



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

**Avaliação *in vitro* da recuperação de lactobacilos,
a partir de probióticos de aplicação vaginal,
disponíveis no mercado nacional e internacional**

Diana Filipa Neves de Sousa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Medicina

(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Professora Doutora Ana Palmeira de Oliveira

Co-orientador: Professor Doutor José Martinez de Oliveira

Co-orientador: Doutor Carlos Gaspar

Covilhã, Maio de 2015

Aos meus pais e irmã.

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Palmeira de Oliveira pela orientação preciosa, pelo apoio constante, disponibilidade e por ser um exemplo para todos os que com ela trabalham.

Ao Doutor Carlos Gaspar pelo incentivo, apoio e disponibilidade.

Ao Professor Doutor José Martinez de Oliveira pela perspectiva clinico-científica.

Aos meus pais, Armando e Zulmira, por serem pessoas extraordinárias, pelo apoio, paciência e, por dia-após-dia, fazerem tudo para que eu e a minha irmã possamos ter todas as oportunidades. Um muito obrigado por tornarem este meu sonho possível.

À minha irmã, Daniela, por ser a minha melhor amiga, pela confiança que tem em mim e por estar sempre presente quando eu mais preciso.

Ao Miguel pelo apoio, paciência e por ter sido meu porto seguro nestes últimos anos.

À Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior onde cresci, não só em termos académicos, mas também como ser humano.

Resumo

A evidência científica quanto à eficácia, efectividade e segurança dos probióticos, assim como movimentos de valorização destes produtos, têm contribuído cada vez mais para a evidenciação do valor terapêutico dos mesmos. A prescrição clínica de probióticos deve ser feita tendo em consideração a evidência científica, clínica e/ou laboratorial, que garanta ao médico dados sobre o benefício que estes produtos trazem para os seus doentes.

Este estudo teve como objectivos avaliar a recuperação *in vitro* de lactobacilos vivos a partir de produtos probióticos de aplicação vaginal, ao longo de 48 horas, em dois tipos de soluções simulantes de fluido vaginal, e comparar os resultados com a alegada recuperação patente no produto.

Utilizaram-se 6 formulações probióticas neste estudo (Baciginal Activ®, Baciginal Is®, Gynoflor®, Gynophilus®, Isadin barcilus®, Pregyn-S®). Estas foram dispersas em MRS (controlo) e em dois simulantes de fluido vaginal. A contagem de células vivas de lactobacilos ao longo do tempo foi realizada no meio de cultura MRS aditivado de agar. As experiências foram repetidas para cada produto em dois ensaios independentes estando os resultados apresentados, após cálculo de média e desvio padrão de UFC/forma farmacêutica, em logaritmo.

A recuperação obtida em MRS, meio ideal de crescimento dos *Lactobacilos*, é na maioria dos casos superior à obtida nos meios simulantes utilizados. Todos os produtos estudados tiveram recuperações superiores às alegadas na embalagem. Ao T0h os dois simulantes de fluido vaginal parecem apresentar recuperações de lactobacilos vivos próximas, no entanto, ao longo das 48 horas a diminuição logarítmica é menor no SFVM que no SFV para a maioria dos probióticos.

Todos os produtos estudados cumprem com a alegação de células vivas descrita na embalagem. O SFVM parece apresentar-se como uma solução mais próxima do fluido vaginal humano quando se pondera recuperações de lactobacilos ao longo do tempo e, por conseguinte, o seu efeito mimetizador poderá ser considerado mais real do que o do SFV. Cada produto probiótico tem uma individualidade única não extrapolável para outro semelhante, e por isso são necessários estudos individualizados, em condições que mimetizem, como este estudo, as condições de aplicação *in vivo* de modo a comprovarem e afirmarem a sua eficácia clínica, e promoverem a sua utilização pela comunidade médica.

Palavras-chave

Probiótico, probiótico vaginal, recuperação lactobacilos, simulante de fluido vaginal

Abstract

Scientific evidence for efficacy, safety and effectiveness of probiotics, as well as movements for valorization of these products, has contributed to increasing their therapeutic value. The clinical prescription of probiotics must be made taking into account the scientific evidence, clinical and / or laboratory, so that the physician can be sure of the benefit that these products can bring for their patients.

This study aims to assess the *in vitro* recovery of live lactobacilli from probiotic products for vaginal application, over the course of 48 hours, using two types of vaginal fluid simulant solutions, and comparing the results with the recovery claimed in the product.

The 6 probiotic formulations used in this study (Baciginal Activ®, Baciginal Is®, Gynoflor®, Gynophilus®, Isadin barcilus®, Pregyn-S®) were dispersed in MRS (control) and two vaginal fluid simulants. The living cell counts of lactobacilli over time were done in the broth of additive MRS agar culture. The experiments were repeated for each product in two independent assays and the results were presented, after calculating the average and standard deviation of CFU/dosage form, in logarithm.

The recovery obtained in MRS, for optimal growth of Lactobacilli is in most cases superior to that obtained in the two vaginal fluid simulants. All products studied had higher recoveries than the alleged in the product. For T0h the recovery difference in the two vaginal fluid simulants doesn't appear to be significant, however, over the period of the 48 hours, the logarithmic decrease is smaller in the modified vaginal fluid simulant (SFVM) than in the regular SFV, for most probiotics.

All the studied products comply with the claim of living cells described in the package. The SFVM seems to be present as a solution closest of the human vaginal fluid when considering lactobacilli recoveries over time, and thus it may be considered more real than the SFV. Each probiotic product has a unique individuality that cannot be extrapolated to others, and so are required individualized studies in conditions that mimic, as this study, the conditions for applying *in vivo* in order to prove and assert their clinical effectiveness, and promote its use by the medical community.

Keywords

Probiotic, vaginal probiotic, lactobacilli recovery, vaginal fluid simulant

Índice

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de acrónimos	xi
Introdução	1
Materiais e métodos	3
Formulações probóticas	3
Meios de cultura e soluções	4
Método	5
Resultados	7
Discussão	15
Conclusões	19
Bibliografia	20

Lista de Figuras

Figura 1- Recuperação a partir do Baciginal Activ® em MRS e SFV	7
Figura 2- Recuperação a partir do Baciginal Activ® em MRS e SFVM	7
Figura 3- Recuperação a partir do Baciginal Is® em MRS e SFV	8
Figura 4- Recuperação a partir do Baciginal IS® em MRS e SFVM	8
Figura 5- Recuperação a partir do Gynoflor® em MRS e SFV	9
Figura 6- Recuperação a partir do Gynoflor® em MRS e SFVM	9
Figura 7- Recuperação a partir do Gynophilus® em MRS e SFV	10
Figura 8- Recuperação a partir do Gynophilus® em MRS e SFVM	10
Figura 9- Recuperação a partir do Isadin α barcilus® em MRS e SFV	11
Figura 10- Recuperação a partir do Isadin α barcilus® em MRS e SFVM	11
Figura 11- Recuperação a partir do Pregyn-S® em MRS e SFV	12
Figura 12- Recuperação a partir do Pregyn-S® em MRS e SFVM	12

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características dos produtos probióticos utilizados neste estudo	3
Tabela 2 - Comparação na composição de diferentes simulantes de fluido vaginal	5
Tabela 3 - Diminuição logarítmica da recuperação de lactobacilos nas 48 horas de experiência.	13
Tabela 4 - Tabela com recuperação logarítmica média, obtidas ao T0h.	14

Lista de Acrónimos

CICS-UBI	Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior
Cp	Comprimido ou cápsula (forma farmacêutica)
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentos
MRS	Meio de cultura líquido de Main Rogosa and Sharpe
Nº	Número
OMS	Organização Mundial de Saúde
SFV	Simulante de fluido vaginal
SFVM	Simulante de fluido vaginal modificado
T0h	Tempo inicial da recuperação de lactobacilos
T48h	Tempo final da recuperação de lactobacilos
UFC	Unidades formadoras de colónias

Introdução

O conhecimento do ecossistema vaginal é fundamental para compreender a etiologia das infecções ginecológicas. Por ecossistema vaginal entende-se o conjunto dos microrganismos comensais da vagina - microbioma, os metabolitos produzidos por estes, bem como os componentes celulares e metabólicos do hospedeiro (1). O equilíbrio desta combinação é fundamental para a prevenção de infecções genitais e urinárias, podendo este ser alterado por factores endógenos, como a idade, o estado hormonal, o estado imunitário e a genética, e por factores exógenos, nomeadamente actividade sexual, fármacos, e a exposição a produtos de higiene íntima (2-4).

A promoção do equilíbrio do ecossistema vaginal está em grande parte dependente do microbioma vaginal. Este é constituído por uma vasta variedade de microrganismos, contudo, os *Lactobacillus* são os mais prevalentes em mulheres de idade fértil e saudáveis, sendo *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. iners* e *L. gasseri* os mais frequentemente isolados (1-3).

O pH ácido do ecossistema vaginal saudável, que varia entre 4 e 4.5, determina a selecção das espécies de microrganismos capazes de o colonizarem, tornando-se crucial na inibição da proliferação de microrganismos patogénicos (1, 3). Esta característica é condição e consequência de uma flora vaginal saudável, visto ser resultado da produção de ácido láctico pelos lactobacilos, ao utilizarem a glicose resultante do metabolismo das células epiteliais vaginais (1, 3, 5, 6). Adicionalmente, os *Lactobacillus* competem com espécies patogénicas por nutrientes e locais de adesão às células epiteliais e produzem produtos bacteriostáticos e bactericidas que controlam o crescimento de estirpes patogénicas (1, 3).

Pela sua importância os *Lactobacillus* têm sido os mais usados no desenvolvimento de formulações probióticas para auxiliar na prevenção e tratamento de infecções vaginais (1-3).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define probióticos como “microrganismos vivos, que quando administrados em doses adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro”. Assim, destaca-se a premissa da viabilidade dos microrganismos, da dose adequada à via de administração e do efeito pretendido (7).

Actualmente vários factores têm contribuído para aumentar o foco da atenção na área dos probióticos, em particular a multirresistência de muitos microrganismos patogénicos a antibióticos, sobretudo em hospitais, e a evidência científica e clínica da sua eficácia e segurança (8, 9).

Os probióticos podem ser classificados como suplementos alimentares ou produtos farmacêuticos, sendo os primeiros administrados por via oral e sujeitos à regulamentação e legislação imposta pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentos (FAO) e pela OMS (7, 8). Por sua vez, os probióticos farmacêuticos podem ser classificados como medicamentos ou dispositivos médicos, respeitando regulamentações mais restritas

relativamente a evidência de eficácia e segurança, incluindo a rotulagem de produto, com clara identificação das estirpes, a sua origem, o número de células viáveis, condições de conservação e posologia recomendada para o efeito terapêutico pretendido (8-10).

Nos probióticos a dose administrada está directamente relacionada e dependente da quantidade de microrganismos vivos recuperáveis, a partir da formulação no momento da administração. Relaciona-se a eficácia do produto com a capacidade destas bactérias libertadas se manterem viáveis ao longo do tempo no local e nas condições *in vivo* (8). A garantia da recuperação de células vivas e a manutenção *in vivo* dessa viabilidade é promovida pela selecção das estirpes e pela inclusão, no produto final, de compostos estimulantes da proliferação e/ou do efeito probiótico dos microrganismos, denominados de prebióticos (8, 11, 12). Um estudo de 1990 que visou a avaliação da recuperação de *Lactobacillus* a partir 16 produtos comercializados, sobretudo suplementos alimentares com indicação de promoção de uma flora vaginal saudável (iogurtes, leite, comprimidos, etc.), evidenciou que na maioria a contagem de células vivas era inferior às alegações do rótulo (13). Adicionalmente conclui que, em 11 dos 16 produtos, foram identificadas espécies distintas das indicadas na embalagem. Um outro estudo mais recente veio corroborar estes mesmos resultados, visto ter verificado que 1 em 5 dos suplementos alimentares comercializados para restabelecer a flora intestinal, apresentava recuperação de lactobacilos vivos abaixo do valor alegado na embalagem (14).

Estas evidências sublinham a necessidade de se implementar mais rigor na avaliação e garantia da qualidade dos produtos probióticos comercializados. Neste sentido, têm vindo a ser propostos movimentos internacionais de valorização da utilização dos produtos probióticos, nomeadamente com a criação do Pharmabiotic Research Institute, cujos objectivos consistem em facilitar o desenvolvimento de probióticos medicinais e adaptar a regulamentação farmacêutica europeia de forma a contemplar estes mesmos produtos (15). Alinhados com estes movimentos, pretendemos neste estudo contribuir para o estado da arte da avaliação da eficácia dos produtos probióticos de aplicação vaginal.

Desta forma, os objectivos deste estudo foram:

- avaliar a recuperação *in vitro* de lactobacilos vivos a partir de produtos farmacêuticos de aplicação vaginal;
- comparar os resultados laboratoriais de recuperação com a informação alegada para o produto;
- avaliar a viabilidade das células vivas recuperadas ao longo do tempo (48h);
- comparar a recuperação dos lactobacilos vivos em dois tipos de soluções simulantes de fluido vaginal (SFV) de modo a sustentar a escolha da melhor solução para estudos futuros.

Materiais e Métodos

Formulações probióticas

Neste estudo incluímos exclusivamente formulações probióticas de aplicação tópica vaginal. Os produtos foram pesquisados activamente no mercado farmacêutico nacional e internacional, tendo sido adquiridas formulações em farmácias portuguesas, francesas, belgas e suíças. Dos probióticos utilizados apenas um, o Gynoflor®, é reconhecido pelo Infarmed como um medicamento, sendo os restantes considerados dispositivos médicos, conforme indicado nas embalagens dos produtos. Todas as condições de armazenamento, descritas pelos fabricantes de cada produto, foram respeitadas. Na tabela 1 encontram-se as características de cada um dos probióticos utilizados nesta experiência.

Tabela 1- Características dos produtos probióticos utilizados neste estudo.

Nome Comercial	Forma Farmacêutica	Estirpe	Alegação de células viáveis por unidade de forma farmacêutica	Outras substâncias activas e excipientes	Fabricante
Baciginal Activ®	Comprimidos vaginais	<i>L. acidophilus</i>	10 ⁹	Ácido láctico	NTC (Itália)
Baciginal Is®	Comprimidos vaginais	<i>L. acidophilus</i>	5*10 ⁸	Ácido láctico, extracto de soja padronizado a 40% isoflavonas, manitol, amido, carboximetilcelulose, behenato de glicerol, e dióxido de silício	NTC (Itália)
Gynoflor®	Comprimidos vaginais	<i>L. acidophilus</i>	10 ⁷	Estriol, lactose, celulose microcristalina, estearato de magnésio, carboximetilamido sódico e hidrogenofosfato disódico.	Medinova (Suíça)

Gynophilu®	Capsulas vaginais	<i>L. rhamnosus</i>	10 ⁹	Monohidrato de Lactose	Probionov (Austria)
Isadin α barcilus®	Capsulas vaginais	<i>L. plantarum</i> P17630	10 ⁸	Triglicéridos de cadeia média, sílica coloidal; Revestimento: Gelatina, glicerol, dimetilpolisiloxano AK 1000, dióxido de titânio E171, etilo p-oxibenzoato sódico, propilo p-oxibenzoato sódico.	Proge Farme (Itália)
Pregyn-S®	Comprimidos vaginais	<i>L. acidophilus</i>	5*10 ⁸	Acido láctico, isoflavonas de soja, manitol, amido, carboximetilcelulose, behenato de glicerol, e dióxido de silício.	S.I.I.T. (Itália)

Meios de cultura e soluções

Para a dispersão das formulações foram utilizadas três tipos de soluções diferentes: o meio de cultura líquido Main Rogosa (MRS; Prolabo, Bélgica) que foi utilizado como controlo; e duas soluções distintas de simulantes de fluido vaginal (SFV) descritos na tabela 2. O SFV é o mais genericamente utilizado em estudos de produtos de aplicação vaginal, simulando principalmente a osmolaridade e pH vaginal; o SFVM é uma modificação do primeiro, com adição de glicogénio, mucina e concentrações maiores de glicose, como se observa na tabela 2 (16, 17).

A contagem de células vivas de lactobacilos ao longo do tempo foi realizada no meio de cultura MRS aditivado de agar (Pronadisa, Espanha).

Tabela 2 - Comparação na composição de diferentes simuladores do fluido vaginal (16, 17).

^a-O fluido vaginal real tem outros compostos não detalhados na tabela: imunoglobulinas, proteínas, péptidos, aminoácidos, etc. (16).

^b-Simulante de fluido vaginal sugerido por Owen e Katz (17).

^c-Simulante de fluido vaginal modificado proposto por Nader-Macias (16).

Componente	Fluido vaginal ^a (g/l)	SFV (g/l) ^b	SFVM (g/l) ^c
Glicose (Fisher Chemical, Inglaterra)	6,2-10	5	10
Glicogénio (USB, USA)	15	-	10
Glicerol (Acofarma, Espanha)	0,16	0,16	-
Ácido láctico (Sigma-Aldrich, USA)	0,9-4,0	2	2
Ácido acético (Sigma-Aldrich, Alemanha)	0,52	1	1
Albumina (Sigma-Aldrich, USA)	0,018-3,75	0,018	2
Mucina (Sigma-Aldrich, USA)	0,25	-	0,25
Ureia (Acros organics, USA)	0,49	0,40	0,50
Cloreto de Sódio (Fisher Chemical, Inglaterra)	Na ⁺ : 1-1,95; Cl ⁻ : 2,20-2,94	-	-
Cloreto de Potássio (Panreac, Espanha)	K ⁺ : 0,55-1,17	-	-
Hidróxido de Potássio (Pronalab, Portugal)	-	1,4	-
Hidróxido de Cálcio (Acros organics, USA)	-	0,222	-
Tween 80 (Sigma-Aldrich, Suíça)	-	-	1,064
Cisteína (Acros organics, USA)	-	-	0,50
pH	Normal: <4,5	4,2	4,25±0,05

Método

Um comprimido /cápsula (cp) de produto probiótico foi disperso em 6 ml de SFV, um em 6 ml de SFVM e para cada uma destas dispersões utilizou-se como controlo uma solução de 6 ml MRS à qual se adicionou um cp. Depois de completamente disperso o conteúdo do produto, procedeu-se à diluição de 20 µl de cada tubo em 180 µl de água destilada estéril (CICS-UBI), e realizadas diluições de 10⁻¹ até 10⁻⁶. Este procedimento foi efectuado às 0, 6, 12,

24 e 48 horas de incubação, visto que as dispersões preparadas para cada produto nas diferentes soluções descritas foram incubadas a 37°C numa atmosfera com 10% de CO₂ e 21% de O₂. De cada uma das diluições preparadas em cada momento, 4 µl foram repicados em quadriplicado para placas de MRS aditivado de agar (Pronadisa, Espanha) e as placas incubadas nas mesmas condições de temperatura e atmosfera descritas acima e durante 48h. Após o tempo de incubação, foram contabilizadas as unidades formadoras de colónias (UFC) observadas em cada diluição.

As experiências foram repetidas para cada produto em dois ensaios independentes. Os resultados são apresentados, após cálculo de média e desvio padrão de UFC/cp, em logaritmo. A recuperação de UFC/cp ao tempo inicial (T0) em cada uma das soluções de SFV, foi também calculada em valor percentual, tendo por referência o valor de recuperação obtido no controlo (meio MRS).

Resultados

Para cada formulação estudada são apresentados dois gráficos comparativos entre a recuperação de UFC/forma farmacêutica (cp) em SFVsMRS e SFVMvsMRS. Em cada gráfico encontra-se assinalada a verde o nº de células vivas de lactobacilos alegadas na embalagem de cada produto.

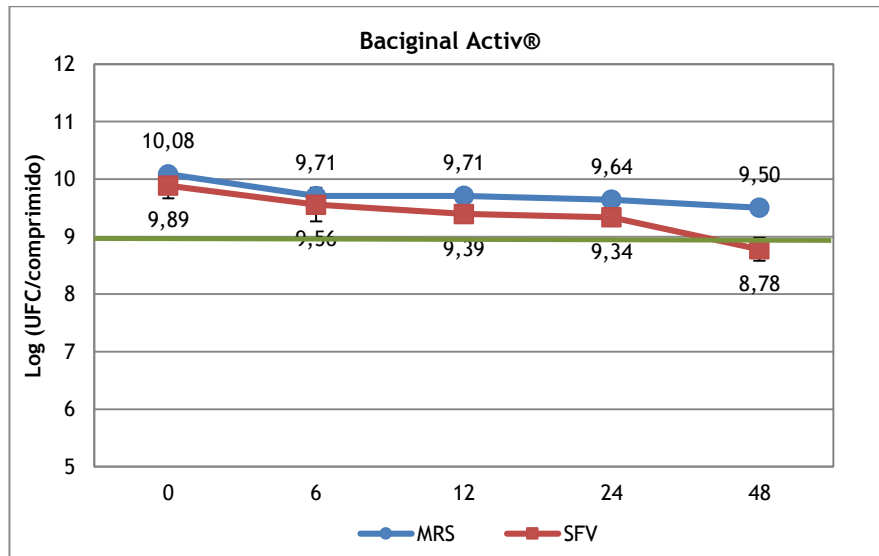


Figura 1- Recuperação de Lactobacillus a partir do Baciginal Activ® em MRS, SFV e UFC/cp alegadas no produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFV abaixo dos respectivos pontos.

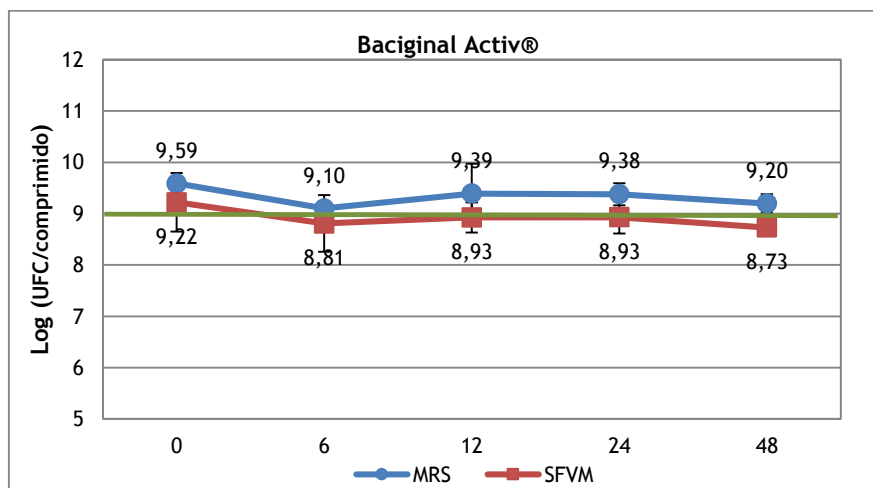


Figura 2 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Baciginal Activ® em MRS, SFVM e UFC/cp, alegadas no produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFVM abaixo dos respectivos pontos.

A recuperação de microrganismos a partir do Baciginal Activ® foi, ao T0h, superior aos 1000 milhões de UFC/cp alegado pelo produto, em MRS e em ambas as soluções de simulantes (SFV e SFVM) (gráficos 1 e 2). As recuperações de células vivas, no momento inicial, a partir das dispersões nas soluções SFV e SFVM corresponderam a 63,3% e 61,7% das obtidas no MRS, respectivamente. Ao longo das 48h de ensaio a recuperação de células viáveis foi reduzindo gradualmente, verificando-se que ao T48h esta correspondia a 22,9% da obtida no MRS para o SFV e a 14,3% para o produto disperso em SFVM. Efetivamente, a recuperação obtida por dispersão do produto em SFV manteve-se acima do valor alegado para o produto até ao T24h (gráfico 1). Em contraste, no ensaio de recuperação em SFVM os valores foram oscilando mais próximos do limite de alegação, sendo o valor final em T48h semelhante ao obtido para o ensaio em SFV (gráfico 2).

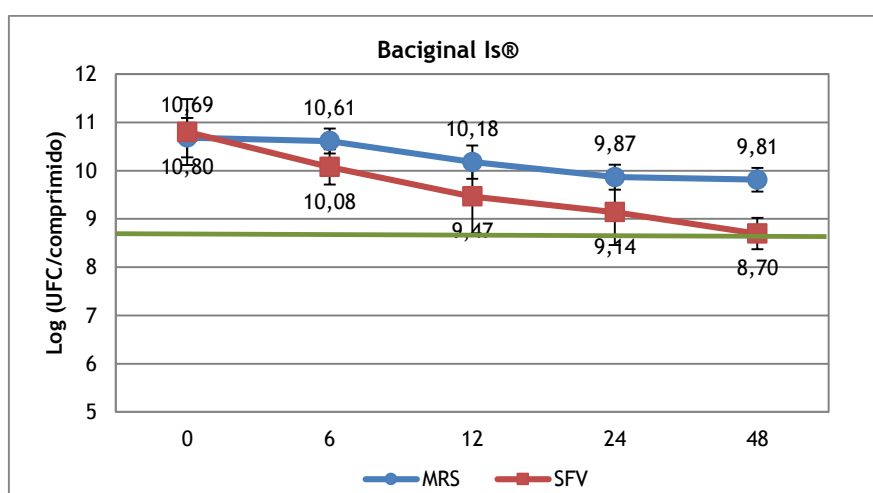


Figura 3 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Baciginal Is® em MRS, SFV e UFC/cp alegadas no produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFV abaixo dos respectivos pontos.

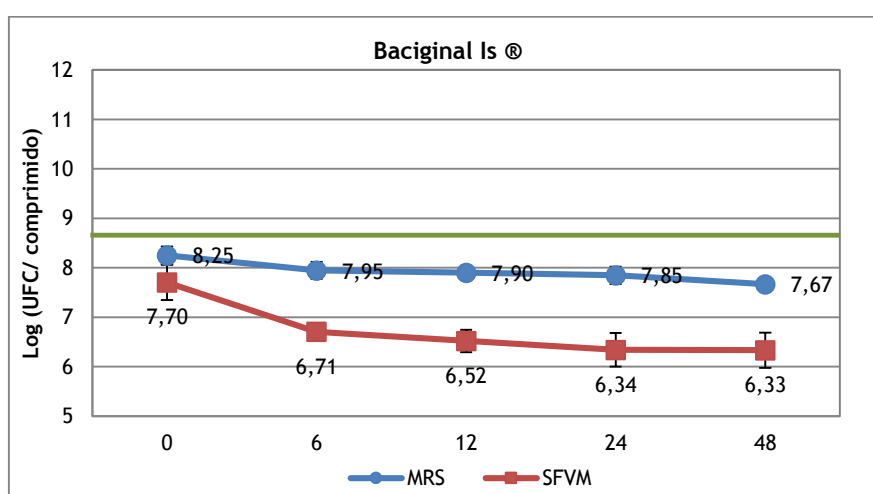


Figura 4 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Baciginal Is® em MRS, SFVM e UFC/cp alegadas no produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS à direita e do SFVM abaixo dos respectivos pontos.

A recuperação de lactobacilos vivos a partir do Baciginal Is® foi superior aos 500 milhões de UFC/cp alegado no produto, em MRS e SFV (gráfico 3). No entanto, este valor não foi verificado nas experiências efectuadas para o SFVM (gráfico 4). Apesar deste desvio, parece ocorrer uma tendência coincidente em ambos os ensaios no que diz respeito à redução do nº de células vivas ao longo do tempo. Efetivamente ao T0h a recuperação de células vivas foi coincidente para o MRS e SFV verificando-se que após 48h de incubação o valor para este último era de 8,49% da recuperação obtida no controlo (MRS). Por outro lado, a recuperação média em SFVM ao T0h foi 31,95% do MRS, e ao T48h foi 3,93% do MRS.

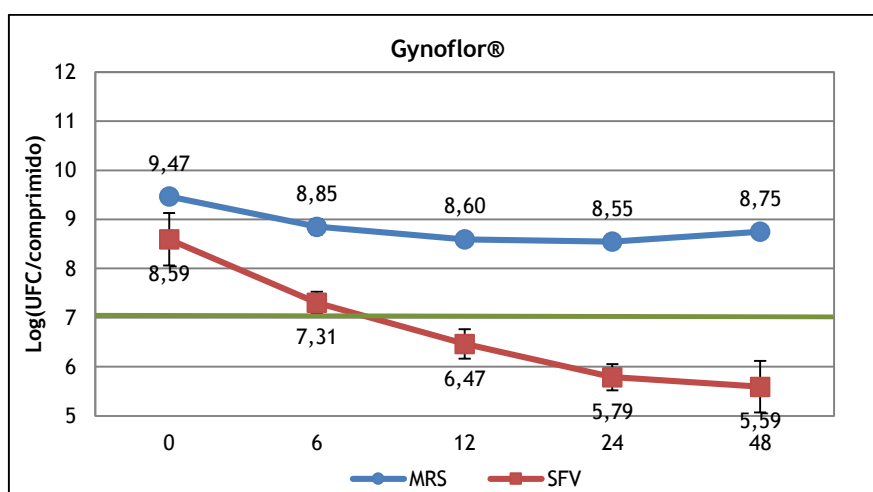


Figura 5 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Gynoflor® em MRS, SFV e UFC/cp alegadas no produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFV abaixo dos respectivos pontos.

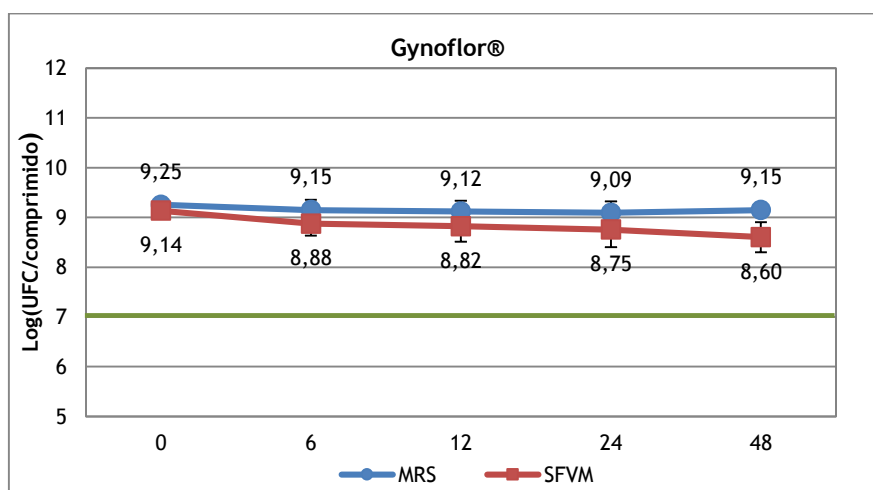


Figura 6 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Gynoflor® em MRS, SFVM e UFC/cp alegadas no produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFVM abaixo dos respectivos pontos.

A recuperação obtida a partir do Gynoflor® foi superior aos 10 milhões de UFC por comprimido vaginal alegado pelo produto, em MRS e em ambas as soluções de simulantes

vaginais ao T0h (gráficos 5 e 6). As contagens de UFC/cp em SFV obtida no tempo inicial foi de 13,4% da obtida em MRS, enquanto que ao T48h foi de 0,07%. A recuperação obtida por dispersão do produto em SFV manteve-se acima do valor alegado para o produto até ao T6h (gráfico 5), verificando-se no T12h uma redução para valores abaixo dos alegados na embalagem do medicamento. Em contraste, no ensaio de recuperação em SFVM a recuperação de microrganismos foi sempre superior ao alegado no produto (gráfico 6). A recuperação em SFVM foi de 76,15% do MRS no T0h, enquanto que no T48h foi de 28,5%.

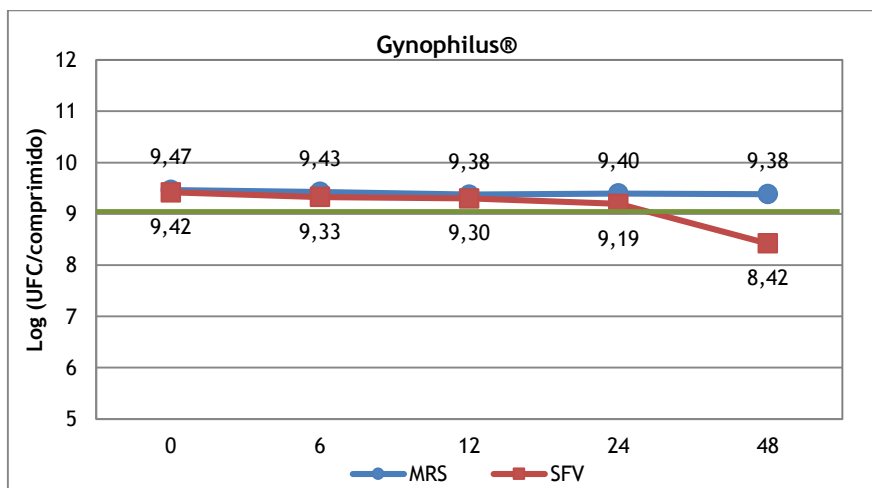


Figura 7 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Gynophilus® em MRS, SFV e UFC/cp alegadas no produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFV abaixo dos respectivos pontos.

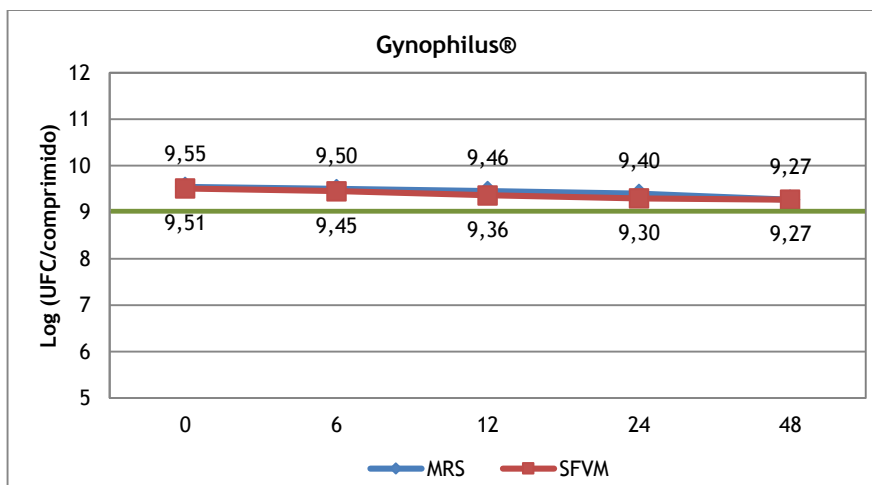


Figura 8 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Gynophilus® em MRS, SFVM e UFC7cp alegadas pelo produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFVM abaixo dos respectivos pontos.

A recuperação de Lactobacillus a partir do Gynophilus® foi superior aos 1000 milhões de UFC por cápsula vaginal alegado pelo produto, em MRS e em ambos os simulantes como pode ser observado nos gráficos 7 e 8. Em SFV apenas no T48h a recuperação foi inferior à

alegada. A contagem de UFC/cp em SFV obtida no tempo inicial (T0h) foi 89,4 % da obtida para o MRS enquanto que no T48h foi de 11,6%. Em SFVM toda a recuperação obtida estava acima da concentração de células referidas na embalagem do produto, tendo-se obtido uma recuperação média de 92,3% do MRS no T0h, e de 100% no T48h.

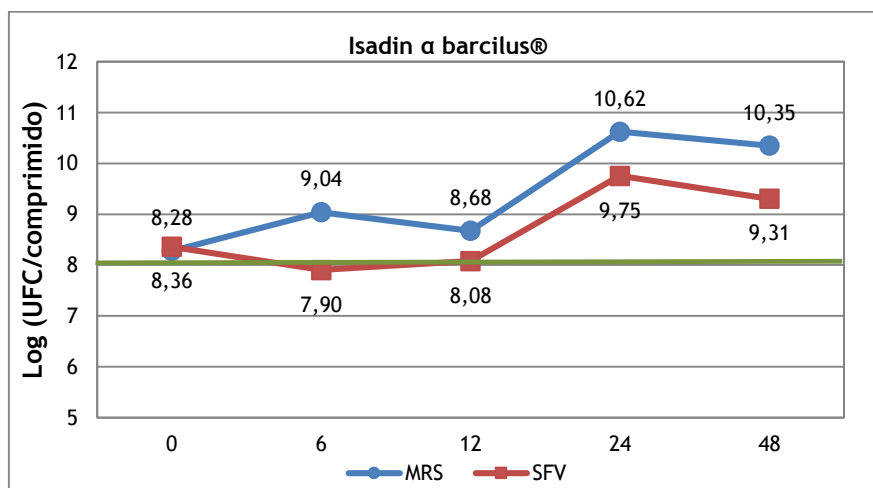


Figura 9 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Isadin α barcilus® em MRS, SFV e UFC por comprimido, alegadas pelo produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFV abaixo dos respectivos pontos.

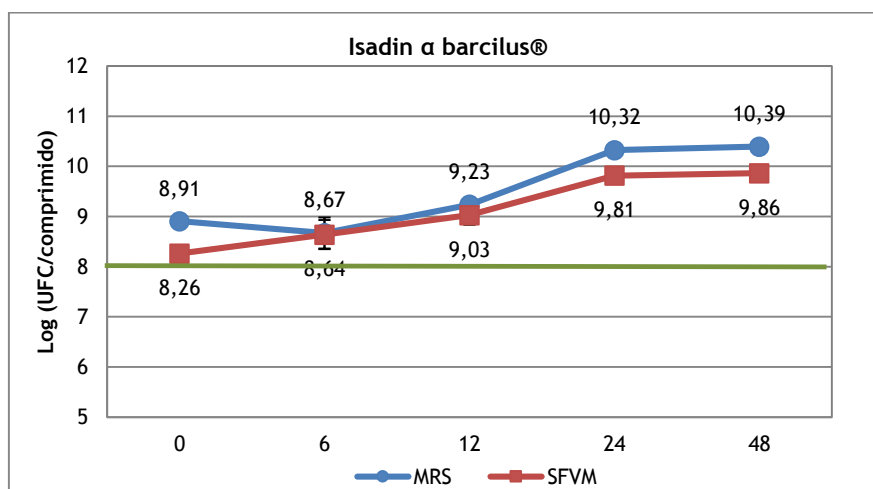


Figura 10 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Isadin α barcilus® em MRS, SFVM e UFC por comprimido, alegadas pelo produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFVM abaixo dos respectivos pontos.

A alegada recuperação a partir do Isadin α barcilus® é de pelo menos 100 milhões de UFC por cápsula vaginal. Obteve-se uma recuperação superior a esse valor quer em MRS, quer em SFV e SFVM, no T0h como pode ser observado nos gráficos 9 e 10. A recuperação média obtida em SFV ao T0h foi de 120% do MRS e no T48h foi de 9%. A observação do gráfico 9 permite verificar uma inconstância na recuperação de células vivas a partir do produto, ao longo do tempo, observando-se uma inversão no nº de células recuperado ao T6h-T12h que

encontra paralelismo nos dois meios de recuperação usados. Contrariamente, em SFVM todas as recuperações foram superiores às alegadas pelo produto, sendo que no T0h obteve-se 22,3% do MRS e no T48h 29,4%. Salienta-se, mais uma vez, a semelhança do padrão de recuperação de células vivas a partir das duas soluções de dispersão utilizadas (MRS e SFVM).

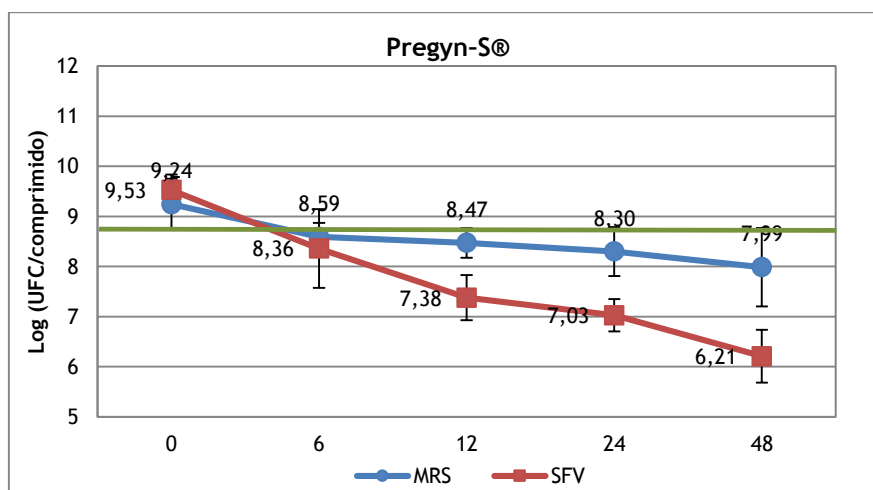


Figura 11 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Pregyn-S® em MRS, SFV e UFC por comprimido, alegadas pelo produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFV à esquerda dos respectivos pontos.

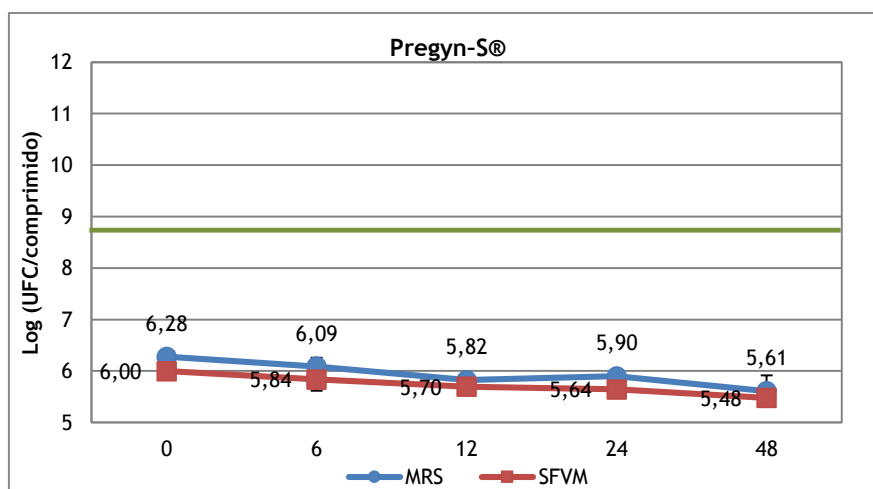


Figura 12 - Recuperação de Lactobacillus a partir do Pregyn-S® em MRS, SFVM e UFC por comprimido, alegadas pelo produto, a verde. Apresentam-se os valores, em logaritmo, do MRS em cima e do SFVM à esquerda dos respectivos pontos.

A recuperação de microrganismos ao T0h a partir do Pregyn-S® foi superior em MRS e SFV aos 500 milhões de UFC por comprimido vaginal alegado pelo produto, verificando-se que a recuperação média no SFV foi de 137,9 % do MRS, e ao T48h foi de 0,97% do MRS.

A partir do T6 horas, quer em MRS, quer em SFV a recuperação obtido é inferior à alegada pelo produto como se pode observar no gráfico 11. A recuperação em MRS e SFVM foi inferior à alegada como se pode observar no gráfico da figura 12. Obteve-se ao T0h uma recuperação em SFVM de 53,8% do MRS e ao T48h de 63,4%.

De modo a objectivar a avaliação das reduções logarítmicas nos diferentes produtos e nas diferentes soluções de dispersão ao longo das 48h de estudo, estabelecemos um cutoff de 1 logaritmo na diferença obtida ao T48h relativamente ao resultado de T0h, apresentando na Tabela 3 a redução acima ou abaixo deste cutoff de acordo com os resultados obtidos.

Tabela 3 - Diminuição logarítmica da recuperação de lactobacilos nas 48 horas de experiência.

^a-MRS correspondente ao SFV;

^b- MRS correspondente ao SFVM.

Diminuição logarítmica da recuperação nas 48 horas			
Probióticos	SFV	SFVM	MRS^{a/b}
Baciginal Activ®	>1	<1	≤1/≤1
Baciginal Is®	>1	>1	≤1/≤1
Gynoflor®	>1	<1	≤1/≤1
Gynophilus®	>1	<1	≤1/≤1
Isadin α barcilus®	<1	<1	≤1/≤1
Pregyn-S®	>1	<1	≤1/≤1

Na Tabela 4 apresentamos o resumo das recuperações de lactobacilos nas soluções de simulante vaginal utilizadas ao T0h, de modo a permitir a comparação entre os resultados médios obtidos em ambos os casos, para cada formulação.

Tabela 4 - Tabela com recuperação logarítmica média obtidas ao T0h.

Produto	SFV	SFVM	Estirpe
Baciginal Activ®	9,89	9,22	<i>L. acidophilus</i>
Baciginal Is®	10,80	7,70	<i>L. acidophilus</i>
Gynoflor®	8,59	9,14	<i>L. acidophilus</i>
Gynophilus®	9,42	9,51	<i>L. rhamnosus</i>
Isadin α barcilus®	8,36	8,26	<i>L. plantarum</i>
Pregyn-S®	9,53	6	<i>L. acidophilus</i>

Discussão

A evidência científica e clínica quanto à eficácia, efectividade e segurança de algumas estirpes probióticas, assim como movimentos de promoção da valorização dos probióticos com base em evidência científica, têm contribuído de forma preponderante para a valorização terapêutica dos mesmos. A prescrição clínica de produtos probióticos é baseada na evidência científica, clínica e/ou laboratorial, que garanta ao médico dados sobre o benefício que estes produtos trazem para os seus pacientes.

Estudos *in vitro* da viabilidade de estirpes lactobacilares veiculadas em produtos comercializados podem contribuir para aumentar o conhecimento sobre a possível eficácia destes produtos. A selecção da estirpe probiótica é um dos passos fundamentais no desenvolvimento do produto. Estudos relativos à adesão às células epiteliais vaginais e cervicais, a produção de peróxido de hidrogénio e bacteriocinas, a resistência a espermicidas e produtos de higiene íntima são efectuados sobre as estirpes seleccionadas de modo a definir a melhor candidata à inclusão no produto final (18). Adicionalmente são também efectuados estudos de segurança, de modo a garantir um reduzido potencial patogénico, pesquisando-se genes de resistência a antibióticos e a capacidade da estirpe probiótica para coexistir com a flora vaginal normal (18). Contrariamente ao que seria de esperar na escolha de uma estirpe para recolonização de um ambiente natural, verifica-se que as estirpes mais utilizadas nas formulações probióticas não são as mais prevalentes na flora vaginal saudável. Efectivamente, a estirpe mais utilizada em probióticos de aplicação vaginal e presente em 4 dos 6 probióticos utilizados neste estudo, é o *L. acidophilus*. Talvez o facto de este ter sido considerado o microrganismo mais comum na flora vaginal durante vários anos, possa explicar este uso “clássico” desta espécie como probiótica vaginal. No entanto, estudos sobre a flora vaginal humana utilizando métodos moleculares vieram mostrar que esta não é das espécies mais prevalentes na flora vaginal saudável. Apesar disso, continua a ser utilizada em larga escala provavelmente por apresentar muitas das características ideais descritas para uma boa espécie probiótica.

Independentemente do uso de estirpes da mesma espécie, o que à partida garantiria uma homogeneidade de resultados, visto os mecanismos de probiose serem estirpe-dependentes, verifica-se que os produtos probióticos apresentam perfis de recuperação diferentes dada a influência adicional de outros factores, nomeadamente os prebióticos, para o resultado final. Este estudo parece corroborar isso mesmo, visto que os dois produtos da mesma casa comercial incluídos neste trabalho, que apresentando a mesma espécie e potencialmente será da mesma estirpe (Baginal Activ®, Baciginal Is®), apresentaram perfis de variação e recuperação ao longo do tempo diferentes, conforme exemplificado nos respectivos gráficos e resumido nas tabelas 3 e 4. Por outro lado, atentando apenas aos produtos com recuperação superior à alegada, independentemente da espécie, e comparando

especificamente cada produto nos dois simulantes, constata-se que a diferença no T0h é em todos inferior a um logaritmo (tabela 4), sugerindo assim que no início da recuperação a diferença entre o SFV e SFVM não seja significativa.

Estudos realizados *in vitro* deverão procurar utilizar a totalidade do produto, garantindo a avaliação do efeito da estripe e dos compostos da formulação que influenciam a viabilidade da mesma. Adicionalmente, também a composição do fluido vaginal parece ter influência sobre os resultados de viabilidade dos microrganismos probióticos. Neste estudo a recuperação de lactobacilos foi efectuada, não só numa solução controlo que serviu de comparação padrão (MRS), como também em dois simulantes vaginais distintos. O SFV é o mais utilizado por ter sido o primeiro a ser proposto, sendo reportado em diversos estudos de ensaio de microbicidas e produtos probióticos (17). O SFVM é uma adaptação do primeiro, aproximando-o, pelo ajuste da sua composição química, do simulante vaginal encontrado na mulher saudável e em idade fértil. A comparação destes dois meios simulantes permitiu-nos compreender a influência que estes compostos parecem ter na viabilidade de algumas estirpes probióticas, como se explicitará posteriormente.

A recuperação em MRS, meio ideal de crescimento dos *Lactobacillus*, é na maioria dos casos superior à obtida nos meios simulantes utilizados. Comparando as recuperações ao longo das 48 horas em SFV e SFVM, a diminuição logarítmica ao longo das 48 horas é menor no SFVM que no SFV para a maioria dos probióticos. Assim, atentando à tabela 3 observa-se que a diminuição da recuperação em SFVM, ao longo do tempo, é menor que 1 logaritmo em todos os probióticos à excepção do Baciginal Is®, em que a recuperação em SFVM é ligeiramente superior a esse valor, sendo no entanto superior a 2 logaritmos no SFV. Poderá ter influenciado este resultado relativo ao Baciginal Is® o facto de ser um lote diferente ou a proximidade do final do prazo de validade definido na embalagem (2 meses). De facto, este estudo corrobora o trabalho de Nader-Macias (16) em que um meio mais semelhante ao simulante vaginal real com glicogénio, mucina e concentrações maiores de glicose promovem recuperações maiores e mais próximas do MRS ao longo das 48 horas de estudo, como pode ser observado tabela 3 e nos diversos gráficos, mas não inicialmente no T0h (tabela 4). O SFVM parece apresentar-se como uma solução mais próxima do fluido vaginal humano e, por conseguinte, o seu efeito mimetizador poderá ser considerado mais real do que o do SFV. Estes resultados deverão ser tomados em consideração na escolha da solução para dispersão de produtos probióticos em estudos *in vitro*.

O único probiótico deste estudo em que a recuperação foi aumentando ao longo das 48 horas foi o Isadin α barcilus®. O perfil de libertação prolongada não está descrito, sendo necessários mais estudos relativamente a este produto especificamente, pois provavelmente o tipo de formulação (cápsulas vaginais de gelatina com conteúdo oleoso) poderá ser o factor influenciador deste resultado. No entanto, deve-se também considerar o facto de se tratar de um *L. plantarum*, que apresenta, pela nossa experiência, um bom perfil de multiplicação *in vitro*.

Um outro objectivo deste trabalho de investigação foi comparar a recuperação de células vivas obtidas laboratorialmente com a alegada na embalagem do produto. Assim, a maioria dos produtos testados tiveram recuperações ao T0 horas superiores às preconizadas pelos probióticos, à excepção do Baciginal Is® em SFVMvsMRS e do Pregyn-S® em MRSvsSFVM. Nestes dois ensaios a recuperação mostrou-se inferior ao valor preconizado, como se pode observar nos gráficos 4 e 12 respectivamente, apesar de os produtos se encontrarem no período de validade, de se terem respeitado as condições de armazenamento e de já terem sido obtidas recuperações superiores às alegadas na embalagem em SFVvsMRS. Relativamente ao Pregyn-S® as experiências foram repetidas utilizando sempre o mesmo lote, apesar de não apresentadas, verificando-se uma gradual perda de viabilidade ao longo do tempo, provavelmente relacionada com a aproximação do fim do prazo de validade (4 meses), embora este nunca tenha expirado durante o período do estudo. Relativamente ao Baciginal Is® utilizaram-se lotes diferentes para obtenção dos gráficos em SFV e SFVM, não tendo sido possível repetir as experiências porque a comercialização do produto foi descontinuada. No entanto, também o produto utilizado para obtenção do gráfico 4 (Baciginal Is® MRSvsSFVM) se encontrava próximo do fim do prazo de validade. Desta forma, estes resultados parecem evidenciar a necessidade de efectuar ensaios rigorosos para garantir a qualidade dos lotes e a estabilidade do produto durante todo o seu período preconizado de uso.

Comparando com o estudo de 1990 (13), onde a maioria das recuperações eram inferiores às alegadas, neste trabalho de investigação parece haver mais consistência entre as UFC preconizadas e as obtidas. No seguimento desse mesmo estudo, seria importante averiguar a identidade das estirpes presentes em cada um dos probióticos utilizados, mas esse não foi objectivo deste trabalho.

Embora a manutenção da viabilidade ao longo do tempo seja um fator importante, este não é indicador absoluto da eficácia do produto. Desta forma, a capacidade das estirpes manterem a expressão dos seus mecanismos de probiose após recuperação é também importante, e um factor a avaliar, no entanto não fez parte dos objectivos deste estudo. Sendo, normalmente estes produtos de dose única diária, a sua viabilidade às 24h é mais determinante do que o valor recuperado às 48h. No entanto, pretendemos também avaliar a influência do tempo de modo a eventualmente sustentar a prescrição por vezes proposta de 3 administrações por semana. Para além de indicar o nº de células viáveis, a indústria farmacêutica deverá evoluir, desenhando estudos que permitam indicar qual o nº de células vivas necessárias para assegurar o efeito probiótico do seu produto. Só assim estes produtos poderão evoluir no futuro, para uma redução do nº total de células vivas veiculadas, caso se conclua que o nº total para garantir a eficácia seja menor.

Em suma, os produtos probióticos têm um enorme potencial, sobretudo devido à evidência científica da sua eficácia e segurança. No entanto, cada produto tem uma individualidade única, sendo por isso necessários estudos específicos, que caracterizem cada um deles de forma a comprovarem a sua eficácia clínica.

Conclusões

Este estudo pretendeu contribuir para o estado da arte com o intuito de avaliar a eficácia dos produtos probióticos de aplicação vaginal. Desta forma, com este trabalho concluiu-se, não só que todos os produtos estudados cumprem com a alegação de células vivas descrita na embalagem, mas também que o SFVM, quimicamente mais próximo do fluido vaginal humano, poderá ser considerado mais apropriado do que o do SFV no que concerne à recuperações de lactobacilos ao longo do tempo. No entanto, para o T0h não parece haver grande diferença entre SFV e SFVM.

Em estudos futuros será importante incluir a totalidade dos probióticos de forma a obter resultados fidedignos e completos acerca dos produtos, identificar todas as estirpes de microrganismos isoladas nestes produtos e elaborar estudos rigorosos relativos à estabilidade dos probióticos para garantir a sua qualidade durante todo o período de uso. De forma a contribuir para o conhecimento da eficácia destes produtos, deverão elaborar-se estudos para determinar a capacidade das estirpes manterem a expressão dos seus mecanismos de probiose após recuperação.

A indústria farmacêutica deve evoluir, desenhando estudos que permitam indicar qual o nº de células vivas necessárias para assegurar o efeito probiótico do seu produto, para que, também os produtos probióticos evoluam no futuro.

De facto, os probióticos são produtos com um grande potencial, mas cada produto tem uma individualidade única não extrapolável para outro semelhante, e por isso são necessários estudos individualizados, em condições que mimetizem, como este estudo, as condições de aplicação *in vivo* de modo a comprovarem e afirmarem a sua eficácia clínica, e desta forma promover a sua utilização pela comunidade médica.

Bibliografia

1. Boris S, Barbés C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection*. 2000;2(5):543-6.
2. Mastromarino P, Vitali B, Mosca L. Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. *New Microbiol*. 2013;36(3):229-38.
3. Borges S, Silva J, Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2014;289(3):479-89.
4. Mirmonsef P, Hotton AL, Gilbert D, Burgad D, Landay A, Weber KM, et al. Free Glycogen in Vaginal Fluids Is Associated with Lactobacillus Colonization and Low Vaginal pH. *PloS one*. 2014;9(7):e102467.
5. Jaisamrarn U, Triratanachat S, Chaikittisilpa S, Grob P, Prasauskas V, Taechakraichana N. Ultra-low-dose estriol and lactobacilli in the local treatment of postmenopausal vaginal atrophy. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2013;16(3):347-55.
6. Spear GT, French AL, Gilbert D, Zariffard MR, Mirmonsef P, Sullivan TH, et al. Human α -amylase present in lower genital tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by Lactobacillus. *Journal of Infectious Diseases*. 2014:jiu231.
7. Organization WH. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2006.
8. McFarland LV, Elmer GW. Pharmaceutical probiotics for the treatment of anaerobic and other infections. *Anaerobe*. 1997;3(2-3):73-8.
9. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical microbiology reviews*. 2003;16(4):658-72.
10. INFARMED I. Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento: IP; 2008 [cited 2015 18/04/2015]. Available from: https://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/S_AIBA_MAISSOBRE/SAIBA_MAISSOBRE_ARQUIVO/Dispositivos_Medicos.pdf.
11. Mugambi MN, Musekiwa A, Lombard M, Young T, Blaauw R. Synbiotics, probiotics or prebiotics in infant formula for full term infants: a systematic review. *Nutrition journal*. 2012;11:81.
12. Reid G. The importance of guidelines in the development and application of probiotics. *Current pharmaceutical design*. 2005;11(1):11-6.
13. Hughes VL, Hillier SL. Microbiologic characteristics of Lactobacillus products used for colonization of the vagina. *Obstetrics and gynecology*. 1990;75(2):244-8.
14. Goldstein EJ, Citron DM, Claros MC, Tyrrell KL. Bacterial counts from five over-the-counter probiotics: Are you getting what you paid for? *Anaerobe*. 2014;25:1-4.

15. Pharmabiotic Research Institute [internet]. 2014 [updated 2014; cited 2015 18/04/2015]. Available from: www.pharmabiotic.org.
16. Tomás MSJ, Nader-Macías ME. Effect of a medium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic lactobacilli. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007;2:732-9.
17. Owen DH, Katz DF. A vaginal fluid simulant. *Contraception*. 1999;59(2):91-5.
18. Harzallah D, Belhadj H. Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. 2013:197-217.