



Francisca Pinto Lisboa Martins Rodrigues

Desenvolvimento e Caracterização de Óvulos de *Lactobacillus Acidophilus*

Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade
Especialidade em Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal

Trabalho desenvolvido sobre a orientação de:

Prof. Doutora Maria Beatriz Prior Pinto de Oliveira

Departamento de Ciências Químicas
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

e co-orientação de

Prof. Doutora Maria Helena dos Anjos Rodrigues Amaral

Departamento de Ciências do Medicamento
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Julho 2011

De acordo com a legislação em vigor, não é permitida a reprodução de qualquer parte desta Dissertação/Tese.

Aos meus pais.

Ao Bruno.

Agradecimentos

À Professora Doutora Beatriz Oliveira por toda a sua amizade, apoio, incentivo e constante disponibilidade que sempre teve para mim.

À Professora Doutora Maria Helena Amaral pelo apoio incondicional e por toda a sua dedicação.

Ao Professor José Carlos e à Professora Nazaré Pestana, pelos primeiros passos laboratoriais.

Ao Professor José Manuel Sousa Lobo, por me ter permitido a realização de todo o trabalho no Departamento de Ciências do Medicamento, tendo-me sempre facultado tudo o que necessitava.

Ao Zé, amigo de todos os momentos.

À Maria João, pela ajuda prática no decorrer da parte laboratorial.

À D. Conceição, à Cristina e ao Nuno, sempre incansáveis e disponíveis para me ajudar em tudo o que precisei.

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicionais, contra ventos e marés.

The last but not the least, ao Bruno, my valentine.

Resumo

Os probióticos são microrganismos que, administrados em quantidades adequadas, têm um efeito nutricional ou fisiológico benéfico para o hospedeiro. Na abordagem tecnológica à aplicação vaginal, as bactérias probióticas são seleccionadas de modo a sobreviver ao ambiente da flora local, conseguindo manter-se viáveis e, assim, contribuir positivamente para a saúde do hospedeiro.

Apesar da maioria das infecções do tracto urinário (ITU) serem facilmente tratadas com antibióticos de largo espectro, estes alteram a susceptibilidade do doente a situações de recorrências. A qualidade de vida do doente é, consideravelmente, afectada e a eficácia do tratamento reduzida devido ao aumento de resistência aos antibióticos. Acresce ainda o facto de serem frequentes as situações de ITU em mulheres sem sintomatologia. Nestes casos, os probióticos veiculados através de óvulos apresentam-se como uma alternativa viável na prevenção deste tipo de patologias.

Ao longo deste trabalho foram desenvolvidas formulações de óvulos com diferentes excipientes para a veiculação vaginal de *Lactobacillus acidophilus*. Foram avaliados: a segurança dos excipientes usados face às células vaginais, características tecnológicas dos óvulos formulados (ensaios descritos na Farmacopeia Portuguesa 9.0); viabilidade das bactérias em fluido vaginal simulado (FVS). Verificou-se que os óvulos apresentam uma textura uniforme e suave, possuíam um teor aproximado de 1×10^8 Unidades Formadoras de Colónias (UFC), desagregaram eficazmente em FVS e proporcionaram uma libertação contínua de *L. acidophilus*. Os excipientes utilizados na formulação não apresentaram citotoxicidade significativa. A incorporação das bactérias liofilizadas não originou perdas significativas de células viáveis, pelo que estes óvulos possuem boas características para promoverem a reposição da flora vaginal em situações de ITU.

Palavras-chave: probióticos; óvulos vaginais, probiose vaginal; *lactobacillus acidophilus*; citotoxicidade

Abstract

Probiotics are microorganisms that, when administered in quantities appropriate, have a physiological effect beneficial to the host. Alterations in the indigenous vaginal microflora with uropathogenic bacteria can frequently predispose women to recurring bacterial cystitis. *Lactobacilli*, used as probiotics, have played an important role in preventing colonization of pathogenic bacteria in vagina by forming normal microflora. Therefore, a new approach for the effective prevention of such a recurrent urinary tract infections (UTI) case is awaited.

In technological approach for vaginal application, the probiotic bacteria are selected to survive the environment of the local flora, managing to stay viable and thus contribute positively to the health of the host. Although most UTI are easily treated with broad spectrum antibiotics, they might alter the susceptibility of patient situations recurrences. The quality of life of patients is considerably affected and reduced effectiveness of treatment due to increased antibiotic resistance. Furthermore, they are frequent UTI cases in women without symptoms. In these cases, probiotics conveyed through vaginal suppositories present as a viable alternative in the prevention of this sort of pathologies.

Throughout, in this work we developed two formulations of vaginal suppositories with different excipients for the placement of vaginal *Lactobacillus acidophilus* and the technological characteristics (tests described in the Portuguese Pharmacopoeia 9.0) and the viability of bacteria after administration were evaluated. It was found that vaginal suppositories have a uniform and mild texture, a content of about 1×10^8 UFC, disintegrate totally in simulated vaginal environment and provided a continued release of *L. acidophilus*. The incorporation of freeze-dried bacteria do not resulted in significant losses of viable bacteria, giving rise to the idea that these vaginal suppositories possess good properties to promote the replacement of the vaginal flora in situations of UTI.

Keywords: probiotics; vaginal suppository; vaginal probiose; *lactobacillus*; citotoxicity

Índice

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES	XII
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
I. Introdução.....	2
II. Probiose Vaginal.....	4
Probióticos	4
Anatomia da Vagina.....	5
Flora e Composição Vaginal	8
a) Produção de Ácido Láctico	10
b) Produção de metabolitos Antimicrobianos e Biosurfactantes	11
c) Estimulação do sistema imunitário.....	12
Desequilíbrios ecológicos vaginais e patologia infecciosa.....	12
Seleção e Estudo de Estirpes Probióticas	15
III. Desenvolvimento e estudo de formulações vaginais de probióticos	18
IV. Óvulos	22
Classificação dos excipientes.....	23
Preparação dos óvulos.....	25
Ensaio dos Óvulos.....	27
a) Controlo Organoléptico.....	27
b) Ensaio físicos.....	27
c) Ensaio de controlo de novas formulações	29
Formulações Comerciais.....	29
V. Liofilização	32

MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
I. Materiais.....	37
Matérias-primas e reagentes.....	37
Equipamento.....	41
II. Métodos.....	42
1. Ensaio de citotoxicidade dos excipientes utilizados.....	42
a) Linhas celulares, células primárias de isolamento e condições de cultura ...	43
b) Ensaio MTS para as linhas celulares utilizadas	47
2. Preparação dos óvulos : Pré-Formulação e Formulação.....	49
3. Características Organolépticas	52
4. Cálculo do Factor de Deslocamento.....	52
5. Uniformidade de Massa	52
6. Ensaio de Desagregação	53
7. Avaliação da Textura.....	54
8. Estudos de Libertação.....	55
9. Ensaio de Estabilidade.....	58
10. Análise Estatística	59
RESULTADOS.....	60
1. Pré - Formulação e Formulação.....	61
2. Ensaio de Citotoxicidade dos Excipientes Seleccionados	62
3. Características organolépticas dos óvulos preparados.....	65
4. Determinação do Factor de Deslocamento	69
5. Uniformidade de Massa	69
6. Avaliação da Textura.....	74
7. Ensaio de Desagregação	77
8. Ensaio de Libertação <i>in vitro</i>	78
9. Ensaio de Estabilidade	85
a) Características Organolépticas.....	85
b) Ensaio de Desagregação.....	87
c) Avaliação da Textura	88
d) Ensaio de libertação <i>in vitro</i>	89
CONCLUSÃO.....	92
BIBLIOGRAFIA.....	95

Lista de Figuras

Figura 1 - Órgãos genitais externos femininos (adaptado de [17]).	6
Figura 2 – Órgãos genitais internos femininos e estruturas relacionadas (corte sagital): vagina (1), cervix (2), útero (3), ovário (4), trompa de Falópio (5), bexiga (6), uretra (7) ânus (8), recto (9), cólon (10), vestibulo (11) e sínfise púbica (12) (adaptado de [17]).	7
Figura 3 - Mecanismos de acção de microrganismos probióticos no trato urogenital (adaptado de [28]).	9
Figura 4 - Representação de lactobacillus (bastonetes azuis), num epitélio vaginal colonizado por leveduras (cinza), enterococos (azul), e uropatógenos (vermelho) (adaptado de [6]).	11
Figura 5 - Aparelho para a desagregação dos supositórios e dos óvulos (dimensões em milímetro).	28
Figura 6 - Diagrama de fases da água (adaptado de [82]).	32
Figura 7 - Esquematização dos diferentes tipos de métodos de obtenção de óvulos: método convencional e método de enchimento	51
Figura 8 – Equipamento para estudo da desagregação dos supositórios e óvulos.	53
Figura 9 – Texturómetro TA-XT2i utilizado nos ensaios de texturometria.	54
Figura 10 – Equipamento de dissolução modelo SOTAX AT7 utilizado nos ensaios de libertação.	58
Figura 11 - Valores médios da força de penetração das formulações avaliadas - Fórmula A: 100% Witepsol; Fórmula B: 30% PEG 4000 + 70% PEG 400; Fórmula C: 25% PEG 4000 + 75% PEG 400; Fórmula D: 50% Witepsol H12 + 50% Parafina; Fórmula E: 70% Witepsol H12 + 30 % Parafina; Fórmula F: 100% PEG 4000.	Erro!
Marcador não definido.	
Figura 12 - Ensaio de Citotoxicidade (MTS) para verificação da viabilidade das células Epiteliais Vaginais VK2/E6E7 quando incubadas com os excipientes PEG 400, PEG 4000 e Witepsol H12.	63
Figura 13 - Ensaio de Citotoxicidade (MTS) para verificação da viabilidade das células cervicais HeLa quando incubadas com os excipientes PEG 400, PEG 4000 e Witepsol H12.	63
Figura 14 - Óvulo sem probióticos.	65
Figura 15 - Óvulo obtido pelo método de fusão com <i>L. acidophilus</i> 50 mg.	66
Figura 16 - Óvulo obtido pelo método de fusão com <i>L. acidophilus</i> 100 mg.	66
Figura 17 - Óvulo obtido pelo método de enchimento com <i>L. acidophilus</i> 50 mg.	66

Figura 18 - Óvulo obtido pelo método de enchimento com <i>L. acidophilus</i> 100 mg.	67
Figura 19 - Interior dos óvulos obtidos pelo método de enchimento.....	67
Figura 20 – Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com Witepsol (50 e 100 mg) – método convencional.	70
Figura 21 – Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com PEG (50 e 100 mg) - método convencional.	71
Figura 22 – Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com WIT (50 e 100 mg) - método de enchimento.	72
Figura 23 – Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com PEG (50 e 100 mg) - método de enchimento	73
Figura 24 - Representação gráfica da força <i>versus</i> tempo, cuja força máxima (F _{máx}) corresponde à firmeza e a área negativa corresponde à adesividade do produto analisado (figura adaptada de [95]).....	75
Figura 25 - Valores médios da força de penetração das formulações avaliadas – WIT C. 50 mg: Witepsol método clássico 50 mg; WIT C. 100 mg: Witepsol método clássico 100 mg; PEG C. 50 mg: Polietilenoglicol método clássico 50 mg; PEG C. 10 mg: Polietilenoglicol método clássico 100 mg; WIT E. 50 mg: Witepsol método enchimento 50 mg; WIT E. 100 mg: Witepsol método enchimento 100 mg; PEG E. 50 mg: Polietilenoglicol método enchimento 50 mg; PEG E. 100 mg: Polietilenoglicol método enchimento 100 mg;	75
Figura 26 - Perfis de libertação de <i>L. acidophilus</i> ao longo do tempo nos diferentes tipos de óvulos preparados (tempo zero).....	80
Figura 27 - Perfis de libertação de <i>L. acidophilus</i> ao longo do tempo nos diferentes tipos de óvulos preparados pelo método clássico.....	81
Figura 28 - Perfis de libertação de <i>L. acidophilus</i> ao longo do tempo nos diferentes tipos de óvulos preparados através do método de enchimento.....	82

Lista de Tabelas

Tabela I - Produtos probióticos disponíveis no mercado internacional para reequilibrar o ecossistema vaginal (adaptado de [79]).....	31
Tabela II - Desenho esquemático da preparação da placa de 96 poços para o ensaio MTS.....	48
Tabela III - Composição (%) das diferentes fórmulas desenvolvidas no estudo de pré-formulação.....	49
Tabela IV - Composição das diferentes formulações utilizadas	50
Tabela V - Desvios limite, em percentagem da massa média, para o ensaio de uniformidade de massa em óvulos (FP 9.0).....	53
Tabela VI - Composição do FVS utilizado nos ensaios de dissolução.	56
Tabela VII - Valores médios e desvios padrão da força de penetração (N) dos diferentes tipos de óvulos pré-formulados.....	62
Tabela VIII - Valores de CC50 (em % m/v) para o PEG 400, PEG 4000 e Witepsol H12 obtidos através do ensaio MTS nas diferentes linhas celulares utilizadas (NQ, não quantificável).	64
Tabela IX - Características organolépticas das diferentes formulações desenvolvidas.	68
Tabela X - Cálculo do factor de deslocamento das duas formulações base utilizadas. m - massa do óvulo sem substância activa; B - massa óvulo com substância activa; B-p – substância activa adicionada; FC - Factor Deslocamento.....	69
Tabela XI - Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com Witepsol (50 e 100 mg)	70
Tabela XII - Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com PEG (50 e 100 mg) – método convencional.....	71
Tabela XIII- Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com WIT (50 e 100 mg) – método de enchimento	72
Tabela XIV - Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com PEG (50 e 100 mg) – método de enchimento	74
Tabela XV - Valores médios e desvios padrão da força de penetração (N) dos diferentes tipos de óvulos preparados.	76
Tabela XVI - Tempo de desagregação, em minutos, das diferentes formulações.....	77
.....	77

Tabela XVII - Características Organolépticas dos óvulos armazenados a 4°C e a 20°C ao fim do primeiro, segundo e terceiro mês.	86
Tabela XVIII - Tempos de Desagregação (min) dos diferentes tipos de óvulos obtidos pelo método clássico ao final do primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento a 4° e 20° C.	87
Tabela XIX - Valores da força de penetração (N) das formulações avaliadas ao final do primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento a 4°C e 20°C.	88
Tabela XX – Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> nos óvulos de Witepsol H12 e mistura de PEG obtidos através do método clássico, ao fim do primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento.	89

Lista de Abreviaturas e Unidades

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ATCC - American Type Culture Collection

Cl⁻ - Ião Cloreto

EHL – Equilíbrio Hidrófilo–Lipófilo

FDA – Food and Drug Administration

FP 9.0 – Farmacopeia Portuguesa 9.0

FVS – Fluido Vaginal Simulado

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogénio

ITU – Infecções Tracto Urinário

LAB – Lactic Acid Bacteria

MRS - Man-Rogosa-Sharpe

OH⁻ - Radical Hidroxilo

OMS – Organização Mundial de Saúde

PEG – Polietilenoglicol

SBF – Soro Bovino Fetal

T-RFLP - Polimorfismo de Fragmento de Restrição Terminal

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

VB – Vaginose Bacteriana

WIT – Witepsol H12

Revisão Bibliográfica

I. Introdução

Uma infecção urinária pode ser definida como cistite, quando compromete apenas o trato urinário inferior. A cistite pode ser sintomática ou não. Trata-se de uma pielonefrite, quando afecta simultaneamente o trato urinário inferior e o superior [1].

As infecções do trato urinário podem ser complicadas ou não complicadas. As primeiras têm maior risco de falha terapêutica e estão associadas a factores que favorecem a ocorrência de infecção. A infecção urinária é complicada quando ocorre num aparelho urinário com alterações estruturais ou funcionais [2-3]. Habitualmente, as cistites são infecções não complicadas, enquanto as pielonefrites, pelo contrário, são mais complicadas. Resultam, em geral, da ascensão de microrganismos do trato urinário inferior e estão, frequentemente, associadas com cálculos renais [4]. Tanto a infecção urinária baixa como a alta podem ser agudas ou crónicas e a sua origem pode ser comunitária ou hospitalar [5].

As infecções urogenitais dividem-se em vaginites (causadas por fungos), vaginoses bacterianas e infecções do trato urinário. Trata-se de um problema de saúde pública, dado o elevado número de mulheres que, anualmente, são afectadas. Apesar da terapia antibiótica ser, geralmente, eficaz na erradicação destas infecções, o número de recidivas continua a ser um problema. A qualidade de vida da paciente é, consideravelmente, afectada e, em muitos casos, a mulher torna-se frustrada pelos ciclos repetidos de agentes bacterianos a que tem de recorrer, e cuja efectividade é, cada vez mais diminuta, devido ao aumento de resistências microbianas. Evidências clínicas demonstram que a flora urogenital e intestinal tem um importante papel na manutenção do bem-estar físico e psíquico. Além disso, o recurso a probióticos, de modo a restabelecer ou aumentar a população bacteriana, é cada vez mais aceite pela comunidade científica [6]. Os probióticos eram, classicamente, definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afectam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço da sua microbiota intestinal [7]. Nos últimos anos, foram publicadas diversas definições de probióticos e a definição actualmente aceite, internacionalmente, é a que define probióticos como microrganismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro [8].

A utilização de probióticos na reposição da flora vaginal comensal não é nova. Com efeito, na década de 70, o Dr. Andrew Bruce, Chefe do Serviço de Urologia da

Universidade de Queens, Canadá, observou que a flora do trato urogenital não apresentava características normais em pacientes com UTI recorrentes, quando comparadas com mulheres saudáveis [9]. Esta observação da alteração da flora vaginal, particularmente de *lactobacillus* (e mais recentemente de *bifidobacterium*), na manutenção da saúde genital e na redução do risco de infecção, tornou-se assim objecto de estudo. Algumas publicações têm vindo a descrever factores críticos para a competição, com sucesso, entre *lactobacillus* e uropatógenos que ascendem do recto e períneo para a vagina [9].

Apesar de muitos dos casos de infecções do trato urinário serem facilmente tratados com antibióticos de largo espectro, estes não alteram a susceptibilidade do doente a situações de recorrência de infecção [10]. Frequentemente, observam-se cistites em mulheres que não apresentam sintomas detectáveis de infecção urinária [10]. Torna-se então imperativo que a ciência procure desenvolver uma nova estratégia no tratamento de situações de ITU.

Actualmente, há cinco estratégias, sob investigação, para prevenção de infecções recorrentes do trato urinário:

- Recurso a antibióticos, incluindo péptidos naturais;
- Alimentos funcionais;
- Vacinas;
- Probióticos;
- Recurso a espermicidas e boa higiene diária [9]

A profilaxia com antibióticos apresenta-se como o método mais usual de tratamento de ITU. Contudo, o recurso contínuo a antibióticos leva a um aumento das resistências bacterianas. De igual modo, muitas pacientes sofrem de vaginites causadas por fungos, como resultado da alteração dos níveis normais da flora vaginal e intestinal. Nestes casos, os probióticos apresentam-se como uma alternativa viável de prevenção [9].

Pensa-se que os uropatógenos ascendem do recto até à vagina e depois para a bexiga. Este processo é mediado pela adesão das bactérias e não é alterado por recurso a antibióticos [9].

II. Probiose Vaginal

Probióticos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) para a Agricultura e Alimentação (FAO), o termo probiótico é relativamente novo, significando “para a vida”, sendo normalmente utilizado para designar bactérias associadas a efeitos benéficos sobre o homem e os animais [11]. Os probióticos são definidos no âmbito alimentar como "microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro", definindo-se contudo a discussão do tópico ao âmbito do consumo em alimentos [8].

A observação original do papel positivo que determinadas estirpes de bactérias apresentavam foi atribuída a Eli Metchnikoff, prémio Nobel Russo, que trabalhava no Instituto Pasteur. No início do século passado sugeriu que: “a dependência das bactérias intestinais relativamente aos alimentos permite adoptar medidas para modificar a flora do organismo e substituir microrganismos patogénicos por bactérias benéficas para o hospedeiro” [11].

Com efeito, as bactérias probióticas são cada vez mais importantes no contexto da nutrição humana, havendo evidências científicas contínuas sobre as suas propriedades, funcionalidades e benefícios para a promoção da saúde [12-13]. Os probióticos são fortemente promovidos a nível mundial, com sugestões de que podem desempenhar um importante papel nas funções imunológicas, ao nível do sistema digestivo e respiratório, podendo igualmente ter um efeito significativo no alívio de doenças infecciosas [12-14]. O recurso a *Lactobacillus* para tratar ITU data de 1915, quando Newman injectou *Lactobacillus* na vagina para tratar situações de cistite [15].

Recentemente, FAO e OMS colaboraram no estabelecimento de directrizes sobre o uso de probióticos na alimentação, nomeadamente no que diz respeito a alegações de saúde, bem como à apresentação de resultados com as recomendações do *Codex Alimentarius* sobre rotulagem e pedidos de alimentos probióticos [12]. Foi igualmente reconhecido que os estudos *in vitro* devem estabelecer os potenciais efeitos benéficos dos probióticos, antes de se realizarem os ensaios *in vivo* [12]. De facto, testes como a tolerância à acidez gástrica, produção de substâncias antimicrobianas e capacidade de adesão às células intestinais humanas devem

sempre ser realizados, dependendo do benefício para a saúde a que cada estirpe se propõe [8, 11]. Para ensaios *in vivo*, devem utilizar-se estudos comparativos duplo-cego, randomizados e controlados, de modo a estabelecer a eficácia do probiótico [11]. No que concerne à avaliação dos benefícios para a saúde em estudos humanos, devem ser fornecidos os resultados clinicamente relevantes na população estudada [11].

Os probióticos utilizados em alimentos são principalmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, excluindo as referências a agentes bioterapêuticos e microrganismos benéficos utilizados em alimentos. Embora as questões relacionadas com organismos geneticamente modificados não fossem especificamente abordadas neste quadro de trabalho FAO/OMS, foi reconhecido que os conceitos e princípios são igualmente aplicáveis a todos os probióticos [8, 11-12]. São, também, estas mesmas espécies as mais utilizadas no desenvolvimento de formulações destinadas à aplicação vaginal, tal como descrito na secção “Flora e Composição Vaginal”.

Anatomia da Vagina

Ao longo da história da civilização humana a administração vaginal de fármacos tem sido prática recorrente [16]. Apesar do uso tradicional com substâncias de actuação local, algumas substâncias podem permear a mucosa vaginal e atingir, na corrente sanguínea, concentrações com efeitos sistémicos. Mediante esta via de administração procura-se obter efeitos locais [16]. Só em casos excepcionais se utilizam fármacos destinados a exercer efeitos sistémicos, como é o caso dos anovulatórios [16]. Na monografia da Farmacopeia Portuguesa 9.0 dedicada aos óvulos incluem-se outras preparações destinadas a ser administradas por esta via, como sejam as cápsulas e os comprimidos vaginais [16].

O conhecimento da anatomia, histologia e fisiologia da vagina humana é deste modo fundamental na concepção e desenvolvimento de sistemas de libertação vaginal [17]. Devem ser conhecidas as características próprias deste órgão, de modo a reconhecer as suas limitações naturais, e aproveitar as suas vantagens como via de administração de diferentes tipos de compostos [17]. Aspectos fundamentais da administração de medicamentos vaginais, tais como o volume a administrar ou a sua espalhabilidade e retenção, são fortemente dependentes da morfologia vaginal [18].

Os órgãos que constituem o sistema reprodutor feminino são classicamente divididos em órgãos genitais externos e internos. A vulva é o nome dado ao conjunto dos órgãos genitais externos (monte púbico, grandes lábios, pequenos lábios, hímen, clítoris, uretra, glândulas de *Skene*, glândulas de *Bartholin* e vestibulo), os quais são observáveis na zona perineal (Figura 1).

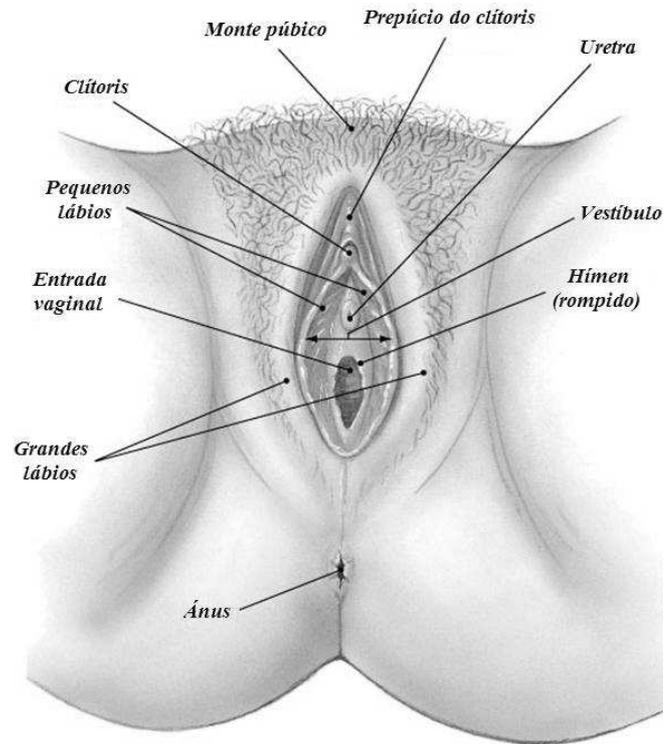


Figura 1 - Órgãos genitais externos femininos (adaptado de [17]).

A depressão anatômica onde se dá a abertura da vagina (introito vaginal) e da uretra, bem como dos ductos das glândulas de Bartholin e de Skene, é denominada vestibulo, sendo esta região delimitada pelos pequenos lábios. Os órgãos genitais internos localizam-se na pélvis e incluem a vagina, a cervix, o útero, as trompas de Falópio, os ovários e todas as estruturas de suporte circundantes (Figura 2).

As funções da vagina são essencialmente a recepção do pénis erecto e do sémen durante o coito e ejaculação, servindo igualmente como um local de passagem para o feto e a menstruação para o exterior do organismo.

O pH vaginal oscila entre 3,5 – 4,5, variando no decorrer do ciclo menstrual (é mais baixo a meio do ciclo menstrual e mais alto durante o período menstrual) [19-20]. Além disso, o pH vaginal pode ser alterado por diferentes condicionantes, como a presença de sémen (pH 7,2 – 8,0) ou infecções bacterianas. Neste último caso, o pH vaginal normalmente ronda os 5,0 – 6,5 [19-20].

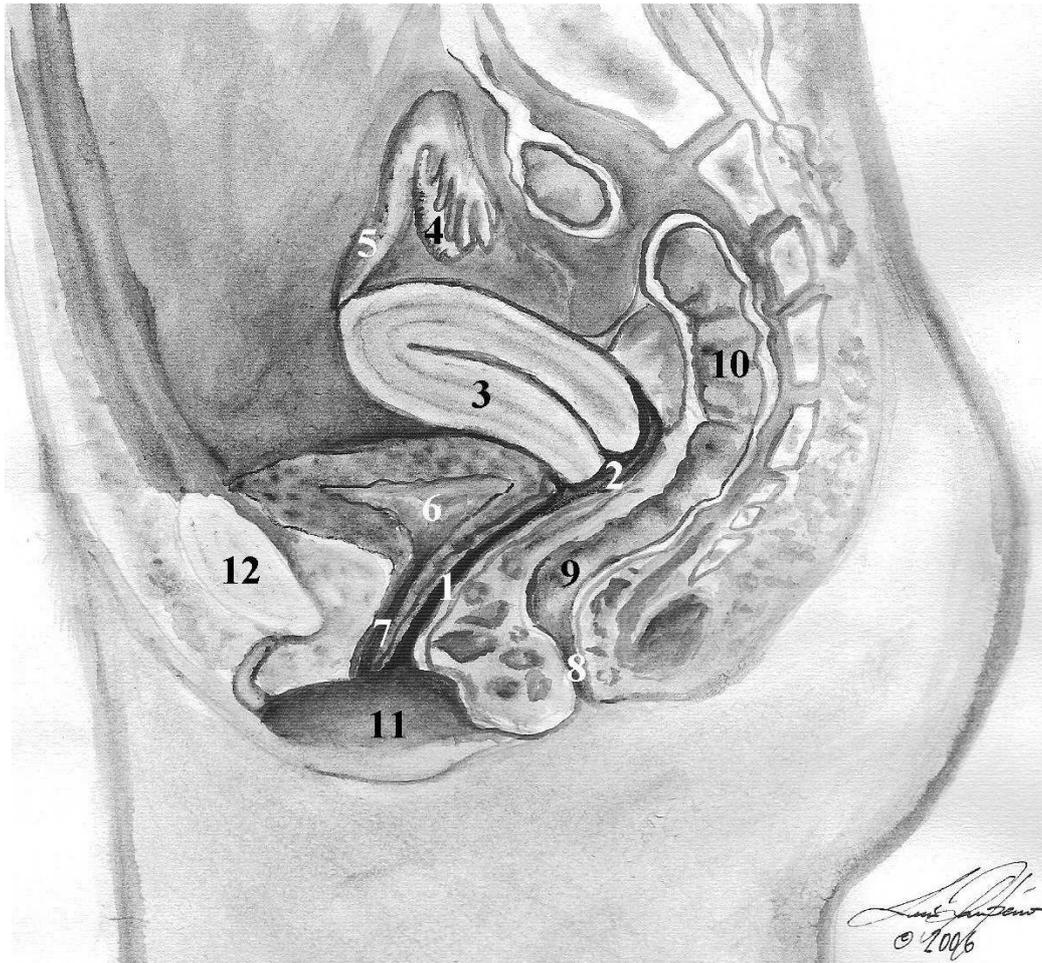


Figura 2 – Órgãos genitais internos femininos e estruturas relacionadas (corte sagital): vagina (1), cervix (2), útero (3), ovário (4), trompa de Falópio (5), bexiga (6), uretra (7) ânus (8), recto (9), cólon (10), vestibulo (11) e sinfise púbica (12) (adaptado de [17])

Flora e Composição Vaginal

A flora vaginal autóctone é essencial para a manutenção da saúde vaginal. Habitualmente, quando é alterada, em consequência de infecção por microrganismos indesejáveis, o tratamento inclui o recurso a antibióticos o que, em certas situações, altera ainda mais o ecossistema vaginal, dificultando a recuperação e abrindo portas a processos crónicos de recidivas. Deste modo, tem-se vindo a tentar encontrar tratamentos alternativos para devolver a homeostasia do ecossistema vaginal. Os resultados começam assim a acumular-se e a indicar que o recurso a probióticos pode apresentar-se como uma alternativa terapêutica fiável e efectiva, de fácil administração e sem efeitos secundários marcados [21-22].

Embora bastante complexa e variável, a flora vaginal de mulheres saudáveis em idade fértil é, geralmente, dominada por espécies do género *Lactobacillus*, nomeadamente *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri*, razão pela qual correspondem aos microrganismos mais estudados em probiose vaginal [21, 23-25]. No corpo humano os *lactobacillus* podem colonizar essencialmente três regiões anatómicas: a cavidade oral, os intestinos e a vagina [26-27]. São conhecidas as suas capacidades para proteger a mucosa, face ao estabelecimento de microrganismos patogénicos, mediante diferentes mecanismos complementares, como por exemplo:

- a) Adesão específica ao epitélio vaginal, impossibilitando a aderência por parte dos restantes microrganismos [21, 24];
- b) Produção de bacteriocinas e compostos antimicrobianos [21, 26];
- c) Produção de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) [24, 26];
- d) Produção de ácido láctico [26];
- e) Co-agregação com os microrganismos patogénicos, o que potencia o seu efeito microbicida [21].

A Figura 3 resume de forma sucinta os mecanismos de acção propostos para os *Lactobacillus*:

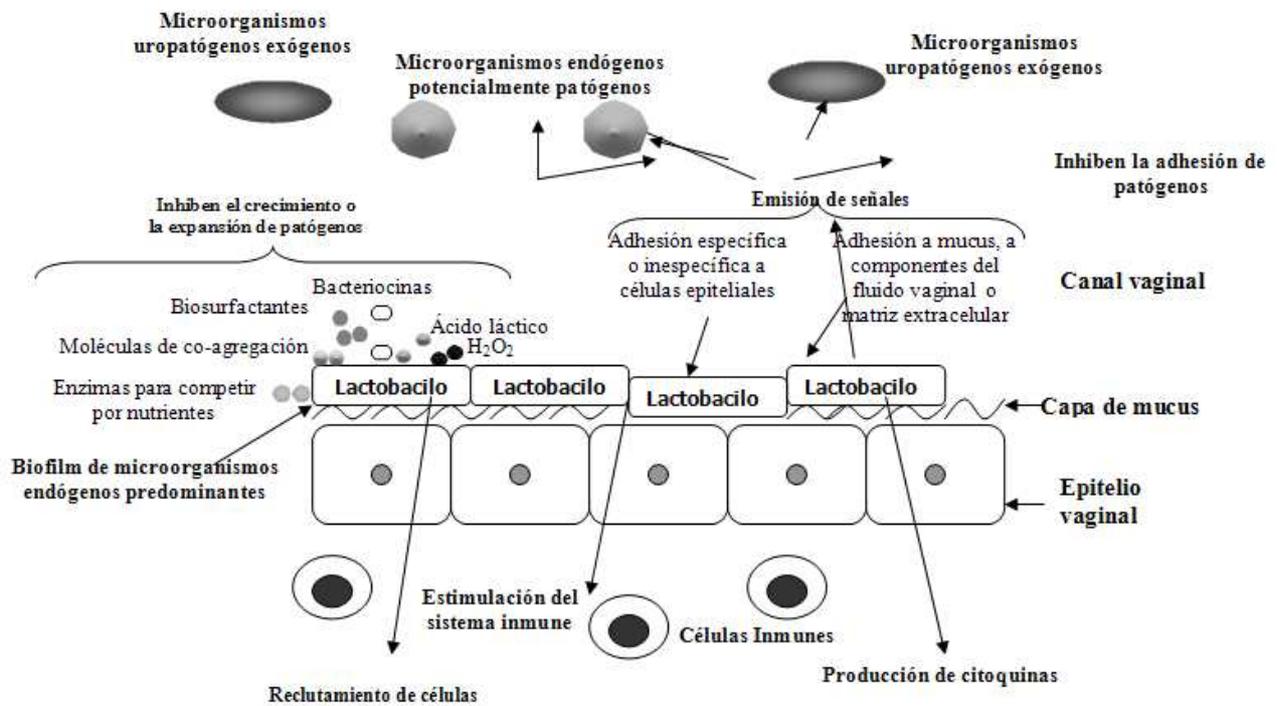


Figura 3 - Mecanismos de acção de microrganismos probióticos no trato urogenital (adaptado de [28]).

Quando os *Lactobacillus* se encontram em menor número, ou mesmo ausentes da flora vaginal, outros microrganismos, como as bactérias anaeróbias, começam a multiplicar-se [26, 29-30]. Deste modo, apesar dos mecanismos de acção contra bactérias patogênicas existirem, muitas vezes a flora vaginal é recoberta e sofre os efeitos indesejáveis de determinados microrganismos, originando vaginose bacterianas, vaginites por *Candida spp.*, tricomonioses e ITU [20, 24]. Muito raramente os *Lactobacillus* podem originar patologia, invariavelmente em indivíduos imunodeprimidos.

A maioria dos *Lactobacillus* da flora vaginal habita no ambiente intestinal, o que sugere que o trato entérico pode actuar como reservatório. Na realidade, os *Lactobacillus* encontram-se numa concentração de 10^7 - 10^8 UFC/g de fluido vaginal [20]. Contudo, as frequências encontradas no ambiente vaginal são muito diferentes das que ocorrem na porção final do tubo digestivo. As diferenças mais notáveis são o facto de os *Lactobacillus* serem dominantes na vagina, ao ponto de serem

praticamente exclusivos em determinadas situações. Pelo contrário, são minoritários a nível intestinal, não aparecendo sempre e, quando o fazem, surgem numa proporção nunca superior a 1 %. Em geral, a percentagem no exsudado vaginal que apresenta predominância de *Lactobacillus* é superior a 70%. Por outro lado, as bactérias Gram positivas ou Gram negativas anaeróbicas estritas dos grupos *Clostridium-Eubacterium*, *Bacteroides-Prevotella*, respectivamente, as quais dominam no ambiente intestinal, aparecem muito esporadicamente na vagina [21].

Os três principais mecanismos de acção dos *Lactobacillus* podem ser resumidos do seguinte modo:

a) Produção de Ácido Lático

Tal como referido anteriormente, o pH fisiológico da vagina de uma mulher em idade fértil é de aproximadamente 4 [31-33]. Quando o pH vaginal é extremamente ácido, as células epiteliais tornam-se mais vulneráveis à citólise, designada vaginose citolítica, a qual pode originar sintomas como queimaduras e corrimento abundante [31]. Teoricamente, muitas situações não infecciosas podem alterar o pH normal da vagina, tais como a menstruação, as relações sexuais não protegidas com deposição de sêmen e o uso de antibióticos ou antifúngicos. Nestas situações, o aumento do valor de pH deve ser seguido por um exame microscópico e/ou cultura celular de modo a confirmar o diagnóstico presumido, evitando deste modo o tratamento com antibióticos [31].

O ambiente ácido inibe parcial ou totalmente o desenvolvimento da maioria das bactérias provenientes do trato digestivo e de origem ambiental, sendo um mecanismo de protecção da mucosa vaginal extremamente eficaz [32, 34]. O composto que está na origem deste valor de pH vaginal ácido é o ácido lático, produto final do metabolismo fermentativo dos glúcidos, levado a cabo pelos *Lactobacillus*, residentes na vagina e pelas células epiteliais [21, 32]. As células vaginais tendem a acumular glicogénio, especialmente durante o período compreendido entre a menarca e a menopausa, pelo que se considera que este esteja na origem da acidez vaginal. Pensa-se que, após hidrólise do glicogénio, a glucose seja metabolizada a ácido lático. Não há evidências de que a degradação de glicogénio seja uma característica geral destas bactérias. É provável que o glicogénio vaginal seja degradado a glucose pelas próprias células vaginais epiteliais e o papel dos *Lactobacillus* se limite apenas à fermentação deste açúcar para originar o ácido lático, responsável pela protecção à colonização por microrganismos indesejados.

Como sustentação desta hipótese, está o facto de na vagina aparecerem dois isómeros (L e D) do ácido láctico em proporções semelhantes. A formação de ambas as formas quirais é uma das características do *Lactobacillus* spp., ao contrário das células vaginais epiteliais, as quais apenas originam o isómero L [35].

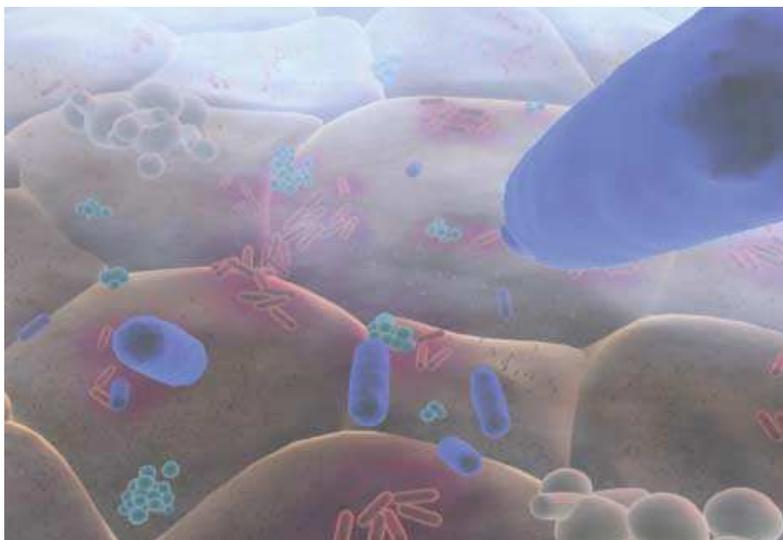


Figura 4 - Representação de lactobacillus (bastonetes azuis), num epitélio vaginal colonizado por leveduras (cinza), enterococos (azul), e uropatógenios (vermelho) (adaptado de [6]).

b) Produção de metabolitos Antimicrobianos e Biosurfactantes

A produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é comum entre certas espécies de *lactobacillus* como *L. crispatus* e *L. jensenii*, enquanto noutras espécies como *L. fermentum* e os *lactobacillus* que habitam preferencialmente no intestino (como *L. plantarum* e *L. casei*) é praticamente nula [24, 36]. O efeito bactericida provém da sua capacidade oxidante e da geração de metabolitos como o radical hidroxilo (OH^\cdot), que danificam a integridade do ácido desoxirribonucleico (ADN) celular. Este efeito é potenciado pela mieloperoxidase e por radicais livres como o ião cloreto (Cl^\cdot), os quais são abundantes nas secreções biológicas e cuja concentração elevada no muco uterino é especialmente pertinente, sobretudo durante a ovulação [21, 37].

Além disso, as bactérias lácticas produzem uma variedade de bacteriocinas, como por exemplo a nisina. Estas substâncias são moléculas anfipáticas que originam a abertura dos poros das membranas e inclusive a lise celular, uma vez que algumas se unem ao lípido II da parede (o mesmo que é reconhecido pela vancomicina) [38].

Por outro lado, existe igualmente uma produção por parte destas bactérias de agentes tensioactivos. Trata-se de compostos anfifílicos que diminuem a tensão superficial, favorecendo a solubilização de substâncias hidrofóbicas. Estão descritos dois agentes tensioactivos produzidos, respectivamente, por uma estirpe de *L. acidophilus* e outra de *L. fermentum*, os quais inibem a adesão de *E. faecalis* e de *E. coli*, mas não de *C. albicans* à goma siliconada de cateteres [13, 30, 39-40].

c) Estimulação do sistema imunitário

A administração oral de probióticos, sobretudo para efeitos terapêuticos intestinais, tem sido associada a um aumento de imunoglobulinas séricas (IgM e IgA) e de actividade fagocitária de macrófagos [41-42]. O efeito estimulador dos probióticos na mucosa e no sistema imunitário, e os seus efeitos imunomoduladores sugerem que os probióticos podem igualmente conduzir ao desenvolvimento de vacinas. Este facto é suportado por estudos que demonstraram uma actividade adjuvante e um aumento da resposta imune quando administrados por via oral [41, 43].

Desequilíbrios ecológicos vaginais e patologia infecciosa

Em determinadas situações, a concentração vaginal de *Lactobacillus* é inferior aos níveis necessários para exercerem os efeitos de protecção supracitados [24]. Estas circunstâncias são normalmente aproveitadas por microrganismos que se encontram habitualmente na vagina saudável, bem como por microrganismos exógenos, para proliferarem até se tornarem dominantes, comportando-se assim como patógenos oportunistas. Os quadros que se associam à diminuição de *Lactobacillus* no epitélio vaginal são quatro:

1. Vaginose bacteriana, cujos agentes etiológicos mais habituais são *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella* e *Peptostreptococcus* [6, 23, 44-45]
2. Candidíase, originada por *C. albicans* (em 85% dos casos), *C. glabrata* e *C. tropicalis* [46-47];
3. Tricomonioses, consequência da proliferação de *Trichomonas vaginalis*
4. UTI, causadas sobretudo por enterobactérias de origem intestinal (a *Escherichia coli* é responsável por cerca de 80% dos casos), apesar de em

algumas situações serem responsáveis cocos Gram positivos como o *Enterococcus faecalis*

A diminuição da concentração hormonal também contribui para a inibição do desenvolvimento de *Lactobacillus*, sendo igualmente benéfica para alguns potenciais microrganismos patogénicos. Por exemplo, os estrogénios favorecem a adesão de *Candida* ao epitélio, bem como a proliferação de *T. vaginalis*, ao ponto de este se desenvolver na vagina de recém-nascidas, devido às hormonas recebidas via placenta. Esta flora desaparece poucas semanas, à medida que são metabolizadas as hormonas. Por outro lado, o período menstrual, bem como o sémen, têm um pH próximo da neutralidade, circunstância em que os *Lactobacillus* têm dificuldade em crescer [48-49]. Neste último caso, o grau de acidez protector leva algumas horas a voltar aos valores ideais [48-49]. O uso de tampões durante períodos prolongados ajuda igualmente na manutenção de um pH excessivamente elevado [21].

Assim, se juntarmos estes dados ao facto de uma das características da vaginose e da tricomoniose ocorrer a um pH superior a 4,7, poderíamos postular que a diminuição da acidez vaginal é um dos factores que predispõem a proliferação excessiva de oportunistas patogénicos [21].

A alcalinização do ambiente vaginal pode não ser apenas a causa, se não mesmo a consequência, para o desenvolvimento excessivo de alguns patogénicos. Por exemplo, *G. vaginalis* e *T. vaginalis* apresentam uma potente actividade descarboxilase, originando aminas biogénicas, as quais (à parte do seu efeito anafilático) originam um aumento do pH, favorecendo o crescimento destes patogénicos e a inibição dos *Lactobacillus*. Além disso, as aminas são responsáveis pelo odor pútrido, típico da secreção, o qual aumenta com a adição de hidróxido de potássio a 10%, e que constitui outro sinal de diagnóstico relevante [34].

A descarboxilação dos aminoácidos origina dióxido de carbono, o que pode favorecer a infecção por bactérias anaeróbias como *Prevotella* e *Peptostreptococcus* [21]. Constatam-se ainda que tanto os dispositivos intra-uterinos como os espermicidas inibem o desenvolvimento dos *Lactobacillus*, favorecendo o desenvolvimento de situações de vaginoses e vaginites [50].

Os quadros derivados da diminuição de *Lactobacillus* vaginais parecem induzir complicações importantes. Apesar das ITU não serem propriamente genitais, a colonização vaginal por parte das bactérias que causam a patologia, cujo reservatório é o intestino grosso, parece ser um passo intermédio essencial na sua migração para a região periuretral e, posteriormente, para a vagina [51]. Chegou-se deste modo à

conclusão que a frequência de ITU é inversamente proporcional à presença de uma flora normal, dominada por *Lactobacillus*, na vagina de mulheres saudáveis.

As ITU são normalmente precedidas pela colonização vaginal por parte de patogénicos urinários. Assim, pode igualmente explicar-se porque são predominantes estes quadros em mulheres pós-menopausa, as quais perderam grande parte dos *Lactobacillus* vaginais e são, por isso mesmo, mais susceptíveis a *E. coli* e outras enterobactérias [52]. Explica igualmente a relação entre a redução de ITU e a terapia de substituição neste grupo de pacientes, onde se induz a recolonização da mucosa com *Lactobacillus spp.*[53].

A crença de que a administração de bactérias em grandes quantidades causaria o seu depósito sobre a mucosa, veio demonstrar-se extremamente optimista, uma vez que um dos pressupostos mais básicos dos ecossistemas complexos, a homeostasia, foi esquecido. Cada membro da comunidade tem um papel complementar a todos os restantes o que, na prática, impede a substituição de qualquer membro autóctone por organismos que se administram a partir do exterior [54]. Contudo, o ecossistema vaginal é muito menos complexo do que o ecossistema intestinal e os *Lactobacillus* são dominantes pelo que, em princípio, deveria ser mais fácil promover a reposição de uma flora normal após um processo patológico ou como consequência de um tratamento quimioterápico.

O recurso aos antibióticos acabaria por colocar esta prática fora de uso. Em meados de 1970 começou a evidenciar-se que os tratamentos apenas com antibióticos eram parcialmente ineficazes, com altas taxas de recidivas. Tal obrigava, em certos casos, ao uso profilático contínuo de quimioterápicos, os quais induziam o aparecimento de efeitos secundários e a selecção de mutantes resistentes. Todas estas razões fizeram renascer o interesse na terapia de reposição microbiana. Não parece, contudo, que a veiculação de *Lactobacillus* tenha dado resultados satisfatórios até muito recentemente. Esta falta de êxito podia estar motivada por uma selecção deficiente de estirpes (em alguns casos teriam origem ambiental, láctica ou animal) e o facto de quase sempre se administrar uma única estirpe o que, provavelmente, não proporcionava as combinações necessárias para que se gerasse um ecossistema maduro, em que os seus componentes estabelecessem uma relação a longo prazo entre si e o hospedeiro.

Com efeito, o recurso a antibióticos tem vindo a conduzir a resultados pouco animadores no tratamento de vaginoses bacterianas, recorrendo-se assim a novas terapias, as quais incluem a recolonização da flora vaginal com *Lactobacillus* veiculados através de óvulos [6]. Não há estudos que demonstrem as taxas de

recorrências de vaginoses bacterianas em mulheres cujos parceiros foram tratados com uma multiplicidade de regimes antibióticos que incluem metronizadol e clindamicina por via oral (excepto no caso de transmissão sexual) [6].

A maior parte dos trabalhos realizados nos últimos anos para seleccionar estirpes com propriedades probióticas partiram de amostras vaginais, em geral provenientes de mulheres saudáveis. Logicamente, esta origem aumenta a possibilidade de adesão das células à mucosa, o que facilita a sua implantação, bem como a sua capacidade de coagregação com patogénios habituais, para maximizar o efeito do ácido láctico, do peróxido de hidrogénio e de outros agentes antimicrobianos sobre eles.

Contudo, nenhuma destas propriedades manifestadas *in vitro* garante uma boa implantação e antagonismo frente aos microrganismos não desejados. Por isso, é necessário levar a cabo ensaios clínicos bem desenhados para avaliar adequadamente o potencial das estirpes candidatas a tornarem-se probióticos urogenitais [21].

Seleção e Estudo de Estirpes Probióticas

No final dos anos 90, a espécie *L. acidophilus* era considerada a espécie dominante na vagina, contudo, técnicas recentes, subdividiram esta espécie num grande número de geno-espécies [48]. Actualmente, a maioria dos estudos foca-se na caracterização da flora microbiana encontrada em vaginas de mulheres adultas (idade entre os 18 e os 35 anos). Estes estudos comprovaram a existência de uma abundante composição de bactérias ácido-lácticas (LAB). As espécies mais frequentemente encontradas em todas as mulheres a nível mundial foram *L. crispatus*, *L. gasseri*, e *L. jensenii*. [26, 55-58]. Diferentes estudos moleculares conduziram também frequentemente à detecção de *L. iners* e *Atopobium vaginae* [59-60]. O género *Atopobium* é constituído por bactérias anaeróbias, Gram positivas, de forma elíptica, as quais produzem uma maior quantidade de ácido láctico [60].

Num estudo recente, Yamamoto *et al.* procederam à análise da composição e estrutura da flora vaginal em jovens adolescentes [61]. Com efeito, a flora bacteriana vaginal de 90 adolescentes no período pós menarca, com idades compreendidas entre os 13 e os 18 anos, foi caracterizada recorrendo à análise do polimorfismo de fragmento de restrição terminal (T-RFLP) de genes 16S rRNA [61]. Foram

identificados quatro *clusters* principais que contabilizam 96,7% da população. Em geral, estes *clusters* podem ser divididos em *Lactobacillus spp.* e uma variedade de bactérias produtoras de ácido láctico e bactérias anaeróbicas, como *Atopobium vaginae* e *Streptococcus spp.* As semelhanças encontradas na composição da flora vaginal em adolescentes no período pré-menarca e na mulher adulta sugerem que esta não se altera significativamente após o aparecimento da menstruação [61]. Neste estudo, as bactérias produtoras de ácido láctico *L. iners* e *L. crispatus* constituíram 50% dos isolados de amostras de fluido vaginal. De facto, um elevado número de amostras era unicamente constituída por *L. iners* e *L. crispatus*. Foi igualmente reportada a presença de espécies produtoras de peróxido de hidrogénio, *L. gasseri* e *L. jensenii*, bem como de *A. Vaginae*. As espécies menos frequentes incluem *L. ruminis*, *L. oris*, *L. reuteri* e *L. vaginalis* [26]. Estes resultados demonstram que a flora vaginal é semelhante em adolescentes e mulheres adultas[61].

Há de facto muitas hipóteses que podem explicar a ausência de diferença significativa na composição e na estrutura vaginal. A explicação mais plausível centra-se no facto das mudanças fisiológicas induzidas pelo estrogénio já terem ocorrido antes ou no momento da menarca. A partir deste momento, os níveis de estrogénio aumentam, o que conduz ao aumento dos níveis de glicogénio vaginal, originando uma pressão selectiva a favor de microrganismos fermentadores da glucose, como é o caso dos *Lactobacillus*. Esta hipótese pode explicar a relativa predominância de *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* e *A. Vaginae*, os quais estão adaptados ao ambiente vaginal, e a relativa ausência de outras LAB.

No que diz respeito a diferenças entre raças, os estudos recentemente realizados são claros e objectivos: não há diferenças consideráveis quanto às bactérias com maior predominância, mas há de facto diferenças significativas no que toca às proporções em que estão presentes na flora vaginal [56, 58]. Relativamente ao valor de pH vaginal os estudos não são claros: há estudos que reportam variações de pH vaginal significativas entre as diferentes raças [62] e estudos que não concluíram [63].

Os resultados das pesquisas realizadas por Nam *et al.* demonstraram que as LAB que constituem a flora vaginal nas mulheres coreanas são bastante diferentes das que se observam nas mulheres ocidentais, em termos de prevalência [64]. O mesmo se verifica para outras bactérias. Este facto pode dever-se às diferentes características das células do epitélio vaginal ou das LAB existentes nos produtos fermentados que consomem, uma possível origem para estes microrganismos [64]. Por exemplo, as LAB existentes no *kimchi* (um vegetal coreano fermentado) são

bastante diferentes das existentes nos produtos fermentados dos países ocidentais, como o iogurte ou as salsichas [64]. A ligação entre a dieta e a flora vaginal já foi anteriormente demonstrada, nomeadamente o facto de os probióticos administrados oralmente aparecerem no fluido vaginal. Deste modo, *Nam et al.* sugerem que as LAB existentes em determinados produtos fermentados são uma fonte da flora vaginal [64].

III. Desenvolvimento e estudo de formulações vaginais de probióticos

As infecções vulvovaginais são a razão mais frequente pela qual as mulheres procuram a ajuda de um profissional de saúde [31]. Ao mesmo tempo, as infecções vulvovaginais encontram-se no centro de um negócio multi-milionário que tem como mecanismo principal a venda de medicamentos não sujeitos a receita médica para auto-tratamento [31]. Um diagnóstico apropriado, realizado por um profissional de saúde qualificado permitirá um tratamento eficaz, diminuindo custos de diagnóstico, efeitos secundários indesejados, bem como situações de ansiedade desnecessárias [31].

A capacidade de absorção vaginal é vastamente conhecida, pelo que este órgão pode funcionar na veiculação de fármacos a nível sistémico, oferecendo uma entrada directa na corrente sanguínea e, possibilitando o contorno do metabolismo hepático e gastrointestinal [31]. Com efeito, o recurso à via vaginal como forma de administração de substâncias activas recebeu recentemente muita atenção, principalmente devido aos agentes terapêuticos que são objecto de efeito intenso de primeira passagem a nível hepático, tais como as proteínas terapêuticas e os péptidos [31]. Vários compostos farmacologicamente activos, que são metabolizados quando administrados por via oral, como a progesterona ou o estrogénio, foram veiculados por via intravaginal para alcançar uma maior actividade sistémica.

Uma pequena pesquisa realizada para avaliar as preferências das mulheres em relação ao uso de medicamentos intravaginais, apresentou uma visão positiva do mercado para este tipo de produtos [31]. Os produtos actualmente disponíveis incluem contraceptivos vaginais, antifúngicos, antibióticos, detergentes, desodorizantes e lubrificantes, podendo ser formulados na forma de comprimidos, cápsulas, cremes, supositórios, espumas, filmes, soluções, pomadas e géis [31].

O desenvolvimento de formulações vaginais com probióticos levanta assim enormes desafios tecnológicos, desde a selecção e caracterização das estirpes com melhores propriedades terapêuticas, passando pela selecção dos processos e excipientes mais adequados para a produção em larga escala, até à obtenção da forma farmacêutica final. Em todo o processo de produção e armazenamento (até 2 anos de validade) deverá ser mantida a viabilidade celular e a capacidade probiótica das estirpes. Um rigoroso controlo de qualidade deve assegurar a eficácia e

segurança do produto obtido. Contudo, a sua utilidade no panorama terapêutico só pode ser determinada pela realização de ensaios clínicos de grande rigor e dimensão. Este aspecto, por si só, condiciona todas as opções desde a pré-formulação à obtenção do produto final adaptado ao tipo de administração.

O estudo da via oral para administração de probióticos, e a tecnologia que lhe está associada, tem sido, sobretudo, explorada pela indústria alimentar para o desenvolvimento de probióticos nutricionais, impulsionando muita da investigação relacionada com a potenciação da viabilidade celular dos microrganismos. Neste caso, os principais desafios que se levantam do ponto de vista tecnológico relacionam-se com a promoção da estabilidade das formulações ao longo das condições extremas de pH, motilidade e acção de sais biliares, as quais caracterizam o trato gastrointestinal. Contudo, a estabilidade (prazo de validade) pretendida para um produto nutricional é muito inferior à exigida para medicamentos.

De modo resumido, uma formulação de libertação de probióticos a nível vaginal deve:

- Apresentar um longo de tempo de retenção de modo a maximizar a libertação de probióticos;
- Apresentar uma libertação adequada no conteúdo vaginal, de modo a que ocorra a colonização nos diferentes locais da vagina;
- Não causar danos na mucosa vaginal e na microflora vaginal;
- Apresentar uma forma de fácil administração;
- Não causar desconforto ao paciente [65];

Encontram-se comercializadas no mercado internacional diferentes tipos de formulações para libertação vaginal de probióticos. Contudo o maior grupo de libertação de probióticos vaginais consiste em liofilizados compactados em comprimidos ou encapsulados numa base de gelatina. Também se encontram comercializados tampões impregnados de *Lactobacillus* [65].

Os estudos mais antigos que envolvem a utilização vaginal de probióticos datam dos anos 90. Nessa época Reid e os seus colaboradores analisaram a recorrência de ITU em mulheres a quem foram administrados óvulos com probióticos [66]. As conclusões foram satisfatórias: após a administração dos óvulos apenas 21% das mulheres apresentaram recorrências de ITU, contra os 47% que se observaram em mulheres que tinham administrado placebo [66].

Estudos posteriores de Baerheim *et al.* [67] viriam a demonstrar o contrário, pelo que a eficácia do uso de óvulos com probióticos se manteria inconclusiva. Uma das possíveis causas para estes resultados, menos positivos, poderá ter sido o facto de os autores utilizarem como estirpe na formulação dos óvulos, *Lactobacillus casei*, a qual não seria de todo a mais adequada para administração vaginal.

Por outro lado, estudos recentes têm vindo a demonstrar a eficácia e a segurança deste tipo de tratamentos. Num estudo desenvolvido por Uehara *et al.* [10] demonstrou-se que óvulos com *L. crispatus* GAI 98332 podem reduzir significativamente os estados de recorrência de ITU, sem causar complicações adversas durante o tratamento. Neste estudo em particular, foi administrado a cada paciente durante um ano, duas vezes por dia, um óvulo contendo 1×10^8 UFC [10]. A razão pela qual este estudo se veio a demonstrar tão promissor poderá estar no facto de se ter seleccionado uma estirpe mais estável, isolada da vagina de mulheres saudáveis, sendo conhecida a sua capacidade de produção de peróxido de hidrogénio, bem como a sua capacidade de adesão ao epitélio vaginal [10].

De igual modo, Kaewnopparat e seus colaboradores procederam ao desenvolvimento de óvulos com uma mistura de PEG e Witepsol H15, através de diferentes métodos de preparação, de modo a comparar a viabilidade de *Lactobacillus casei* [68]. Os óvulos cuja base de excipiente utilizada foi a mistura de PEG e cuja metodologia de preparação foi o método de enchimento, foram os mais indicados para a veiculação de *lactobacillus* vaginais, no que diz respeito à rápida libertação e à estabilidade microbiológica [68].

Kale et al. procederam à investigação e desenvolvimento de formulações de óvulos com *Lactobacillus sporogenes* [69]. Desenvolveram uma formulação farmacêutica de óvulos contendo *Lactobacillus* liofilizados e posteriormente estudaram a performance *in vivo* dos óvulos desenvolvidos, através de métodos de avaliação *in vitro*. Foram desenvolvidas três formulações de óvulos, todas recorrendo ao método de fusão: formulação I, II e III, contendo, respectivamente, manteiga de cacau, gelatina glicerinada e PEG 10 000. De acordo com as características físicas, os óvulos de gelatina glicerinada apresentaram as propriedades mais satisfatórias [70].

Um estudo desenvolvido por G. Reid *et al.* [42] demonstrou que a ingestão por via oral, na forma de cápsulas gelatinosas com *L. rhamnosus* GR-1 e *L. fermentum* RC-14, numa concentração final superior a 1×10^9 UCF/cápsula, diariamente, durante dois meses, não originou qualquer tipo de efeito secundário. Pelo contrário, a terapia resultou num aumento significativo no número de *lactobacillus* vaginais, aliada a uma diminuição de fungos e coliformes. A passagem intestinal destes microrganismos

conduziu igualmente ao aumento da população probiótica vaginal [42]. Este facto pode dever-se à ascensão dos *Lactobacillus* do recto para a vagina. A terapia conduziu igualmente a uma alteração da imunidade da mucosa do hospedeiro (por via intestinal ou vaginal), o que levou a uma redução significativa de patógenos [42]. Este estudo permitiu assim concluir que a ingestão diária de estirpes probióticas seleccionadas pode ser um modo selectivo, seguro e natural de estabilizar a flora vaginal e, deste modo, diminuir o risco de desenvolvimento de infecções em mulheres saudáveis, bem como em mulheres com tendência para o desenvolvimento do ITU [42].

De igual modo, estudos com diferentes formulações de comprimidos vaginais, contendo diferentes estirpes bacterianas, têm vindo a mostrar-se promissores na veiculação de probióticos [65, 69, 71-74].

Os óvulos apresentam determinadas vantagens em relação a outras formas farmacêuticas, nomeadamente o facto de a uniformidade de massa poder ser mantida, ser possível a inserção na vagina sem irritação e não requererem um grande volume de dissolução para que a substância activa seja libertada [70].

As formulações desenhadas devem ter em conta a exequibilidade da produção a nível industrial e ter elevado potencial de aceitabilidade para a população a quem se destinam. Para isso, deve ser dada especial atenção às etapas de pré-formulação e formulação de um produto probiótico e à integração de conhecimentos diversos das áreas da microbiologia, química e tecnologia farmacêutica. Em todas as etapas de pré-formulação e formulação de produtos probióticos impera a necessidade da manutenção da viabilidade celular. Este aspecto deve ser tido em conta desde a selecção dos processos para a manutenção dos microrganismos da suspensão que se pretende incorporar, definição do tipo de forma farmacêutica a formular, e selecção dos métodos de produção e de excipientes adequados. Em todo o processo deve ser avaliada a influência na viabilidade e manutenção das propriedades probióticas dos microrganismos e a sua adequabilidade à aplicação vaginal.

Na área terapêutica, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido do estudo e desenvolvimento de formulações para o tratamento de patologias do trato gastrointestinal sendo, contudo, escassos os produtos probióticos classificados como medicamentos. Efectivamente, em Portugal apenas quatro formulações se encontram registadas no Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED) como medicamentos: *UL-250®*, formulação oral contendo o fungo *Sacharomyces boulardii*, *Lacteol®* (*L. acidophilus*), *Antibiophilus®* (*L. casei*) aprovados com indicação na terapêutica adjuvante de diarreias e *Gynoflor®*, comprimidos vaginais contendo uma associação de estriol (em baixa concentração) com *L. acidophilus*. Este último constitui

o único medicamento probiótico tópico, para aplicação vaginal, com autorização de introdução no mercado português, não se encontrando, contudo, comercializado. Os restantes produtos disponíveis no mercado que alegam actividade probiótica são, pelo exposto, classificados como suplementos alimentares pelos laboratórios que os comercializam, obedecendo a legislação diferente da aplicável aos medicamentos.

IV. Óvulos

Desde a antiguidade e durante muito tempo, os supositórios e os óvulos foram as formas farmacêuticas utilizadas para a administração de substâncias medicamentosas por via rectal e vaginal [16]. Por definição, os óvulos são preparações sólidas, cuja massa pode variar entre 1 e 15 g, com uma ou várias substâncias medicamentosas, destinadas a administração vaginal em doses unitárias [16, 75]. A sua forma, volume e consistência devem ser adequados para facilitar a sua administração. Os excipientes utilizados nesta preparação são os usados nos supositórios [16]. As bases gordas usam-se, ocasionalmente, quando se utilizam fármacos de carácter lipófilo, tornando a sua libertação bastante lenta. As bases hidrófilas também são muito utilizadas, sendo o excipiente mais clássico a mistura gelatina-glicerina-água [16]. A proporção em que intervêm os três componentes pode variar, de modo a adequar a consistência em função da natureza do fármaco. Os óvulos assim preparados são pouco apelativos devido ao seu tamanho. Por este motivo, tem-se vindo a recorrer cada vez mais aos excipientes à base de polietilenoglicóis (PEG) [16]. São de preparação muito mais simples, sendo constituídos por misturas de polietilenoglicol 1500 e 4000 ou 6000, em proporções que variam entre 60:40 e 40:60. Estas bases são especialmente adequadas para fármacos muito activos, não lipófilos, cuja dose terapêutica é baixa [16]. A massa média ronda os 5 g ou menos, pelo que a sua aplicação é muito mais cómoda. São sensíveis à contaminação e por isso podem conter conservantes [16].

Os excipientes utilizados na preparação de óvulos devem permitir que a forma farmacêutica preparada se funda na vagina a 37 °C ou se dissolva no fluido vaginal. Além disso, devem reunir um conjunto de propriedades adequadas, nomeadamente:

- ser inócuos e bem tolerados pela mucosa vaginal, a qual é bastante sensível e irritável;
- ser inertes perante os fármacos administrados

- estáveis perante a acção de agentes externos;
- apresentar uma consistência conveniente, não sendo nem muito moles nem excessivamente rígidos ou quebradiços;
- solidificar num intervalo de tempo bastante reduzido, de modo a assegurar a homogeneidade do óvulo;
- apresentar um certo poder de retracção ao arrefecer de modo a facilitar o esvaziamento do molde e devem permitir a libertação rápida e completa da substância activa na vagina, excepto quando a sua finalidade é a libertação controlada do mesmo [16].

Nem todos os excipientes reúnem as qualidades descritas pelo que, em determinados casos, é necessário recorrer à adição de coadjuvantes específicos que melhorem as suas propriedades [16].

Classificação dos excipientes

Os principais excipientes utilizados na preparação de óvulos pertencem a dois grandes grupos: lipófilos e hidrófilos.

Os **excipientes lipófilos** são provavelmente os mais utilizados devido ao facto de possuírem uma acção emoliente que, em parte, compensa a acção irritante de determinadas substâncias activas, uma vez que formam uma película hidrófoba protectora sobre a mucosa [16]. Devem fundir à temperatura corporal [16, 70, 75-76].

Entre os excipientes lipófilos mais utilizados encontra-se a manteiga de cacau, os óleos hidrogenados e os óleos hidrogenados dispersíveis em água [16, 75]. Estes últimos obtêm-se por adição de tensoactivos de elevado valor de EHL aos óleos hidrogenados. Trata-se, geralmente, de tensoactivos não iónicos, como é o caso do Tween®, e de ésteres de ácidos gordos com polietilenoglicóis (Mirj®) [16]. Os nomes registados com os quais se identificam os excipientes obtidos a partir de óleos hidrogenados são, entre outros, Massa estearium®, Witepsol®, Massupol® e Suppocire® [75]. Estas marcas comerciais apresentam diferentes tipos de bases que se identificam mediante letras ou letras e números (por exemplo, Witepsol H12, Witepsol H15, Suppocire AM, Massa estarinum B) [75]. Cada tipo apresenta as suas características físicas e químicas próprias (índices de acidez, de hidroxilo, de iodo, de saponificação, temperatura de solidificação e fusão, índice de fractura) e deve-se seleccionar o mais adequado para cada caso particular [16, 75].

Em linhas gerais, os **excipientes hidrófilos** não apresentam problemas de conservação a temperaturas elevadas, relacionados com a consistência, pelo que são adequados para uso em climas tropicais. Contudo, apresentam o inconveniente de ter um certo poder de irritação sobre a mucosa vaginal [16]. Neste caso, utilizam-se excipientes à base de glicerina e polietilenoglicóis [16, 75].

No passado, recorreu-se muito aos excipientes de glicerina-gelatina ou gelatina glicerinada, que consistem numa mistura de glicerina, água e gelatina. As gelatinas obtêm-se por hidrólise parcial do colagénio animal; quando não são preparadas por métodos especiais são substâncias anfotéricas, incompatíveis com numerosos fármacos do tipo iónico. Para uso farmacêutico costumam utilizar-se os seguintes tipos de gelatina específicos: gelatina tipo A, que se prepara por hidrólise ácida e é de tipo catiónico, com um ponto isoeléctrico compreendido entre 7 e 9; gelatina tipo B, que se prepara por hidrólise alcalina e é de tipo aniónico, com um ponto isoeléctrico compreendido entre 4 e 7 [16].

Pode eleger-se uma ou outra variedade de gelatina consoante as características iónicas do fármaco a incorporar [16]. A gelatina apresenta-se normalmente na forma de folhas ou em pó; esta última é de melhor qualidade e mais usada em farmácia. Os excipientes de glicerina-gelatina adequados a este tipo de formulação contêm habitualmente 70% de glicerina e 14% de gelatina [16]. Se as formas que se vão preparar se destinam a países quentes o fármaco é capaz de reduzir a consistência do excipiente, e pode-se aumentar a proporção de gelatina. Quando o fármaco é incompatível com a água, podem utilizar-se misturas de gelatina e glicerina anidras em partes iguais ou em diferentes proporções [16]. Contudo, devido à sua acção irritante sobre as mucosas, este excipiente não se costuma utilizar como base de óvulos e supositórios [16]. A preparação das bases de glicerina-gelatina deve ser extemporanea já que, com o tempo, têm tendência a secar e são, além disso, um excelente meio de crescimento para muitos microrganismos. Por este motivo, frequentemente são adicionados antimicrobianos [16].

Por seu lado, os PEG ou “macrogóis”, podem apresentar diferentes massas moleculares que condicionam as suas propriedades físicas. Os de massa molecular entre 200 e 700 são líquidos; os compreendidos entre 800 e 1500 têm consistência semi-sólida e os superiores, até 6000, são sólidos e com aspecto de cera [16]. Combinando PEG de diferentes massas moleculares podem obter-se bases com características diferentes, relativamente à dureza, facilidade de dissolução e capacidade de cedência do fármaco. De um modo geral, as bases de PEG apresentam uma temperatura de fusão mais elevada que a temperatura corporal. Após

administração não fundem, mas sim dissolvem ou dispersam nos fluidos corporais, e tendem a ceder o fármaco lentamente. Conferem elevada viscosidade ao meio, o que dificulta a difusão dos fármacos incorporados. Não é estritamente necessário que se conservem no frio e são adequados para zonas de climas quentes. Com efeito, as bases de PEG apresentam uma boa capacidade de retracção ao arrefecerem, pelo que não é estritamente necessário lubrificar os moldes, podendo contudo usar-se parafina líquida. São um pouco irritantes, apesar de não terem o efeito laxante característico da glicerina-gelatina. O poder irritante pode ser reduzido por incorporação de cerca de 20% de água na massa. As bases de PEG apresentam alguns inconvenientes, nomeadamente o facto de poderem ser incompatíveis com determinados fármacos (por exemplo sais de bismuto, benzocaína, fenóis) e reduzirem a actividade de alguns conservantes como os ésteres do ácido *para*-hidroxibenzóico e os derivados de amónio quaternário [16]. Também apresentam interacções com alguns plásticos, o que limita a escolha do material de acondicionamento [16]. Os óvulos preparados podem ser frágeis, especialmente quando contêm água na sua composição[16]. Isto deve-se à elevada hidrossolubilidade dos PEG, que podem originar uma solução sobresaturada em água e a sua posterior cristalização [16]. Este efeito pode corrigir-se mediante a adição de agentes tensioactivos e plastificantes. Se o fármaco estiver disperso na massa, pode cristalizar também, o que retarda a sua cedência e causa maior irritação na mucosa [16].

Preparação dos óvulos

Habitualmente os óvulos obtêm-se vertendo a massa medicamentosa, derretida pelo calor em moldes que contêm alvéolos adequados, nos quais a massa adquire uma consistência sólida por arrefecimento [75]. A preparação da massa implica a pesagem dos constituintes, cuja mistura se quantifica de acordo com o volume do molde (capacidade do molde). Cada unidade deve conter uma dose exacta da substância activa. Devem conhecer-se as densidades aparentes dos fármacos em relação aos excipientes usados, o que permite calcular com exactidão para cada óvulo o peso de excipiente necessário. Se as densidades do fármaco e do excipiente são iguais, a quantidade de excipiente usado é equivalente à quantidade de fármaco adicionado. Contudo, de um modo geral, as densidades são bastante diferentes e fazem com que seja necessário efectuar cálculos, recorrendo aos valores da

densidade aparente ou do factor de deslocamento (excepto no caso em que o fármaco se doseie em percentagem) [75].

O factor de deslocamento ou factor de substituição (f) define-se como o peso de excipiente, em gramas, que corresponde ao volume ocupado por um grama de fármaco [75]. Em várias farmacopeias, e em muitos textos, existem tabelas que indicam o factor de deslocamento de determinados fármacos relativamente aos excipientes mais comuns [75]. No caso deste dado não ser conhecido, estes valores podem ser facilmente determinados. Para isso, funde-se e enche-se em excesso os alvéolos dos moldes só com excipiente. Deixa-se arrefecer à temperatura ambiente e retira-se o excesso de excipiente com uma espátula. Colocam-se os moldes numa câmara frigorífica e quando a massa tiver arrefecido por completo retiram-se os óvulos dos moldes e pesam-se, anotando-se o seu peso em gramas (m). Prepara-se outra massa de excipiente, numa quantidade claramente insuficiente para encher os alvéolos dos moldes e adiciona-se o fármaco requerido. A mistura, fundida é vertida nos moldes, deixa-se arrefecer e procede-se como anteriormente, anotando o peso em grama (B) dos óvulos obtidos. A diferença entre este último peso e o de fármaco adicionado (p) corresponde ao peso de excipiente necessário para preparar os óvulos finais. O valor de m anteriormente indicado menos o valor de ($B - p$) corresponde ao excesso de excipiente deslocado pelo fármaco. Dividindo este valor por p obtém-se o factor de deslocamento, f , expresso em grama:

$$f = \frac{m - (B - p)}{p}$$

O factor de deslocamento pode calcular-se utilizando apenas um alvéolo, contudo o procedimento acima descrito, utilizando vários alvéolos é mais exacto, uma vez que o erro experimental é muito menor.

Conhecendo o factor de deslocamento do fármaco, num dado excipiente, e se se pretende calcular o peso de excipiente necessário para preparar um determinado número de óvulos, procede-se do seguinte modo: enchem-se os moldes com excipiente fundido, deixa-se solidificar por completo, separa-se o excesso de massa, retiram-se os óvulos dos moldes e pesa-se; este valor é m . Por definição, o factor de deslocamento, f , multiplicado pelo peso total de fármaco, p , que deve existir nos óvulos, equivale ao peso de excipiente deslocado pelo fármaco ($f.p$). Se subtrairmos este valor a m obtém-se o peso de excipiente necessário para a preparação:

$$\text{Peso de excipiente necessário} = m - (f.p)$$

Dado que o factor de deslocamento corresponde ao inverso da densidade aparente (d_{ap}), pode utilizar-se a seguinte equação em alternativa à anterior:

$$\text{Peso de excipiente necessário} = m - (p/d_{ap})$$

Ensaio dos Óvulos

De acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9.0 (F.P. 9.0) as “preparações vaginais são preparações líquidas, semi-sólidas ou sólidas, destinadas a serem administradas por via vaginal, geralmente para uma acção local. Contêm uma ou várias substâncias activas num excipiente apropriado. Podem distinguir-se várias categorias de preparações vaginais: óvulos, comprimidos vaginais, cápsulas vaginais, soluções, emulsões e suspensões vaginais, comprimidos para soluções ou suspensões vaginais, preparações vaginais semi-sólidas, espumas vaginais e tampões vaginais medicamentosos” [77].

Igualmente, de acordo com a F.P. 9.0, os óvulos devem obedecer aos seguintes ensaios:

a) Controlo Organoléptico

Os óvulos devem apresentar um aspecto homogéneo na sua superfície e em profundidade [77]. A superfície deve ser lisa e brilhante, sem fissuras. Estas devem-se normalmente a um arrefecimento excessivamente rápido ou ao facto de se retirarem dos moldes prematuramente ou excessivamente tarde [77]. Não deve aparecer qualquer tipo de cristalização do fármaco na superfície [77].

b) Ensaio físicos

No que se refere aos ensaios físicos devem controlar-se os seguintes parâmetros:

- **Uniformidade de massa:** deve executar-se o ensaio da F.P. 9.0 para as formas sólidas que se apresentam em dose unitária.

- **Controlo da dureza:** a dureza deve ser adequada para permitir uma correcta manipulação no momento de acondicionamento e uso. O ensaio consiste em determinar a pressão de ruptura da forma farmacêutica a uma temperatura pré-determinada. Na realidade, o controlo da dureza é um ensaio de fragilidade ou resistência à ruptura da forma farmacêutica.
- **Tempo de desagregação:** é um ensaio de fusão ou dispersão, de acordo com o excipiente utilizado na preparação da forma farmacêutica. Realiza-se num banho de água a uma temperatura constante de 36–37 °C. Submerge-se o óvulo no banho e submete-se a uma ligeira agitação. Para realização deste ensaio utiliza-se o equipamento representado na Figura 5, o qual serve igualmente para determinar o tempo de desagregação de supositórios e de outras formas sólidas unidose, rectais ou vaginais. É constituído por um cilindro, aberto dos dois lados, de vidro ou plástico transparente, com uma espessura adequada, em cujo interior se fixam as placas metálicas na posição horizontal, presas ao cilindro por três ganchos e separadas entre si por uma distância de 30 mm. Estas placas são perfuradas por 38 orifícios de 4 mm de diâmetro dispostos de forma circular à volta do orifício central (1, 6, 12, 21 orifícios em cada anel, respectivamente). Este equipamento utiliza-se para apenas uma amostra. Para a realização do ensaio, o equipamento acima descrito é introduzido num banho, com de água a 36 – 37 °C. O banho contém um agitador lento e um dispositivo que permite manter o cilindro 90 mm abaixo da superfície da água, invertendo a sua posição sem ser retirado da água.

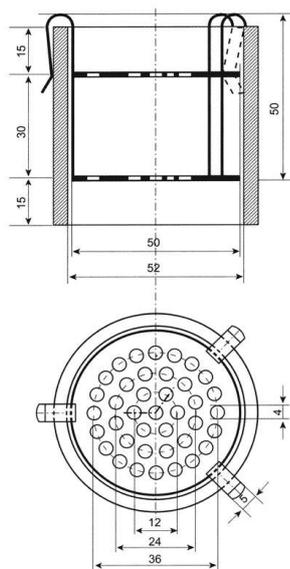


Figura 5 - Aparelho para a desagregação dos supositórios e dos óvulos (dimensões em milímetro)

O ensaio realiza-se com três unidades e considera-se correcto se as três unidades se desagregam no tempo correcto. A desagregação considera-se terminada quando:

- Há uma dissolução completa da forma farmacêutica;
- Os produtos de desagregação saem totalmente através dos orifícios da placa inferior ou ascendem pela placa superior;
- Quando nenhuma matéria sólida permanece entre as placas perfuradas;

c) Ensaio de controlo de novas formulações

Quando se prepara uma nova formulação, deve fazer-se um seguimento, ao longo do tempo, dos controlos indicados, especialmente das características físicas da forma farmacêutica e da libertação *in vitro* do fármaco ou fármacos incorporados [77]. Para isso, armazena-se um lote de óvulos à temperatura ambiente, considerando-se como tal 25 ± 3 °C e outro lote a 4 °C [77]. Efectuam-se os ensaios a tempos regulares durante um mês, três meses, seis meses, um ano e dois anos, controlando-se variações do aspecto físico (as quais não devem ocorrer), do ponto de fusão e de ruptura, estabilidade da substância activa e características de cedência [77].

Formulações Comerciais

No mercado internacional estão disponíveis diferentes produtos, para administração oral ou tópica, que alegam actividade probiótica e, conseqüentemente, acção terapêutica na regularização do ecossistema vaginal [78]. Em Portugal não se encontra comercializada até ao momento qualquer formulação referente a óvulos probióticos. A Tabela I sumaria alguns produtos comercializados internacionalmente na forma farmacêutica óvulos.

Uma análise detalhada à tabela permite constatar que a origem da estirpe bacteriana utilizada é omissa, mas é referida clara e objectivamente a estirpe utilizada, a quantidade de UFC por óvulo, as condições de armazenamento, as indicações terapêuticas e a posologia [79]. Há, contudo, que ressaltar as questões legais e regulamentares. Embora existam orientações quanto à escolha de determinadas estirpes probióticas e à avaliação da sua eficácia e segurança, ainda não há um consenso internacional de regulamentação, no que diz respeito aos produtos

farmacêuticos [79-80]. É ainda necessário muito trabalho antes de se poder dar credibilidade às alegações de eficácia sobre o uso de produtos probióticos na saúde humana [79]. Torna-se, assim, urgente a uniformização de procedimentos regulamentares internacionais para as alegações de saúde para probióticos, de modo a garantir um adequado fabrico, manipulação e rotulagem [79]. Com efeito, segundo Nader-Macías *et al.* [79] há questões fundamentais que devem ser respondidas:

- A eficácia dos probióticos depende do género, espécie e estirpe específica. A sua eficácia, bem como as suas propriedades, são mantidas ao longo de todo o processo de fabrico?
- É benéfica a complementação de LAB com péptidos, vitaminas, antioxidantes, prebióticos, ou outras substâncias?
- Qual o melhor desenho de formulação a ser administrado pela via oral ou local?
- Quais são os regulamentos e as regras de rotulagem desses produtos? Devem ser incluídos como medicamentos, ou como complementos, quando administrados por via oral?

Tabela I - Produtos probióticos disponíveis no mercado internacional para reequilibrar o ecossistema vaginal (adaptado de [79]).

Produto Comercial/ Fabricante (País)	Células Viáveis, Estirpe e Origem	Dose recomendada /Tempo de tratamento	Condições de Armazenamento	Excipientes	Indicações
Vagiflor®, Asche AG, Alemanha	10 ⁷ -10 ⁸ UFC de <i>L. acidophilus</i> por grama de óvulo	1 / dia	Refrigeração (2-8°C)	Lípidos	Restauração e manutenção da flora vaginal normal e pH
Lactinex®, Omega (Argentina)	10 ⁸ - 10 ⁹ UFC de <i>L. Acidophilus</i> e <i>L. helveticus</i> (bulgaricus) por óvulo	1 / dia durante 6 a 12 dias	Refrigeração (4-8°C)	Dióxido de silicone Witepsol S55	Restauração do ecossistema vaginal. Tratamento de infecções vaginais por <i>C. albicans</i> e <i>G. vaginalis</i>
Tropivag® Finadiet (Argentina)	8 x 10 ⁸ células viáveis de <i>L. rhamnosus</i> Lcr35® (Döderlein's bacillus) por óvulo	2 / dia (manhã e noite) durante 7 dias	Refrigeração (4-8°C)	Dióxido de silicone Glicerídeos sólidos sintéticos	Restauração e protecção do ecossistema vaginal contra agressões não hormonais
HLC CandaclearTM, Pharmax (Canada)	10 ⁸ células viáveis de <i>L. acidophilus</i> CUL 21 e CUL 60 por óvulo	1-2 /dia; período de tratamento inespecífico.	No congelador (sem limite); 24 meses refrigerado; 6 meses à temperatura ambiente; 3-4 semanas a 32-37°C	Concentrado de <i>Allium sativum</i> (alicina), óleo essencial de rosa e polietilenoglicol	Restauração e manutenção da flora vaginal
IntrafreshTM, BioCare (UK)	10 ⁸ células viáveis de <i>L. acidophilus</i> por óvulo	1 / dia; periodo inespecifico de tratamento	Refrigeração; 1 semana à temperatura ambiente;	Extracto de <i>Allium sativum</i> (alicina), óleo essencial de rosa e polietilenoglicol	Manutenção da flora vaginal normal.

V. Liofilização

Um dos problemas que sempre preocupou os investigadores é a estabilidade dos produtos biológicos, químicos e alimentares, os quais, ao desnaturarem, não permitem a sua conservação sem que as suas qualidades originais sejam alteradas. Como factores que afectam estas substâncias pode-se assinalar os microrganismos, a água, as enzimas, o oxigénio, a temperatura, entre outros. O ideal seria conservar um produto e encontrá-lo absolutamente idêntico no momento de ser utilizado, contudo tal é praticamente impossível.

Entre as técnicas modernas, talvez a liofilização seja a que mais vantagem aponta nesse sentido. A liofilização é um processo de dissecação onde o solvente, em geral a água, é primeiro congelado e posteriormente eliminado por sublimação em vácuo.

A primeira etapa do processo de liofilização é a pré-congelação [81]. O produto é congelado a temperaturas muito inferiores ao ponto de congelação, de modo a assegurar que se encontra no estado sólido [81]. A congelação deve ser feita abaixo do ponto triplo da água (temperatura à qual toda a água no interior do produto se encontra no estado sólido), tal como demonstra a Figura 6:

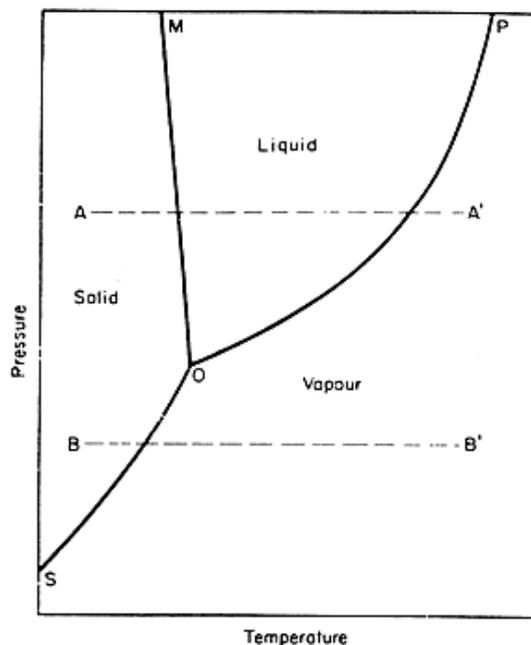


Figura 6 - Diagrama de fases da água (adaptado de [82]).

É desejável que o arrefecimento seja rápido, de modo a originar pequenos cristais de gelo nos microrganismos [82].

O segundo passo do processo de liofilização é a secagem primária. Neste passo ocorre a remoção dos cristais de gelo por sublimação. A sublimação é um processo que conduz ao do produto seco. Durante este estado a temperatura do produto deve oscilar entre a temperatura de congelação e a temperatura de evaporação do produto. De seguida, a temperatura aumenta consideravelmente e a pressão é reduzida. Contudo, o produto mantém bastantes ligações de água no seu interior [82].

O estágio final do processo de liofilização é a secagem secundária, a qual remove as ligações finais de água por dessorção [82].

De um modo geral, as principais vantagens da liofilização são:

- A temperatura a que é submetido o produto está abaixo da que pode alterar as substâncias menos estáveis;
- Devido à baixa temperatura à qual se opera, a perda de constituintes voláteis é mínima;
- Uma vez que o produto é conservado no estado congelado durante todo o processo, não ocorre formação de espuma ou borbulhas, as quais originariam desnaturação das proteínas;
- O soluto permanece uniformemente disperso e distribuído, sem sofrer concentração nem tendência de coagulação;
- O produto liofilizado consta de uma estrutura entrelaçada, apresentando-se sólido, bastante poroso e ocupando essencialmente o mesmo espaço total que ocupava a solução inicial. Como resultado destas características a sua solubilidade é elevada e completa.
- O produto final obtido possui uma percentagem muito baixa de humidade, podendo chegar a ser inferior a 0,5%.
- O desenvolvimento bacteriano e as variações enzimáticas não podem ocorrer nem durante o processo de liofilização nem quando o produto está seco;
- Dado que durante todo o processo de sublimação se efectua um elevado vácuo, o qual pode ser conservado uma vez liofilizado o produto, a quantidade de oxigénio presente é nula, pelo que os compostos facilmente oxidáveis se encontram protegidos.

Todas estas particularidades podem resumir-se numa estabilidade óptima, uma solubilidade elevada, rápida e completa, uma conservação ilimitada, uma boa protecção contra as influências externas nocivas e uma rápida disponibilidade de uso.

A nível industrial, os concentrados de microrganismos probióticos devem ser mantidos e utilizados directamente ou activados por sucessivas subculturas até se atingir a concentração necessária para inoculação dos fermentadores [83]. Deste modo, obtém-se um número de microrganismos suficientes para incorporação na formulação [83].

Apesar de muitas bactérias e esporos apresentarem resistência ao processo de liofilização sem recurso ao uso de crioprotectores, a presença destes aumenta significativamente a sua taxa de sobrevivência [84]. A justificação do recurso a crioprotectores tem por base o facto do processo de liofilização envolver o congelamento das culturas microbiológicas, seguido da remoção de água a temperaturas de congelamento e reduzida pressão [85]. Tal como já foi referido, durante o processo de congelamento a água é removida do material biológico por sublimação.[85]. Em presença do crioprotector, o dano feito na membrana celular nas bactérias procarióticas é minimizado, uma vez que a água é sublimada passando directamente do estado sólido ao estado gasoso [85].

Os aditivos crioprotectores usados no processo de congelação de microrganismos (como vírus, bactérias, fungos, algas ou protozoários) inclui uma enorme variedade de compostos, mais simples ou complexos, onde apenas uma pequena percentagem tem proporcionado resultados positivos. Dentro desta gama de compostos encontra-se o dimetilsulfóxido, o glicerol, a albumina sérica, o leite em pó, a peptona, o extracto de fungos, a glucose, a sacarose, o metanol, a polivinilpirrolidona, o sorbitol e o extracto de malte [83-84].

Os crioprotectores utilizados em microbiologia podem ser classificados em três categorias: substâncias que penetram rapidamente nas células (como álcoois monovalentes, amidas e sulfóxidos); substâncias que penetram lentamente nas células (como o glicerol) e substâncias sem capacidade de penetração nas células (como mono, oligo e polissacarídeos, sorbitol, proteínas e polietilenoglicol) [84]. Os mecanismos pelos quais exercem a sua actividade crioprotectora estão intimamente ligados com a natureza do composto, sendo que substâncias com capacidade de penetração na célula tornam a membrana mais plástica e ligam-se à água intracelular, prevenindo a desidratação excessiva e a formação de grandes cristais de gelo no espaço intracelular. Pelo contrário, os crioprotectores não permeáveis têm a capacidade de formar uma camada viscosa à superfície da célula, promovendo o

efluxo parcial da água intracelular, inibindo o crescimento de cristais de gelo e mantendo a estrutura de gelo amorfa na proximidade da célula [84]. Efectivamente, pós de microrganismos liofilizados podem ainda incorrer em perda de viabilidade durante o período de armazenamento e durante a etapa crítica de rehidratação, uma vez aplicada a forma farmacêutica. A incorporação de excipientes com actividade protectora e prebiótica na formulação é essencial para assegurar o conteúdo do produto (viabilidade e manutenção de propriedades probióticas) ao longo do tempo, para que a dose terapêutica esteja assegurada [93, 95, 99]. No que respeita à definição da quantidade necessárias de probiótico a administrar, Reid e colaboradores mostraram que doses superiores a 1×10^9 de células viáveis de *Lactobacillus* probióticos administrados por via oral diariamente e 1×10^9 aplicadas na vagina são necessárias para restaurar e manter a flora urogenital normal [34, 37]. Deste modo, ao estudo de viabilidade e estabilidade das suspensões ou pós (liofilizados) de microrganismos a serem incorporados em formulações de probióticos, segue-se a avaliação dos mesmos parâmetros na formulação final. O desenvolvimento de formulações probióticas para obtenção de efeito a nível vaginal pode conduzir-se, como anteriormente referido, tendo em vista a administração oral ou a aplicação tópica. No primeiro caso, levantam-se questões relacionadas com a resistência da forma farmacêutica (e estirpes) às condições extremas do trato gastrointestinal, nomeadamente no que se refere ao pH estomacal e à agressividade dos sais biliares. Assim se assegura que o produto atinge o ambiente intestinal onde deve ocorrer desagregação e libertação dos microrganismos. No caso da aplicação tópica vaginal o desenho de formulações caracterizadas por elevado tempo de permanência no epitélio associa-se simultaneamente a uma elevada aceitabilidade, com consequente optimização da adesão à terapêutica, e a um aumento da eficácia terapêutica.

Os resultados apresentados no trabalho desenvolvido por Mastromarino *et al.* demonstraram que a liofilização reduz a capacidade de adesão ao epitélio vaginal e, portanto, a capacidade de colonização de algumas estirpes probióticas, pelo que este factor deve ser tido em consideração na preparação de formulações com probióticos [71]. A este respeito, a compreensão do papel das interacções electrostáticas na ligação dos *Lactobacillus* às células epiteliais para a saúde humana é igualmente de grande importância. A adição, à formulação farmacêutica, de compostos capazes de reduzir consideravelmente a carga negativa à superfície, pode melhorar a capacidade de colonização do epitélio vaginal [71].

Materiais e Métodos

I. Materiais

Matérias-primas e reagentes

Para a execução experimental do trabalho conducente a esta tese de mestrado foram utilizados as seguintes matérias-primas e reagentes:

A estirpe *Lactobacillus Acidophilus* foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC), Estados Unidos

O PEG 400 (Lote 091768), o PEG 4000 (Lote 093318) e a Glicerina (Lote 090381) foram adquiridos à Acofarma, Portugal.

O Witepsol H12 (Lote 499 540) foi cedido pela Sasol, Alemanha.

O cloreto de sódio (Lote K35518404601), dihidrogenofosfato de potássio (Lote A850773 735) e o hidrogenofosfato de sódio dodecahidratado (Lote A408379 320 A408379 320) foram adquiridos à Merck KGaA, Alemanha.

A Fungizona® - Anfotericina B (Lote 823522), a Penicilina- Estreptomina (Lote 823960), o Soro de Bovino Fetal (SBF) inactivado pelo calor (Lote 07F54985 e 07F4104K), Tripsina 0,25% com EDTA (Lote 838590), Meio de McCoy's 5A (Lote 755054), meio de Keratinocyte-SFM (Lote 745977) o Factor de crescimento epidérmico humano de recombinação (rhEGF) (Lote 738281), o extracto de pituitária bovina (Lote 738023) e o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle com GlutaMAX™ I (Lote 828392) foram adquiridos à Invitrogen Corporation, E.U.A.

O Triton® X-100 (Lote 035K0166) foi obtido na Sigma-Aldrich, Estados Unidos.

O Ácido Láctico (Lote 2010900035), a Ureia (Lote 21360) e o Ácido Acético Glacial (Lote) foram adquiridos à firma José M. Vaz Pereira, SA., Portugal.

A Glucose Anidra (Lote 0403090) e o Hidróxido de Potássio (Lote 0505796) foram obtidos da RoigFarma SA., Espanha.

Uma vez que os excipientes utilizados como base de formulação foram o Witepsol H12 e os PEG 400 e 4000, torna-se pertinente a análise das suas características:

Witepsol

De um modo geral, os excipientes lipossolúveis devem fundir a temperatura inferior a 37°C, de preferência menor que 36,5°C [75]. Em termos práticos interessa que os excipientes gordos fundam completamente num período de tempo igual ou inferior a 10 minutos, quando aquecidos a 37°C [75].

Os excipientes Witepsol são constituídos por glicerídeos semi-sintéticos, por vezes modificados, e apresentam-se em 4 tipos fundamentais – H, W, S e E – cada um deles com vários subtipos [75].

As massas do tipo H são caracterizadas por um teor reduzido em mono e diésteres (baixo índice de hidroxilo), sendo duras e pouco elásticas e apresentando um intervalo de fusão muito curto, com solidificação rápida [75] [86]. Dentro do tipo H distinguem-se os subtipos H12, H15 e H 19. O Witepsol H12 recomenda-se para a preparação de supositórios com substâncias que lhe elevem o ponto de fusão e consistência (elevada percentagem de pós incorporados, por exemplo). Dado que o seu ponto de fusão é muito baixo (32–33,5°C), é também adequado para a preparação de supositórios contendo substâncias termossensíveis [75] [86]. O Witepsol H15 é um excipiente de uso universal, servindo para a preparação da quase totalidade dos supositórios [75] [86]. Entre as suas vantagens figura o facto de apresentar um ponto de solidificação extremamente próximo do ponto de fusão límpido, o que evita a sedimentação dos fármacos suspensos, quando a mistura é vertida nos moldes [75]. Nas circunstâncias referidas é dispensável o arrefecimento para solidificação, podendo aquela operação considerar-se mesmo indesejável, originando supositórios com fendas e quebradiços [75]. O Witepsol H19 é um intermédio que contém 0-48-G, um éster de ácido gordo hidroxilado [75]. Quando os supositórios preparados com Witepsol H19 fundem no recto, o 0-48-G actua sobre a mucosa, recobrando-a de uma película que a protege da irritação provocada por alguns fármacos, como anti-histamínicos. Este excipiente é ainda desejável para supositórios que se destinem ao tratamento de estados ulcerativos ou inflamatórios da mucosa rectal, como acontece no caso de hemorróides e fissuras anais [75].

Os intermédios da série de Witepsol W contêm proporções mais elevadas de mono e diglicéridos, sendo por isso bons absorventes de água ou de soluções aquosas e apresentando certo poder emulgente [75]. O seu índice de hidroxilo é elevado (cerca de 30 a 50), sendo igualmente largo o intervalo entre a fusão e a

solidificação. Aconselham-se para a preparação automática de supositórios ou sempre que contenham fármacos voláteis [75]. O Witepsol W25 emprega-se, sobretudo, em fórmulas magistrais, podendo os moldes ser arrefecidos moderadamente [75]. O Witepsol W31 é utilizado no fabrico industrial, podendo as massas ser vertidas nos moldes no estado cremoso, e sofrerem um arrefecimento artificial bastante rápido [75]. Quando há necessidade de absorção de grandes quantidades de água ou de soluções aquosas pelo excipiente, pode-se recorrer ao Witepsol W35 ou W45 (índices de hidroxilo 40-50), que permitem o trabalho automatizado e podem arrefecer a temperaturas muito mais baixas [75].

Os excipientes que correspondem à série S destinam-se ao fabrico industrial de supositórios que contenham substâncias de elevada densidade [75]. Entre as suas características figura um índice de hidroxilo anormalmente elevado (50-75). Tal elevação do poder absorvente de água conseguiu-se à custa da introdução de radicais polioxietilénicos, o que permite uma fácil difusão sobre as mucosas onde seja aplicado (rectal, vaginal e uretral) [75, 87]. O Witepsol S52 tem um ponto de fusão muito baixo (32-33,5°C), podendo usar-se nos casos indicados para o H12 [87]. Não deve ser arrefecido a temperaturas baixas (pode originar fendas). O Witepsol S55 emprega-se para preparar supositórios que contenham compostos de elevada densidade ou que sejam prescritos em concentração elevada (caso das sulfamidas) [75]. Finalmente, o Witepsol S58 é um excipiente semelhante aos anteriores, mas tal como o H19 contém uma substância protectora das mucosas.

A série Witepsol E é caracterizada por os seus intermédios apresentarem um ponto de fusão elevado, servindo, por isso, de preferência para a preparação de supositórios cujos fármacos ocasionem depressão daquela constante, ou que se destinem a ser utilizados em países quentes [75]. O Witepsol E75 tem na sua composição uma pequena quantidade de cera (ponto de fusão: 37-39°C), usando-se nas circunstâncias acima referidas e em misturas com Witepsol H, W e S [75]. O Witepsol E76, mais hidrófilo do que o anterior, aconselha-se em preparações com cânfora e óleos essenciais. O Witepsol E79 possui propriedades inerentes ao grupo E, contendo um elemento protector das mucosas [75]. Por último, o Witepsol E85 aconselha-se em misturas com os excipientes das séries H, W e S, já que o seu ponto de fusão é anormalmente elevado (42-44°C) [75].

Polietilenoglicol

O Polietilenoglicol (PEG), também designado polioxietilenoglicol ou óxido de polietileno (POE), é um polímero sintético que se encontra disponível numa variedade de massas moleculares [88]. São igualmente conhecidos pelo seu nome comercial de Carbowax® ou Macrogol® [75]. Os materiais com massa molecular inferior a 100.000 são usualmente designados de PEG, enquanto os compostos que apresentam massa molecular superior são classificados de POE [88]. Estes polímeros são anfífilicos e solúveis em água, bem como numa ampla variedade de solventes orgânicos (tolueno, etanol, acetona, clorofórmio) [88]. Os PEG de baixa massa molecular ($MM < 1000$) são líquidos viscosos e incolores, enquanto os que apresentam elevada massa molecular ($MM > 1000$) são sólidos, cerosos, brancos e com pontos de ebulição proporcionais à sua massa molecular, até um limite de 67°C [88].

Os PEG foram considerados compostos não tóxicos e encontram-se aprovados pela FDA como excipientes ou como veículos de diferentes formulações farmacêuticas, alimentares e cosméticas. São amplamente utilizados numa variedade de formulações farmacêuticas, incluindo preparações para uso parentérico, cutâneo, oftálmico, oral e rectal. São igualmente utilizados em matrizes poliméricas biodegradáveis usadas em sistemas de libertação controlada [88-89]. Estes compostos penetram facilmente na pele, sendo solúveis em água e, como tal, facilmente removidos da pele. São úteis como bases de pomadas [88]. Os PEG sólidos são, geralmente, empregados em pomadas, sendo a consistência destas corrigida através da adição de PEG líquidos [89-90].

As misturas de PEG podem ser igualmente utilizadas como base de supositórios [90], apresentando muitas vantagens sobre as gorduras: o ponto de fusão do supositório pode ser elevado, de modo a suportar a exposição a climas mais quentes; a libertação da substância activa não é dependente do ponto de fusão; a estabilidade física após armazenamento é consideravelmente superior e os supositórios são facilmente miscíveis com os fluidos rectais. Contudo, os PEG apresentam algumas desvantagens: são substâncias quimicamente mais reactivas do que as gorduras; é necessário um processamento mais cuidadoso de modo a evitar a fractura dos supositórios; a taxa de libertação de fármacos solúveis em água diminui com o aumento da massa molecular do PEG e tendem a ser mais irritantes para as mucosas [90].

As soluções aquosas de PEG podem ser usadas tanto como agentes suspensores como para ajustar a viscosidade e a consistência dos outros veículos da suspensão [75]. Quando usados em conjunto com outros emulsionantes, podem actuar como estabilizantes das emulsões. Os PEG líquidos são usados como solventes miscíveis com a água. No entanto, podem causar endurecimento das cápsulas de gelatina, por exemplo, pela absorção preferencial de humidade.

Equipamento

- Balança semi-analítica Adventurer OHAUS ARC 120, China
- Balança analítica Mettler Toledo AG 204, E.U.A
- Centrífuga Eppendorf 5804, Alemanha
- Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i, Reino Unido
- Estufa Heraeus, Heraeus 150, Alemanha
- Estufa Astell, Reino Unido
- Agitador magnético *Heidolph*, Alemanha
- Potenciómetro Mettler Toledo 320, Estados Unidos
- Banho termostático BM 3 Falc Instruments, Itália
- Liofilizador Telstar Cryodos-80, Espanha
- Câmara de fluxo Laminar Herasafe KSP, Alemanha
- Leitor de Placas Bio-Tek PowerWave X 340 w KC4, E.U.A.

II. Métodos

1. Ensaio de citotoxicidade dos excipientes utilizados

A utilização de testes *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular, constitui o primeiro passo para a avaliação da compatibilidade biológica de uma substância e pode fornecer elementos importantes para a análise da biocompatibilidade dos diferentes materiais. Para ser aprovado no teste de citotoxicidade *in vitro*, um produto não deve ocasionar a morte das células nem afectar as suas funções celulares. Assim sendo, com o uso de técnicas de cultura de células, os testes podem detectar a ocorrência de lise celular, de inibição do crescimento celular e de outros efeitos que possam ser desencadeados nas mesmas. A avaliação da citotoxicidade é, deste modo, essencial na fase inicial de desenvolvimento de formulações farmacêuticas, uma vez que permite determinar, *à priori*, a concentração a ser utilizada bem como fornecer informações quanto aos danos celulares. A citotoxicidade é, normalmente verificada pelos testes de viabilidade celular. A prova do composto de tetrazólio 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximethoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-(2H-tetrazólio) (MTS) é uma das mais utilizadas como indicadora colorimétrica da viabilidade celular, avaliando-se a função mitocondrial da célula [91].

Neste sentido, de modo a avaliar a citotoxicidade dos excipientes a usar usados como base de formulação, foram efectuados ensaios de citotoxicidade para o Witepsol H12, PEG 400 e PEG 4000. Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas diferentes linhas celulares: células epiteliais vaginais humanas (VK2/E6E7), células do colo do útero (HeLa) e células do endométrio humano (HEC-1-A). O modo de preparação das diferentes linhas celulares bem como os protocolos seguidos descrevem-se de seguida.

Para o ensaio de citotoxicidade dos excipientes usados, alíquotas de 0,1mL das diferentes linhas celulares, na concentração de 2×10^5 células/mL, foram depositadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 24h, com posterior troca do meio por outro contendo diluições de 0,001 μ M; 0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M e 100 μ M de cada um dos excipientes: polietilenoglicol 400 (PEG 400), polietilenoglicol 4000 (PEG 4000), Witepsol H12 (WIT H12). Após 24 h de incubação, o meio foi desprezado e acrescentaram-se 200 μ L de MTS a uma concentração de 5 mg/mL. As microplacas foram incubadas por 4 h/37°C. A análise espectrofotométrica foi realizada num leitor

de placas a 490 e 630 nm. A leitura a 490 nm permite obter um branco e deste modo retirar interferentes da leitura a 630 nm. A partir dos valores das densidades ópticas determinou-se a concentração de excipiente capaz de reduzir em 50% as células viáveis. Para o cálculo do valor de concentração citotóxica de 50% recorreu-se ao software JMP® (v. 9.0.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

a) Linhas celulares, células primárias de isolamento e condições de cultura

Células epiteliais vaginais humanas VK2/E6E7 (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram cultivadas em meio livre de soro de queratinócitos (K-SFM) suplementado com 50 mg/mL de extrato de hipófise bovina, 0.1 ng/ml de factor de crescimento epidérmico humano recombinante, penicilina 100 U/mL, 100 mg/mL de estreptomicina, e cloreto de cálcio (concentração final de 0,4 mM), e utilizado em passagens 49-62.

Células do endométrio humano HEC-1-A (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram mantidas em meio 5A McCoy modificado, 10% de Soro Bovino Fetal, penicilina 100 U/mL e 100 mg/mL de estreptomicina, 0.25 µg/mL de anfotericina B, e usado em passagens 4-6.

Células do colo do útero HeLa (ATCC, Manassas, VA, EUA) foram cultivadas em DMEM com Glutamax™-I suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal, penicilina 100 U/mL, 100 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B, e utilizadas em passagens 40-42.

Protocolo das Células Epiteliais Vaginais VK2/E6E7

Meio de Crescimento Completo

O meio de crescimento é designado por Keratinocyte-Serum Free Medium (K-SFM). A este meio é adicionado 0,1 ng/mL de factor recombinante humano de crescimento epitelial (hrEGF), 0,05 mg/mL de extrato de pituitária bovina (BPE) e cloreto de cálcio 44,1 mg/L (concentração final de 0,4 mM). Podem ainda adicionar-se antibióticos de modo a evitar contaminações.

Preparação do Meio de Crescimento

Para preparar o meio de cultura adiciona-se 0,05 µg de hrEGF e 25 mg de BPE (concentração final: 0,1 ng/mL hrEGF e 50 µg/mL BPE) a 500 mL de K-SFM. De seguida adicionam-se 5 mL de penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL) (concentração final: 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina). No final adiciona-se 775 µL de 0,2 M de solução de cloreto de cálcio estéril (concentração final: 0,4 mM).

Meio Crioprotector

1:1 DMEM e Meio Ham's F12 (85%); Soro Bovino Fetal (10%); e DMSO (5%).

Procedimento de descongelação celular

O procedimento consiste, inicialmente, em descongelar o *vial* com agitação suave em banho de água a 37° C. Descontaminam-se de seguida as superfícies com etanol a 70°C. O conteúdo do *vial* é transferido para um tubo de centrífuga com 9,0 mL de meio de cultura, centrifugando-se a 1300 rpm durante 10 minutos. Ressuspende-se o *pellet* em 10 mL de meio e transfere-se para frascos T75. Coloca-se a incubar a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

Procedimento de Subcultura

O primeiro passo do procedimento consiste em remover o meio de cultura e adicionar 3 mL de solução de 0,25% (w/v) Tripsina-0,53 mM EDTA. Coloca-se a incubar a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante cerca de 15 minutos. De seguida neutraliza-se a Tripsina adicionando 8 mL de DMEM contendo 10% de soro bovino fetal e centrifuga-se 10 minutos a 1300 rpm. Ressuspende-se o *pellet* com 4 mL de meio e adiciona-se 1 mL de suspensão celular a 9 mL de meio em frasco T75. Coloca-se a incubar a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O procedimento deve ser repetido a cada 2-3 dias.

Protocolo das Células do Endométrio HEC-1-A

Meio de Crescimento Completo

Usa-se o meio de crescimento McCoy's 5A, adicionado de 10% de SBF.

Preparação do Meio de Crescimento

Inicia-se o procedimento removendo 50 mL F de meio de McCoy's 5A de um frasco de 500 mL e adicionando 50 mL de SBF (concentração final: 10% SBF). De seguida, adiciona-se 5 mL de penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL) (concentração final: 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina);

Meio Crioprotector

Meio de Crescimento Completo (95%) e DMSO (5%).

Procedimento de descongelação celular

O procedimento consiste inicialmente no descongelamento do *vial* com agitação suave em banho de água a 37° C. Descontaminam-se de seguida as superfícies com etanol a 70°C. O conteúdo do *vial* é transferido para um tubo de centrífuga com 9.0 mL de meio de cultura, centrifugando-se a 1300 rpm durante 10 minutos. Ressuspende-se o *pellet* em 10 mL de meio e transfere-se para frascos T75. Coloca-se a incubar a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

Procedimento de Subcultura

O primeiro passo do procedimento consiste em remover o meio de cultura e adicionar 3 mL de solução de 0.25% (w/v) Tripsina-0.53 mM EDTA. Coloca-se a incubar a 37°C em atmosfera com 5% CO₂ durante cerca de 15 minutos. De seguida neutraliza-se a Tripsina adicionando 8 mL de DMEM contendo 10% de soro bovino

fetal e centrifuga-se 10 minutos a 1300 rpm. Ressuspende-se o *pellet* com 4 mL de meio e adiciona-se 1 mL de suspensão celular a 9 mL de meio em frasco T75. Coloca-se a incubar a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. O procedimento deve ser repetido a cada 2-3 dias.

Protocolo das Células Cervicais HeLa

Meio de Crescimento Completo

O meio de crescimento é constituído por DMEM com GlutaMAX™-I, sendo deste modo designado como DMEM, ao qual é adicionado 10 % de SBF.

Preparação do Meio de Crescimento

Inicia-se o procedimento removendo 50 mL F de meio de McCoy's 5A de um frasco de 500 ml e adicionando 50 ml de SBF (concentração final: 10% SBF). De seguida adiciona-se 5 ml de penicilina (10,000 U/ml) e estreptomicina (10,000 µg/ml) (concentração final: 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina);

Meio Crioprotector

Meio de Crescimento Completo (95%) e DMSO (5%).

Procedimento de descongelação celular

O procedimento consiste inicialmente no descongelamento do *vial* com agitação suave em banho de água a 37° C. Descontamina-se de seguida as superfícies com etanol a 70°C. O conteúdo do *vial* é transferido para um tubo de centrífuga com 9.0 ml de meio de cultura, centrifugando-se a 1300 rpm durante 10 minutos. Ressuspende-se o *pellet* em 10 mL de meio e transfere-se para frascos T75. Coloca-se a incubar a 37°C em atmosfera com 5% CO₂.

Procedimento de Subcultura

O primeiro passo do procedimento consiste em remover o meio de cultura e adicionar 3 mL de solução de 0.25% (w/v) Tripsina-0.53 mM EDTA. Coloca-se a incubar a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ durante cerca de 15 minutos. De seguida, neutraliza-se a Tripsina adicionando 8 mL de DMEM contendo 10% de soro

bovino fetal e centrifuga-se 10 minutos a 1300 rpm. Ressuspende-se o *pellet* com 4 mL de meio e adiciona-se 1 mL de suspensão celular a 9 mL de meio em frasco T75. Coloca-se a incubar a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O procedimento deve ser repetido a cada 2-3 dias.

b) Ensaio MTS para as linhas celulares utilizadas

As três linhas celulares utilizadas foram tratadas com concentrações crescentes dos diferentes excipientes utilizados na formulação: 1 x 10⁶ g/mL; 1 x 10⁵ g/mL; 1 x 10⁴ g/mL; 1 x 10³ g/mL; 0,01 g/mL; 0,1 g/mL e 1 g/mL durante 24 horas. Foi realizado de seguida o ensaio de MTS para determinar a viabilidade celular face à exposição a estes excipientes. O procedimento utilizado neste ensaio pode ser resumido do seguinte modo:

Preparação da placa de 96 poços

No início remove-se e descarta-se o meio de cultura sobrenadante do frasco que contém as células confluentes. De seguida, lavam-se as células com 10 mL de PBS pH 7,4. Adicionam-se 3 mL de solução de 0,25% (w/v) Trypsin-0,53 mM EDTA e coloca-se a incubar a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ cerca de 15 minutos. Neutraliza-se a Tripsina adicionando cerca de 8 mL de meio de cultura e centrifuga-se as células a 1300 rpm durante 10 minutos. Descarta-se o sobrenadante e ressuspende-se o *pellet* com 4 mL de meio de cultura. De seguida, determina-se a concentração celular através da contagem em câmara Neubauer. Deve diluir-se a suspensão total de células com meio de cultura de modo a obter uma concentração final de 25 000 células/mL. Adicionam-se então 200 µL de suspensão celular a cada um dos poços da placa e deixa-se incubar a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ cerca de 24 horas.

Ensaio MTS

Numa primeira etapa este ensaio consiste em remover e descartar o meio de cultura, lavando de seguida as células com 200 µL de PBS pH 7,4. Adicionam-se 200 µL de cada dispersão dos diferentes excipientes em meio de cultura e incuba-se 24 h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ (deve ser sempre incluído um controlo positivo - meio de cultura e células - um controlo negativo -Triton X-100 1% - e um controlo de branco -meio de cultura sem células). Remove-se, de seguida, e descarta-se o meio de cultura dos frascos. Lavam-se as células com 200 mL de solução PBS pH 7,4. O

passo seguinte consiste em adicionar 120 µL de reagente MTS e deixar a incubar a placa durante 4 horas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após este tempo mede-se a absorvância a 490 nm.

A Tabela II esquematiza a forma de preparação placas de 96 poços para o ensaio MTS:

Tabela II - Desenho esquemático da preparação da placa de 96 poços para o ensaio MTS.

PEG 400			PEG 4000			WIT H12					
1X10 ⁻⁶	Triton X-100 (1%)	Triton X-100 (1%)	Triton X-100 (1%)								
1X10 ⁻⁵	Triton X-100 (1%)	Triton X-100 (1%)	Triton X-100 (1%)								
1X10 ⁻⁴	Meio de cultura com células	Meio de cultura com células	Meio de cultura com células								
1X10 ⁻³	Meio de cultura com células	Meio de cultura com células	Meio de cultura com células								
1X10 ⁻²											
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1			
1	1	1	1	1	1	1	1	1			
10	10	10	10	10	10	10	10	10	Meio de Cultura (Sem células)	Meio de Cultura (Sem células)	Meio de Cultura (Sem células)

2. Preparação dos óvulos : Pré-Formulação e Formulação

A etapa de pré-formulação consistiu na selecção dos excipientes que iriam ser utilizados como base de formulação. Com efeito, foram feitos óvulos com diferentes excipientes e percentagens de composição de modo a comparar com óvulos já existentes no mercado e assim seleccionar o excipiente, ou mistura de excipientes, e a percentagem dos mesmos que proporcionariam uma textura mais semelhante aos óvulos comercializados. Deste modo, os óvulos comerciais seleccionados como base de comparação foram os óvulos de Nelex ®. Estes óvulos, de acordo com o Índice Nacional Terapêutico, são constituídos por um regenerador tecidual com efeito bactericida, fungicida e tricomonocida, que respeita a flora fisiológica, sendo deste modo indicados para a erosão cervical, colpíte e cervicite, leucorreia cervical e vaginal e para estimulação da neoformação tissular após electrocoagulação. A ausência de óvulos constituídos por probióticos no mercado nacional levou à selecção deste medicamento como referência no ensaio de textura.

Foram assim formulados seis tipos diferentes de óvulos de modo a comparar com a formulação comercial. Com efeito, de acordo com a percentagem de excipiente, foram desenvolvidos óvulos com diferentes excipientes e proporções de excipientes, de acordo com a Tabela III.

Tabela III - Composição (%) das diferentes fórmulas desenvolvidas no estudo de pré-formulação.

Fórmula	Composição (%)
A	100 % Witepsol H12
B	30% PEG 4000 70% PEG 400
C	25% PEG 4000 75% PEG 400
D	50% Witepsol H12 50% Parafina Líquida
E	70% Witepsol H12 30% Parafina Líquida
F	100 % PEG 4000

Após selecção de uma base lipófila e de uma base hidrófila como excipientes a utilizar, procedeu-se ao estudo do processo de liofilização. Para isso, utilizou-se uma cultura de *L. acidophilus* ATCC. As bactérias foram congeladas a -80 °C em tubos

crioprotectores. No momento da sementeira, a cultura dos tubos crioprotectores foi adicionada a 250 mL de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) Broth (Oxoid).

O processo de lavagem das células consistiu na sua centrifugação das células durante 5 minutos a 6000 rpm, 4 °C. Após centrifugação, o *pellet* resultante foi lavado duas vezes com NaCl 0,9 %, durante 5 minutos, a 6000 rpm, a 4°C, sendo ressuspenso a 50% em meio crioprotector (sacarose, 10% (w/v), previamente esterilizado a 115 °C durante 20 minutos). Foram posteriormente produzidos lotes contendo aproximadamente 1×10^9 bactérias viáveis por óvulo, tal como descrito em estudos anteriores [71, 73].

Procedeu-se assim ao desenvolvimento de quatro formulações diferentes de óvulos contendo *L. acidophilus*. A composição destas formulações encontra-se apresentada na Tabela IV.

Tabela IV - Composição das diferentes formulações utilizadas

	Constituintes	Quantidades (%; m/m)	Funções
PEG 50 mg	Polietilenoglicol 400	24,62	Excipiente
	Polietilenoglicol 4000	73,87	Excipiente
	Liofilizado <i>L. Acidophilus</i>	1,51	Substância Activa
PEG 100 mg	Polietilenoglicol 400	24,24	Excipiente
	Polietilenoglicol 4000	72,73	Excipiente
	Liofilizado <i>L. Acidophilus</i>	3,03	Substância Activa
WIT 50 mg	Witepsol H12	98,37	Excipiente
	Liofilizado <i>L. Acidophilus</i>	1,63	Substância Activa
WIT 100 mg	Witepsol H12	96,74	Excipiente
	Liofilizado <i>L. Acidophilus</i>	3,26	Substância Activa

Os óvulos foram preparados pelo método convencional e pelo método de enchimento, tal como descrito a seguir. As substâncias utilizadas como bases para a formulação dos óvulos foram o Witepsol H12 e a mistura de PEG 400 e PEG 4000 na proporção de 25% e 75%, respectivamente.

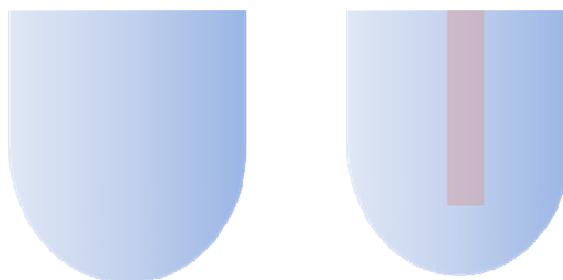
Os métodos de preparação dos dois tipos de óvulos encontram-se esquematizados na Figura 7, podendo ser descritos do seguinte modo:

Método Convencional

Fundir as bases utilizadas numa cápsula em banho de água a cerca de 75-80 °C. Adicionar às bases fundidas, à temperatura de cerca de 40–45 °C, o liofilizado de *L. acidophilus*, com uma agitação suave até que a massa fique homogénea. Verter a mistura para os moldes a uma temperatura próxima da temperatura de solidificação da respectiva base utilizada. De seguida, refrigerar até que a massa solidifique e retirar os óvulos dos moldes.

Método de Enchimento

Fundir as bases utilizadas numa cápsula em banho de água a cerca de 75-80 °C. Verter a mistura para os moldes a uma temperatura próxima da temperatura de solidificação da respectiva base utilizada, colocando uma vareta que permita formar o orifício central no interior do óvulo antes de a massa solidificar. Refrigerar até que a massa solidifique. Retirar a vareta do interior dos óvulos e encher o orifício interno dos óvulos com a massa de liofilizado de *L. acidophilus*. Cobrir o orifício com a massa de base fundida, a uma temperatura de cerca de 40–45 °C. Refrigerar até que a massa solidifique e retirar os óvulos dos moldes.



Método Convencional

Método de Enchimento

Figura 7 - Esquematização dos diferentes tipos de métodos de obtenção de óvulos: método convencional e método de enchimento.

O objectivo deste estudo era, deste modo, preparar óvulos com 1×10^8 UFC *L. acidophilus*. Dada a sua pouca resistência à temperatura foram formulados óvulos contendo 50 e 100 mg de liofilizado, de modo a comparar qual a quantidade ideal a veicular por óvulo, de modo a obter uma viabilidade celular de 1×10^8 UFC / óvulo.

A viabilidade de *L. acidophilus* nos óvulos foi avaliada após 1, 2, e 3 meses, de modo a comparar a sua estabilidade a 22 °C e a 4 °C.

3. Características Organolépticas

De acordo com a F.P. 9.0, os óvulos devem apresentar um aspecto homogéneo à superfície e em profundidade. A superfície deve ser lisa e brilhante, sem fissuras, as quais se devem normalmente a um arrefecimento excessivamente rápido ou ao facto de se retirarem dos moldes prematuramente ou excessivamente tarde. Não deve aparecer qualquer tipo de cristalização da substância activa na superfície.

4. Cálculo do Factor de Deslocamento

Procedeu-se tal como se descreveu no capítulo IV – Óvulos, subcapítulo “Preparação dos óvulos”.

5. Uniformidade de Massa

A variabilidade de enchimento aquando da preparação laboratorial torna impossível que a totalidade dos óvulos apresente massas rigorosamente iguais e são por isso permitidas variações, limites especificados nas farmacopeias.

A F.P. 9.0 apresenta a monografia: “Uniformidade de Massa das Preparações apresentadas em Formas Farmacêuticas Unitárias”. O ensaio consiste em pesar individualmente 20 óvulos retirados ao acaso de um mesmo lote e determinar a sua massa média. Não mais do que 2 dos 20 óvulos poderão diferir da massa média encontrada em percentagem superior à indicada na Tabela V abaixo indicada e em nenhum dos casos a diferença poderá exceder o dobro dessa percentagem.

Tabela V - Desvios limite, em percentagem da massa média, para o ensaio de uniformidade de massa em óvulos (FP 9.0).

Forma farmacêutica	Massa média	Desvios limite em percentagem da massa média
Supositórios e óvulos	sem distinção de massa	5

6. Ensaio de Desagregação

O ensaio de desagregação é um ensaio de fusão ou dispersão, de acordo com o excipiente utilizado na preparação da forma farmacêutica. Realiza-se num banho de água a uma temperatura constante de 36–37 °C. Submerge-se o óvulo no banho e submete-se a uma ligeira agitação. Para realização deste ensaio utiliza-se o equipamento representado nas Figuras 5 e 8, o qual serve igualmente para determinar o tempo de desagregação de supositórios e de outras formas sólidas unidose, rectais ou vaginais.



Figura 8 – Equipamento para estudo da desagregação dos supositórios e óvulos.

7. Avaliação da Textura

As propriedades textuométricas foram determinadas através de um texturómetro *Stable Micro Systems*, modelo TA-XT2i. As amostras testadas foram previamente acondicionadas em suportes de plástico da forma do óvulo. Procedeu-se ao ensaio propriamente dito em modo de compressão e à temperatura ambiente (aproximadamente 20°C).

O ensaio consistiu na penetração de uma sonda cilíndrica na amostra, à velocidade de 3 mm.s⁻¹, até uma profundidade de 2,0 mm. Em seguida, a sonda recuou até à posição inicial acima da superfície da plataforma do texturómetro (90 mm). O ensaio foi executado seis vezes para cada tipo de óvulos testado. A partir dos perfis de textura obtidos foi calculada a força positiva máxima.

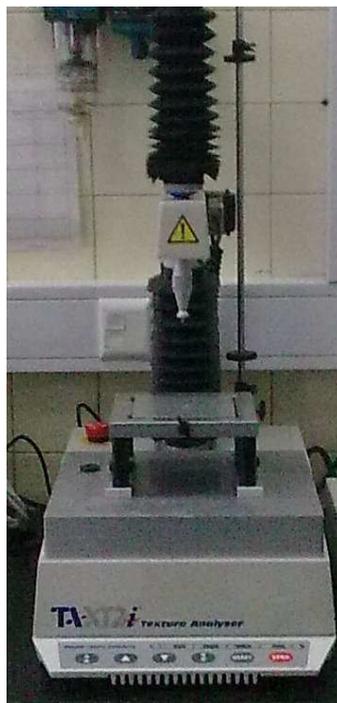


Figura 9 – Texturómetro TA-XT2i utilizado nos ensaios de textuometria.

8. Estudos de Libertação

Os ensaios de libertação servem para conhecer a taxa com que o fármaco se liberta no meio líquido (geralmente aquoso) e a quantidade total de substância activa dissolvida. É assim possível saber se existe alguma interacção excipiente/substância activa que afecte a taxa de dissolução e, portanto, possa influenciar a biodisponibilidade. Para que haja absorção é fundamental que a substância activa esteja no estado molecular, ou seja, dissolvido quando alcançar a região de absorção. Desta forma, facilmente se compreende a importância do estudo da libertação/dissolução. Trata-se de um ensaio muito utilizado como auxiliar no desenvolvimento galénico, na identificação de variáveis críticas à produção, na escolha entre diferentes formulações e na optimização de uma determinada fórmula. Um processo de libertação/dissolução inadequado obriga a redesenhar a composição da formulação para assegurar a dissolução da substância activa num tempo pré-determinado e segundo um objectivo específico. Actualmente, qualquer trabalho de formulação e desenvolvimento de formas sólidas é acompanhado por ensaios de libertação/dissolução.

Os ensaios de libertação realizados no decurso deste trabalho não tiveram como objectivo simular as condições verificadas *in vivo*. Como se trata de estudos de formulação, adoptaram-se condições de ensaio que permitissem comparar as diferentes formulações desenvolvidas. Os ensaios foram realizados numa amostra de 6 óvulos de cada formulação. Para o ensaio recorreu-se a um aparelho de dissolução SOTAX AT7 e utilizou-se o método do cesto. Em cada vaso foi colocado um volume de líquido de dissolução de 500 ml, nomeadamente de Fluido Vaginal Simulado (FVS), a uma temperatura de $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A velocidade de agitação foi de 100 rpm. Ao tempo de recolha 5, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos foi retirada uma alíquota de 1,0 mL, com reposição do mesmo volume de FVS.

Para a realização dos ensaios de libertação das duas formulações de óvulos contendo *L. acidophilus* foi preparado um fluido vaginal simulado (FVS). O FVS é baseado na composição proposta por Owen e Katz [92]. A constituição do referido fluido vaginal simulado modificado está resumida na Tabela VI:

Tabela VI - Composição do FVS utilizado nos ensaios de dissolução.

Componentes	Quantidade (g)
Cloreto de sódio	3,51
Hidróxido de potássio	1,40
Hidróxido de cálcio	0,22
Ácido láctico	2,00
Ácido acético glacial	1,00
Glicerina	0,16
Ureia	0,40
Glucose	5,00
Ácido clorídrico	q.b.p. pH 4,2 ± 0,1
Água purificada	q.b.p. 1L

A composição do FVS é baseada numa extensa revisão da literatura disponível acerca da constituição das secreções da vagina humana [92]. A escolha dos diferentes constituintes teve como objectivo principal realçar propriedades que afectam a sua interacção com contraceptivos tópicos, bem como produtos profilácticos ou terapêuticos [92]. Dentro destas propriedades, o pH e a osmolaridade apresentam um papel dominante nos processos físico-químicos que influenciam a libertação e distribuição dos compostos em estudo [92]. Com efeito, é importante utilizar um FVS com propriedades físicas e químicas que mimetizem o fluido vaginal nativo [92]. Este deve ser constituído pelos diferentes constituintes vaginais, nomeadamente pelas secreções das glândulas de Bartholin e Skenes, células epiteliais exfoliativas, resíduos de urina e fluidos do trato reprodutor superior como muco cervical e fluidos endometriais e tubulares [92]. A determinação da quantidade e composição do fluido vaginal é extremamente difícil, devido à pouca quantidade disponível para recolha e pela possibilidade de diluição da amostra pelo muco cervical, material menstrual, urina e resíduos de sémen [92]. Além disso, é difícil a determinação da acidez do fluido

vaginal devido à sua fácil contaminação com o muco cervical, cujo pH é neutro (pH aproximado de 8,0) e pelo sémen (pH aproximado de 7,5). O objectivo do FVS utilizado é mimetizar o fluido vaginal de uma mulher saudável, não grávida e no período pré-menopausa.

Diferentes estudos sugerem que a produção diária de fluido vaginal é de cerca de 6g/dia (considerando a densidade do fluido vaginal igual à da água), com cerca de 0,5-0,75 g constantemente presentes na vagina [92]. Por exemplo, Owen e Katz, estudaram a actividade contraceptiva de diferentes formulações de geles recorrendo a um volume de 0,75 mL de FVS [92]. De acordo com os mesmos autores, o FVS deve ter um pH aproximado de 4,2, uma vez que se trata de um valor normal para o fluido vaginal em mulheres saudáveis, não menstruadas e no período pré-menopausa.

Os valores de concentração de iões utilizados por estes autores tiveram por base estudos previamente feitos por outros autores, recorrendo a diferentes técnicas. O fluido vaginal apresenta ainda na sua constituição proteínas, hidratos de carbono e compostos orgânicos de baixa massa molecular. Outros compostos presentes em concentrações significativas são o ácido láctico, o ácido acético, o glicerol, a ureia e a glicose [92]. O glicerol é o responsável pela qualidade de lubrificação das secreções vaginais. O glicogénio encontra-se presente em elevadas quantidades no epitélio vaginal e é quebrado por processos enzimáticos. A glucose resultante é depois metabolizada a ácido láctico, responsável pela acidez do fluido vaginal.

O fluido vaginal é, essencialmente, ácido devido ao metabolismo anaeróbio do glicogénio vaginal a produtos ácidos, predominantemente ácido láctico e ácido acético [48]. Deste modo, no FVS desenvolvido por Owen e Katz [92] a presença dos diferentes ácidos orgânicos é modelada através da inclusão destes dois ácidos presentes em maiores quantidades, o ácido láctico e o ácido acético, enquanto o teor proteico é mimetizado recorrendo apenas a uma proteína, a albumina. No FVS utilizado para a realização dos estudos de libertação não se recorreu à albumina, uma vez que a proteína em causa era um elemento dispendioso e que não permitiria em simultâneo a observação do tempo e das características de dissolução/ desagregação das diferentes formulações de óvulos em estudo.

Com efeito, utilizou-se um equipamento de dissolução, com cesto de dissolução rotativo a 100 ± 1 rpm à temperatura de 37 ± 0.5 °C (Figura 9). Como meio de dissolução foram utilizados 500 mL de FVS, de acordo com o que foi previamente mencionado.



Figura 10 – Equipamento de dissolução modelo SOTAX AT7 utilizado nos ensaios de liberação.

Cada óvulo foi colocado num cesto no interior do vaso contendo o fluido vaginal. A intervalos apropriados (5, 10, 20, 30, 45 e 60 min.), foi retirado 1.0 mL de amostra e foi adicionado igual volume à solução de FVS à temperatura adequada, de modo a que o volume fosse constante. A quantidade de *L. acidophilus* foi determinada pelo método de contagem em placa, usando meio de MRS agar, e incubada a 37 °C durante 48 horas.

9. Ensaio de Estabilidade

Pode definir-se estabilidade de uma preparação farmacêutica como o grau de resistência da mesma às alterações químicas e físicas. A eficácia de uma preparação farmacêutica ou cosmética deve permanecer constante (ou alterar-se apenas dentro dos limites legais), até à data de expiração da validade. Quando se prepara uma nova formulação devem ser efectuados os controlos indicados, especialmente das características físicas da forma farmacêutica e da liberação *in vitro* da substância activa ou fármacos incorporados. Para isso, armazena-se um lote de óvulos à temperatura ambiente, considerando-se como tal 20 ± 3 °C e outro lote a 4 °C. O armazenamento a diferentes temperaturas permite saber a temperatura a que os óvulos mantêm as suas características mais eficazmente, bem como os *Lactobacillus* mantêm maior viabilidade.

Efectuam-se os ensaios ao fim de um mês, dois meses e três meses, procedendo à avaliação das alterações das características organolépticas, textura, desagregação e estabilidade dos probióticos e características de cedência.

10. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi efectuada com o auxílio do programa informático SPSS® 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A avaliação de eventuais diferenças estatísticas entre os valores médios dos diferentes óvulos, obtidos para cada um dos parâmetros, foi realizada através da análise univariada da variância (*One-Way ANOVA*), sendo as médias de cada grupo comparadas de acordo com o teste *Post-hoc* de *Tukey* (*Tukey's honestly significant difference test*). Valores de $p < 0,05$ indicam uma diferença significativa dos valores médios dos diferentes óvulos.

1. Pré - Formulação e Formulação

Foram estudadas seis formulações iniciais para determinar as duas melhores, lipófila ou hidrófila, para veicular *L. acidophilus*. As formulações foram comparadas com uma formulação comercial, Nelex®, de modo a avaliar as que apresentariam uma consistência mais semelhante à formulação comercial, bem como uma força de penetração que não fosse consideravelmente baixa ou muito elevada.

Deste modo, foram formulados seis tipos diferentes de óvulos. A avaliação da força de penetração encontra-se representada na Figura 10.

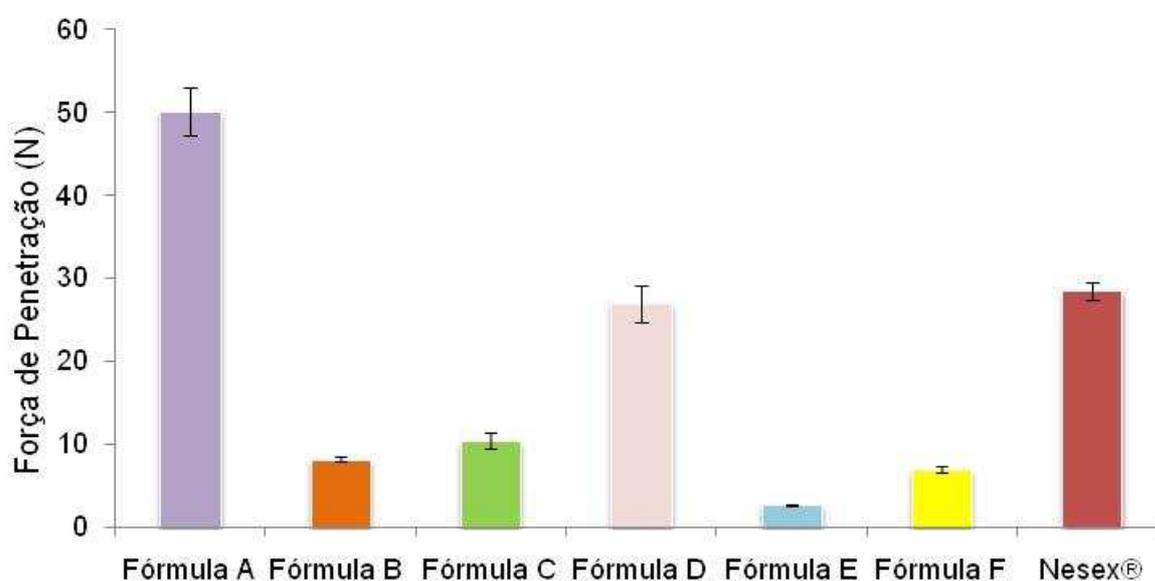


Figura 13 - Valores médios da força de penetração das formulações avaliadas - Fórmula A: 100% PEG 4000; Fórmula B: 30% PEG 4000 + 70% PEG 400; Fórmula C: 25% PEG 4000 + 75% PEG 400; Fórmula D: 100% Witepsol H 12; Fórmula E: 50% Witepsol H12 + 50% Parafina; Fórmula F: 70% Witepsol H12 + 30 % Parafina

Os resultados permitem verificar que a Fórmula C e D são as que mais se aproximavam da dureza da fórmula comercial, havendo diferenças significativas entre esta e as outras fórmulas propostas.

A Tabela VII sumaria os Valores médios e os desvios padrão da força de penetração dos diferentes tipos de óvulos pré-formulados.

Tabela VII - Valores médios e desvios padrão da força de penetração (N) dos diferentes tipos de óvulos pré-formulados.

	Fórmula A	Fórmula B	Fórmula C	Fórmula D	Fórmula E	Fórmula F	Nesex®
Média	50,22	8,20	10,38	26,92	2,66	7,02	28,44
DP	2,89	0,30	0,96	2,20	0,13	0,35	1,09

A avaliação dos valores médios de dureza permitiu a selecção da Fórmula C e da Fórmula D como as fórmulas base a utilizar para a incorporação do liofilizado. A escolha destas duas fórmulas teve por base o facto de se tratarem de bases hidrófilas e lipófilas, respectivamente, com a dureza mais aproximada dos óvulos comerciais.

2. Ensaio de Citotoxicidade dos Excipientes Seleccionados

Após selecção das duas formulações a utilizar, procedeu-se ao estudo da citotoxicidade dos excipientes que as constituíam. Os resultados obtidos com o ensaio de MTS podem ser resumidos nas Figuras 11, 12 e 13, de acordo com as diferentes linhas celulares utilizadas.

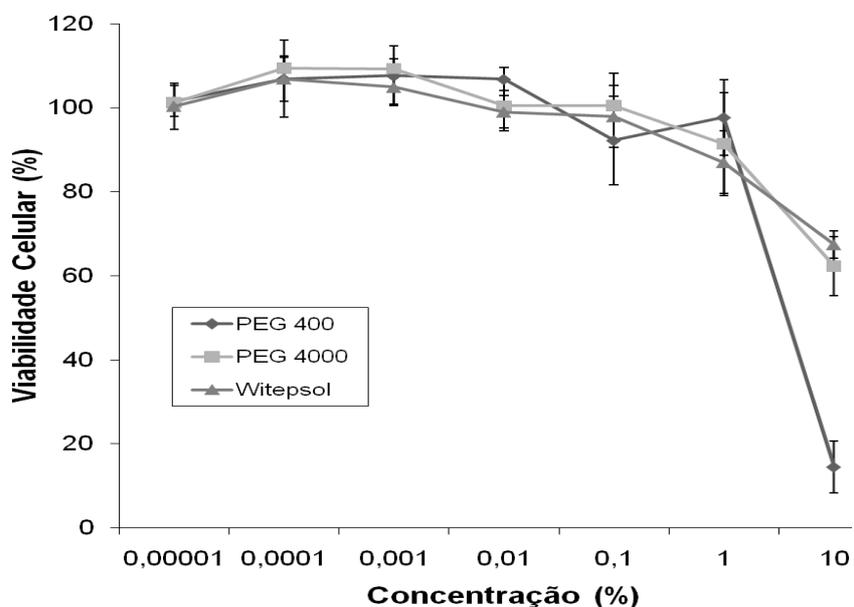


Figura 11 - Ensaio de Citotoxicidade (MTS) para verificação da viabilidade das células do Endométrio HEC-1-A quando incubadas com os excipientes PEG 400, PEG 4000 e Witepsol H12.

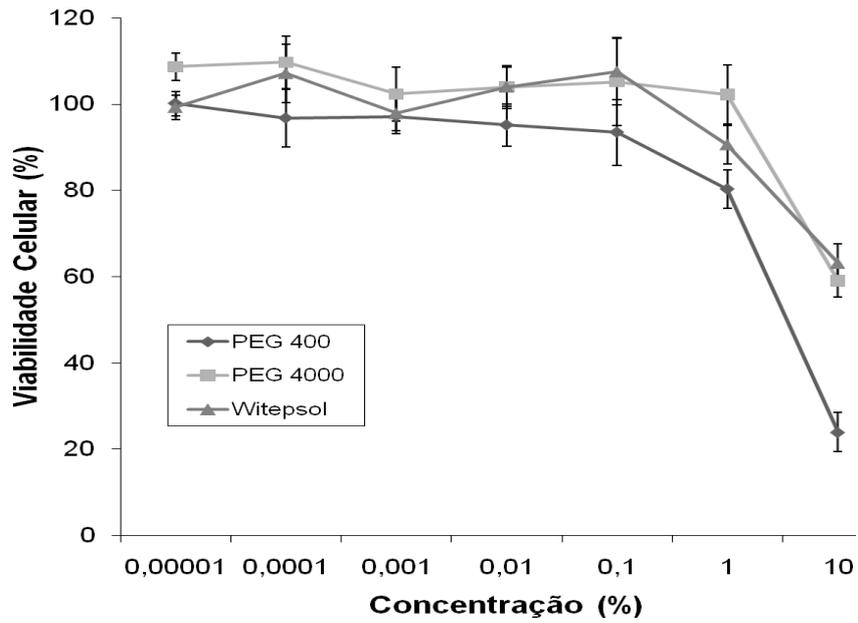


Figura 12 - Ensaio de Citotoxicidade (MTS) para verificação da viabilidade das células Epiteliais Vaginais VK2/E6E7 quando incubadas com os excipientes PEG 400, PEG 4000 e Witepsol H12.

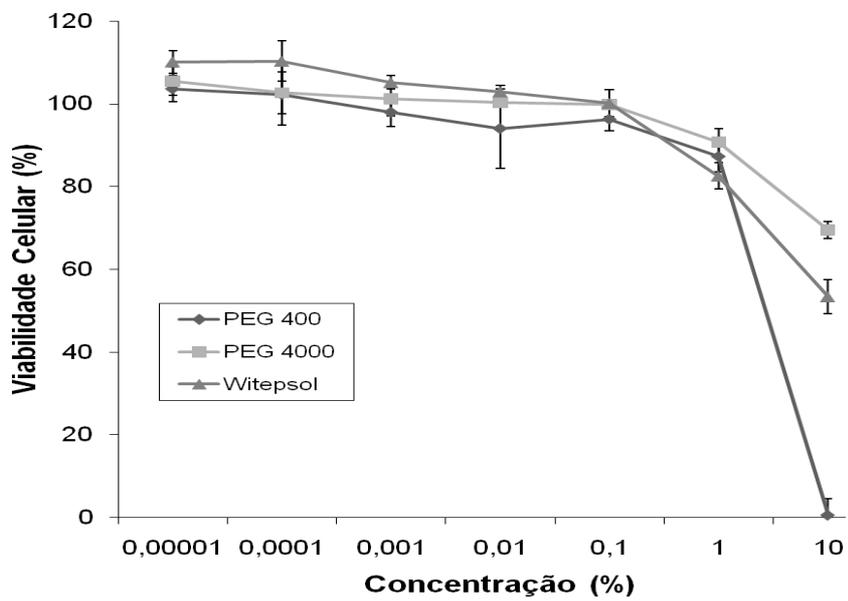


Figura 13 - Ensaio de Citotoxicidade (MTS) para verificação da viabilidade das células cervicais HeLa quando incubadas com os excipientes PEG 400, PEG 4000 e Witepsol H12.

O cálculo da Concentração Citotóxica 50 (CC50) foi efectuado através do software JMP® (v. 9.0.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), permitindo concluir os seguintes valores:

Tabela VIII - Valores de CC50 (em % m/v) para o PEG 400, PEG 4000 e Witepsol H12 obtidos através do ensaio MTS nas diferentes linhas celulares utilizadas (NQ, não quantificável).

Média	CC50 (%)								
	Média			Desvio padrão			CV%		
	PEG 400	PEG 4000	Witepsol	PEG 400	PEG 4000	Witepsol	PEG 400	PEG 4000	Witepsol
VK2/E6E7	3,5	> 10	> 10	1,9	NQ	NQ	54,7	NQ	NQ
HEC-1-A	5,1	> 10	> 10	1,7	NQ	NQ	33,1	NQ	NQ
HeLa	1,9	> 10	> 10	0,1	NQ	NQ	7,6	NQ	NQ

A análise dos dados resultantes do ensaio de MTS para avaliação da citotoxicidade dos compostos utilizados como excipientes no desenvolvimento deste trabalho permitiu, de um modo geral, concluir acerca da sua baixa toxicidade. Com efeito, a CC50 do PEG 4000 bem como do Witepsol H12 em todas as linhas celulares é superior a 100 000 µg/ mL, enquanto a do PEG 400 varia de linha celular para linha celular, sendo de 35 000 µg/ mL nas células VK2/E6E7, de 51 000 µg/ mL nas células HEC-1-A e de 19 000 µg/ mL nas células HeLa, sendo por isso significativamente inferior em relação aos dois primeiros excipientes ($p < 0,05$).

Estes resultados estão concordantes com o que Gali *et al.*[93] verificaram para o PEG 400 num trabalho desenvolvido recentemente. Neste estudo, a segurança de excipientes pertencentes a diferentes classes (como cosolventes, tensoactivos ou ciclodextrinas) foi avaliada recorrendo a ensaios de citotoxicidade usando três linhas celulares distintas - HEC-1A, CaSki e SiHa - e explantes cervicais [93]. Os autores concluíram que o PEG 400 em concentrações na ordem de 20% se apresentava tóxico, diminuindo a viabilidade e/ou alterando a morfologia celular [93]. Por outro lado, um estudo realizado por Chiba *et al.*, tentou provar a baixa toxicidade do PEG 400, cujo CC50 foi de 10 000 mg/mL [94].

Pode-se assim concluir que o PEG 400 apresenta um perfil de composto com baixa toxicidade quando utilizado em concentrações normais.

Com efeito, o PEG 4000 e o WIT H12 não apresentaram efeitos tóxicos nas três linhas celulares utilizadas, quando utilizados na concentração de 10%. Pelo contrário, o PEG 400 apresenta uma CC50 de 3,5, 5,1 e 1,9, respectivamente, para as células VK2/E6E7, HEC-1-A e HeLa.

3. Características organolépticas dos óvulos preparados

As características organolépticas de uma formulação farmacêutica determinam muitas vezes a sua aceitação por parte do consumidor final. A caracterização organoléptica das formulações desenvolvidas encontra-se sumariada na Tabela IX. Na base da classificação encontra-se o aspecto apresentado pelas diferentes formulações bem como a cor, textura, uniformidade, superfície e presença/ausência de fissuras. Nas Figuras 14 a 19 são apresentadas imagens dos diferentes óvulos formulados:



Figura 14 - Óvulo sem probióticos.



Figura 15 - Óvulo obtido pelo método de fusão com *L. acidophilus* 50 mg.



Figura 16 - Óvulo obtido pelo método de fusão com *L. acidophilus* 100 mg.



Figura 17 - Óvulo obtido pelo método de enchimento com *L. acidophilus* 50 mg.



Figura 18 - Óvulo obtido pelo método de enchimento com *L. acidophilus* 100 mg.



Figura 19 - Interior dos óvulos obtidos pelo método de enchimento.

Os resultados obtidos foram usados como ponto de comparação ao longo do ensaio de estabilidade.

Tabela IX - Características organolépticas das diferentes formulações desenvolvidas.

	Óvulos Sem Probióticos		Método Convencional				Método de Enchimento			
	PEG	WIT	PEG 50 mg	PEG 100 mg	WIT 50 mg	WIT 100 mg	PEG 50 mg	PEG 100 mg	WIT 50 mg	WIT 100 mg
Aspecto	Homogéneo na superfície e em profundidade									
Superfície	Lisa e Opaca	Lisa e Brilhante	Lisa e Opaca	Lisa e Opaca	Lisa e Brilhante	Lisa e Brilhante	Lisa e Opaca	Lisa e Opaca	Lisa e Brilhante	Lisa e Brilhante
Textura	Suave									
Cor	Branco	Branco	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Amarelo	Branco	Branco	Branco	Branco
Fissuras	Ausência									

4. Determinação do Factor de Deslocamento

A determinação do factor de deslocamento para a substância utilizada como substância activa (*L. acidophilus*) permite concluir pela necessidade de consideração do mesmo no cálculo da massa de excipiente a utilizar em cada óvulo.

Tabela X - Cálculo do factor de deslocamento das duas formulações base utilizadas. m - massa do óvulo sem substância activa; B - massa óvulo com substância activa; B-p – substância activa adicionada; FC - Factor Deslocamento

	m (massa óvulo sem SA)	B (massa óvulo com SA)	B-p (SA adicionado)	P	Factor Deslocamento	Média
Witepsol	2,55	2,70	0,12	2,58	0,94	0,92
	2,52	2,73	0,15	2,58	0,92	
	2,56	2,78	0,20	2,58	0,91	
	2,51	2,72	0,15	2,58	0,92	
PEG	3,20	3,19	0,06	3,12	1,01	0,97
	3,18	3,28	0,16	3,12	0,97	
	3,19	3,19	0,07	3,12	1,00	
	3,06	3,39	0,26	3,12	0,90	

Com efeito, o valor obtido foi de 0,92 e 0,97, respectivamente, no caso dos excipientes Witepsol H12 ou a mistura de PEG 400 e PEG 4000. Deste modo, de acordo com Nogueira Prista *et al.* [75] sendo um valor diferente da unidade, deve ser considerado para o cálculo da massa de excipiente a utilizar.

5. Uniformidade de Massa

Para a avaliação da uniformidade de massa procedeu-se segundo a monografia da F.P. 9.0, anteriormente descrita.

Método Convencional

Óvulos constituídos por Witepsol

Os resultados do ensaio de uniformidade de massa estão representados na Figura 20 e Tabela XI. A análise dos resultados para os óvulos constituídos por Witepsol, obtidos pelo método convencional (50 e 100 mg) permitiu concluir que estes se mantiveram dentro dos limites estipulados na FP 9.0.

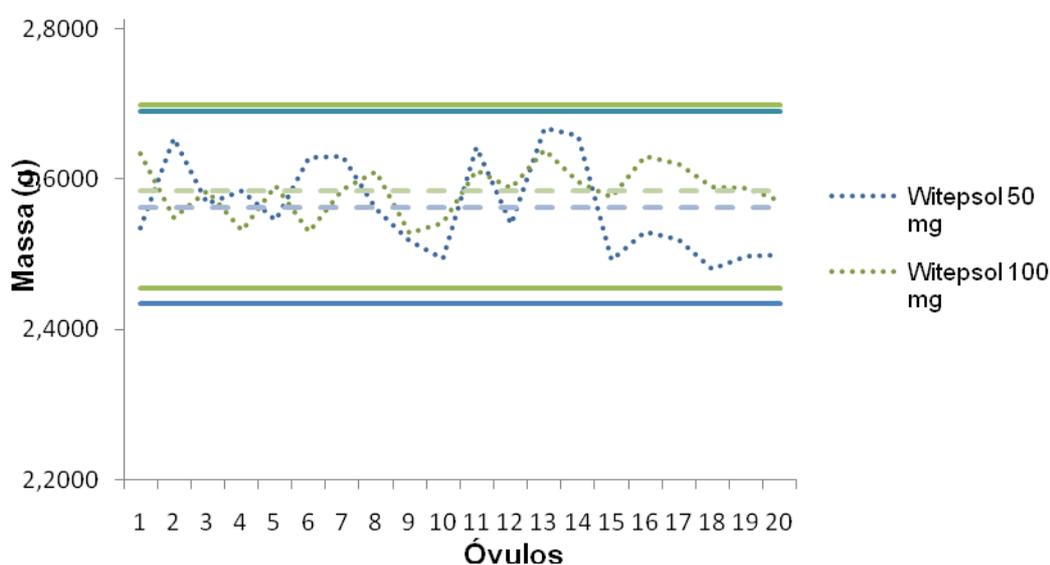


Figura 20 – Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com Witepsol (50 e 100 mg) – método convencional.

Tabela XI - Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com Witepsol (50 e 100 mg)

Fórmula	Média (mg)	Máximo	Mínimo	DP	CV (%)
WIT 50 mg	2,56	2,67	2,48	0,06	2,45
WIT 100 mg	2,58	2,64	2,53	0,03	1,31

Óvulos constituídos por PEG

A análise dos resultados obtidos no ensaio de uniformidade de massa para os óvulos constituídos por PEG (50 e 100 mg) através do método convencional demonstraram que se mantiveram dentro dos limites estipulados na FP 9.0 (variação de massa de $\pm 5\%$ do valor médio) – Figura 21 E Tabela XII.

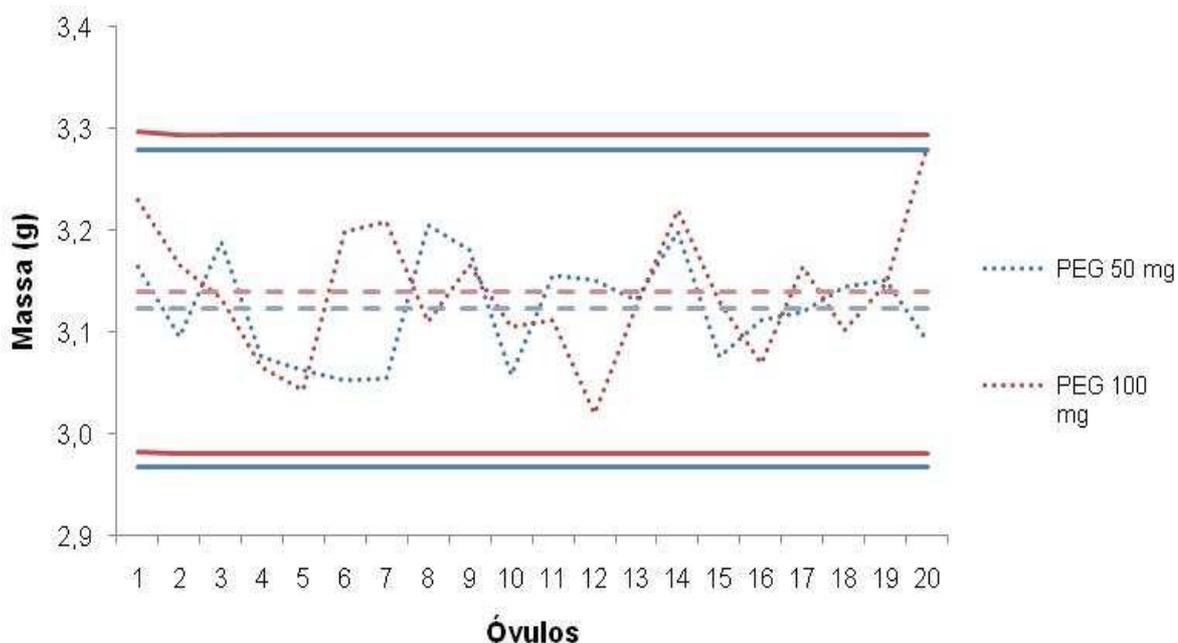


Figura 21 – Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com PEG (50 e 100 mg) - método convencional.

Tabela XII - Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com PEG (50 e 100 mg) – método convencional

Fórmula	Média (mg)	Máximo	Mínimo	DP	CV (%)
PEG 50 mg	3,12	3,20	3,05	0,05	1,59
PEG 100 mg	3,14	3,28	3,02	0,06	2,07

Método de Enchimento

Óvulos constituídos por Witepsol

A análise dos resultados obtidos no ensaio de uniformidade de massa para os óvulos constituídos por Witepsol H12 (50 e 100 mg), através do método de enchimento demonstraram que estes se mantiveram dentro dos limites estipulados na FP 9.0 (variação de massa de $\pm 5\%$ do valor médio).

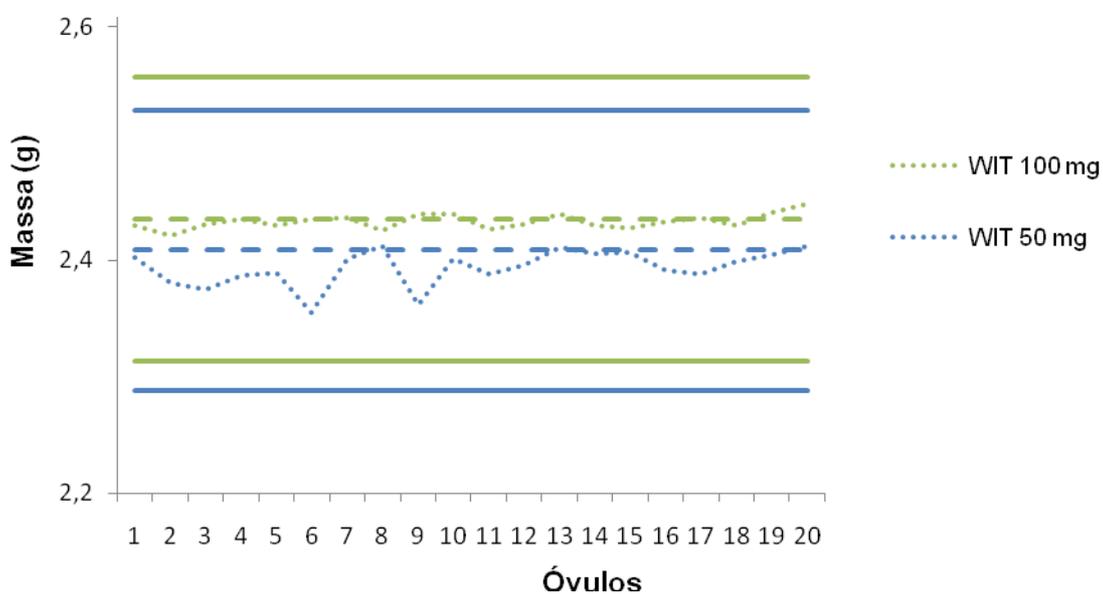


Figura 22 – Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com WIT (50 e 100 mg) - método de enchimento.

Tabela XIII- Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com WIT (50 e 100 mg) – método de enchimento

Fórmula	Média (mg)	Máximo	Mínimo	DP	CV (%)
WIT 50 mg	2,39	2,41	2,35	0,02	0,67
WIT 100 mg	2,43	2,45	2,42	0,01	0,27

Óvulos constituídos por PEG

Relativamente ao método de enchimento, a análise dos resultados obtidos neste ensaio demonstrou que para a massa dos óvulos constituídos por PEG (50 e 100 mg) foram ultrapassados os limites estipulados na Farmacopeia Portuguesa 9.0 (variação de massa de $\pm 5\%$ do valor médio). No entanto, não mais do que 2 dos 20 óvulos apresentavam massas que diferiam do valor médio (Tabela XIV), tal como refere a monografia da F.P 9.0.

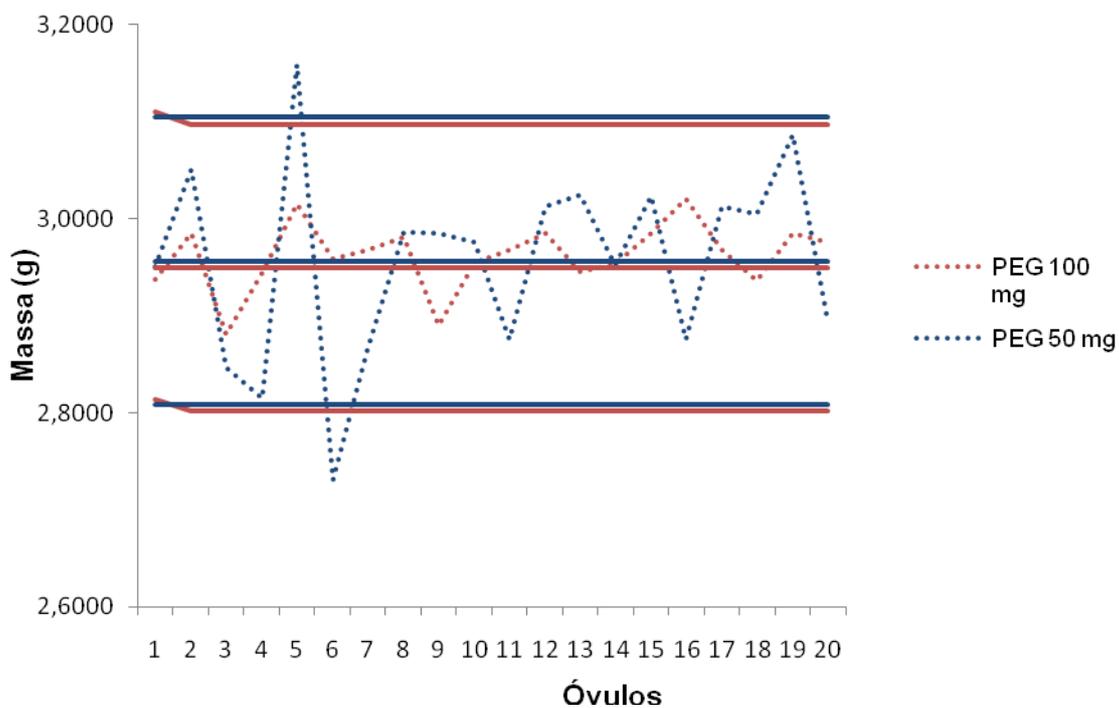


Figura 23 – Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com PEG (50 e 100 mg) - método de enchimento

Tabela XIV - Ensaio de uniformidade de massa dos óvulos com PEG (50 e 100 mg) – método de enchimento

Fórmula	Média (mg)	Máximo	Mínimo	DP	CV (%)
PEG 50 mg	2,96	3,1593	2,8153	0,10	0,03
PEG 100 mg	2,95	3,0210	2,9356	0,08	0,03

De acordo com os resultados podemos considerar satisfatório este ensaio.

6. Avaliação da Textura

A textura corresponde às características físicas percebidas pelo tacto, que estão relacionadas com a deformação provocada por uma força e que são medidas em termos de força, distância e tempo.

No desenvolvimento de preparações para aplicação cutânea é necessário ter em consideração certos atributos que contribuem para a aceitação do produto e melhoria da sua eficácia. Esses atributos incluem as propriedades mecânicas como a adesividade e a espalmabilidade. No caso dos produtos farmacêuticos e cosméticos, na análise da textura é, geralmente, realizado o teste de penetração, em que a sonda penetra a amostra a uma determinada velocidade e a uma distância pré-definida, retornando depois para uma posição a uma distância pré-determinada. Na Figura 24 está representado um gráfico tipo, força *versus* tempo, cuja força máxima (F_{\max}) corresponde à firmeza e a área negativa (A) corresponde à adesividade do produto analisado, operando nas seguintes condições:

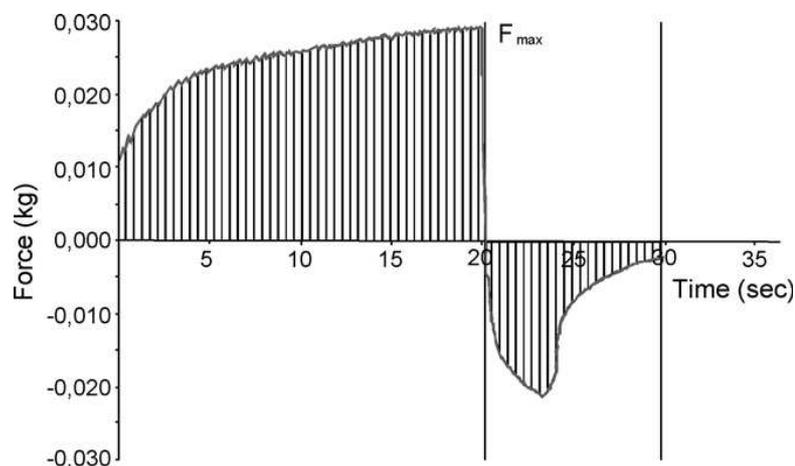


Figura 24 - Representação gráfica da força versus tempo, cuja força máxima (F_{máx}) corresponde à firmeza e a área negativa corresponde à adesividade do produto analisado (figura adaptada de [95]).

No ensaio realizado foram usadas como condições o modo “return to start”, com recurso à sonda cilíndrica de 2 mm (P 2.0) e uma distância de penetração de 2 mm. A velocidade teste foi de 3 mm/s, com uma *trigger force* de 0,049 N.

Com efeito, a Figura 25 representa graficamente a força necessária para penetrar 2 mm em cada óvulo, de acordo com o método de preparação e a base de excipiente utilizada. Na Tabela XIV estão resumidos os valores.

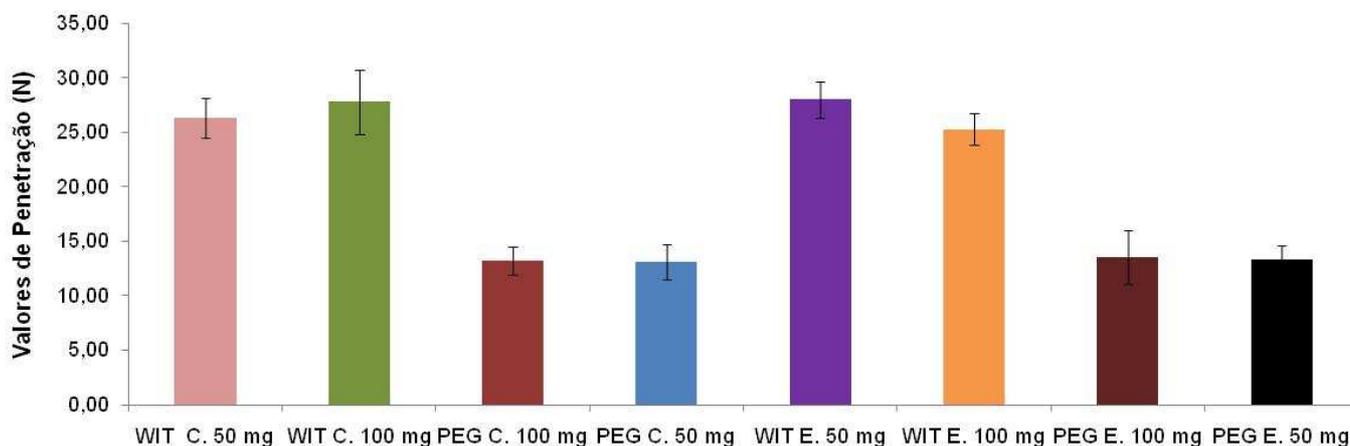


Figura 25 - Valores médios da força de penetração das formulações avaliadas – WIT C. 50 mg: Witepsol método clássico 50 mg; WIT C. 100 mg: Witepsol método clássico 100 mg; PEG C. 50 mg: Polietilenoglicol método clássico 50 mg; PEG C. 10 mg: Polietilenoglicol método clássico 100 mg; WIT E. 50 mg: Witepsol método enchimento 50 mg; WIT E. 100 mg: Witepsol método enchimento 100 mg; PEG E. 50 mg: Polietilenoglicol método enchimento 50 mg; PEG E. 100 mg: Polietilenoglicol método enchimento 100 mg;

Os resultados permitiram verificar que os óvulos de Witepsol obtidos pelo método convencional ou pelo método de enchimento, não apresentavam diferenças estatisticamente significativas, o mesmo sucedendo no caso dos óvulos de PEG obtidos pelo método convencional ou pelo método de enchimento. Contudo, quando

comparados os óvulos de Witepsol H12 e de PEG, existem diferenças estatisticamente significativas nos valores de força de penetração entre as fórmulas propostas ($p < 0,05$).

A Tabela XV resume os valores obtidos para os diferentes óvulos.

Tabela XV - Valores médios e desvios padrão da força de penetração (N) dos diferentes tipos de óvulos preparados.

	Método Convencional				Método de Enchimento			
	WIT 50 mg	WIT 100 mg	PEG 100 mg	PEG 50 mg	WIT 50 mg	WIT 100 mg	PEG 100 mg	PEG 50 mg
Média	26,33	27,79	13,23	13,15	28,00	25,29	13,52	13,36
DP	1,81	2,94	1,27	1,60	1,64	1,42	2,48	1,25

Quanto maior for o valor associado à força de penetração menor será a porosidade que o óvulo vai apresentar e, conseqüentemente, mais dificuldade terá o líquido de dissolução em penetrar na matriz e mais lenta será a libertação da substância activa. Os óvulos cujo excipiente é o Witepsol H12 apresentam uma maior consistência e, portanto, à partida, o líquido de dissolução terá maior dificuldade em penetrar a matriz. Isto verifica-se quer para os óvulos cuja metodologia de preparação foi o método convencional quer para os óvulos preparados pelo método de enchimento.

Kale *et al.* [70] desenvolveram e analisaram três formulações diferentes de óvulos contendo *L. sporogenes*. Os óvulos foram preparados PELO método clássico, sendo desenvolvidos óvulos cuja base de excipiente era a manteiga de cacau (Formulação I), gelatina glicerinada (Formulação II) e PEG 1000 (Formulação III) [70]. As formulações foram caracterizadas sob o ponto de vista das suas propriedades físicas, bem como da viabilidade bacteriana. No que se refere às características físicas a Formulação II, cuja base era gelatina glicerinada foi a mais satisfatória [70]. No ensaio de penetração, a força de penetração para a Formulações II e III variou entre, respectivamente, 1,3 – 1,4 kg/cm² e 1,9 – 2,1 kg/cm² [70]. A formulação com manteiga de cacau (Formulação I) não pode ser avaliada sob o ponto de vista da força de penetração, uma vez que o seu ponto de fusão é de cerca de 32°C [70]. Com efeito, os óvulos cuja base é o PEG 1000 demonstraram ser mais resistentes à penetração do que os óvulos cuja base é a gelatina glicerinada, uma vez que o PEG é isento de água e mantém-se sólido à temperatura de 37-40°C [70]. Estes resultados encontram-se, assim, em concordância com os obtidos nos ensaios efectuados. De facto, os óvulos cuja base foi uma mistura

de PEG apresentaram valores no ensaio de penetração na ordem dos 13 N (de acordo com a Tabela XIV), enquanto os óvulos à base de Witepsol, eram substancialmente mais resistentes à penetração, com valores que oscilaram entre 25-28 N. Por outro lado, a análise dos resultados permite verificar que não há uma diferença significativa entre os óvulos formulados pelo método clássico e os óvulos em que foi utilizado o método de enchimento. Este dado permite concluir que a massa de liofilizado se encontra deste modo bem colocada no interior do óvulo, quando formulado pelo método de enchimento, não estando assim à superfície, nem se verificando uma zona oca no interior.

7. Ensaio de Desagregação

De acordo com a F.P 9.0 os óvulos satisfazem ao ensaio de desagregação dos supositórios e dos óvulos [77].

O tempo de desagregação das diferentes formulações encontra-se na Tabela XVI:

Tabela XVI - Tempo de desagregação, em minutos, das diferentes formulações

Óvulos sem Probióticos	Método Convencional				Método de Enchimento					
	PEG	WIT	PEG 50 mg	WIT 50 mg	PEG 100 mg	WIT 100 mg	PEG 50 mg	WIT 50 mg	PEG 100 mg	WIT 100 mg
Média	20,77	6,72	19,40	6,74	19,60	6,58	16,22	6,74	20,79	6,97
Desvio Padrão	0,43	0,46	0,80	0,54	0,72	0,88	0,19	0,38	0,32	0,36
Máximo	21,26	7,27	20,34	7,35	20,20	7,10	16,45	7,15	21,15	7,35
Mínimo	20,31	6,18	18,45	6,01	18,27	5,18	16,02	6,32	20,42	6,45

Os resultados permitiram verificar que os óvulos de Witepsol obtidos pelo método convencional ou pelo método de enchimento, não apresentavam diferenças significativas entre si no que diz respeito ao tempo de desagregação, sucede o mesmo no caso dos óvulos de PEG obtidos por ambos os métodos. Contudo, quando

comparados os dois grupos de óvulos, Witepsol H12 e de PEG, verificam-se diferenças significativas entre as fórmulas propostas ($p < 0,05$).

De acordo com o descrito na F.P. 9.0 todas as formulações obedecem aos requisitos mínimos. Com efeito, após 60 minutos, todos os óvulos se devem encontrar desagregados [77]. Este ensaio demonstra, deste modo, que as formulações estão de acordo com a F.P. 9.0.

Com efeito, Kaewnopparat *et al.* formularam e avaliaram as características de óvulos contendo *L. paracasei* HL32 no momento de fabrico, bem como ao longo de três meses. Os excipientes usados como base de formulação foram o Witepsol H15 e uma mistura de PEG, nomeadamente PEG 400 e PEG 4000, na proporção de 1:1. Para esta formulação utilizaram dois tipos de metodologias diferentes: através de um método convencional de fusão e através de um método de enchimento. Os resultados obtidos no ensaio de desagregação permitiram verificar que o tempo de desagregação para os óvulos fabricados pelo método convencional para os óvulos constituídos por Witepsol H15 e pela mistura de PEG foi, respectivamente, de $13,4 \pm 1,0$ e $15,3 \pm 1,1$ minutos. No que concerne aos óvulos cuja preparação foi realizada através do método de enchimento, o tempo de desagregação foi de $13,7 \pm 1,1$ e $17,4 \pm 1,3$, respectivamente para os óvulos formulados com Witepsol H15 e mistura de PEG.

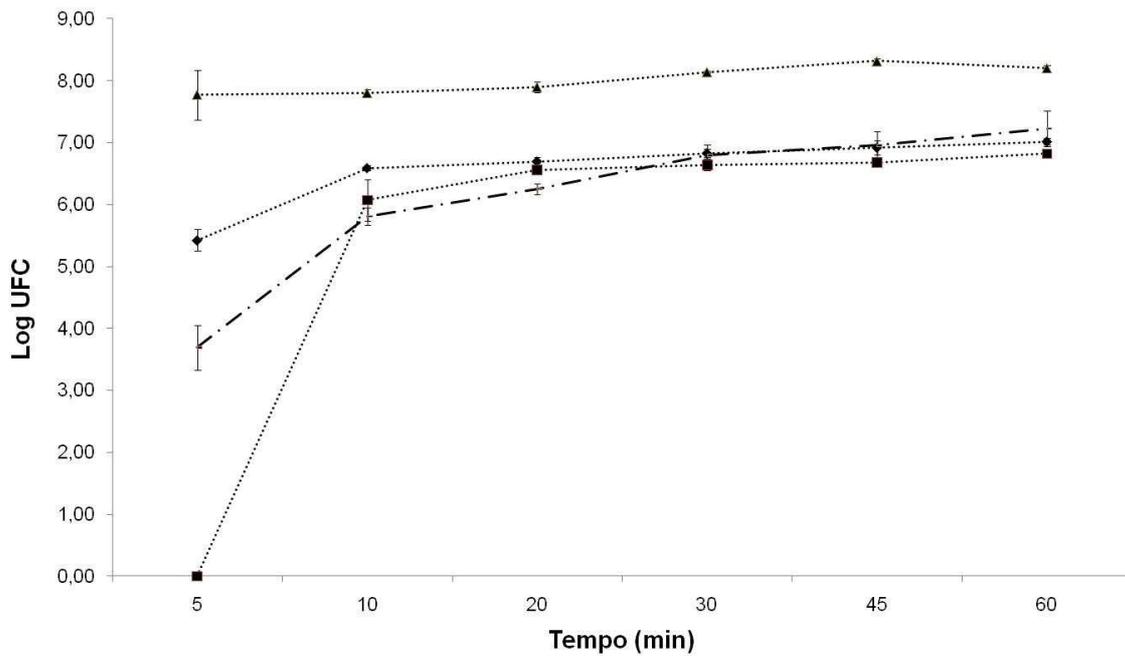
Deste modo, podemos concluir que para os óvulos desenvolvidos neste trabalho, o tempo de desagregação é superior no caso das formulações cujo excipiente é a mistura de PEG, comparativamente com as formulações cujo excipiente é o Witepsol H12. Não há diferenças significativas no tempo de desagregação entre os óvulos sem probióticos e os óvulos com *L. acidophilus* em diferentes quantidades (50 e 100 mg). Um maior tempo de desagregação implica uma libertação mais lenta das bactérias e, portanto, uma menor competição entre elas, permitindo um crescimento mais estável e contínuo.

8. Ensaio de Libertação *in vitro*

O estudo dos perfis de libertação dos diferentes tipos de óvulos formulados permitem inferir acerca da viabilidade de *L. acidophilus* ao longo do tempo. O ensaio de libertação *in vitro* serve, deste modo, para conhecer a taxa com que os probióticos veiculados se libertam no FVS, bem como a quantidade total de substância activa disponível. É assim possível inferir se existe alguma interacção entre os componentes

da formulação que afecte a taxa de dissolução/desagregação e, portanto, possa influenciar a biodisponibilidade dos probióticos. Trata-se de um ensaio de extrema importância no desenvolvimento galénico, bem como na identificação de variáveis críticas à produção, na escolha entre diferentes formulações e na optimização de uma determinada fórmula. Um processo de libertação inadequado obriga a redesenhar a composição da formulação para assegurar a dissolução/desagregação da substância activa num tempo pré-determinado e segundo um objectivo específico. Na realidade, actualmente, qualquer trabalho de formulação e desenvolvimento de formas sólidas é acompanhado por ensaios de libertação/dissolução.

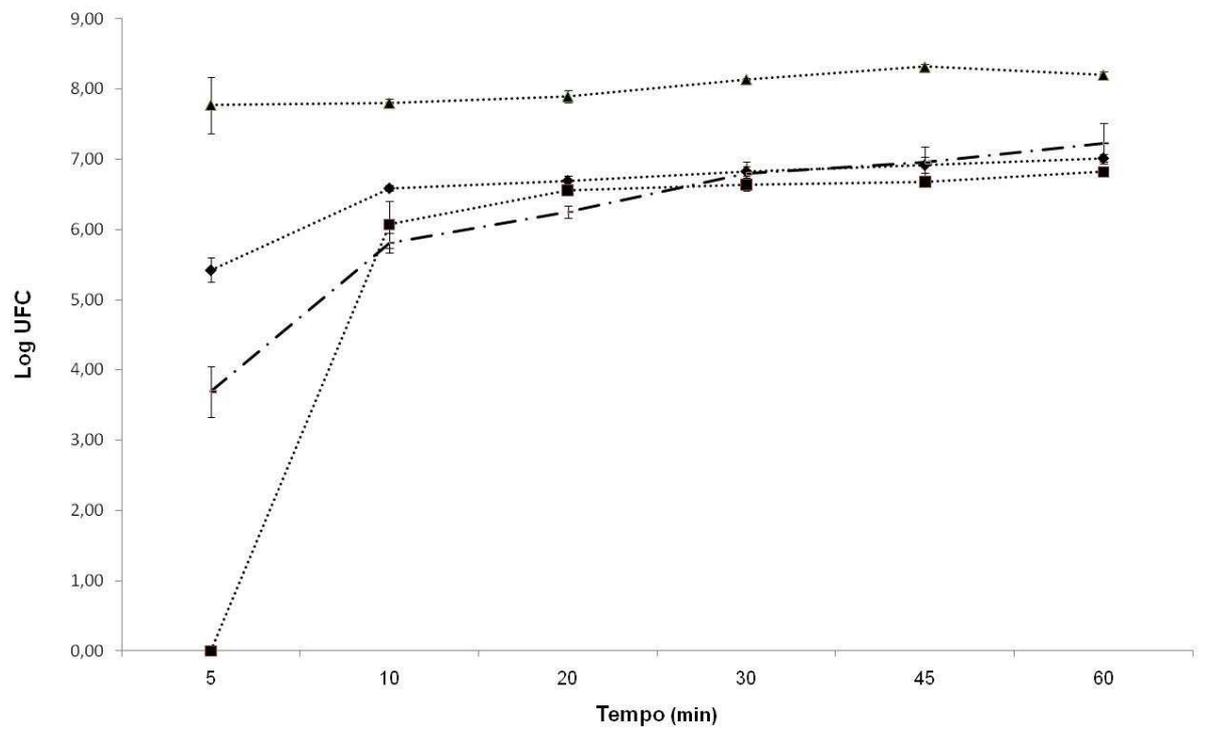
Os perfis de libertação de *L. acidophilus* dos diferentes tipos de óvulos formulados ao longo deste trabalho encontram-se representados na Figura 26.



◆ Peg 50 mg - Método Clássico ■ Wit 50 mg - Método Clássico ▲ Peg 100 mg - Método Clássico — Wit 100 - Método Clássico

Figura 26 - Perfis de libertação de *L. acidophilus* ao longo do tempo nos diferentes tipos de óvulos preparados (tempo zero).

As Figuras 27 e 28 representam, de modo mais específico, os perfis de libertação dos óvulos formulados pelo método convencional e pelo método de enchimento, respectivamente.



◆ Peg 50 mg - Método Clássico ■ Wit 50 mg - Método Clássico ▲ Peg 100 mg - Método Clássico - Wit 100 - Método Clássico

Figura 27 - Perfis de libertação de *L. acidophilus* ao longo do tempo nos diferentes tipos de óvulos preparados pelo método clássico.

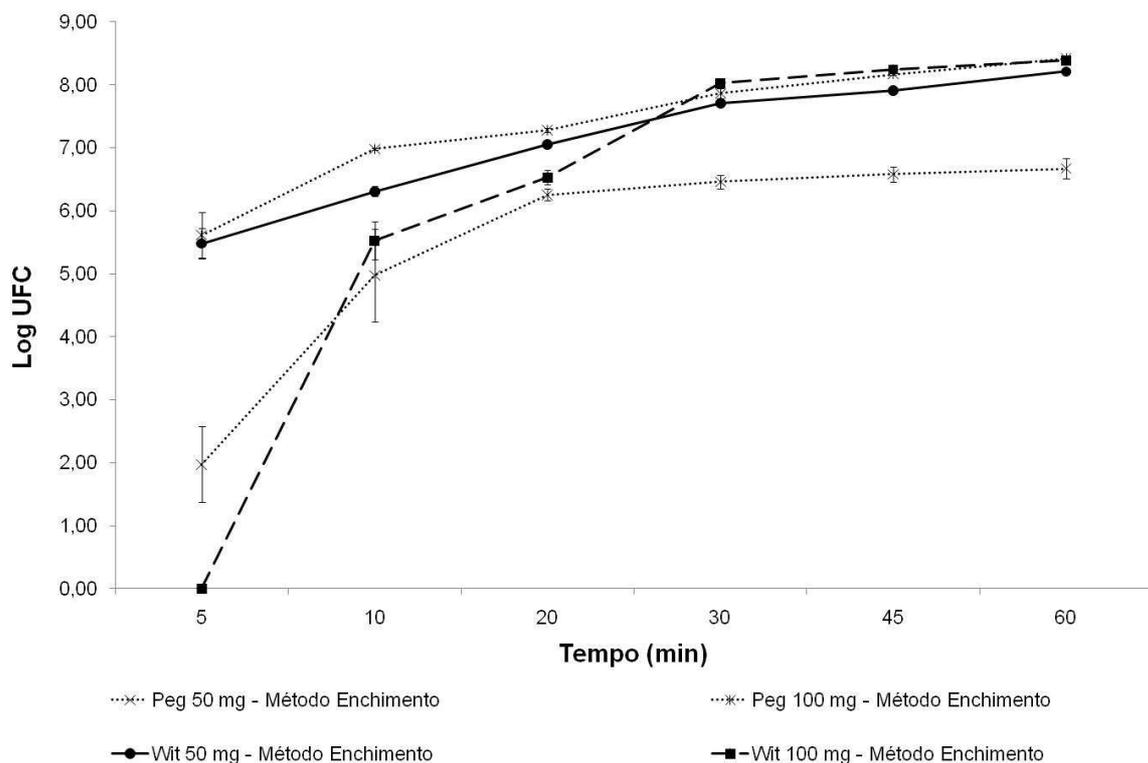


Figura 28 - Perfis de libertação de *L. acidophilus* ao longo do tempo nos diferentes tipos de óvulos preparados através do método de enchimento

De um modo geral, as principais linhas conclusivas a retirar da análise dos resultados são o facto de o perfil de libertação ser similar nos óvulos cuja base é uma mistura de PEG (base hidrófila) e nos óvulos cuja base é o Witepsol H12 (base lipófila). Estes resultados encontram-se em desacordo com os resultados obtidos por Kaewnopparat *et al.*, os quais concluíram que os óvulos obtidos através do método de enchimento, e cuja base era uma mistura de PEG, apresentavam um perfil de libertação consideravelmente mais satisfatório, apresentando uma taxa de viabilidade celular de $1,2 \times 10^8$ UFC/óvulo [68].

O método de enchimento utilizado neste trabalho foi desenvolvido por Watanaber *et al.* [96], tendo apresentado resultados consideravelmente mais satisfatórios do que o método convencional. De facto, os óvulos obtidos através do método de enchimento apresentam uma libertação consideravelmente superior na maioria dos óvulos, sendo no caso máximo de cerca de 1×10^8 UFC/ml, aos 60

minutos. Com efeito, de acordo com Kaewsrichan *et al.* a justificação para o método de enchimento ser consideravelmente mais promissor tem na base o facto de as bactérias não serem sujeitas a um stresse de temperatura durante a formulação dos óvulos, ao contrário do que sucede no método clássico, em que muitas vezes são expostas a temperaturas superiores à sua temperatura óptima de crescimento, levando a uma diminuição da viabilidade celular [19].

Além disso, para que se consiga um perfil de libertação, após 60 minutos, nesta ordem de grandeza, em três dos quatro casos o teor de liofilizado veiculado através do óvulo foi de 100 mg. Este facto pode dever-se ao elevado número de bactérias que morrem durante o período de manufactura dos óvulos devido à exposição a temperaturas superiores à sua temperatura óptima de crescimento, bem como a erosões mecânicas sofridas durante a sua manipulação, o que diminui a taxa de viabilidade [19].

Uma análise detalhada das Figuras 26,27 e 28 permite igualmente constatar que o perfil de libertação de *L. acidophilus* é consideravelmente mais lento e inferior no caso dos óvulos de Witepsol H12 cuja base lipófila é formulada através do método clássico, do que os óvulos obtidos através do método de enchimento. Apesar do Witepsol H12 fundir rapidamente a 37°C, o perfil de libertação dos óvulos contendo este excipiente é mais lento do que o dos óvulos cujo excipiente é hidrófilo. Este facto pode resultar do *L. acidophilus* se encontrar no interior do óvulo (no caso do método de enchimento), ao contrário do que sucede no método convencional, em que o probiótico se encontra de imediato em contacto com o FVS.

O perfil de libertação mais acelerado que se verifica nos óvulos cuja base é uma mistura de PEG pode ter por base o facto da bactéria probiótica apresentar uma baixa afinidade para este excipiente. Pode ainda ser devido à sua solubilidade, uma vez que se trata de uma substância extremamente hidrófila, o que conduz à sua libertação dos probióticos através de mecanismos de difusão bem como de erosão [97]. Estudos desenvolvidos anteriormente, nos quais se formularam supositórios constituídos por PEG 4000 e por Witepsol W45, mostraram que a velocidade de dissolução do PEG 4000 é consideravelmente mais rápida do que a velocidade de desagregação do Witepsol W45, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho [97]. Este facto deve-se às diferentes taxas de solubilidade destes compostos.

De acordo com trabalhos recentes na área dos probióticos vaginais, a concentração necessária para o tratamento de infecções vaginais é de 1×10^6 a 1×10^{10} UFC/g [98-99]. Com efeito, ao longo deste trabalho foram obtidos óvulos com 1×10^8 UFC, pelo que a administração vaginal de um óvulo duas vezes ao dia, ao levantar e ao deitar, seria suficiente para o tratamento de infecções vaginais.

9. Ensaio de Estabilidade

Ao longo deste trabalho foram realizados ensaios de estabilidade nos óvulos formulados pelo método convencional ao final do primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento a 4° C e a 20° C. Os ensaios consistiram na avaliação das características organolépticas, ensaios de textura, ensaios de desagregação e ensaios de liberação. Importa ressaltar que os ensaios de estabilidade apenas foram efectuados neste tipo de óvulos devido a questões económicas e de logística, sendo contudo um aspecto negativo a ressaltar a ausência de ensaios similares nos óvulos obtidos pelo método de enchimento. Há contudo que mencionar que à partida, devido às características físicas dos óvulos obtidos através do método de enchimento, estes se encontram menos sujeitos a processos de degradação, uma vez que os probióticos incorporados não estão expostos ao meio exterior.

Os resultados obtidos encontram-se sumariados nas tabelas apresentadas a seguir.

a) Características Organolépticas

Os resultados da avaliação das características organolépticas no final do primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento encontram-se na Tabela XVII.

Características Organolépticas

Tempo /Formulação	4° C				20°C			
	Cheiro	Cor	Brilho	Superfície	Cheiro	Cor	Brilho	Superfície
Witepsol H12 50 mg								
0 dias	Ausente	Amarelo	Presente	Lisa	Ausente	Amarelo	Presente	Lisa
30 dias	Ausente	Amarelo	Presente	Lisa	Ligeiramente ácido	Amarelo	Ausente	Esbranquiçada e com ligeiras fissuras
60 dias	Ligeiramente ácido	Amarelo	Presente	Lisa	Ácido	Amarelada; pontuações brancas	Ausente	Esbranquiçada e com ligeiras fissuras
90 dias	Ligeiramente ácido	Amarelo	Presente	Lisa	Ranço	Esbranquiçado	Ausente	Esbranquiçada e com ligeiras fissuras
Witepsol H12 100 mg								
0 dias	Ausente	Amarelo	Presente	Lisa	Ausente	Amarelo	Presente	Lisa
30 dias	Ligeiramente ácido	Amarelo	Presente	Lisa	Ligeiramente ácido	Amarelo	Ausente	Lisa
60 dias	Ligeiramente ácido	Amarelo	Presente	Lisa	Ácido	Amarelada; pontuações brancas	Ausente	Esbranquiçada e com ligeiras fissuras
90 dias	Ligeiramente ácido	Amarelo	Presente	Lisa	Ranço	Esbranquiçado	Ausente	Esbranquiçada e com ligeiras fissuras
Mistura PEG 50 mg								
0 dias	Ausente	Branco	Presente	Lisa	Ausente	Branco	Presente	Lisa
30 dias	Ausente	Branco	Presente	Lisa	Ausente	Branco	Mais Intenso	Lisa
60 dias	Ausente	Branco	Presente	Lisa	Ausente	Branco	Mais Intenso	Lisa
90 dias	Ausente	Branco	Presente	Lisa	Ausente	Branco	Muito Intenso	Lisa
Mistura PEG 100 mg								
0 dias	Ausente	Branco	Presente	Lisa	Ausente	Branco	Presente	Lisa
30 dias	Ausente	Branco	Presente	Lisa	Ausente	Branco	Mais Intenso	Lisa
60 dias	Ausente	Branco	Presente	Lisa	Ausente	Branco	Mais Intenso	Lisa
90 dias	Ausente	Branco	Presente	Lisa	Ausente	Branco	Muito Intenso	Lisa

Tabela XVII - Características Organolépticas dos óvulos armazenados a 4°C e a 20°C ao fim do primeiro, segundo e terceiro mês.

A análise dos resultados obtidos permite verificar que ao final do primeiro mês não ocorreu qualquer alteração das características organolépticas dos óvulos formulados, quer a 4°C quer a 20°C, no que diz respeito ao cheiro, cor e superfície, comparativamente com as características dos óvulos com 0 dias de armazenamento.

No final do segundo mês de armazenamento verificou-se uma alteração do odor nos óvulos de Witepsol H12 armazenados a 20° C, apresentando um cheiro mais intenso a ranço. Ao mesmo tempo, a uniformidade de cor começou a desaparecer, tornando-se menos amarelados e com pontuações brancas. Os óvulos armazenados a 4°C mantiveram as suas características de uniformidade, quando comparados com o ensaio no tempo 0.

No final dos 90 dias de armazenamento os óvulos à base de Witepsol tinham alterações mais intensas das características organolépticas quando armazenados a 20°C do que a 4°C.

No caso dos óvulos à base de PEG as diferenças organolépticas em relação ao tempo 0 ocorrem apenas nos óvulos armazenados a 20°C, observando-se a partir dos 30 dias de armazenamento um brilho mais intenso.

Os resultados permitiram verificar que existem diferenças significativas entre o teor de *Lactobacillus* libertado no final do primeiro, segundo e terceiro mês, bem como entre os diferentes tipos de óvulos formulados.

b) Ensaio de Desagregação

Os tempos de desagregação obtidos para os diferentes tempos de armazenamento encontram-se resumidos na Tabela XVIII.

Tabela XVIII - Tempos de Desagregação (min) dos diferentes tipos de óvulos obtidos pelo método clássico ao final do primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento a 4° e 20° C.

	Temperatura 4° C				Temperatura 20° C			
	Peg 50	Peg 100	Wit 50	Wit 100	Peg 50	Peg 100	Wit 50	Wit 100
0 dias	19,50	19,60	6,74	6,58	19,50	19,60	6,74	6,58
30 dias	19,99	17,61	6,37	7,52	21,02	19,20	7,12	6,74
60 dias	21,28	19,23	9,94	9,23	22,05	21,61	7,03	6,98
90 dias	18,66	20,19	8,66	7,83	16,64	19,58	6,58	7,17

Com efeito, a análise dos tempos de desagregação permite constatar que estes se encontram de acordo com a F.P. 9.0. Não há alterações significativas dos tempos de desagregação das diferentes amostras, verificando-se apenas como aspecto fundamental que para os óvulos de Witepsol armazenados a 4°C o tempo de desagregação aumenta gradualmente, sendo, contudo, este aumento não significativo. Relativamente aos óvulos armazenados a 20°C o tempo de desagregação mantém-se praticamente constante.

c) Avaliação da Textura

A avaliação da textura ao longo do ensaio de estabilidade permitiu constatar que não houve alterações significativas. A Tabela XIX mostra os resultados obtidos.

Tabela XIX - Valores da força de penetração (N) das formulações avaliadas ao final do primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento a 4°C e 20°C.

	Temperatura 4º C				Temperatura 20º C			
	Peg 50	Peg 100	Wit 50	Wit 100	Peg 50	Peg 100	Wit 50	Wit 100
0 dias	13,13	13,23	26,33	27,79	13,13	13,23	26,33	27,79
30 dias	27,39	23,47	16,97	18,25	18,98	18,51	11,88	11,12
60 dias	21,17	22,46	15,70	14,98	20,60	19,09	11,42	14,07
90 dias	23,59	20,30	14,81	12,50	21,21	20,40	14,90	12,57

A análise dos resultados obtidos permite concluir que existe uma alteração significativa dos valores da força de penetração do tempo zero para o final do primeiro mês, mantendo-se contudo constantes quando comparados o primeiro, segundo e terceiro mês.

Relativamente aos óvulos cujo excipiente é uma mistura de PEG uma perda de água considerável que conduziu a um aumento da dureza dos óvulos.

No caso dos óvulos de Witepsol ocorreu diminuição dos valores da força de penetração, provavelmente devido ao aumento da temperatura a que foram efectuadas as determinações.

d) Ensaio de libertação in vitro

A avaliação da taxa de viabilidade de *L. acidophilus* ao fim de 60 minutos nos óvulos obtidos pelo método clássico com diferentes excipientes encontra-se resumida na Tabela XX.

Tabela XX – Viabilidade de *L. acidophilus* nos óvulos de Witepsol H12 e mistura de PEG obtidos através do método clássico, ao fim do primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento.

Tempo de armazenamento	UFC	
	4º C	20ºC
Witepsol H12 50 mg		
0 dias	$6,6 \pm 0,35 \times 10^7$	$6,6 \pm 0,35 \times 10^7$
30 dias	$3,0 \pm 0,25 \times 10^6$	$4,2 \pm 0,33 \times 10^5$
60 dias	$1,1 \pm 0,13 \times 10^6$	$3,5 \pm 0,27 \times 10^4$
90 dias	$1,5 \pm 0,12 \times 10^5$	$2,2 \pm 0,26 \times 10^4$
Witepsol H12 100 mg		
0 dias	$1,7 \pm 0,12 \times 10^7$	$1,7 \pm 0,12 \times 10^7$
30 dias	$8,1 \pm 0,18 \times 10^6$	$5,3 \pm 0,4 \times 10^5$
60 dias	$1,2 \pm 0,15 \times 10^6$	$4,3 \pm 0,52 \times 10^4$
90 dias	$2,3 \pm 0,23 \times 10^5$	$2,7 \pm 0,42 \times 10^4$
Mistura PEG 50 mg		
0 dias	$1,0 \pm 0,13 \times 10^8$	$1,0 \pm 0,13 \times 10^8$
30 dias	$1,3 \pm 0,6 \times 10^5$	$3,3 \pm 1,65 \times 10^4$
60 dias	$2,5 \pm 0,39 \times 10^5$	$5,3 \pm 1,61 \times 10^3$
90 dias	$2,1 \pm 0,25 \times 10^4$	$2,2 \pm 0,27 \times 10^3$
Mistura PEG 100 mg		
0 dias	$1,6 \pm 0,16 \times 10^9$	$1,6 \pm 0,16 \times 10^9$
30 dias	$1,2 \pm 0,26 \times 10^7$	$8,3 \pm 1,60 \times 10^4$
60 dias	$3,3 \pm 0,23 \times 10^5$	$8,9 \pm 1,62 \times 10^3$
90 dias	$1,2 \pm 0,25 \times 10^5$	$2,7 \pm 0,42 \times 10^3$

Estes resultados permitem constatar que à medida que o tempo passa há uma perda progressiva da viabilidade celular, conduzindo a uma diminuição do número de

UFC por óvulo. Esta diminuição é mais acentuada nos óvulos armazenados a 20°C do que nos óvulos armazenados a 4°C. Há igualmente uma perda mais significativa nos óvulos que utilizam como base um excipiente hidrófilo. Com efeito, ao final do primeiro mês os óvulos já não apresentam uma concentração mínima de UFC que lhes permita serem veiculados como substâncias probióticas no auxílio do tratamento de ITU.

Estes resultados estão concordantes com os resultados descritos por Kaewnopparat *et al.*, os quais concluíram que havia uma diminuição, ao longo do tempo, da viabilidade celular de cerca de 3 log nos óvulos formulados pelo método convencional com uma mistura de PEG e Witepsol H15 [68]. Esta diminuição pode ser devida ao calor durante a preparação [68]. Há contudo, tal como observado ao longo deste trabalho, uma diminuição mais acentuada nos óvulos armazenados a 20°C do que nos óvulos armazenados a 4°C. Esta observação pode dever-se ao facto de uma temperatura de 4°C colocar os *L. acidophilus* num estado de latência mais acentuado.

Por outro lado, esta acentuada diminuição do número de UFC a 20°C quando comparadas com as UFC refrigeradas a 4°C, pode dever-se também ao impacto do potencial redox no armazenamento dos probióticos [100]. No decorrer da experiência não há motivo que nos levem a pensar que a composição da atmosfera foi diferente na estufa e no frigorífico. Contudo, é do conhecimento comum, que a presença de oxigénio (potencial redox positivo) nos produtos com probióticos pode conduzir a uma diminuição da viabilidade celular. Tal como todas as reacções químicas, a oxidação depende da temperatura (lei de Arrhenius). Consequentemente, a elevada mortalidade dos *Lactobacillus* quando armazenados a 20°C pode dever-se simplesmente ao aumento do fenómeno de oxidação. Estes resultados permitem concluir que existe uma maior estabilidade dos óvulos armazenados a 4°C, uma prática comum quando estão presentes microorganismos probióticos. Contudo, uma solução para este problema poderia ser o armazenamento em condições de atmosfera modificada, originando muito provavelmente uma maior estabilidade [100].

Quando comparados os óvulos de Witepsol com diferentes conteúdos de massa de liofilizado é possível verificar que não há uma viabilidade consideravelmente superior nos óvulos com maior teor de liofilizado. De facto, em ambos os óvulos há um decréscimo de 2 log desde o tempo 0 até aos 90 dias. Pelo contrário, no caso dos óvulos de PEG esse decréscimo atinge os 4 log, quando armazenados a 20°C, e os 5 log quando armazenados a 4°C. Na realidade estas diferenças podem ocorrer devido a fenómenos de temperatura que levam a que as bactérias probióticas não sobrevivam

de igual modo como no Witepsol H12, um excipiente mais lipófilo e que retém menos água na sua composição.

Conclusão

O desenvolvimento deste trabalho permitiu avaliar as diferentes características físicas e de quantidade de *L. acidophilus* em óvulos formulados com diferentes excipientes, no momento da preparação e ao longo do tempo de armazenamento. Com efeito, foi desenvolvido um estudo de pré-formulação que conduziu à selecção de dois excipientes, um hidrófilo (mistura de PEG 400 e PEG 4000, na proporção de 75:25) e um lipófilo (Witepsol H12) como base de formulação de óvulos contendo *L. acidophilus*. Foram utilizadas duas técnicas de preparação dos óvulos: o método clássico e o método de enchimento. Os óvulos foram formulados com 50 mg e 100 mg de *L. acidophilus*. Realizaram-se igualmente estudos de estabilidade ao longo do primeiro, segundo e terceiro mês de armazenamento a 4°C e a 20°C, que permitiram aferir acerca da base de excipiente mais adequada para manter uma maior viabilidade celular.

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho permitiram concluir que os óvulos obtidos pelo método de enchimento permitem obter resultados mais promissores do que os óvulos obtidos pelo método convencional, permitindo alcançar uma taxa de libertação *in vitro* de cerca de $1,0 \times 10^8$ UFC. Na realidade, este resultado é consideravelmente mais satisfatório quando a massa de liofilizado utilizado é de 100 mg, uma vez que existe uma maior percentagem de bactérias por óvulo que irão resistir às variações de temperatura e alterações mecânicas durante o processo de produção, permitindo deste modo uma maior viabilidade celular. Não há contudo alterações muito significativas ao longo do tempo entre os óvulos cujo excipiente é a mistura de PEG ou os óvulos formulados à base de Witepsol H12.

De igual modo, procedeu-se a uma análise das características físicas especificadas na F.P. 9.0, bem como das características organolépticas e de textura. Estes ensaios permitiram concluir que os resultados se encontram de acordo com a F.P. 9.0. A avaliação das características de textura demonstraram que, no tempo zero, as duas formulações eram as que mais se assemelhavam em dureza ao Nelex®, medicamento na forma de óvulos comercializado em Portugal.

Os ensaios ao longo do tempo nos óvulos formulados apenas pelo método clássico demonstraram que, a partir do segundo mês, ocorreram alterações das características organolépticas dos óvulos de base lipófila. Há igualmente uma alteração significativa da força de penetração a partir do primeiro mês. Os tempos de desagregação mantêm-se de acordo com os critérios da F.P. 9.0. Relativamente à

viabilidade celular ocorreu uma diminuição significativa do número de UFC ao longo do tempo de armazenamento, sendo mais pronunciada nos óvulos armazenados à temperatura de 20°C e cuja base era PEG

Deste modo, os óvulos formulados com base de Witepsol H12 e com um teor de 100 mg apresentam-se como os mais promissores na veiculação de *lactobacillus*.

As perspectivas futuras deste trabalho passam pelo ensaio de estabilidade de óvulos obtidos pelo método de enchimento, bem como pela inserção de adjuvantes que ajudem na manutenção da viabilidade celular bem como das características organolépticas e de textura ao longo do tempo de armazenamento.

Bibliografia

1. Lopes, H.V. and W. Tavares, *Diagnóstico das infecções do trato urinário*. Revista da Associação Médica Brasileira, 2005. **51**: p. 306-308.
2. Naber, K.G., *Treatment options for acute uncomplicated cystitis in adults*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. **46**(suppl 1): p. 23-27.
3. Bishop, M.C., *Uncomplicated Urinary Tract Infection*. EAU Update Series, 2004. **2**(3): p. 143-150.
4. Mak, R.H. and H.-J. Kuo, *Pathogenesis of urinary tract infection: an update*. Current Opinion in Pediatrics, 2006. **18**(2): p. 148-152 10.1097/01.mop.0000193276.39495.0d.
5. Stamm, W.E. and S.R. Norrby, *Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges*. Journal of Infectious Diseases, 2001. **183**(Supplement 1): p. S1-S4.
6. Sobel, J.D., *Bacterial Vaginosis*. Annual Review of Medicine, 2000. **51**(1): p. 349-356.
7. Fuller, R., *Probiotics in man and animals*. Journal of Applied Bacteriology, 1989. **66**: p. 365-378.
8. FAO/WHO, *Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. 2002.
9. Reid, G., *Potential preventive strategies and therapies in urinary tract infection*. World Journal of Urology, 1999. **17**(6): p. 359-363.
10. Uehara, S., et al., *A pilot study evaluating the safety and effectiveness of Lactobacillus vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2006. **28**(Supplement 1): p. 30-34.
11. FAO/WHO, *Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. 2006: Roma.
12. Pineiro, M. and C. Stanton, *Probiotic Bacteria: Legislative Framework— Requirements to Evidence Basis*. The Journal of Nutrition, 2007. **137**(3): p. 850S-853S.
13. Matu, M.N., et al., *In vitro inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women*. Anaerobe, 2010. **16**(3): p. 210-215.
14. Reid, G., *In vitro testing of Lactobacillus acidophilus NCFMTM as a possible probiotic for the urogenital tract*. International Dairy Journal, 2000. **10**(5-6): p. 415-419.
15. Reid, G. and E. Devillard, *Probiotics for Mother and Child*. Journal of Clinical Gastroenterology, 2004. **38**: p. S94-S101.
16. Herráez, M. and A.M. Villodre, *Formas de administración rectal y vaginal*, in *Tecnología Farmacéutica - Formas Farmacéuticas*, J.L.V. Jato, Editor. 2001, Editorial Síntesis: Madrid. p. 251-272.
17. das Neves, J., M.H. Amaral, and M.F. Bahia, *Vaginal Drug Delivery*, in *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, S.C. Gad, Editor. 2008, John Wiley & Sons, Inc.: Nova Iorque (EUA). p. 809-878.
18. Barnhart, K.T., E.S. Pretorius, and D. Malamud, *Lesson learned and dispelled myths: three-dimensional imaging of the human vagina*. Fertility and Sterility, 2004. **81**(5): p. 1383-1384.
19. Kaewsrichan, J., et al., *Evaluation of Lactobacilli Containing Suppository Formulation for Probiotic Use*. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **34**((1-4)): p. 1-8.
20. Sobel, J. and W. Chaim, *Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis*. J. Clin. Microbiol., 1996. **34**(10): p. 2497-2499.
21. Martín, R., et al., *La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2008. **26**(3): p. 160-167.

22. McGroarty, J.A., *Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1993. **6**(4): p. 251-264.
23. Lamont, R.F., et al., *The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques*. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2011. **118**(5): p. 533-549.
24. Kaewsrichan, J., K. Peeyananjarassri, and J. Kongprasertkit, *Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2006. **48**(1): p. 75-83.
25. Hoppe, C., et al., *Commercially Available Human Probiotic Microorganisms*. Handbook of Probiotics and Prebiotics. 2008: John Wiley & Sons, Inc. 441-532.
26. Pavlova, S.I., et al., *Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences*. Journal of Applied Microbiology, 2002. **92**(3): p. 451-459.
27. Massi, M., et al., *Identification method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic Lactobacillus strains colonizing the human gut and vagina*. Journal of Applied Microbiology, 2004. **96**(4): p. 777-786.
28. Nader-Macías, M.E., et al., *Lactic Acid Bacteria in the Prevention of Urogenital and Respiratory Infections*, in *Biotechnology of Acid Lactic Bacteria*, F. Mozzi, R.R. Raya, and G.M. Vignolo, Editors. 2010, Blackwell Publishing: Iowa, USA. p. 141-160.
29. Otero, M.C. and M.E. Nader-Macías, *Lactobacillus adhesion to epithelial cells from bovine vagina*, in *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Méndez-Vilas, Editor. 2007. p. 747-757.
30. Gil, N., et al., *Vaginal Lactobacilli as potential probiotics against Candida spp*. Brazilian Journal of Microbiology, 2010. **41**: p. 6-14.
31. Donders, G.G.G., *Definition and classification of abnormal vaginal flora*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2007. **21**(3): p. 355-373.
32. Linhares, I.M., et al., *Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2011. **204**(2): p. 120.e1-120.e5.
33. Donders, G., et al., *Can vaginal pH be measured from the wet mount slide?* European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2009. **146**(1): p. 100-103.
34. Amsel, R., et al., *Nonspecific vaginitis: Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations*. The American journal of medicine, 1983. **74**(1): p. 14-22.
35. Boskey, E.R., et al., *Origins of vaginal acidity: high d/l lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source*. Human Reproduction, 2001. **16**(9): p. 1809-1813.
36. Antonio, May A.D., Lorna K. Rabe, and Sharon L. Hillier, *Colonization of the Rectum by Lactobacillus Species and Decreased Risk of Bacterial Vaginosis*. The Journal of Infectious Diseases, 2005. **192**(3): p. 394-398.
37. Ehrström, S., et al., *Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis*. Microbes and Infection, 2010. **12**(10): p. 691-699.
38. Nes, I.F., et al., *Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek, 1996. **70**(2): p. 113-128.
39. Velraeds, M.M.C., et al., *Interference in Initial Adhesion of Uropathogenic Bacteria and Yeasts to Silicone Rubber by A Lactobacillus Acidophilus Biosurfactant*. J Med Microbiol, 1998. **47**(12): p. 1081-1085.
40. Velraeds, M.M.C., et al., *Inhibition of uropathogenic biofilm growth on silicone rubber in human urine by lactobacilli – a teleologic approach*. World Journal of Urology, 2000. **18**(6): p. 422-426.

41. Alvarez-Olmos, M.I. and R.A. Oberhelman, *Probiotic Agents and Infectious Diseases: A Modern Perspective on a Traditional Therapy*. *Clinical Infectious Diseases*, 2001. **32**(11): p. 1567-1576.
42. Reid, G. and J. Burton, *Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria*. *Microbes and Infection*, 2002. **4**(3): p. 319-324.
43. Reid, G., *The Scientific Basis for Probiotic Strains of Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999. **65**(9): p. 3763-3766.
44. Thorsen, P., et al., *Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: A population-based microbiologic study among 3596 pregnant women*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1998. **178**(3): p. 580-587.
45. Turovskiy, Y., K. Sutyak Noll, and M.L. Chikindas, *The aetiology of bacterial vaginosis*. *Journal of Applied Microbiology*, 2011. **110**(5): p. 1105-1128.
46. Jeavons, H.S., *Prevention and Treatment of Vulvovaginal Candidiasis Using Exogenous Lactobacillus*. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*, 2003. **32**(3): p. 287-296.
47. Martinez, R.C.R., et al., *Effect of Lactobacillus rhamnosus GR-1 and Lactobacillus reuteri RC-14 on the ability of Candida albicans to infect cells and induce inflammation*. *Microbiology and Immunology*, 2009. **53**(9): p. 487-495.
48. Boskey, E.R., et al., *Acid Production by Vaginal Flora In Vitro Is Consistent with the Rate and Extent of Vaginal Acidification*. *Infect. Immun.*, 1999. **67**(10): p. 5170-5175.
49. Hay, P., *Life in the littoral zone: lactobacilli losing the plot*. *Sexually Transmitted Infections*, 2005. **81**(2): p. 100-102.
50. Wilson, J., *Managing recurrent bacterial vaginosis*. *Sexually Transmitted Infections*, 2004. **80**(1): p. 8-11.
51. Reid, G. and A. Bruce, *Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence*. *World Journal of Urology*, 2006. **24**(1): p. 28-32.
52. Raz, R., et al., *Recurrent Urinary Tract Infections in Postmenopausal Women*. *Clinical Infectious Diseases*, 2000. **30**(1): p. 152-156.
53. Raz, R., *Hormone Replacement Therapy or Prophylaxis in Postmenopausal Women with Recurrent Urinary Tract Infection*. *Journal of Infectious Diseases*, 2001. **183**(Supplement 1): p. S74-S76.
54. Zoetendal, E.G., E.E. Vaughan, and W.M. De Vos, *A microbial world within us*. *Molecular Microbiology*, 2006. **59**(6): p. 1639-1650.
55. Antonio, May A.D., Stephen E. Hawes, and Sharon L. Hillier, *The Identification of Vaginal Lactobacillus Species and the Demographic and Microbiologic Characteristics of Women Colonized by These Species*. *The Journal of Infectious Diseases*, 1999. **180**(6): p. 1950-1956.
56. Kilic, A.O., et al., *Comparative Study of Vaginal Lactobacillus Phages Isolated from Women in the United States and Turkey: Prevalence, Morphology, Host Range, and DNA Homology*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001. **8**(1): p. 31-39.
57. Vallor, Ana C., et al., *Factors Associated with Acquisition of, or Persistent Colonization by, Vaginal Lactobacilli: Role of Hydrogen Peroxide Production*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001. **184**(11): p. 1431-1436.
58. Vasquez, A., et al., *Vaginal Lactobacillus Flora of Healthy Swedish Women*. *J. Clin. Microbiol.*, 2002. **40**(8): p. 2746-2749.
59. Burton, J.P., et al., *Detection of Atopobium vaginae in Postmenopausal Women by Cultivation-Independent Methods Warrants Further Investigation*. *J. Clin. Microbiol.*, 2004. **42**(4): p. 1829-1831.

60. Jovita, M.R., et al., *Characterization of a novel Atopobium isolate from the human vagina: description of Atopobium vaginae sp. nov.* Int J Syst Bacteriol, 1999. **49**(4): p. 1573-1576.
61. Yamamoto, T., et al., *Bacterial Populations in the Vaginas of Healthy Adolescent Women.* Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology, 2009. **22**(1): p. 11-18.
62. Stevens-Simon, C., et al., *Racial Variation in Vaginal pH Among Healthy Sexually Active Adolescents.* Sexually Transmitted Diseases, 1994. **21**(3): p. 168-172.
63. Fiscella, K. and M.A. Klebanoff, *Are racial differences in vaginal pH explained by vaginal flora?* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2004. **191**(3): p. 747-750.
64. Nam, H., K. Whang, and L. Yeonhee, *Analysis of Vaginal Lactic Acid Producing Bacteria in Healthy Women.* The Journal of Microbiology, 2007. **45**(6): p. 515-520.
65. Santiago, G.L.d.S., et al., *A pilot study evaluating the safety of vaginal administration of a multi-particulate pellet formulation.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009. **73**(3): p. 399-403.
66. Reid, G., A.W. Bruce, and M. Taylor, *Influence of three-day antimicrobial therapy and lactobacillus vaginal suppositories on recurrence of urinary tract infections.* Clinical Therapeutics, 1992. **14**(1): p. 11-16.
67. Baerheim, A., E. Larsen, and A. Digranes, *Vaginal application of lactobacilli in the prophylaxis of recurrent lower urinary tract infection in women.* Scandinavian Journal of Primary Health Care, 1994. **12**(4): p. 239-243.
68. Kaewnopparat, S. and N. Kaewnopparat, *Formulation and Evaluation of Vaginal Suppositories Containing Lactobacillus.* World Academy of Science, Engineering and Technology, 2009. **55**: p. 25-28.
69. Alam, M., et al., *Development and evaluation of acid-buffering bioadhesive vaginal tablet for mixed vaginal infections.* AAPS PharmSciTech, 2007. **8**(4): p. 229-236.
70. Kale, V.V., et al., *Development and Evaluation of a Suppository Formulation Containing Lactobacillus and Its Application in Vaginal Diseases.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2005. **1056**(1): p. 359-365.
71. Mastromarino, P., et al., *Characterization and selection of vaginal Lactobacillus strains for the preparation of vaginal tablets.* Journal of Applied Microbiology, 2002. **93**(5): p. 884-893.
72. Klayraung, S., H. Viernstein, and S. Okonogi, *Development of tablets containing probiotics: Effects of formulation and processing parameters on bacterial viability.* International Journal of Pharmaceutics, 2009. **370**(1-2): p. 54-60.
73. Maggi, L., et al., *Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(3): p. 389-395.
74. Fazeli, M.R., et al., *Viability of lactobacillus acidophilus in various vaginal tablet formulations.* DARU, 2006. **14**(4): p. 172-177.
75. Nogueira Prista, L., et al., *Formas Farmacêuticas destinadas a serem aplicadas nas mucosas,* in *Tecnologia Farmacêutica*, F.C. Gulbenkian, Editor. 2008.
76. Zárate, G. and M.E. Nader-Macias, *Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules.* Process Biochemistry, 2006. **41**(8): p. 1779-1785.
77. *Farmacopeia Portuguesa 9.0.* 2009, Autoridade Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED) - Ministério da Saúde.
78. Ozkinay, E., et al., *The effectiveness of live lactobacilli in combination with low dose oestriol (Gynoflor) to restore the vaginal flora after treatment of vaginal infections.* BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2005. **112**(2): p. 234-240.

79. Nader-Macías, M.E., et al., *Advances in the Knowledge and Clinical Applications of Lactic Acid Bacteria as Probiotics in the Urogenital Tract*. Current Women's Health Reviews, 2008. **4**: p. 240-257.
80. Bernardeau, M., M. Guguen, and J.P. Vernoux, *Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments*. FEMS Microbiology Reviews, 2006. **30**(4): p. 487-513.
81. Matejtschuk, P., M. Stanley, and P. Jefferson, *Freeze-Drying of Biological Standards*, in *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, L. Rey and J. May, Editors. 2010, INFORMA: London. p. 317-353.
82. Earle, R.L. and M.D. Earle, *Drying*, in *Unit operations in food processing*. 2004, The New Zealand Institute of Food Science & Technology (Inc.).
83. Juárez Tomás, M.S., V.S. Ocaña, and M.E. Nader-Macías, *Viability of vaginal probiotic lactobacilli during refrigerated and frozen storage*. Anaerobe, 2004. **10**(1): p. 1-5.
84. Hubálek, Z., *Protectants used in the cryopreservation of microorganisms*. Cryobiology, 2003. **46**(3): p. 205-229.
85. Capela, P., *Use of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation of bacterial cells in improving the viability of probiotic organisms in freeze-dried yoghurt*. 2006, School of Molecular Sciences, Victoria University: Victoria, Australia. p. 1-107.
86. Oladiran, G.S. and H.K. Batchelor, *Determination of ibuprofen solubility in wax: A comparison of microscopic, thermal and release rate techniques*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007. **67**(1): p. 106-111.
87. El-refaey, H.W.T.R., London SW2 3SL, GB), *Vaginal compositions for treating pelvic tissue infections and traumas*. 2009, El-refaey, Hazem (63 Waver Tree Road, London SW2 3SL, GB).
88. Wallick, D., *Polyethylene Glycol*, in *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, R.C. Rowe, P.J. Sheskey, and S.C. Owen, Editors. 2009. p. 517 - 522.
89. Fruijtier-Pölloth, C., *Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products*. Toxicology, 2005. **214**(1-2): p. 1-38.
90. Working Peter, K., et al., *Safety of Poly(ethylene glycol) and Poly(ethylene glycol) Derivatives*, in *Poly(ethylene glycol)*. 1997, American Chemical Society. p. 45-57.
91. Araújo, S.A.C., et al., *Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos*. Ciência Animal, 2008. **18**(1): p. 25-31.
92. Owen, D.H. and D.F. Katz, *A vaginal fluid simulant*. Contraception, 1999. **59**(2): p. 91-95.
93. Gali, Y., et al., *In Vitro Evaluation of Viability, Integrity, and Inflammation in Genital Epithelia upon Exposure to Pharmaceutical Excipients and Candidate Microbicides*. Antimicrob. Agents Chemother., 2010. **54**(12): p. 5105-5114.
94. Chiba, K., et al., *Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients (9). Evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells*. Toxicology in Vitro, 1999. **13**(1): p. 189-198.
95. Arzhavitina, A. and H. Steckel, *Foams for pharmaceutical and cosmetic application*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **394**(1-2): p. 1-17.
96. Watanabe, Y. and M. Matsumoto, *Pharmaceutical evaluation of hollow type suppositories. IV. Improvement of bioavailability of propranolol in rabbits after rectal administration*. Journal of pharmacobio-dynamics, 1986. **9**(6): p. 526-531.
97. Hosny, E.A., S.S. Abdel-Hady, and K.E.H. El-Tahir, *Formulation, in-vitro release and ex-vivo spasmolytic effects of mebeverine hydrochloride suppositories containing polycarbophil or polysorbate 80*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **142**(2): p. 163-168.

98. De Simone, C.V.F., 8, 00161 Rome, IT), *Pharmaceutical compositions containing lactobacilli for treatment of vaginal infections and related method*. 2007: United States.
99. Volkmann, P., *Method for administering a vaginal care composition*. 2010: United States.
100. Poulin, J.-F., R. Caillard, and M. Subirade, *[beta]-Lactoglobulin tablets as a suitable vehicle for protection and intestinal delivery of probiotic bacteria*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011. **405**(1-2): p. 47-54.