióticos pela via vaginal tais como: conforto posológico, acurácia na dosagem, facilidade de produção, ausência de temperatura no método produtivo e baixo custo (PINGITORE *et al.*, 2015; SENOK *et al.*, 2006).

Nas cápsulas vaginais analisadas no presente estudo o excipiente empregado foi a lactose. A lactose foi escolhida como excipiente por apresentar um potencial efeito lioprotetor na preservação da viabilidade de *Lactobacillus* spp., favorecendo a estabilidade das formulações e atuando como nutriente para *Lactobacillus* spp. quando liberados no meio (AFRASSIABIAN; GUESSASMA; SALEH, 2019; SANTIAGO *et al.*, 2009).

Conforme demonstrado em diferentes publicações, a lactose contribui com o crescimento das espécies probióticas em detrimento dos patógenos *E. faecalis* e *E. coli* (AFRASSIABIAN; GUESSASMA; SALEH, 2019; REID *et al.*, 1998; SANTIAGO *et al.*, 2009; VAESSEN *et al.*, 2019).

Corroboram com a escolha da lactose como excipiente para cápsulas vaginais contendo *Lactobacillus* spp., os achados do estudo de Arnold *et al.* (2018), no qual foi avaliada a capacidade de diferentes cepas em fermentar galactooligosacarídeos (GOS), um prebiótico favorável ao controle de sintomas de intolerância à lactose, bem como a capacidade de cada cepa na fermentação da lactose. Das 5 cepas avaliadas, apenas uma delas foi inapta em realizar a fermentação da lactose (ARNOLD *et al.*, 2018).

Em outro estudo, Pingitore *et al.* (2015) avaliaram a viabilidade de uma combinação de diferentes cepas de probióticos com diferentes excipientes, e verificaram que a viabilidade de todas as cepas foi maior quando a lactose estava presente na mistura, sendo as cápsulas vaginais, a forma farmacêutica com melhores resultados (PINGITORE *et al.*, 2015). Dados que confirmam os resultados do presente estudo, no qual a Fórmula L5 de cápsulas vaginais apresentou uma recuperação maior ao longo de toda a cinética

de tempo.

Por se tratarem de formulações vaginais, é relevante destacar a importância do *L. crispatus*, a espécie considerada mais abundante e protetiva da microbiota vaginal saudável (GAJER *et al.*, 2012; RAVEL *et al.*, 2011). Essa cepa embora apresente exigências de crescimento, apresentou melhor desempenho de recuperação nas cápsulas vaginais.

Para compreender seu desempenho de recuperação e considerando sua importância para a MBV saudável, foi realizada uma avaliação adicional com outras concentrações da cepa. Foram então veiculadas 1, 2, 3, 4 e 5 bilhões de UFC em cápsulas vaginais de *L. crispatus*, e nova contagem foi realizada no tempo zero. O objetivo da avaliação foi verificar se haveria uma recuperação mais significativa das UFC veiculadas à medida em que concentração aumentasse, assim seria possível pensar em uma correção da perda de viabilidade pelo processo de armazenamento.

Os resultados demonstraram viabilidade semelhante das cepas para as 3 primeiras concentrações, com redução progressiva nas fórmulas contendo 4 e 5 bilhões de UFC respectivamente. Ao contrário do que foi presumido, o aumento da concentração de micro-organismos ocasionou a redução na viabilidade dos mesmos, o que sugere duas hipóteses iniciais: 1) a elevação na concentração de UFC levou a uma exaustão dos nutrientes do meio, impedindo um aumento no crescimento do *L. crispatus* e reduzindo sua viabilidade, ou 2) pode ter ocorrido um processo de competição intraespecífica que inibiu o crescimento da cepa.

Para a primeira hipótese sabe-se que o crescimento dos *Lactobacillus* spp. pode ser influenciado por várias condições, como temperatura, pH, concentração de oxigênio e atividade de água (DALCANTON *et al.*, 2018). Também é fato conhecido que os cursos de tempo de crescimento microbiano estão envolvidos em fases de crescimento individuais: fase lag, fase de crescimento exponencial, fase estacionária e a fase com decaimento exponencial (REZVANI; ARDESTANI; NAJAFPOUR, 2017). Estudo desenvolvido por Śliżewska *et al.* (2020) demonstrou que quando se emprega MRS, meio empregado neste estudo, a fase lag e a taxa de crescimento são menores quando comparadas a outro meio desenvolvido no estudo (ŚLIŻEWSKA; CHLEBICZ-WÓJCIK, 2020).

Considerando que não houve estudo sobre o impacto das variáveis de crescimento para o cultivo de *Lactobacillus crispatus* empregadas nesta pesquisa e que as condições de cultivo foram mantidas ao longo do cultivo microbiano, a única variável modificada

foi o aumento da concentração da cepa, ou seja, das UFC presentes nas cápsulas vaginais, e é bem plausível que as fases de crescimento acima descritas tenham se alterado e o meio de cultivo MRS tenha esgotado seus nutrientes impedindo o crescimento da cepa.

Em relação à segunda hipótese, competição dentro da mesma espécie de *Lactobacillus crispatus* (competição interespecífica), é necessário compreender o que ocorre nas relações interespecíficas com esse gênero microbiano, que discorreremos a seguir.

Para explicar esse evento biológico tomar-se-á por base estudos publicados pela indústria de alimentos, que empregam frequentemente *Lactobacillus* spp. para fabricação de inúmeros produtos alimentícios. Considerando o emprego de *Lactobacillus curvatus* e *L. sakei* que são usados pela indústria alimentícia para produção de linguiça fermentada, os pesquisadores demonstraram que a assertividade para produção da fermentação, depende da escolha de cepas em uma espécie, pois pode ocorrer a exclusão de cepas competidoras por cepas parceiras complementares (JANSSEN *et al.*, 2020).

Na referência citada, a hipótese colocada é a de *L. curvatus* cepa TMW 1.624 poderia suprimir todas as outras cepas de *L. curvatus* e a maioria das cepas de *L. sakei* em ambientes competitivos. Isso pode estar relacionado a expressão nessa cepa de várias bacteriocinas, que são ativas contra todas as cepas de *L. curvatus*. Diferenças específicas de cepas podem ser demonstradas na suscetibilidade de *L. sakei* a bacteriocinas e na tolerância ao estresse oxidativo, que é maior em cepas coexistentes de *L. sakei* do que no produtor de bacteriocina. Isso sugere que a tolerância às bacteriocinas e o estresse oxidativo representam determinantes adicionais para a assertividade, além da produção de bacteriocinas anteriormente relatada *versus* o complementarismo metabólico de cepas parceiras (JANSSEN *et al.*, 2020).

Transportando essa hipótese para o cultivo de 4 e 5 bilhões de UFC de *L. crispatus* cepa LCr86, testada na mesma quantidade de meio MRS e com período de incubação anteriormente descrito, sabe-se que a rigor *L. crispatus* é um grande produtor de ácido láctico, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e peptídeos antimicrobianos (PETROVA *et al.*, 2015). Além disso, *L. crispatus* também produz grande quantidade beta-galactose quando cultivada em meio MRS contendo galactose (como fonte de carbono) (KIM, J.-W.; RAJAGOPAL, 2000).

Isso sugere que mesmo em condição intraespécie com uma única cepa de *L. crispatus*, não se pode descartar a possibilidade de ocorrência de inibição tal como sugerido por Janssen *et al.* (2020), bem como a influência de metabólitos secretados como

o ácido láctico e bacteriocinas, que também podem influenciar no desempenho de crescimento destes micro-organismos em meios de cultivo (JANSSEN *et al.*, 2020).

Estudo conduzido por Pan *et al.* (2020) demonstrou que algumas cepas específicas de *L. crispatus* tiveram maior habilidade de metabolizar outros açúcares, entre eles a lactose, que *L. gasseri* (PAN *et al.*, 2020). Corroborando estes achados, em nosso estudo a cepa de *L. crispatus* Lcr I apresentou melhor crescimento com a formulação de cápsula vaginal, que possuía como excipiente lactose, o que indiretamente acabou por suplementar o meio de cultivo. Mesmo nesta circunstância, foi observada uma redução do crescimento devido ao esgotamento de nutrientes do meio, além de uma redução do pH, que também pode ter influenciado o crescimento a medida em que o número de UFC aumentou na formulação.

Avaliando as pomadas vaginais, pode-se verificar que em todas houve redução de 1 log na quantidade de UFC recuperadas após 60 dias da preparação, todavia, *L. johnsonii* não foi recuperado em quantidades adequadas na pomada em nenhum dos tempos estudados. Das composições veiculadas no petrolato *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e a Fórmula L5 foram as que apresentaram as melhores taxas de recuperação de UFC em 30 dias. Embora *L. crispatus* tenha apresentado menor taxa de recuperação em 30 dias, demonstrou um comportamento mais estável que as outras cepas, com taxa de recuperação maior que as demais cepas em 60 dias da validade.

Outros autores, como Puebla-Barragan *et al.* (2021) estudaram a viabilidade de uma fórmula comercial de *L. rhamnosus* (LGR-1) e *L. reuteri* (LRC-14) em diferentes veículos oleosos e verificaram uma perda de viabilidade na ordem de 59,3% em todos os veículos testados, sendo o óleo de coco e o petrolato aqueles que apresentaram os melhores resultados (PUEBLA-BARRAGAN *et al.*, 2021). Avaliando o comportamento das mesmas espécies no estudo atual, no tempo de 30 dias observa-se uma semelhança na viabilidade perdida. Entretanto em 60 dias a perda da viabilidade foi bastante superior ao estudo de Puebla-Barragan *et al.* (2021), fato que talvez possa ser explicado pelo emprego de cepas diferentes de *Lactobacillus* estudadas.

Tanto na pomada vaginal quanto nos óvulos cerosos foi mantida a característica lipofílica. Na aplicação vaginal, tais excipientes são muito utilizados por formarem um filme emoliente que confere conforto e proteção à paciente contra a ação irritante de algumas substâncias (PINTO LISBOA MARTINS RODRIGUES, 2011). Além disso, a presença de água em determinadas fórmulas interfere sobremaneira na viabilidade de diferentes probióticos. Tal aspecto é mais estudado na fabricação de alimentos lácteos

enriquecidos de probióticos.

A Atividade de Água ( $A_w$ ) é o parâmetro que mede a disponibilidade de água em determinado alimento e está inversamente relacionada à viabilidade de probióticos após longos períodos de armazenamento. Geralmente se observa que a viabilidade decresce quando a atividade de água nos alimentos aumenta (KURTMANN *et al.*, 2009). No presente estudo a hipótese foi de que a retirada da água das formulações favoreceria a viabilidade das cepas de *Lactobacillus* spp. Ambas as formulações lipofílicas permitiram a recuperação de UFC, porém na pomada foram observados percentuais menores de viabilidade das cepas do que nos óvulos.

Em relação aos óvulos cerosos, todas as cepas puderam ser recuperadas; *L. johnsonii* foi a apresentação com maior taxa de viabilidade. A redução da concentração de UFC em estudos é muito comum. No desenvolvimento de óvulos vaginais, Camiletti *et al.* (2018) verificaram uma redução entre 1 e 2 logs em diferentes composições estudadas (CAMILLETTI *et al.*, 2018). Zárate *et al.* (2006) em seus estudos observam uma perda de UFC ao longo do estudo e apresentaram diversas discussões importantes a este respeito (ZÁRATE; NADER-MACIAS, 2006; ZÁRATE; TOMÁS; NADER-MACIAS, 2005).

Este resultado pode em parte ser explicado pelo fato de que para a fusão e moldagem dos óvulos vaginais foi empregado o aquecimento controlado, que embora não tenha excedido 60°C, conforme protocolo de manipulação adotado, pode interferir na viabilidade das cepas.

Dos processos utilizados para as formas farmacêuticas, o processo de aquecimento é o que apresenta maior potencial de degradação dos micro-organismos empregados. Estudo que avaliou o crescimento de cepas de *Lactobacillus* spp. submetidas a altas temperaturas (37°C, 42°C, 50°C e 55°C) por 24h e recultivadas, observou que nenhuma das cepas submetidas a temperaturas acima de 50 °C apresentou capacidade de crescimento (SILVA *et al.*, 2020).

Em relação aos excipientes, para os óvulos foram selecionados dois excipientes distintos – um deles de característica lipofílica (ceroso) e outro de característica hidrofílica (gelatinoso) nessa forma farmacêutica. No óvulo ceroso, algumas cepas como *L. crispatus* apresentaram baixa capacidade de recuperação, embora as demais cepas nos tempos de 30 e 60 dias apresentem recuperação igual ou superior a 50%. Para o óvulo gelatinoso, nenhuma cepa apresentou viabilidade, nem mesmo as mais resistentes.

No excipiente utilizado para o óvulo gelatinoso é possível que o excesso de

glicerol tenha contribuído para este insucesso, pois a composição continha 14,3% de gelatina, 43,0 % de Glicerina a e 0,02% Sorbato de Potássio, além da água. Camilletti *et al.*, (2018) realizaram um teste *in vitro* com diferentes proporções de glicerol para avaliar qual proporção de glicerol permitiria maior viabilidade de cepas *L. fermentum* e *L. rhamnosus*, e verificaram que abaixo de 30% de glicerol houve a manutenção da viabilidade das cepas estudadas por 180 dias (CAMILLETTI *et al.*, 2018).

Além da influência da elevada concentração de glicerol, a presença de gelatina pode ter influenciado na liberação dos probióticos. A gelatina é um biopolímero formado pela desnaturação do colágeno e rico em prolina e hidroxiprolina, que apresenta capacidade de formação de filme e de aglutinação (MARIOD; ADAM, 2013), o que poderia dificultar a liberação dos probióticos no meio.

Associada aos fatores anteriormente citados, a presença de ácido sórbico na formulação pode ter afetado a viabilidade das cepas, embora no presente estudo a formulação continha concentrações de ácido sórbico inferiores às descritas por Georgieva *et al.* (2009) que demonstrou que altas concentração de sorbato de potássio (0,5 a 1,0%) reduziram a capacidade de crescimento de *Lactobacillus plantarum* em produtos lácteos (GEORGIEVA *et al.*, 2009). De maneira geral, podemos afirmar que esta combinação de fatores culminou com a ausência de viabilidade das cepas estudadas no veículo gelatinoso para óvulos.

Uma discussão importante acerca de produtos probióticos disponíveis no mercado refere-se à validade das formulações. Atualmente o termo probiótico está bem definido por diretrizes internacionais (VERSTRAELEN *et al.*, 2022), mas Reid *et al.*, (2001) já afirmavam que um produto deve conter um número viável de micro-organismos consistente com as doses descritas em estudos clínicos (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015).

As pesquisas atuais consideram a dose mínima terapêutica efetiva, reportada entre  $10^7$  e  $10^9$  UFC de micro-organismos viáveis por dose aplicada (HOMAYOUNI *et al.*, 2014; NADER-MACÍAS; DE GREGORIO; SILVA, 2021; POLOVA; ALEINYK; KAZAK, 2020; REID *et al.*, 2001; REID; DOLS; MILLER, 2009; REID; KIM; KOHLER, 2006; ZÁRATE; TOMÁS; NADER-MACIAS, 2005). Neste estudo, com exceção dos óvulos gelatinosos, foram recuperados entre  $10^7$  a  $10^9$  UFC no prazo de validade.

Para a discussão de validade da formulação é preciso estabelecer alguns parâmetros de aceitação. Enquanto para substâncias químicas (medicamentos) existe uma

variabilidade de teor aceitável, que normalmente se situam entre 95 e 105%, não há uma definição explícita da variabilidade aceitável para micro-organismos viáveis. Se levarmos em consideração que é permitido a variação de peso médio na ordem de 7,5% para mais ou para menos, poderia ser considerado aceitável uma variabilidade na mesma ordem para recuperação de *Lactobacillus* spp viáveis. Assim sendo, poderia ser considerada uma variabilidade aceitável de UFC/g entre 92,5 a 107,5%.

O que se observa, no entanto, é que as diretrizes internacionais determinam que em produtos probióticos, a quantidade de cepas declaradas seja o mínimo detectado durante todo o prazo de validade estabelecido. No quadro 3 encontram-se descritas a validade máxima com a menor concentração de UFC detectada para todas as formas farmacêuticas em todos os tempos nos 60 dias de avaliação *in vitro*. Embora algumas cepas tenham atingido altas concentrações ao final de 60 dias, simulamos uma declaração de viabilidade com a menor taxa de recuperação obtida ao longo da cinética.

Validades curtas são recursos muito comuns para formulações magistrais, uma vez que *shelf lifes* (“tempo de prateleira”, validade) curtos são incompatíveis com processos industriais e distribuições continentais.

Nesse sentido, o presente estudo favoreceu o entendimento da viabilidade de cepas veiculadas em diferentes formas farmacêuticas e diferentes veículos. Permitiu a utilização de um fator de equivalência para as cepas estudadas e uma previsibilidade de sua viabilidade e validade. Todas as espécies demonstraram viabilidade em todas as formas farmacêuticas, com exceção do óvulo gelatinoso que não permitiu recuperação de nenhuma delas.

As cápsulas vaginais foram as formas farmacêuticas mais estáveis para recuperação de *Lactobacillus* spp. Além disso pode-se estimar um período de validade dentro do tempo de estudo para as cepas estudadas, adequando as quantidades declaradas de acordo com os resultados obtidos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo permitiu a avaliação da estabilidade e a viabilidade de cinco diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. em quatro formas farmacêuticas diferentes, com probióticos isolados e associados (Fórmula L5). Todas as formas farmacêuticas estudadas, permitiram a recuperação de UFC em percentuais distintos ao longo da cinética de tempo estudada, exceto os óvulos gelatinosos cuja recuperação de *Lactobacillus* spp. foi inviável em todo o estudo. Uma limitação que merece destaque no desenho do estudo, é que não foi possível avaliar se houve relações de competição ou sinergia entre espécies veiculadas na Fórmula L5, bem como a confirmação de quais foram as cepas de *Lactobacillus* spp. recuperadas dessa fórmula associada. As formas farmacêuticas estudadas confirmaram que há diversos fatores interferentes em cada preparação farmacêutica analisada, e que este estudo dá subsídio para o desenvolvimento de formas farmacêuticas vaginais, incluindo correções de preparação como elevação de temperatura na produção de óvulos cerosos e percentual de glicerol e gelatina empregado em óvulos gelatinosos. A viabilidade de recuperação dos *Lactobacillus* spp. variou entre  $10^7$  e  $10^9$  UFC dentro do prazo de validade de 60 dias, com uma variabilidade aceitável de UFC/g entre 92,5 a 107,5%, se considerarmos a variabilidade de teor aceitável empregado pela indústria de medicamento dentro do prazo de validade, que normalmente se situam entre 95 e 105%. Desta forma, a concentração de UFC recuperada das formulações permite a efetivação do efeito biológico da forma farmacêutica, o que viabiliza o uso vaginal destas formulações. Dos excipientes estudados, a lactose apresentou melhor estabilidade demonstrando ação prebiótica para as cepas. Dentre todas as espécies, as que permitiram melhores taxas de recuperação de UFCs foram *L. reuteri* e *L. rhamnosus*. As piores taxas de recuperação foram observadas na pomada de *L. johnsonii*, nas cápsulas de *L. gasseri* e nos óvulos de *L. crispatus*. As cápsulas vaginais permitiram a melhor viabilidade para *L. crispatus*, *L. rhamnosus* e para a Fórmula L5. Os óvulos cerosos favoreceram *L. johnsonii*, *L. gasseri* e *L. reuteri*. A pomada permitiu viabilidade, porém com resultados de viabilidade inferiores a todas as outras formas farmacêuticas. O presente estudo também corroborou a necessidade de padronização das cepas utilizadas em produtos farmacêuticos magistrais de modo a garantir sua efetividade. Mais estudos são necessários para verificar outras possibilidades de estabilização das cepas veiculadas, com a inserção de outros adjuvantes farmacêuticos, diferentes formas de conservação ou mesmo teste de diferentes cepas das espécies estudadas que possam apresentar comportamentos diferentes, aumentando a



estabilidade e viabilidade das formulações vaginais, a exemplo da fórmula farmacêutica cápsula vaginal, que demonstrou ter efetividade e ser uma excelente candidata a formulação para uso vaginal, garantindo sobrevivência de *Lactobacillus* spp. veiculados.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBASI, Amin *et al.* Probiotic intervention as a potential therapeutic for managing gestational disorders and improving pregnancy outcomes. **Journal of Reproductive Immunology**, [s. l.], v. 143, p. 103244, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103244>

ABD EL-GHANY, Wafaa; QUESNELL, Rebecca; SAKAI, Lisa. **The Effect of a Postbiotic Produced by Stabilized Non-Viable Lactobacilli on the Health, Growth Performance, Immunity, and Gut Status of Colisepticaemic Broiler Chickens**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1260009/v1>.

AFRASSIABIAN, Zahra; GUESSASMA, Mohammed; SALEH, Khashayar. A study on the caking behaviour of binary mixtures of lactose due to solid-state crystallisation of the amorphous phase. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], v. 147, p. 354–366, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.05.032>

AGAMENNONE, Valeria *et al.* A practical guide for probiotics applied to the case of antibiotic-associated diarrhea in the Netherlands. **Pharmaceutisch Weekblad**, [s. l.], v. 154, n. 6, p. 17–24, 2019.

AL-MEMAR, M *et al.* The association between vaginal bacterial composition and miscarriage: a nested case–control study. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [s. l.], v. 127, n. 2, p. 264–274, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15972>

AMMOR, Salim *et al.* Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. **Food Control**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 454–461, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.02.006>

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 200, de 26 de dezembro de 2017. Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos**. [S. l.], 2017.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira, 6ª Edição Volume I**. [S. l.], 2019a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos**. [S. l.], 2019b. Disponível em: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fantigo.anvisa.gov.br%2Fdocuments%2F10181%2F5280930%2Fguia%2B21%2Bv2.pdf%2Fdac5bf5f-ae56-4444-b53c-2cf0f7c15301&cLen=971507&pdfFilename=guia 21 v2.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fantigo.anvisa.gov.br%2Fdocuments%2F10181%2F5280930%2Fguia%2B21%2Bv2.pdf%2Fdac5bf5f-ae56-4444-b53c-2cf0f7c15301&cLen=971507&pdfFilename=guia%20v2.pdf).

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Da Diretoria Colegiada**

- **RDC nº 243, de 26 de Julho de 2018.** [S. l.], 2018a.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018.** [S. l.], 2018b. Disponível em: [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900).

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; MS, Ministério da Saúde. **RESOLUÇÃO Nº 92, DE 9 DE DEZEMBRO DE 2008.** [S. l.], 2008. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0092\\_09\\_12\\_2008.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0092_09_12_2008.html).

BALDACCI, Filippo; BALDACCI, Mara; BERTINI, Marco. Lactobacillus rhamnosus BMX 54 + Lactose, A Symbiotic Long-Lasting Vaginal Approach to Improve Women's Health. **International Journal of Women's Health**, [s. l.], v. Volume 12, p. 1099–1104, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJWH.S259311>

BARTKIENE, Elena *et al.* Development of antimicrobial gummy candies with addition of bovine colostrum, essential oils and probiotics. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 53, n. 5, p. 1227–1235, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13701>

BOHBOT, J.M. *et al.* Efficacy and safety of vaginally administered lyophilized Lactobacillus crispatus IP 174178 in the prevention of bacterial vaginosis recurrence. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 81–86, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2017.11.005>

BRADSHAW, Catriona S. *et al.* The influence of behaviors and relationships on the vaginal microbiota of women and their female partners: The WOW health study. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 209, n. 10, p. 1562–1572, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jit664>

BRASIL; MS, Ministério da Saúde; ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário Nacional Da Farmacopeia Brasileira 2ª edição - Revisão 02.** [S. l.], 2012. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.gov.br%2Fanvisa%2Fpt-br%2Fassuntos%2Ffarmacopeia%2Fformulario-nacional%2Farquivos%2F8065json-file-1&clen=1317799&chunk=true>.

BROTMAN, Rebecca M. *et al.* Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 210, n. 11, p. 1723–1733, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu330>

BROWN, Richard G. *et al.* Vaginal dysbiosis increases risk of preterm fetal membrane rupture, neonatal sepsis and is exacerbated by erythromycin. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0999-x>

BRUNO, Laura Maria *et al.* Non-dairy cashew nut milk as a matrix to deliver probiotic bacteria. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 604–607, 2020. Disponível em:

em: <https://doi.org/10.1590/fst.14219>

CAMILLETTI, A. L. *et al.* First Steps towards the Pharmaceutical Development of Ovules Containing Lactobacillus Strains: Viability and Antimicrobial Activity as Basic First Parameters in Vaginal Formulations. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 886–895, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0895-x>

CHANG, Cherry Yin-Yi *et al.* A More Diverse Cervical Microbiome Associates with Better Clinical Outcomes in Patients with Endometriosis: A Pilot Study. **Biomedicines**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 174, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010174>

CHAROO, Naseem Ahmad. Critical Excipient Attributes Relevant to Solid Dosage Formulation Manufacturing. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 163–181, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12247-019-09372-w>

CHEE, Wallace Jeng Yang; CHEW, Shu Yih; THAN, Leslie Thian Lung. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 203, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01464-4>

CIBLEY, Leonard J.; CIBLEY, Laurence J. Cytolytic vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 165, n. 4, p. 1245–1249, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(12\)90736-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(12)90736-X)

DE GREGORIO *et al.* Biosurfactant from vaginal Lactobacillus crispatus BC1 as a promising agent to interfere with Candida adhesion. **Microbial cell factories**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 133, 2020a. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01390-5>

DE GREGORIO, Priscilla Romina *et al.* In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. PART 5, p. 685–696, 2014a. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.069401-0>

DE GREGORIO *et al.* In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 685–696, 2014b. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.069401-0>

DE GREGORIO *et al.* Intravaginal administration of gelatine capsules containing freeze-dried autochthonous lactobacilli: a double-blind, randomised clinical trial of safety. **Beneficial Microbes**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 5–17, 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2019.0081>

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. ELISABETH. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. **Journal of Applied Bacteriology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 130–135, 1960. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>

DE SETA, Francesco *et al.* The Vaginal Microbiome: III. The Vaginal Microbiome in

Various Urogenital Disorders. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 85–92, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000645>

DEL GIUDICE, Michele Miraglia *et al.* Bifidobacterium mixture (B longum BB536, B infantis M-63, B breve M-16V) treatment in children with seasonal allergic rhinitis and intermittent asthma. **Italian Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 4–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0340-5>

DEV, Kapil *et al.* The Integrative Human Microbiome Project. **Nature**, [s. l.], v. 569, n. 7758, p. 641–648, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1238-8>

DI PAOLA, Monica *et al.* Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 10200, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09842-6>

DONDERS *et al.* Aerobic vaginitis: Abnormal vaginal flora entity that is distinct from bacterial vaginosis. **International Congress Series**, [s. l.], v. 1279, n. January, p. 118–129, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.02.064>

DONDERS, Gilbert G.G. *et al.* Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 34–43, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2002.00432.x>

DONDERS *et al.* The use of 3 selected lactobacillary strains in vaginal probiotic gel for the treatment of acute Candida vaginitis: a proof-of-concept study. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 1551–1558, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03868-x>

DONDERS, Gilbert G.G.; SOBEL, Jack D. Candida vulvovaginitis: A store with a buttery and a show window. **Mycoses**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 70–72, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12572>

DRAELOS, Zoe D. The science behind skin care: Moisturizers. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 138–144, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jocd.12490>

FEIZOLLAHZADEH, Sadegh *et al.* Effect of Probiotic Soy Milk on Serum Levels of Adiponectin, Inflammatory Mediators, Lipid Profile, and Fasting Blood Glucose Among Patients with Type II Diabetes Mellitus. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 41–47, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9233-y>

FOX, Michael J. *et al.* Can probiotic yogurt prevent diarrhoea in children on antibiotics? A double-blind, randomised, placebo-controlled study. **BMJ Open**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 2–7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2014-006474>

FREITAS, Aline C. *et al.* Increased richness and diversity of the vaginal microbiota and spontaneous preterm birth. **Microbiome**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 117, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0502-8>

GARDNER, Herman L. Desquamative inflammatory vaginitis: A newly defined entity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 102, n. 8, p. 1102–1105, 1968. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(68\)90399-2](https://doi.org/10.1016/0002-9378(68)90399-2)

HAN, Yiwen; LIU, Zhaoxia; CHEN, Tingtao. Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. June, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643422>

HILL, Colin *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

HOLZMAN, C. *et al.* Factors linked to bacterial vaginosis in nonpregnant women. **American Journal of Public Health**, [s. l.], v. 91, n. 10, p. 1664–1670, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.2105/AJPH.91.10.1664>

HOMAYOUNI, Aziz *et al.* Effects of Probiotics on the Recurrence of Bacterial Vaginosis. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 79–86, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/LGT.0b013e31829156ec>

HOSSAIN, Md Nur *et al.* Healthy chocolate enriched with probiotics: a review. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 531–543, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/fst.11420>

HUSAIN, S. *et al.* Effects of oral probiotic supplements on vaginal microbiota during pregnancy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial with microbiome analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [s. l.], v. 127, n. 2, p. 275–284, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15675>

IBARRA, Alvin *et al.* Effects of 28-day Bifidobacterium animalis subsp. lactis HN019 supplementation on colonic transit time and gastrointestinal symptoms in adults with functional constipation: A double-blind, randomized, placebo-controlled, and dose-ranging trial. **Gut Microbes**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 236–251, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1412908>

KARIYAWASAM, Kariyawasam Majuwana Gamage Menaka Menike; LEE, Na-Kyoung Kyong; PAIK, Hyun-Dong Dong. Fermented dairy products as delivery vehicles of novel probiotic strains isolated from traditional fermented Asian foods. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 58, n. 7, p. 2467–2478, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04857-w>

KOVACHEV, Stefan Miladinov; VATCHEVA-DOBREVSKA, Rossitza Stefanova. Local Probiotic Therapy for Vaginal Candida albicans Infections. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 38–44, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s12602-014-9176-0>

KUMAR, Arun *et al.* A Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* JBC5 Improves Longevity and Healthy Aging by Modulating Antioxidative, Innate Immunity and Serotonin-Signaling Pathways in *Caenorhabditis elegans*. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 268, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox11020268>

LEV-SAGIE, Ahinoam *et al.* The Vaginal Microbiome: II. Vaginal Dysbiotic Conditions. **Journal of lower genital tract disease**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 79–84, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000644>

LEV-SAGIE, Ahinoam *et al.* Vaginal microbiome transplantation in women with intractable bacterial vaginosis. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 1500–1504, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0600-6>

LEWIS, Felicia M. T.; BERNSTEIN, Kyle T.; ARAL, Sevgi O. Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases. **Obstetrics & Gynecology**, [s. l.], v. 129, n. 4, p. 643–654, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001932>

LIN, Meei Yn; SAVAIANO, Dennis; HARLANDER, Susan. Influence of Nonfermented Dairy Products Containing Bacterial Starter Cultures on Lactose Maldigestion in Humans. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 87–95, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78147-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78147-2)

LÓPEZ-MORENO, Ana; AGUILERA, Margarita. Vaginal Probiotics for Reproductive Health and Related Dysbiosis: Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1461, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm10071461>

MACHADO, RM. *et al.* Vaginal Films for Drug Delivery. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 102, n. 7, p. 2069–2081, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jps>

MARAZZO, J.M *et al.* Womens’s Satisfaction with an Intravaginal *Lactobacillus* Capsule for the Treatment of Bacterial Vaginosis. **Journal of women’s Health**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 1053–1060, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006289>

MARCHESI, Julian R.; RAVEL, Jacques. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 31, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>

MASTROMARINO, Paola; VITALI, Beatrice; MOSCA, Luciana. Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. **The new microbiologica**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 229–238, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04857-w>

MEI, Ling *et al.* Dysbiosis of vaginal microbiota associated with persistent high-risk human papilloma virus infection. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 20, n. 1,

p. 12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03201-w>

MIN, Min *et al.* Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 59, n. 16, p. 2626–2641, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1462760>

MITRA, Anita *et al.* The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: What do we know and where are we going next? **Microbiome**, [s. l.], v. 4, p. 1–15, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0203-0>

MOON, NANCY J.; REINBOLD, G. W. Commensalism and Competition in Mixed Cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*1. **Journal of Milk and Food Technology**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 337–341, 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0022-2747-39.5.337>

NADER-MACÍAS, María Elena Fátima; DE GREGORIO, Priscilla Romina; SILVA, Jessica Alejandra. Probiotic lactobacilli in formulas and hygiene products for the health of the urogenital tract. **Pharmacology Research and Perspectives**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1–18, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prp2.787>

NADER-MACÍAS, María Elena Fátima; DE GREGORIO, Priscilla Romina; SILVA, Jessica Alejandra. Probiotic lactobacilli in formulas and hygiene products for the health of the urogenital tract. **Pharmacology Research & Perspectives**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1–18, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prp2.787>

NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 297–301, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.297-301.1991>

OSMAŁEK, Tomasz *et al.* Recent advances in polymer-based vaginal drug delivery systems. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1–49, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060884>

PAKDAMAN, Michael N. *et al.* The effects of the DDS-1 strain of *Lactobacillus* on symptomatic relief for lactose intolerance - A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. **Nutrition Journal**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0172-y>

PALMA, Ettore *et al.* Long-term *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 application to restore a balanced vaginal ecosystem: a promising solution against HPV-infection. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2938-z>

PAN, Meichen *et al.* Comparative Analysis of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus* Isolated From Human Urogenital and Gastrointestinal Tracts. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. January, p. 1–17, 2020. Disponível em:



<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03146>

PANDEY, Kavita R.; NAIK, Suresh R.; VAKIL, Babu V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 12, p. 7577–7587, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>

PAROLIN, Carola *et al.* Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-Candida Activity. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. e0131220, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131220>

PEREIRA, Lívia Custódio *et al.* Vulvovaginal candidiasis and current perspectives: new risk factors and laboratory diagnosis by using MALDI TOF for identifying species in primary infection and recurrence. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 1681–1693, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04199-1>

PETRICEVIC, Ljubomir *et al.* Characterisation of the vaginal Lactobacillus microbiota associated with preterm delivery. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 4, p. 1–6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep05136>

PETROVA, Mariya I. *et al.* Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 6, n. MAR, p. 1–18, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00081>

PINGITORE, EV *et al.* Design of novel urogenital pharmabiotic formulations containing lactobacilli, salivaricin CRL 1328 and non-microbial compounds with different functionalities. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 942–952, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.917092>

POLOVA, Zhanna; ALEINYK, Svitlana; KAZAK, Aurelii. Formulation and technology development of vaginal pessaries with probiotic activity. **Ceska a Slovenska Farmacie**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 90–99, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32545988>

PUEBLA-BARRAGAN, Scarlett *et al.* Topical Probiotics for Women’s Urogenital Health: Selection of an Oil-based Carrier. **OBM Integrative and Complementary Medicine**, [s. l.], v. 06, n. 04, p. 1–1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21926/obm.icm.2104040>

PUEBLA-BARRAGAN, Scarlett; REID, Gregor. Forty-five-year evolution of probiotic therapy. **Microbial Cell**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 184–196, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.15698/mic2019.04.673>

PUEBLA-BARRAGAN, Scarlett; REID, Gregor. Probiotics in Cosmetic and Personal Care Products: Trends and Challenges. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 1249, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26051249>

RAVEL, Jacques *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4680–4687, 2011. Disponível em:

<https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>

RAZMPOOSH, Elham *et al.* The effect of probiotic supplementation on glycemic control and lipid profile in patients with type 2 diabetes: A randomized placebo controlled trial. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 175–182, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.08.008>

REID, Gregor *et al.* Probiotic Lactobacillus dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 37–41, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(01\)00269-3](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(01)00269-3)

REID, Gregor. Probiotic Lactobacillus dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 37–41, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(01\)00269-3](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(01)00269-3)

REID, Gregor; DOLS, Joke; MILLER, Wayne. Targeting the vaginal microbiota with probiotics as a means to counteract infections. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 583–587, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328331b611>

REID, Gregor; KIM, Sung O.; KOHLER, Gerwald A. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 149–157, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00026.x>

ROŠKAR, Irena *et al.* Effects of a probiotic product containing Bifidobacterium animalis subsp. animalis IM386 and Lactobacillus plantarum MP2026 in lactose intolerant individuals: Randomized, placebo-controlled clinical trial. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 35, p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.020>

ROSTOK, M. *et al.* Potential vaginal probiotics: safety, tolerability and preliminary effectiveness. **Beneficial Microbes**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 385–393, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2016.0123>

SALMINEN, Seppo *et al.* The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 649–667, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00440-6>

SANTIAGO, Guido Lopes dos Santos *et al.* A pilot study evaluating the safety of vaginal administration of a multi-particulate pellet formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 399–403, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.08.009>

SARAF, Viqar Sayeed *et al.* Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 203, n. 7, p. 3793–3802, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02414-3>

SAXELIN, Maija. Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: A European perspective. **Clinical Infectious Diseases**,

[*s. l.*], v. 46, n. SUPPL. 2, p. 76–79, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/523337>

SERVIN, Alain L.; COCONNIER, Marie-Hélène. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [*s. l.*], v. 17, n. 5, p. 741–754, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00052-0](https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00052-0)

SHENOY, Adele; GOTTLIEB, Alice. Probiotics for oral and vulvovaginal candidiasis: A review. **Dermatologic Therapy**, [*s. l.*], v. 32, n. 4, p. e12970, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/dth.12970>

SHI, Xueqian; ZHONG, Qixin. Crystallinity and quality of spray-dried lactose powder improved by soluble soybean polysaccharide. **LWT - Food Science and Technology**, [*s. l.*], v. 62, n. 1, p. 89–96, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.024>

SHIMIZU, Kentaro; OJIMA, Masahiro; OGURA, Hiroshi. Gut Microbiota and Probiotics/Synbiotics for Modulation of Immunity in Critically Ill Patients. **Nutrients**, [*s. l.*], v. 13, n. 7, p. 2439, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu13072439>

SILVA, Jessica Alejandra *et al.* Screening of autochthonous vaginal beneficial lactobacilli strains by their growth at high temperatures for technological applications. **Antonie van Leeuwenhoek**, [*s. l.*], v. 113, n. 10, p. 1393–1409, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01431-4>

SIROTA, Ido; ZAREK, Shvetha M.; SEGARS, James H. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. **Seminars in Reproductive Medicine**, [*s. l.*], v. 32, n. 1, p. 35–42, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361821>

SOBEL, JD. Recurrent bacterial vaginosis, relapse or reinfection: the role of sexual transmission. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [*s. l.*], v. 128, n. 4, p. 768–768, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16471>

SOCIETY, Infectious Diseases. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America 2014. This work is written by (a) US Government employee(s) and is in the public domain in the US. [*s. l.*], p. 1–4, 2014.

SPORMANN, Alfred M. *et al.* Microbial biofilms. **Nanoscale Technology in Biological Systems**, [*s. l.*], p. 341–357, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9780203500224>

STRUS, Magdalena *et al.* Studies on the effects of probiotic Lactobacillus mixture given orally on vaginal and rectal colonization and on parameters of vaginal health in women with intermediate vaginal flora. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, [*s. l.*], v. 163, n. 2, p. 210–215, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.05.001>

SUPERTI, Fabiana; DE SETA, Francesco. Warding Off Recurrent Yeast and Bacterial Vaginal Infections: Lactoferrin and Lactobacilli. **Microorganisms**, [*s. l.*], v. 8, n. 1, p.

130, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010130>

TAN, Ai Huey *et al.* Probiotics for constipation in Parkinson's disease: A randomized placebo-controlled study. **Neurology**, [s. l.], v. 96, n. 5, p. 10.1212/WNL.0000000000010998, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010998>

TANG, Bo *et al.* The Effect of Probiotics Supplementation on Gut Microbiota After Helicobacter pylori Eradication: A Multicenter Randomized Controlled Trial. **Infectious Diseases and Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 317–333, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00372-9>

TANIUCHI, Shoichiro *et al.* Administration of Bifidobacterium to infants with atopic dermatitis: Changes in fecal microflora and clinical symptoms. **Journal of Applied Research**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 387–396, 2005.

TERRAF *et al.* Biofilms of vaginal Lactobacillus reuteri CRL 1324 and Lactobacillus rhamnosus CRL 1332: kinetics of formation and matrix characterization. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 198, n. 7, p. 689–700, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1225-5>

TERRAF *et al.* In vitro effect of vaginal lactobacilli on the growth and adhesion abilities of uropathogenic Escherichia coli. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 199, n. 5, p. 767–774, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1336-z>

TERRAF *et al.* Phenotypic surface properties (aggregation, adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 117, n. 6, p. 1761–1772, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.12642>

TERRAF *et al.* Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 113, n. 6, p. 1517–1529, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05429.x>

THARMARAJ, N.; SHAH, N. P. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. **International Food Research Journal**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 261–276, 2009.

TOMÁS, Mariana *et al.* Bacterial vaginosis: Standard treatments and alternative strategies. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 587, p. 119659, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119659>

TOMUSIAK, Anna *et al.* Efficacy and safety of a vaginal medicinal product containing three strains of probiotic bacteria: a multicenter, randomized, double-blind, and placebo-controlled trial. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 9, p. 5345, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S89214>

VAESSEN, Evelien M.J. *et al.* Accumulation of intracellular trehalose and lactose in Lactobacillus plantarum WCFS1 during pulsed electric field treatment and subsequent

freeze and spray drying. **LWT**, [s. l.], v. 115, n. June, p. 108478, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108478>

VAN DER AA, L. B. *et al.* Synbiotics prevent asthma-like symptoms in infants with atopic dermatitis. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 170–177, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02416.x>

VAN NOOD, Els *et al.* Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile*. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 368, n. 5, p. 407–415, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1205037>

VASUDHA, S.; MISHRA, H. N. Non dairy probiotic beverages. **International Food Research Journal**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 7–15, 2013. Disponível em: [chrome-extension://efaidnbmninnibpcajpcgclclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fwww.ifrj.upm.edu.my%2F20%2520\(01\)%25202013%2F2%2520IFRJ%252020%2520\(01\)%25202013%2520Vasudha%2520\(045\).pdf&cLen=421217&chunk=true](chrome-extension://efaidnbmninnibpcajpcgclclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=http%3A%2F%2Fwww.ifrj.upm.edu.my%2F20%2520(01)%25202013%2F2%2520IFRJ%252020%2520(01)%25202013%2520Vasudha%2520(045).pdf&cLen=421217&chunk=true)

VERSTRAELEN, Hans *et al.* The Vaginal Microbiome: I. Research Development, Lexicon, Defining “Normal” and the Dynamics Throughout Women’s Lives. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 73–78, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000643>

VIAZIS, Nikos *et al.* A Four-Probiotics Regimen Combined with A Standard *Helicobacter pylori*-Eradication Treatment Reduces Side Effects and Increases Eradication Rates. **Nutrients**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 632, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu14030632>

VIEIRA-BAPTISTA, Pedro; BORNSTEIN, Jacob. Candidiasis, Bacterial Vaginosis, Trichomoniasis and Other Vaginal Conditions Affecting the Vulva. *In*: BORNSTEIN, Jacob (org.). **Vulvar Disease**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 167–205. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-61621-6\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-319-61621-6_24)

VITELLIO, Paola *et al.* rhamnosus on Gut Microbiota in Patients with Lactose Cross-Over Study. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 886, p. 1–15, 2019.

WEI, Weixia *et al.* Microbiota composition and distribution along the female reproductive tract of women with endometriosis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00356-0>

WENUS, C. *et al.* Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk drink. **European Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 299–301, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602718>

XIE, Huan Yu *et al.* Probiotics for vulvovaginal candidiasis in non-pregnant women. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2013, n. 11, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010496>

XU, Haihong *et al.* Characterization of the vaginal microbiome during cytolytic vaginosis

using high-throughput sequencing. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. e22653, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcla.22653>

YADAV, Manoj Kumar *et al.* Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 106, n. 2, p. 505–521, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>

YOON, Jin Young *et al.* Probiotics Ameliorate Stool Consistency in Patients with Chronic Constipation: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Digestive Diseases and Sciences**, [s. l.], v. 63, n. 10, p. 2754–2764, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10620-018-5139-8>

ZÁRATE, Gabriela; NADER-MACIAS, María Elena. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1779–1785, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.024>

ZÁRATE, Gabriela; TOMÁS, María Silvina Juárez; NADER-MACIAS, María Elena. Effect of some pharmaceutical excipients on the survival of probiotic vaginal lactobacilli. **Canadian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 6, p. 483–489, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/w05-031>

## 8. APÊNDICE

Tabela 14 – Percentual de recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir da formulação de Cápsula Vaginal

Cinética de Tempo	Cápsula vaginal (%)					Fórmula L5
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
0	94	17	8	127	129	55
30	48	30	77	102	149	106
60	151	20	146	52	138	336

Tabela 15 – Percentual de recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir da formulação de Pomada Vaginal

Cinética de Tempo	Pomada vaginal (%)					Fórmula L5
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
0	32	14	7	44	40	71
30	28	0	8	79	45	46
60	23	0	10	15	20	9

Tabela 16 – Percentual de recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir da formulação de Óvulo Ceroso

Cinética de Tempo	Óvulo Ceroso (%)					Fórmula L5
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
0	30	25	19	54	38	144
30	4	52	48	72	158	35
60	0	46	102	107	48	10

Tabela 17 – Percentual de recuperação de *Lactobacillus* spp. a partir da formulação de Óvulo Gelatinoso

Cinética de Tempo	Óvulo Gelatinoso (%)					Fórmula L5
	<i>L. crispatus</i>	<i>L. johnsonii</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0

Tabela 18 – Percentual de recuperação de *L. crispatus* em cada formulação

Cinética de Tempo	<i>L. crispatus</i>			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	94	32	30	0
30	48	28	4	0
60	151	23	0	0

Tabela 19 – Percentual de recuperação de *L. johnsonii* em cada formulação

Cinética de Tempo	<i>L. johnsonii</i>			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	17	14	25	0
30	30	0	52	0
60	20	0	46	0

Tabela 20 – Percentual de recuperação de *L. gasseri* em cada formulação

Cinética de Tempo	<i>L. gasseri</i>			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	8	7	19	0
30	77	8	48	0
60	146	10	102	0

Tabela 21 – Percentual de recuperação de *L. reuteri* em cada formulação

Cinética de Tempo	<i>L. reuteri</i>			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	127	44	54	0
30	102	79	72	0
60	52	15	107	0

Tabela 22 – Percentual de recuperação de *L. rhamnosus* em cada formulação

Cinética de Tempo	<i>L. rhamnosus</i>			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	129	40	38	0
30	149	45	158	0
60	138	20	48	0

Tabela 23 – Percentual de recuperação de *Lactobacillus spp.* da Fórmula L5 em cada formulação

Cinética de Tempo	Fórmula L5			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	55	71	144	0
30	106	46	35	0
60	336	9	10	0

Tabela 24 – Recuperação de UFC/mL de *L. crispatus* em cada formulação

Cinética de Tempo	<i>L. crispatus</i>			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	310 x 10 <sup>2</sup>	105 x 10 <sup>2</sup>	98 x 10 <sup>2</sup>	0
30	159 x 10 <sup>2</sup>	91 x 10 <sup>2</sup>	15 x 10 <sup>2</sup>	0
60	498 x 10 <sup>2</sup>	77 x 10 <sup>2</sup>	0	0



Tabela 25 - Recuperação de UFC/mL de *L. johsonii* em cada formulação

Cinética de Tempo	<i>L. johsonii</i>			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	55 x 10 <sup>2</sup>	47 x 10 <sup>2</sup>	82 x 10 <sup>2</sup>	0
30	99 x 10 <sup>2</sup>	0	170 x 10 <sup>2</sup>	0
60	35 x 10 <sup>2</sup>	0	152 x 10 <sup>2</sup>	0

Tabela 26 - Recuperação de UFC/mL de *L. gasseri* em cada formulação

Cinética de Tempo	<i>L. gasseri</i>			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	25 x 10 <sup>2</sup>	23 x 10 <sup>2</sup>	62 x 10 <sup>2</sup>	0
30	253 x 10 <sup>2</sup>	28 x 10 <sup>2</sup>	159 x 10 <sup>2</sup>	0
60	480 x 10 <sup>2</sup>	32 x 10 <sup>2</sup>	338 x 10 <sup>2</sup>	0

Tabela 27- Recuperação de UFC/mL de *L. reuteri* em cada formulação

Cinética de Tempo	<i>L. reuteri</i>			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	419 x 10 <sup>2</sup>	144 x 10 <sup>2</sup>	177 x 10 <sup>2</sup>	0
30	338 x 10 <sup>2</sup>	262 x 10 <sup>2</sup>	237 x 10 <sup>2</sup>	0
60	172 x 10 <sup>2</sup>	45 x 10 <sup>2</sup>	254 x 10 <sup>2</sup>	0

Tabela 28 - Recuperação de UFC/mL de *L. rhamnosus* em cada formulação

Cinética de Tempo	<i>L. rhamnosus</i>			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	425 x 10 <sup>2</sup>	129x 10 <sup>2</sup>	127 x 10 <sup>2</sup>	0
30	491 x 10 <sup>2</sup>	148x 10 <sup>2</sup>	523 x 10 <sup>2</sup>	0
60	454 x 10 <sup>2</sup>	67x 10 <sup>2</sup>	158 x 10 <sup>2</sup>	0

Tabela 29 - Recuperação de UFC/mL de *Lactobacillus spp.* da Fórmula L5 em cada formulação

Cinética de Tempo	Fórmula L5			
	Cápsula vaginal	Pomada Vaginal	Óvulo ceroso	Óvulo Gelatinoso
0	183 x 10 <sup>2</sup>	233x 10 <sup>2</sup>	475 x 10 <sup>2</sup>	0
30	351 x 10 <sup>2</sup>	151x 10 <sup>2</sup>	114 x 10 <sup>2</sup>	0
60	1108 x 10 <sup>2</sup>	29x 10 <sup>2</sup>	33 x 10 <sup>2</sup>	0