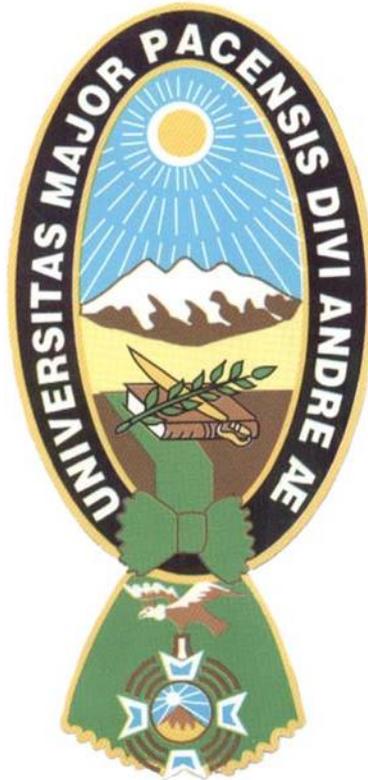


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS



**ELABORACION DE UN RESTAURADOR DE  
MICROBIOTA UROGENITAL CON ACTIVIDAD  
ANTAGONICA CONTRA CEPAS BACTERIANAS  
AISLADAS DE PROCESOS DE INFECCION  
UROGENITAL**

“Tesis presentada para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica”

Elaborado por: Univ. Andrea Daniela del Castillo Salinas

Asesoras: María Teresa Álvarez Aliaga PhD

Carla Crespo Melgar PhD

LA PAZ-BOLIVIA  
2017

## DEDICATORIA

*A Dios y a mi mama por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, que supo darme fuerza para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban.

A la ilustre Universidad Mayor de San Andrés, por haberme acogido durante estos años.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas para poder realizar la tesis de investigación.

A mis queridas asesoras, Dra. Carla Crespo Melgar y Dra. María Teresa Álvarez, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, así como también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

Finalmente, a mi hermano y a mi familia, por darme tanto aliento durante estos años.

## Tabla de Contenido

Pag.

<b>1. Planteamiento del problema</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Justificación</b> .....	<b>1</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>2</b>
Objetivo General .....	2
Objetivos Específicos .....	2
<b>4. Diseño Teórico</b> .....	<b>3</b>
Marco Referencial .....	3
Descripción del ámbito de estudio .....	3
<b>5. Marco Teórico</b> .....	<b>4</b>
<b>6. Marco Conceptual</b> .....	<b>10</b>
<b>7. Formulación de la hipótesis de investigación</b> .....	<b>11</b>
<b>8. Operacionalización de las variables en estudio</b> .....	<b>12</b>
<b>9. Diseño metodológico</b> .....	<b>12</b>
Población en estudio, ámbito y periodo de investigación .....	12
Tipo de investigación .....	13
<b>10. Materiales y métodos</b> .....	<b>13</b>
Condiciones de cultivo de cepas probióticas ( <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> ) y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital.....	16
Evaluación del control axenico de <i>L. casei sp rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital.....	17
Criopreservación de <i>L. casei sp rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital.....	17
Caracterización morfológica de <i>L. casei sp rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital.....	18
Caracterización bioquímica de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> .....	18
Determinación de parámetros cinéticos durante el crecimiento de <i>L. casei sp rhamnosus</i> .....	18
Perfil de resistencia antimicrobiana de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital.....	19
Determinación de Actividad Antagónica .....	19
Estandarización de técnicas para evaluar la actividad antagónica .....	19
Evaluación de la actividad antagónica en placa: <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> contra cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital	20

Evaluación de la actividad antagónica en microplaca empleando sobrenadantes de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> contra cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital .....	20
Evaluación de la actividad antagónica empleando co-cultivo de <i>L. casei sp rhamonosus</i> contra cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital .....	21
Formulación y evaluación del formulado probiótico vaginal con <i>L. casei rhamnosus</i> .....	22
Formulado probiótico vaginal con células activas de <i>L. casei sp rhamnosus</i> inmovilizadas .....	22
Formulado probiótico vaginal con células liofilizadas de <i>L. casei sp rhamnosus</i> .....	22
Evaluación de la actividad antagónica del formulado probiótico vaginal con <i>L. casei rhamnosus</i> inmovilizado y liofilizado .....	23
Evaluación de los formulados probióticos: <i>L. casei sp rhamnosus</i> activo e inmovilizado (Formulado 1) y liofilizado de <i>L. casei sp rhamnosus</i> (Formulado 2) .....	23
Ensayos organolépticos de los formulados probióticos 1 y 2 .....	23
Ensayos geométricos y uniformidad de peso de los formulados probióticos 1 y 2 .....	23
Perfiles de liberación in vitro y evaluación de la viabilidad de <i>L. casei rhamnosus</i> a partir de los formulados probióticos 1 y 2.....	24
Ensayos Microbiológicos .....	24
Recuento de microorganismos aerobios totales y de mohos levaduras .....	24
Recuento de <i>Escherichia coli</i> .....	24
<b>11. Procesamiento de los datos</b> .....	25
Recolección .....	25
Elaboración.....	25
Análisis Estadístico .....	25
<b>12. Resultados y discusión</b> .....	25
Caracterización de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> .....	25
Caracterización bioquímica de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> .....	27
Determinación de parámetros cinéticos durante el crecimiento de <i>L. casei sp rhamnosus</i> .....	28
Perfil de resistencia antimicrobiana de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> ....	30
Características morfológicas y fisiológicas de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina .....	31
Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina ..	32
Determinación de Actividad Antagónica .....	33

Pruebas de actividad antagónica en Placa: <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> contra cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital.....	33
Pruebas de actividad antagónica en microplaca empleando sobrenadante <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> contra cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital.....	35
Prueba de actividad antagónica empleando co-cultivo <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>E. coli</i> .....	38
Prueba de actividad antagónica empleando co-cultivo <i>L. casei sp rhamonosus</i> con cepas que conforman la microbiota normal de la vagina y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital .....	40
Formulación y Evaluación de un formulado probiótico vaginal con <i>L. casei rhamnosus</i> .....	43
Formulado probiótico vaginal con células activas de <i>L. casei sp rhamnosus</i> inmovilizadas .....	43
Formulado probiótico vaginal con células liofilizadas de <i>L. casei sp rhamnosus</i> .....	44
Evaluación de la actividad antagónica de un formulado probiótico vaginal con <i>L. casei rhamnosus</i> inmovilizado y liofilizado .....	44
Características de los formulados probióticos: Inmovilizado de células activas inmovilizadas (Formulado 1) y liofilizado de <i>L. casei sp rhamnosus</i> (Formulado 2) .....	45
Características organolépticas de los formulados probióticos 1 y 2 .....	45
Características Geométricas y Uniformidad de Peso de los Formulados Probióticos 1 y 2.....	46
Perfiles de liberación in vitro de <i>L. casei rhamnosus</i> a partir de los Formulados probióticos 1 y 2.....	47
Control microbiológico de los formulados probióticos 1 y 2.....	48
<b>13. Conclusiones .....</b>	<b>49</b>
<b>14. Bibliografía .....</b>	<b>50</b>

<b><u>Índice de Tablas</u></b>	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1.</b> Caracterización bioquímica de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> .....	<b>28</b>
<b>Tabla 2.</b> Parámetros cinéticos de la curva de crecimiento de <i>L. casei sp rhamnosus</i> .....	<b>29</b>
<b>Tabla 3.</b> Perfil de resistencia antimicrobiano de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>L. acidophilus</i> .....	<b>30</b>
<b>Tabla 4.</b> Caracterización morfológica de Cepas de bacterias aisladas en procesos de infección urogenital, cultivos enriquecidos en medio BHI.....	<b>31</b>
<b>Tabla 5.</b> Perfil de resistencia antimicrobiano de cepas bacterianas aisladas en procesos de infección urogenital.....	<b>32</b>
<b>Tabla 6.</b> Inhibición de cepas bacterianas aisladas de infección urogenital por el microorganismo probiótico <i>L. casei sp rhamnosus</i> .....	<b>34</b>
<b>Tabla 7.</b> Inhibición de cepas bacterianas aisladas de infección urogenital por el microorganismo probiótico <i>L. acidophilus</i> .....	<b>35</b>
<b>Tabla 8.</b> Actividad antagónica del sobrenadante de <i>L. casei sp rhamnosus</i> frente <i>E. coli</i> (D.O. 540nm).....	<b>36</b>
<b>Tabla 9.</b> Actividad antagónica del sobrenadante de <i>L. acidophilus</i> frente <i>E. coli</i> (D.O. 540nm).....	<b>37</b>
<b>Tabla 10.</b> Efecto antagónico de: sobrenadantes artificiales de ácido láctico 0,5% y ácido acético 0,05% y de <i>L. casei sp rhamnosus</i> en contacto con <i>E. coli</i> (Log UFC/mL).....	<b>38</b>
<b>Tabla 11.</b> Actividad antagónica co-cultivo en caldo en condiciones anaerobias y aerobias de <i>L. casei sp rhamnosus</i> contra <i>E. coli</i> (Log UFC/mL).....	<b>36</b>
<b>Tabla 12.</b> Características organolépticas de Formulados probióticos 1 y 2 con <i>L. casei sp rhamnosus</i> .....	<b>39</b>
<b>Tabla 13.</b> Controles Geométricos de los Formulados probióticos 1 y 2.....	<b>46</b>



## Índice de Figuras

Pag.

<b>Figura 1.</b> A. Colonias de <i>L. casei sp rhamnosus</i> cultivado en agar MRS. B. Morfología de <i>L.casei sp rhamnosus</i> bajo observación microscópica (100X). C. Colonias de <i>L. acidophilus</i> cultivado en agar MRS por ingredientes. D. Morfología de <i>L. acidophilus</i> bajo observación microscópica (100X).....	26
<b>Figura 2.</b> Cinética de crecimiento del probiótico <i>L. casei sp rhamnosus</i> en condiciones aerobias y anaerobias a 37°.....	29
<b>Figura 3.</b> Población bacteriana máxima del probiótico <i>L. casei sp rhamnosus</i> en condiciones aerobias y anaerobias a 37°C.....	30
<b>Figura 4.</b> Actividad antagónica en placa mostrando los halos de inhibición de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital por el microorganismo probiótico <i>L. casei sp rhamnosus</i> usando como control positivo al antibiótico Nitrofurantoina (300µg) A. <i>E. coli</i> B. <i>Corynebacterium sp.</i> C. <i>Proteus sp.</i> D. <i>S. epidermidis</i> .....	34
<b>Figura 5.</b> Actividad antagónica en placa mostrando los halos de inhibición de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital por el microorganismo probiótico <i>L. acidophilus</i> usando como control positivo al antibiótico Nitrofurantoina (300µg) A. <i>E. coli</i> B. <i>Corynebacterium sp.</i> C. <i>Proteus sp.</i> D. <i>S. epidermidis</i> .....	35
<b>Figura 6.</b> Actividad antagónica en co-cultivo de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>E. coli</i> en condiciones anaerobias y aerobias.....	40
<b>Figura 7.</b> Actividad Antagónica en co-cultivo en caldo de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>E. coli</i> .....	41
<b>Figura 8.</b> Actividad Antagónica en co-cultivo en caldo de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>Corynebacterium sp.</i> .....	42
<b>Figura 9.</b> Actividad Antagónica en co-cultivo en caldo de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>S. epidermidis</i> .....	42
<b>Figura 10.</b> Actividad Antagónica en co-cultivo en caldo de <i>L. casei sp rhamnosus</i> y <i>Proteus sp.</i> .....	43
<b>Figura 11.</b> Actividad antagónica de <i>L. casei sp rhamnosus</i> en formulado 1, 2 y Control contra <i>E. coli</i> en co-cultivo.....	45
<b>Figura 12.</b> Formulados probióticos.....	46

**Figura 13.** Perfil de Liberación de los Formulados 1 y 2 con *L. casei sp rhamnossus* entre 0 a 60 min .....

## **Tabla de Abreviaturas**

IUG	: Infección urogenital
OMS	: Organización Mundial de la Salud
D.O.	: Densidad óptica
pH	: Potencial de hidrogeniones
rpm	: Revoluciones por minuto
UFC	: Unidades formadoras de colonias
MRS	: Man, Rogosa and Sharpe
BHI	: Brain Heart Infusion
FVS	: Fluido Vaginal Simulado
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
WHO	: World Health Organization

## **Índice de Anexos**

**Anexo 1.** Actividad antagónica en co-cultivo en caldo de *L. casei sp rhamnosus* y *E. coli*.

**Anexo 2.** Actividad antagónica en co-cultivo en caldo de *L. casei sp rhamnosus* y *Proteus sp.*

**Anexo 3.** Actividad antagónica en co-cultivo en caldo de *L. casei sp rhamnosus* y *S. epidermidis*.

**Anexo 4.** Actividad antagónica en co-cultivo en caldo de *L. casei sp rhamnosus* y *Corynebacterium sp.*

## ELABORACION DE UN RESTAURADOR DE MICROBIOTA UROGENITAL CON ACTIVIDAD ANTAGONICA CONTRA CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE PROCESOS DE INFECCION UROGENITAL

**Introducción.** Los microorganismos probióticos a través de los años han ido desempeñando un rol importante en la restauración de la microbiota ya sea gastrointestinal como urogenital. Estos microorganismos han sido utilizados por la producción de metabolitos como ser los ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, bacteriocinas, entre otros. Cuando estos se encuentran enfrentados a otro microorganismo causante de infección inhiben la propagación de estos microorganismos perjudiciales compitiendo por nutrientes y colonizando mucosas.

**Objetivo.** El objetivo de este trabajo fue formular un restaurador de microbiota urogenital y evaluar la actividad antagónica de probióticos contra bacterias aisladas de pacientes con diagnóstico de infección urogenital.

**Metodología.** Se trabajó con cepas probióticas de interés industrial pertenecientes al banco de cepas del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas y Bioquímicas, tales como *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei sp rhamnosus*, de las cuales, en otros estudios, se demostró su capacidad de inhibir el crecimiento de cepas bacterianas patógenas y oportunistas, causantes de procesos infecciosos. Se aplicaron diferentes técnicas de evaluación de actividad antagónica a través del co-cultivo en placa, en caldo, y empleando sobrenadantes de *L. acidophilus* y *L. casei sp rhamnosus* frente a *E. coli* cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital.

**Resultados.** El presente estudio permitió determinar por primera vez en nuestro medio que *Lactobacillus casei sp rhamnosus* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de cepas nativas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital. *Lactobacillus casei sp rhamnosus* ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL), demostró ser la mejor cepa probiótica capaz de inhibir en menor tiempo (48 a 72h) y con mayor eficacia a aquellas cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital como ser *E. coli*, *Proteus sp*, reduciendo completamente su población inicial de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL a 0 UFC/mL. Finalmente se procedió a la elaboración de un formulado probiótico intravaginal con células activas inmovilizadas en matriz de gelatina y células liofilizadas en capsulas duras conteniendo a *L. casei sp rhamnosus* ( $6,41 \times 10^7$  UFC/mL) las cuales cumplieron con las características de inhibición y los parámetros establecidos en las farmacopeas para su correcta dosificación.

**Palabras clave.** *L. casei sp rhamnosus*, *E. coli*, actividad antagónica, restaurador de microbiota.

## ELABORATION OF A UROGENITAL MICROBIOTA RESTAURER WITH ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST BACTERIAL ISOLATED FROM UROGENITAL INFECTION PROCESSES

**Introduction.** Probiotic microorganisms over the years have been playing an important role in restoring the microbiota either gastrointestinal or urogenital. These microorganisms have been used for the production of metabolites such as organic acids, hydrogen peroxide, bacteriocins, among others. When they are confronted with another microorganism causing infection they inhibit the propagation of these harmful microorganisms by competing for nutrients and colonizing mucous membranes.

**Objective.** The objective of this work was to evaluate the antagonistic activity of probiotics against bacteria isolated from patients diagnosed with urogenital infection.

**Methodology.** For this purpose, we worked with probiotic strains of industrial interest belonging to the strains bank of the Institute of Pharmaceutical and Biochemical Researches, such as *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei sp rhamnosus*, from which, in other studies, its ability to inhibit the growth of pathogenic and opportunistic bacterial strains that cause infectious processes. It was applied by different techniques of evaluation of antagonistic activity through plaque co-culture, in broth, and using supernatants of *L. acidophilus* and *L. casei sp rhamnosus* against *E. coli* bacterial strains isolated from urogenital infection processes.

**Results.** The present study allowed us to determine for the first time in our country that *Lactobacillus casei sp rhamnosus* has the capacity to inhibit the growth of native bacterial strains isolated from urogenital infection processes. *Lactobacillus casei sp rhamnosus* ( $1,5 \times 10^7$  CFU / mL), proved to be the best probiotic strain able to inhibit in a shorter time (48 to 72 hours) and more effectively those bacterial strains isolated from urogenital infection processes such as *E. coli*, *Proteus sp*, completely reducing their initial population from  $1,5 \times 10^7$  CFU / mL. An intravaginal probiotic formulation with active cells immobilized on a gelatin matrix and lyophilized cells in hard capsules containing *L. casei sp rhamnosus* ( $6,41 \times 10^7$  CFU / mL), which complied with the characteristics of inhibition and the parameters established in the pharmacopoeias for the correct dosification.

**Keywords.** *L. casei sp rhamnosus*, *E. coli*, antagonistic activity, microbiota restaurer.

## **1. Planteamiento del problema**

Las infecciones urogenitales (IUG) están entre las enfermedades infecciosas más prevalentes ya que representan el segundo proceso infeccioso de mayor incidencia, después de las infecciones del aparato respiratorio. IUG es el principal motivo de consulta en atención primaria, especialmente en mujeres, representando las cistitis el 90% de las IUG (Vedran S., 2010).

La recurrencia de los casos es del 20% y esto puede ser debido a la persistencia de microorganismos oportunistas o patógenos en el tracto urinario, a un tratamiento antibiótico inadecuado o demasiado corto, a que microorganismos oportunistas y patógenos se encuentren en un lugar inaccesible al antibiótico o a la existencia de anomalías genitourinarias. Las reinfecciones son frecuentes, y son producidas por distintos microorganismos meses después de la infección inicial.

La progresiva aparición de resistencias a los antibióticos usados habitualmente para el tratamiento de las IUG, así como la alteración de la microbiota vaginal producida como consecuencia del uso prolongado de antibióticos para prevenir las recurrencias, ha llevado a buscar otras alternativas terapéuticas, entre ellas la administración de probióticos.

Este estudio pretende determinar la capacidad que tienen los microorganismos probióticos para inhibir el crecimiento de los microorganismos aislados de procesos de infección urogenital garantizando la utilización de microorganismos probióticos como restauradores de la microbiota urogenital, ya sea como prevención de infección o después de un tratamiento con antibióticos. Los microorganismos probióticos se prescriben en otros países para el tratamiento de IUG, sin embargo, en nuestro medio no existen estudios que demuestren su efectividad contra microorganismos circulante causantes de IUG, la presente investigación proporciona y genera información sobre la capacidad antagónica que ejercen los probióticos contra microorganismos aislados de procesos infección urogenital.

## **2. Justificación**

En nuestro medio, el tratamiento con antibióticos en casos de infecciones urogenitales en mujeres, es recurrente y prolongado, lo que conlleva a que las pacientes dejen el tratamiento y no cumplan con lo establecido, produciéndose de esta manera una re-infección y la resistencia de estos microorganismos causantes de infección a los antibióticos primeramente prescritos, y conduciendo a la prescripción de antibióticos de mayor espectro, los cuales no solo inhiben el crecimiento de aquellos microorganismos causantes de infección, sino también inhiben microorganismos que forman parte de la microbiota normal urogenital.

La utilización de microorganismos probióticos como restauradores de la microbiota urogenital, ya sea para la prevención de infecciones o después de un tratamiento con antibióticos, normalmente es empleada en otros países (Nomoto K., 2005). Sin embargo,

debido a que en nuestro medio no se cuenta con estudios previamente realizados sobre la eficacia y eficiencia que tienen los restauradores probióticos de microbiota urogenital, contra cepas nativas causantes de infección, se estudió la actividad antagónica de probióticos como *Lactobacillus casei sp rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus*, contra un banco de cepas bacterianas aisladas de pacientes mujeres con infección urogenital, asistentes al instituto SELADIS, entre los meses Julio a Octubre de 2015.

Se evaluó la actividad antagónica de las cepas probióticas en placa, del sobrenadante probiótico en microplaca y la actividad antagónica del co-cultivo de *Lactobacillus casei sp rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital, lo que permitió determinar la capacidad que tienen los microorganismos probióticos para inhibir el crecimiento de cepas bacterianas presentes en procesos de infección urogenital.

Además, se elaboraron formulados probióticos como restauradores de microbiota, los cuales demostraron garantizar calidad, seguridad y eficacia en estudios *in vitro*, para este fin se realizó el control de calidad de los formulados a través de ensayos organolépticos, físicos, geométricos y microbiológicos, cumpliendo así con los parámetros establecidos en las farmacopeas portuguesa y americana para una correcta dosificación y administración de estos.

### **3. Objetivos**

#### **Objetivo General**

- ❖ Elaborar un restaurador de microbiota urogenital con actividad antagónica contra cepas aisladas de procesos de infección urogenital.

#### **Objetivos Específicos**

- ❖ Caracterizar cepas probióticas de *Lactobacillus casei sp rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus* en función a parámetros morfológicos, bioquímicos y cinéticos.
- ❖ Evaluar la actividad antagónica en placa de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus*, contra bacterias aisladas de procesos de infección urogenital con diagnóstico de infección urogenital y microorganismos que conforman la microbiota normal de la vagina.
- ❖ Evaluar la actividad antagónica del sobrenadante de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus*, contra *E. coli*, microorganismo predominante aislado de procesos de infección urogenital.

- ❖ Seleccionar la cepa probiótica con mejor efecto antagónico, sobre un mayor espectro de cepas aisladas de procesos de infección urogenital, estableciendo dosis probiótica efectiva y tiempo de acción.
- ❖ Determinar la actividad antagónica en co-cultivo de *Lactobacillus casei* sp. *rhamnosus* y el banco de cepas aisladas de procesos de infección urogenital, a través de la evaluación de la reducción de ciclos logarítmicos en el tiempo.
- ❖ Elaborar los parámetros de viabilidad, características organolépticas, geométricas, microbiológicas, liberación *in vitro* y su actividad antagónica contra *E. coli* del formulado probiótico seleccionado.

## **4. Diseño Teórico**

### **Marco Referencial**

La problemática en nuestro país sobre el uso indiscriminado de antibióticos y la poca continuidad de los tratamientos hacen que las mujeres sufran de infecciones urogenitales recurrentes. En muchos países se prescriben capsulas intravaginales que contienen microorganismos probióticos, los cuales además de prevenir estas infecciones reconstituyen la microbiota normal urogenital después de un tratamiento con antibióticos (Hoesl C., 2005). Una de las causas fundamentales de la imposibilidad de usar estos restauradores de microbiota en nuestro país, radica en el costo elevado, además de no contar con estudios que avalen la actividad antagónica con cepas circulantes en nuestro medio.

En el presente trabajo de investigación se desarrolló un formulado probiótico, estableciendo la dosis probiótica requerida para inhibir el desarrollo de cepas aisladas de procesos de infección urogenital, cepa mayormente aislada *E. coli* la cual es el causante número uno de infección urogenital. Además, se determinó el tiempo en el cual la dosis probiótica reduce la población de cepas aisladas de procesos de infección urogenital en condiciones aerobias y anaerobias. El formulado probiótico desarrollado fue evaluado en función a la viabilidad de probióticos que alberga y el tiempo de liberación de los mismos a través de su disolución en un medio que simule las condiciones presentes en la vagina.

### **Descripción del ámbito de estudio**

Los probióticos son microorganismos vivos, los cuales al ser administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios sobre la salud del hospedador, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los probióticos tienen uso potencial para

mantener y restaurar la microbiota normal, estos pueden ser beneficiosos para la prevención de infecciones urogenitales.

Una de las funciones más importantes de los probióticos es la resistencia que concede a la invasión por agentes patógenos a través de diversos mecanismos como la producción de bacteriocinas, ácido láctico o peróxido de hidrógeno entre otros. Entre estos podemos encontrar a los probióticos *Lactobacillus casei sp rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus*, habitantes normales del tracto vaginal, que inhiben el crecimiento de bacterias causantes de infección urogenital (Uehara S., 2006).

En este estudio se pretende determinar la actividad antagónica de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* frente a cepas aisladas de procesos de infección urogenital y la capacidad que tienen los probióticos para inhibir a estas. La elaboración de formulados probióticos con células activas e inmovilizadas (formulado 1) y liofilizados (formulado 2) conteniendo a *L. casei sp rhamnosus*, las cuales conserven las mismas propiedades inhibitorias que las células libres de *L. casei sp rhamnosus* frente a cepas aisladas de procesos de infección urogenital.

## 5. Marco Teórico

### Probióticos

El concepto de probióticos data desde hace más de 100 años y recientemente se ha dado una definición amplia a este término: “microorganismos vivos, no patógenos los cuales, administrados en cantidades adecuadas, conceden un beneficio saludable sobre la salud del huésped o su fisiología” (FAO/WHO, 2002).

Debido a que los lactobacilos constituyen una parte integral de la microbiota gastrointestinal y urogenital en humanos, se cree que participan activamente en la regulación de la microbiota normal. Por lo que la propuesta de aumentar las defensas microbianas comensales del huésped, usando organismos probióticos, tiene consecuencias tan buenas para el intestino como para la vagina (Barroms, 2008). Los beneficios potenciales propuestos de los probióticos incluyen: adherencia a las células; eliminación o disminución de adherencia de patógenos; capacidad para formar una microbiota normal equilibrada; producción de ácidos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que son antagonistas del crecimiento de patógenos. Dichos beneficios constituyen características seguras, no invasivas, no carcinogénicas y no patogénicas (Tachedjian, 2017).

Después de la introducción comercial de *L. casei shirota* en Japón en 1930, los siguientes probióticos descubiertos y estudiados exhaustivamente fueron *L. acidophilus* (a mediados de 1970), *L. rhamnosus* y *L. fermentum* para el tracto urogenital (1980 a 1985). Desde entonces varios grupos de investigación han tratado de identificar candidatos idóneos para la colonización intestinal y vaginal (Mousavi, 2016). Se ha sugerido que las bacterias utilizadas desde el punto de vista nutricional y terapéutico deben poseer ciertas cualidades básicas: ser habitantes de la microbiota normal o ser capaces de adaptarse al medio ambiente del huésped; sobrevivir el paso a través del intestino y ser capaces de establecerse en la región de interés; llevar a cabo funciones favorables para el huésped; y

la adición de estos cultivos no debe interferir en la calidad de los alimentos o de la salud (Merk, 2005).

### **Infección del tracto urogenital**

Excluyendo las infecciones de transmisión sexual, casi todas las infecciones de la vagina y la vejiga son causadas por microorganismos que se originan en el intestino. Hay una gran relación con la presencia de la microbiota nativa, particularmente de lactobacilos formando parte de la microbiota normal de la vagina, y la ausencia de estos microorganismos en pacientes con infecciones urogenitales. La alteración de la microbiota normal es causada por el amplio espectro antibiótico, espermicidas y hormonas. Existen estudios preliminares que los microorganismos probióticos obtenidos de ciertos alimentos y preparaciones farmacéuticas tienen un papel importante para la prevención de alteraciones en el tracto urogenital.

Los criterios para la selección de la efectividad de cepas probióticas han sido propuestas por (Gregor Reid, 2007) y estas deben incluir la verificación de que sean seguras y tengan la capacidad de colonizar la vagina y la habilidad de reducir la colonización de los patógenos a través de la competición, la adherencia e inhibición del crecimiento del patógeno.

Las infecciones urogenitales resultan del sobrepoblamiento de varias especies bacterianas anaerobias y están asociadas con la desaparición de los lactobacilos, los cuales son dominantes en la microbiota normal de la vagina. Muchas mujeres con infección urogenital son asintomáticas corriendo riesgos mayores, desatándose complicaciones mayores como la inflamación pélvica, y complicaciones en el embarazo incluyendo riesgo de un parto prematuro. Existe evidencia clínica en los cuales sugieren que la administración oral e intravaginal de lactobacilos pueden erradicar las infecciones urogenitales asintomática y sintomática (Reid et al., 2011).

La necesidad de los lactobacilos para la producción de peróxido de hidrogeno ha sido propuesta, pero al ser propensos a ser eliminados por los espermicidas, conlleva a la combinación de dos o más cepas, una de las cuales sea productora de peróxido de hidrogeno y las otras sean resistentes a los espermicidas, demostrando de esta manera ser de mayor ayuda en la terapia.

Miles de millones de mujeres sufren de infecciones del tracto urogenital (IUG) anualmente. *Escherichia coli* la cual se origina en el intestino es el agente responsable de más del 85% de los casos. La bacteria asintomática es también común de encontrar en mujeres, y en algunos casos es seguida por IUG sintomáticas. Existe evidencia, incluyendo estudios estadísticos que el uso de una capsula semanalmente de cepas de lactobacilos liofilizados pueden restaurar la microbiota normal de lactobacilos y disminuir el riesgo de contraer nuevamente una IUG. Con la creación de una barrera de lactobacilos en la vagina, muy pocos patógenos pueden ascender a la vejiga, de este modo se bloquea los procesos infecciosos (Kirjavainen PV, 2009).

### **Patogenia de las infecciones urogenitales**

El tracto urogenital posee diversos mecanismos de defensa. Entre ellos se encuentra el flujo unidireccional de la orina y la capacidad de las células uroepiteliales de atrapar

bacterias e impedir su fijación. Considerando que la IU alta puede o no estar asociada con anomalías anatómicas del tracto urinario, la infección puede deberse a una alteración del balance entre los factores antimicrobianos y los componentes del sistema inmune, con la consiguiente invasión y multiplicación bacteriana (Florentin, 2014).

La orina y las vías urinarias son estériles, mientras que la uretra distal está colonizada por flora cutánea y vaginal: *Corynebacterias*, *Streptococos*, *Estafilococos*, *Lactobacilos*, etc., pudiendo en ocasiones y de forma transitoria, albergar a otros bacilos Gram negativo.

La infección urinaria en una mujer se inicia cuando un microorganismo potencialmente patógeno, va desde el intestino, o más excepcionalmente desde la vagina (como resultado de una inoculación directa durante la actividad sexual), y coloniza la mucosa periuretral esta asciende a través de la uretra hasta la vejiga. En días previos a un episodio de IU, aumenta sustancialmente la prevalencia de colonización por *E. coli*, y que al menos en el 90% de episodios de IU, *E. coli* la cual es productora de la infección se encuentra también en la flora fecal.

La orina colabora en la eliminación de las bacterias, además de poseer propiedades antibacterianas (principalmente la osmolaridad, la concentración de urea, de ácidos orgánicos y el pH). Si estas bacterias causantes de infección no pueden ser eliminadas por estos mecanismos, se inicia su adhesión al uroepitelio y la posterior infección, esto dependerá del equilibrio entre el potencial virulento de dichas bacterias, su capacidad para evadir los mecanismos defensivos del huésped, lesionar o invadir las células y tejidos del huésped y estimular la respuesta inflamatoria. Además del tamaño del inóculo inicial, la presencia de alteraciones anatómicas o funcionales del tracto urinario y ciertos factores genéticos, aumentaran el riesgo de producir infección.

Mayormente los episodios de infección urinaria se producen por vía ascendente, a partir de microorganismos provenientes del colon, mientras que una minoría posee una etiología exógena, estando producidos por microorganismos ambientales con frecuencia introducidos en las vías urinarias durante su manipulación (Pigrau, 2013).



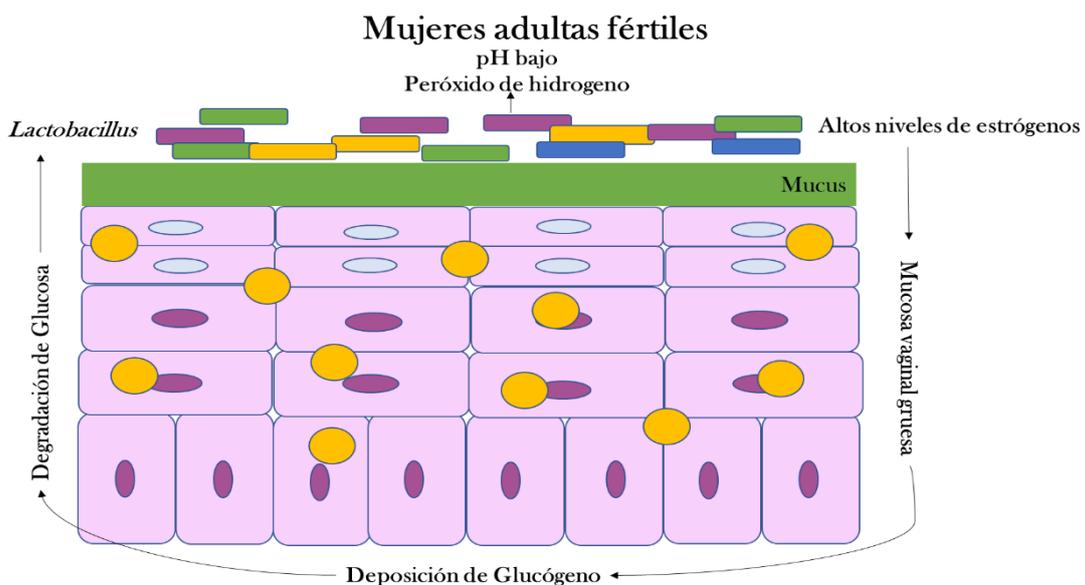
**Figura 1.** Patogenia de infección urogenital.

## Microbiota Vaginal

La vagina representa un ecosistema dinámico que permanece en equilibrio gracias a una fina interacción de factores tales como la microbiota normal bacteriana (Ángeles-López y col., 2011). La microbiota normal vaginal está constituida en un 96 % por especies de Lactobacilos y únicamente el 4 % por bacterias aeróbicas potencialmente patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* grupo B y *Escherichia coli*) y micoplasmas (Ravel, 2011). Estudios basados en cultivos de bacterias, seguidos de tipificación molecular, han mostrado que *L. crispatus* y *L. jensenni* son los organismos predominantes en la mayoría de las mujeres sanas premenopáusicas.

Un análisis de la microbiota vaginal en el curso del ciclo menstrual ha mostrado que el 22 % de las mujeres mantienen una microbiota estable en la que predominan los lactobacilos, mientras que el 78 % restante sufren una alteración de la microbiota (Gajer, 2012). Los lactobacilos son bacterias Gram (+) que constituyen una pieza clave en la microbiota vaginal normal. Algunas especies de lactobacilos tienen la habilidad para producir ácido láctico, responsable de un pH ácido en la vagina el cual inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas. La producción de ácido láctico es considerada como el mejor mecanismo protector de los lactobacilos contra las infecciones vaginales.

Algunos lactobacilos producen peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en cantidades que exceden la capacidad del microorganismo patógeno para degradarlo. Este compuesto puede inhibir o eliminar otros microorganismos, particularmente aquellos que carecen o tienen bajos niveles de peroxidasas o catalasas, enzimas responsables de su degradación. Los lactobacilos productores de  $H_2O_2$  tienen un efecto bactericida in vitro sobre diferentes bacterias incluyendo *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia* y *Neisseria gonorrhoeae* (Saxelin, 2005).



**Figura 1.** Mucosa vaginal durante la vida adulta de una mujer, los niveles de estrógenos y de glucógeno aumentan y proliferan los Lactobacilos.

**Fuente.** Beltrán D., 2015.

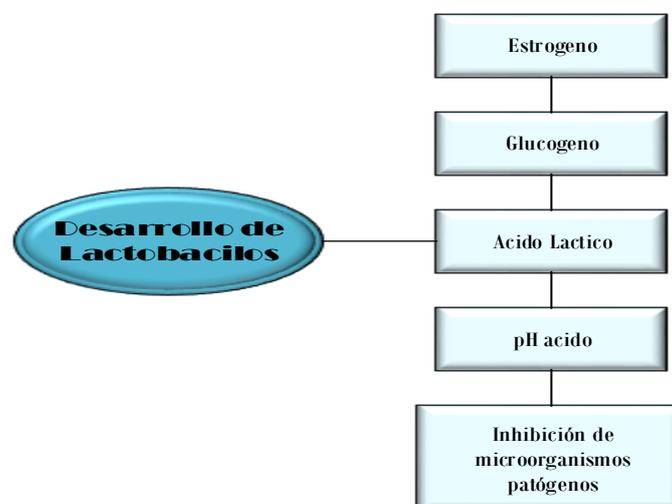
### ***L. casei sp rhamnosus***

Además de su probado papel positivo como probiótico, es uno de los lactobacilos frecuentemente aislados de la vagina. Además, produce sustancias proteínicas que exhiben actividad antibacteriana, como la lactocina 160, una bacteriocina altamente específica en su acción antimicrobiana, eliminando microorganismos asociados a BV pero dejando la microbiota vaginal intacta. Además, lactocina 160 provoca irritación mínima y tiene un buen potencial para la aplicación intravaginal.

Como producto farmacéutico ningún comportamiento patógeno ha sido asociado con esta variedad y presenta una alta resistencia a las propiedades requeridas para probiótico. Se investigaron las capacidades de adherencia *in vitro* de esta cepa usando células humanas, se demostró su capacidad de deteriorar la adherencia de varios patógenos. Además, la actividad antimicrobiana de sus metabolitos de este probiótico se determinó en una amplia variedad de Gram-positivos y Gram-negativos patógenos humanos (Petricevic, 2008).

### **Producción de ácido láctico**

El ambiente ácido inhibe parcial o totalmente el crecimiento de la mayoría de las bacterias del tracto digestivo y del medio ambiente, el cual es un mecanismo de protección de la mucosa vaginal extremadamente eficaz. El compuesto que produce acidez disminuyendo el pH vaginal es el ácido láctico, este es el producto final del metabolismo fermentativo de carbohidratos, llevado a cabo por Lactobacilos, residentes en las células epiteliales de la vagina y células vaginales las cuales tienden a acumular glucógeno, especialmente durante el período comprendido entre la menarquia y la menopausia, se considera que este es el origen de la acidez vaginal. Se cree que, tras la hidrólisis del glucógeno, la glucosa se metaboliza ácido láctico. Hay pruebas de que la degradación del glucógeno es una característica en general de estas bacterias. Es probable que el glucógeno vaginal se degrade a glucosa por las células epiteliales vaginales propias y el papel de los lactobacilos se limita únicamente a fermentación del azúcar para dar ácido láctico, responsable de la protección de la colonización por microorganismos no deseados (Aldunate, 2015).



**Figura 2.** Ciclo virtual producido en la vagina en condiciones fisiológicas.

## **Desarrollo y estudio de formulaciones probióticas vaginales**

Los supositorios y óvulos son las formas farmacéuticas utilizadas para la administración de sustancias drogas por vía rectal y vaginal. Por definición, los óvulos son preparaciones sólidas cuya masa puede variar entre 1 y 15 g, con uno o más sustancias de fármacos, para la administración vaginal en dosis unitaria, la forma, el volumen y la consistencia deben ser apropiados para facilitar la administración.

Los excipientes utilizados en estas preparaciones son los usados en supositorios, bases de grasa se utilizan en ocasiones cuando se usa naturaleza lipofílica de las drogas. Las bases hidrófilas también son ampliamente utilizadas, siendo la mezcla de sustancias auxiliares clásica gelatina-glicerina-agua. La proporción de los tres componentes involucrados puede variar para adaptarse a la consistencia en función de la naturaleza del fármaco. Los excipientes utilizados en la preparación de los óvulos deben permitir que las formas farmacéuticas preparadas se disuelvan en el fluido vaginal de la vagina a 37 ° C.

Además, tienen que cumplir una serie de propiedades adecuadas, a saber: ser seguro y bien tolerado por la mucosa vaginal, que es bastante sensible e irritable; ser inertes; estable frente a la acción de agentes externos; tener una consistencia adecuada, no siendo ni demasiado blando ni demasiado rígido o quebradizo; solidificar en un intervalo de tiempo muy corto, para asegurar la homogeneidad del ovulo; tener un cierto poder de retracción enfriar a facilitar el vaciado del molde y debe permitir la liberación rápida y completa de sustancia activa en la vagina (Thomson, 2012).

## **Control de calidad de cápsulas**

Existen diversas pruebas de control de calidad de productos farmacéuticos cuyos parámetros están estandarizados en documentos oficiales como farmacopeas con el fin de garantizar la calidad, seguridad y eficacia del fármaco.

Para formas farmacéuticas (óvulos o supositorios vaginales) el control de calidad se lo realiza a diferentes niveles, tanto en materias primas, durante el proceso de manufactura y en producto terminado. Los parámetros de control de calidad en producto terminado para óvulos o supositorios vaginales farmacéuticas según la Farmacopea USP-39.

- Ensayos organolépticos. Consiste en un conjunto de pruebas sensoriales con el fin de detectar anomalías en las que tenemos:

**Color:** Se evalúan características como uniformidad, brillo, ausencia de moteados o pigmentaciones con el fin de identificar algún tipo de deterioro.

**Olor:** La presencia de olor desagradable puede ser indicativa de una alteración química de alguno de sus componentes.

**Aspecto:** Se pueden evaluar características y las irregularidades como deformaciones, rupturas, textura, polvo suelto en la superficie, etc.

- Ensayos geométricos. Se evalúan dimensiones de la cápsula como largo, diámetro y forma con ayuda de un calibrador nonio (vernier), variaciones significativas en estos parámetros podría conducir una mala dosificación del fármaco.

- Ensayos posológicos. La uniformidad de dosificación es una prueba oficial, se realiza en diversas formas farmacéuticas y que está destinada a determinar la cantidad de principio activo que contiene cada unidad, se lo puede realizar mediante uniformidad de peso o de contenido.

Variación de peso: Procedimiento destinado a establecer la variabilidad de masa de formas farmacéuticas sólidas. Es aplicable cuando estas contienen 50 mg o más de principio activo o cuando esta constituye el 50 % o más del peso de la forma farmacéutica, los pesos son medidos en una balanza analítica para lo cual se seleccionan 20 unidades y los límites de aceptación de variación para cápsulas farmacéuticas (Corrêa I., 2012).

- Ensayos microbiológicos

La contaminación de los productos farmacéuticos, representa un riesgo para la salud para los pacientes ya que un deterioro microbiano podría cambiar en las características físicas y químicas del fármaco o ser portadores de microorganismos contaminantes, patógenos u oportunistas que pueden producir enfermedades. Es por ello, que los productos farmacéuticos deben ser sometidos a un control de calidad microbiológico que demuestre que cumplen con ciertas especificaciones establecidas por los organismos oficiales, para garantizar su calidad. Las preparaciones farmacéuticas óvulos o supositorios vaginales deben ajustarse a los criterios que se indican a continuación:

Recuento de microorganismos aerobios totales ( $\leq 10^3$  UFC /g o mL)

Recuento de mohos y levaduras ( $\leq 10^2$  UFC /g o mL)

- Prueba de disolución. La prueba de disolución es una prueba fisicoquímica de carácter farmacopeico en la que se mide la velocidad de disolución de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida, en condiciones experimentales controladas de temperatura, composición del medio y agitación (velocidad y tipo). La prueba de disolución se utiliza para evaluar la calidad de un producto farmacéutico.

## 6. Marco Conceptual

**Probiótico:** Los lactobacilos son microorganismos bacilos Gram (+), principalmente anaerobios facultativos o estrictos que generalmente tienen un exigente requerimiento para su desarrollo. Prefieren un ambiente ácido y ayudan a crear uno produciendo ácido láctico y otros ácidos. En general, los lactobacilos no se han asociado con la enfermedad y durante más de 100 años han sido considerados como miembros no patógenos de la microbiota intestinal y genital. Algunos ejemplos que se pueden encontrar en que las bacterias lácticas se han usado para tratar o prevenir infecciones de la piel, intestinal y genital con diferentes grados de éxito (Marelli G1, 2004).

**Infección Urogenital:** Las infecciones urogenitales, afectan la vejiga, los riñones, la vagina, la uretra y el cuello uterino, estas constituyen un problema mundial que afecta a más de 300 millones de mujeres/año, estas infecciones son una razón común para la visita de una mujer a un médico de familia o urólogo. Para esas infecciones en el tracto urinario, se ha estimado que cada episodio conduce a 6 días de signos y síntomas. El principal

resultado clínico es el malestar entre un gran porcentaje de la población femenina, además de enormes costos para el sistema de salud para el tratamiento.

Muchos pacientes experimentan una recurrencia de los síntomas, particularmente en el primer año de la infección original. Es de mayor preocupación las infecciones que se complican por la afectación renal porque la hospitalización es generalmente necesaria y el daño renal o incluso la muerte puede ocurrir, además de complicaciones graves durante el embarazo, que a veces conducen a un parto prematuro. Los datos históricos indican que la gran mayoría (70%) de la infección del tracto urogenital (IUG) en una comunidad suburbana no hospitalizada es causada por *Escherichia coli*, seguida por otras enterobacterias y *Staphylococcus saprophyticus* (Reid G, 2011).

**Antibióticos:** Sustancia producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente son fármacos usados en el tratamiento de infecciones por bacterias, de ahí que se les conozca como antibacterianos.

**Microbiota Normal:** Especies microbianas que habitan en el tracto vaginal, jugando un papel importante para el mantenimiento de la salud y la prevención de infecciones. Más de 50 especies microbianas se han recuperado del tracto vaginal. Las especies que están presentes en la mucosa vaginal varían entre la mujer premenopáusica y aquellos que han pasado por la menopausia. La microbiota de una mujer premenopáusica sana está generalmente dominada por especies de Lactobacilos, las más comunes son *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jenesenii*, followed by *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, y *L. rhamnosus* (Sarah Cribby, 2008).

**Restaurador de microbiota:** Formulados constituidos por una o más cepas concretas de lactobacilos, idealmente aislados de la vagina, que deben haber mostrado capacidad de colonización de dicha mucosa, actividad antagónica (por ejemplo, producción de peróxido de hidrogeno) y de co-agregación con patógenos. Además, que no posean resistencia transmisible a antibióticos y que existan publicaciones en las que se haya descrito que previenen y/o revierte un estado patológico.

**Actividad antagónica:** La capacidad que tienen muchos miembros del género *Lactobacillus* para inhibir bacterias indeseables, estas tienen importantes aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica en la selección de cultivos con fines probióticos.

## 7. Formulación de la hipótesis de investigación

Los microorganismos probióticos seleccionados y caracterizados para este estudio no son capaces de inhibir el crecimiento de las cepas aisladas de procesos de infección urogenital (Hipótesis nula).

Los microorganismos probióticos son capaces de producir ciertos metabolitos, además de disminuir el pH del medio, factores que ayudan en la inhibición del desarrollo y propagación de cepas aisladas de procesos de infección urogenital (Hipótesis alterna).

## 8. Operacionalización de las variables en estudio

Variable	Dimensión	Indicador
Crecimiento Probiótico	Medio MRS	pH (Cuantitativa Continua) Densidad Óptica (Cuantitativa Continua) UFC/mL (Cuantitativa discreta)
Actividad Antagónica	Microorganismo Probiótico y Cepa aislada de infección urogenital	Reducción de Ciclos Logarítmicos (Cuantitativa Continua)
Cepa Probiótica	Dosis Probiótica	Tiempo de acción (Cuantitativa continua) Concentración (Cuantitativa Discreta)
Elaboración de Formulado	Encapsulación de Células	Concentración Probiótico (Cuantitativa Discreta) Porcentaje de Polímeros (Cuantitativa Continua)

## 9. Diseño metodológico

### Población en estudio, ámbito y periodo de investigación

**Población en estudio:** La población en estudio son las cepas aisladas de procesos de infección urogenital (*E. coli*, *Proteus sp* cepas causantes de infección urogenital y *Corynebacterium sp*, *S. epidermidis* cepas de la microbiota normal) recolectados en el Instituto SELADIS del laboratorio de Bacteriología, para su posterior enfrentamiento a *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus*.

**Criterios de inclusión.** Pacientes mujeres entre 18 a 45 años, que no se hallaban en etapa de gestación, ni con enfermedades venéreas o inmunológicas.

**Criterios de exclusión.** No se tomó en cuenta muestras provenientes de pacientes menores de edad, ni pacientes varones.

**Ámbito:** El siguiente trabajo se llevó a cabo en el área de Biotecnología Industrial del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

**Periodo de investigación:** Este trabajo se lo realizo desde la gestión 2015 hasta 2017.

## **Tipo de investigación**

Esta investigación implicó el desarrollo de un estudio de *Investigación cuasi-experimental, aplicada y explicativa* :

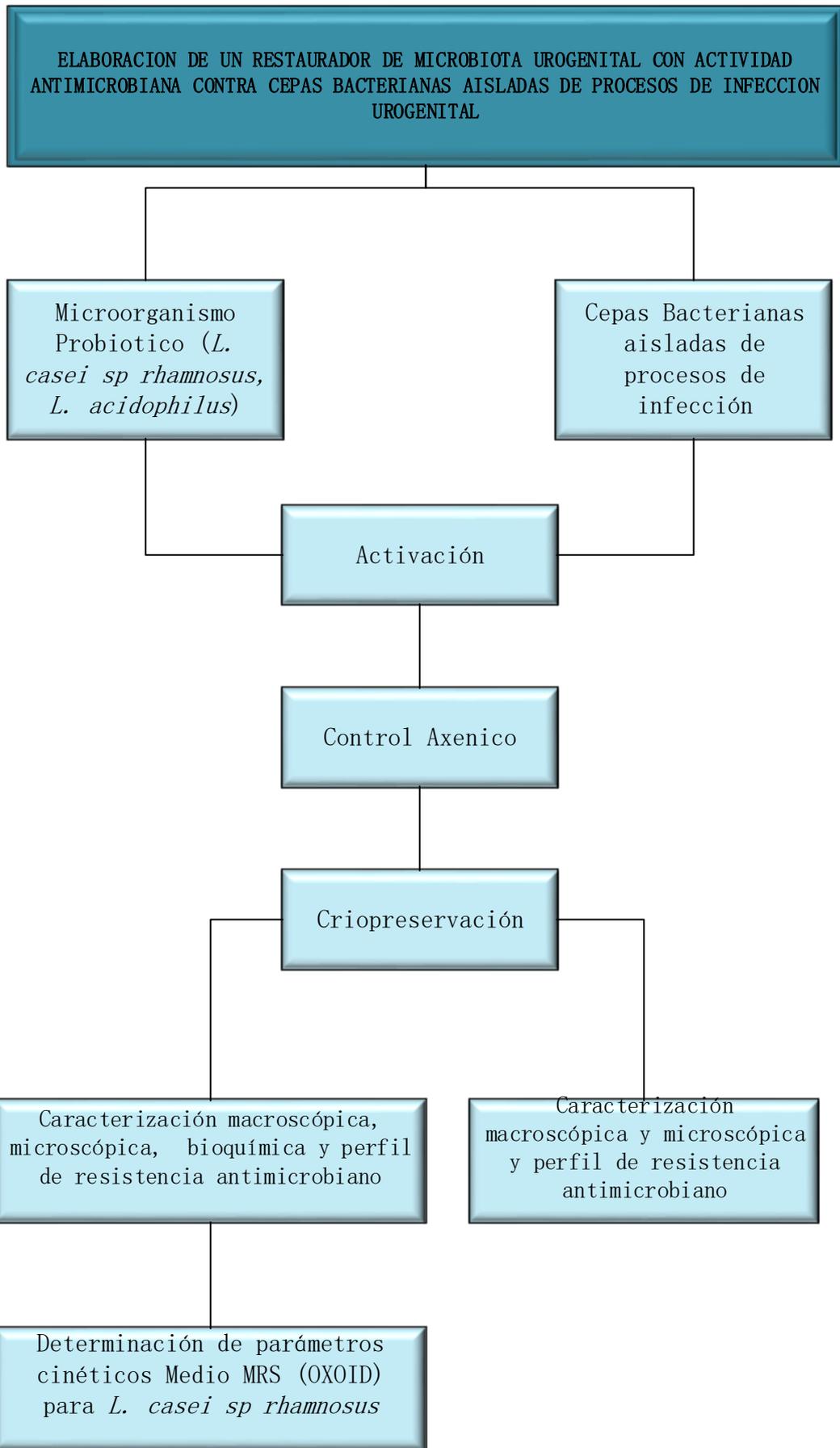
Cuasi-Experimental ya que se siguió diferentes procedimientos para determinar si los microorganismos probióticos cuentan con la capacidad de inhibir el crecimiento de aquellas cepas aisladas de procesos de infección urogenital.

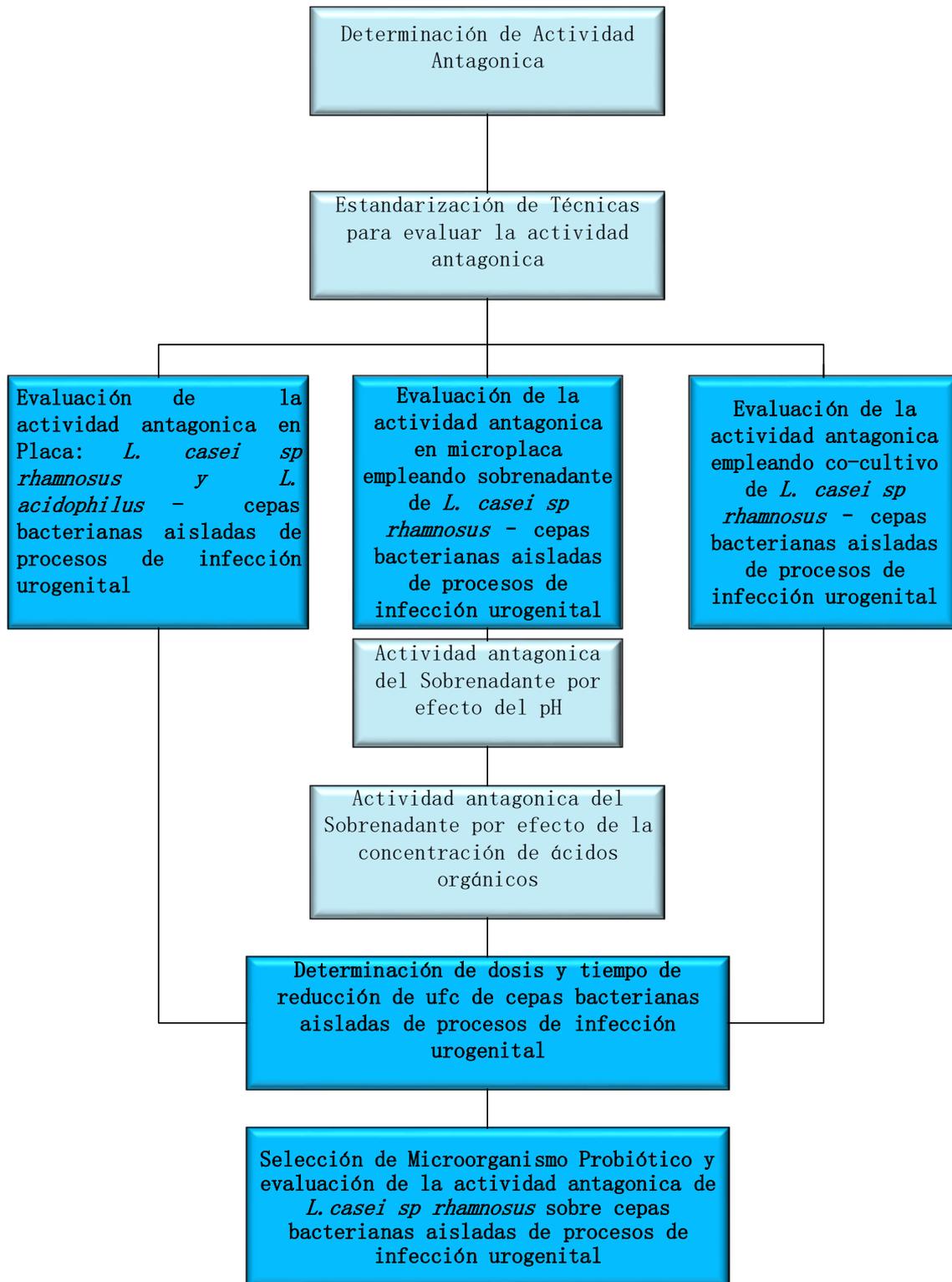
Aplicada por que se elaboró un formulado probiótico que cuenta con células activas inmovilizadas y liofilizadas de *L. casei sp rhamnosus* capaces de inhibir el crecimiento de cepas aisladas de procesos de infección urogenital.

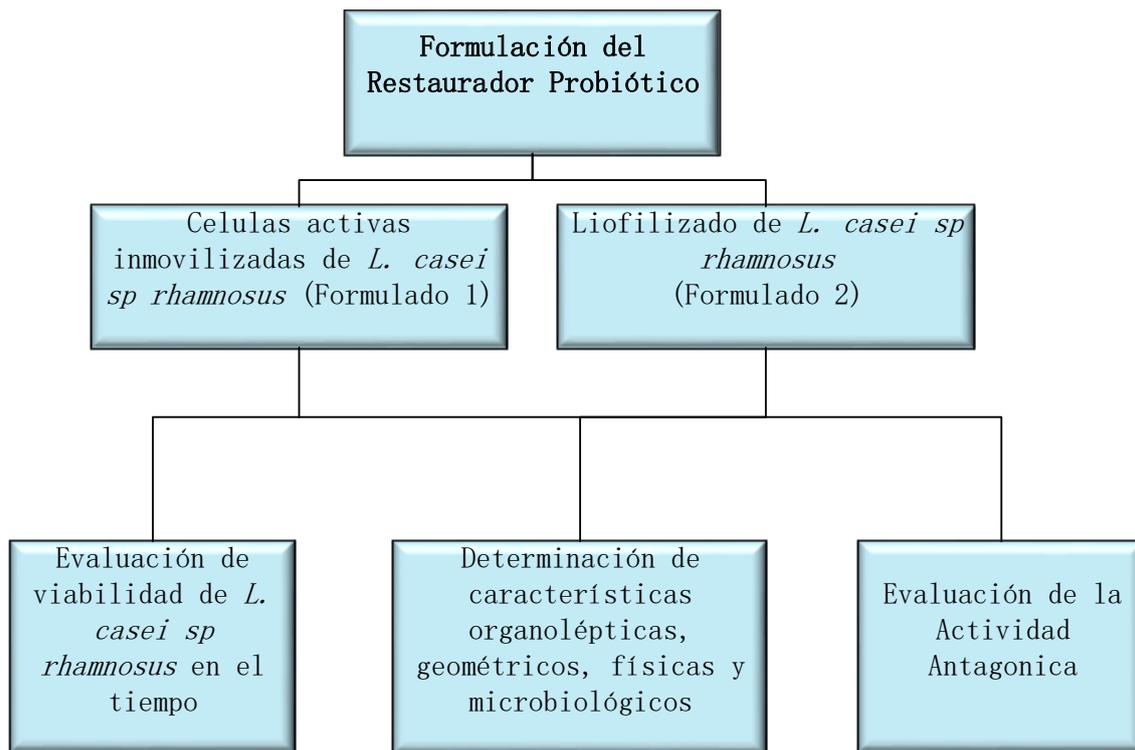
Explicativo, ya que se determinó por medio de pruebas experimentales la concentración o dosis necesaria del probiótico para inhibir el crecimiento de cepas aisladas de procesos de infección urogenital y el tiempo requerido para tal efecto.

## **10. Materiales y métodos**

El escenario del presente trabajo de investigación es resumido en las siguientes figuras en las cuales se describen las principales etapas desarrolladas como parte experimental.







### **Condiciones de cultivo de cepas probióticas (*L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus*) y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital**

Las cepas probióticas empleadas en el presente estudio fueron *Lactobacillus casei sp rhamnosus* (LCR35) y *Lactobacillus acidophilus* (DSM-20079), pertenecientes al banco de cepas criopreservadas del Instituto de Investigaciones Fármaco -Bioquímicas. *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* (3% v/v) fueron activados en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Oxoid) y caldo MRS preparado por ingredientes, compuesto por (para 1L): peptona de caseína 10g, extracto de carne 10g, extracto de levadura 5g, D-glucosa 20g, tween 80 1g, citrato de amonio 2g, acetato de sodio 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2g, MgSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O 0,20g, MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O 0,05g.

Ambos medios de cultivo fueron sometidos a condiciones anaerobias, mediante la técnica de Hungate modificada (Breznak, 2007) saturando la atmosfera gaseosa con nitrógeno libre de oxígeno, esterilizados por autoclave a 121°C, 1,5atm, 15min. Inoculados con *L. casei rhamnosus* o *L. acidophilus* (3%, v/v) e incubados durante 24h a 37°C.

El banco cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital, fue colectado del laboratorio de Bacteriología del Instituto SELADIS. Las cepas fueron aisladas de mujeres con diagnóstico de infección urogenital, entre 18 a 45 años. Las cepas bacterianas de procesos de infección urogenital fueron aisladas a partir de muestras de mujeres que no se hallaban en etapa de gestación, ni con enfermedades venéreas o inmunológicas, y que asistieron a este servicio entre los meses de Julio a Octubre de 2015.

El banco de cepas estuvo constituido por las siguientes bacterias: *Escherichia coli* (10 cepas) y *Proteus sp.* (2 cepas), además de cepas pertenecientes a la microbiota normal de

la vagina *S. epidermidis* (5 cepas), *Corynebacterium sp.* (12 cepas), todas las cepas fueron caracterizadas por pruebas bioquímicas en el laboratorio de Bacteriología del Instituto SELADIS. Las bacterias constituyentes del banco de cepas fueron inoculadas (3%, v/v) en caldo BHI (Oxoid) e incubadas a 37°C por 12h en condiciones aerobias.

### **Evaluación del control axenico de *L. casei sp rhamnosus*, *L. acidophilus* y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital**

De un cultivo activo de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* en caldo MRS con 14h de incubación a 37°C en anaerobiosis, se procedió a realizar diluciones. Se realizaron tres diluciones 1:100 y una dilución 1:20 con el propósito de asegurar recuentos bacterianos en las placas con cantidades entre 25 y 250 UFC/mL. 100µL de la última dilución de cada cepa fue inoculado en agar MRS, realizando siembra por extensión en superficie. Las placas fueron incubadas por 48h a 37°C en condiciones anaerobias (GasPak system; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.). Se verifico que el cultivo presente un solo tipo de morfología de colonia con las mismas características de forma, color, apariencia, y la pureza de los cultivos fue comprobada mediante tinción de Gram (Voravuthikunchai, 2006).

Para la evaluación del control axenico del banco de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina, se tuvo un cultivo de cada cepa bacteriana en caldo BHI con 12h de incubación a 37°C en aerobiosis. Se realizó tres diluciones 1:100 y una dilución 1:20 para asegurar un recuento bacteriano en las placas con cantidades entre 25 y 250 UFC/mL. 100µL de la última dilución de cada cepa bacteriana se inoculo en agar BHI, realizando siembra por extensión en superficie. Las placas fueron incubadas 24h a 37°C en condiciones aerobias.

Se verifico que el cultivo de cada cepa bacteriana aislada de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina presente solo un tipo de morfología con las mismas características de forma, color, apariencia, por medio de tinción Gram se comprobó la pureza de cada cepa bacteriana aislada de procesos de infección urogenital.

### **Criopreservación de *L. casei sp rhamnosus*, *L. acidophilus* y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital**

De un cultivo de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* en caldo MRS con 14h de incubación a 37°C en anaerobiosis, se procedió a la centrifugación a 3500rpm por 10min de 1 mL del cultivo fresco en tubos de criopreservación estériles (3 veces), obteniendo de esta manera un concentrado celular. Seguidamente se colocó en el concentrado celular 750µL de medio estéril MRS. Se incubo a 37°C por una hora, se agregó 250µL de glicerol estéril, resuspendiendo el concentrado celular. Se colocó por una hora a temperatura ambiente, una hora a 4°C, a -20°C hasta el día siguiente y preservó a -80°C hasta su uso.

Para la criopreservación de las cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina, de un cultivo de 12h de incubación a 37°C en caldo BHI en aerobiosis de cada cepa bacteriana aislada de procesos de infección urogenital, se centrifugo a 3500rpm por 10min, se colocó 1mL de

cada cultivo en tubos de criopreservación estériles (3 veces). En el cultivo celular obtenido se colocó 750µL de medio estéril BHI. Incubo a 37°C por una hora. Se agregó 250µL de glicerol estéril, resuspendiendo el concentrado celular. Se colocó por una hora a temperatura ambiente, una hora a 4°C, hasta el día siguiente a -20°C y preservo a -80°C hasta su uso.

### **Caracterización morfológica de *L. casei sp rhamnosus*, *L. acidophilus* y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital**

*L. casei sp. rhamnosus* y *L. acidophilus* fueron caracterizados en base a sus características macroscópicas y microscópicas, realizando siembra por extensión en superficie en agar MRS. Se realizó la respectiva observación de las colonias, bordes, forma, superficie consistencia y color. La caracterización microscópica fue realizada en base a tinción Gram. Se observó la morfología utilizando el objetivo 100X, tanto de *L. casei sp. rhamnosus* como de *L. acidophilus*.

Para la caracterización de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina, se realizó siembra por extensión en superficie en agar BHI de cada una de ellas. Observando las diferentes características de las colonias. Se caracterizó microscópicamente en base a tinción Gram, observando la morfología de cada bacteria utilizando objetivo 100X.

### **Caracterización bioquímica de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus***

Se evaluó para *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* el perfil de fermentación de carbohidratos. Un cultivo activo de *L. casei sp. rhamnosus* y *L. acidophilus* (con 14h de incubación a 37°C en anaerobiosis). Fue inoculado (3% v/v) en una batería de tubos los cuales contenían caldo MRS sin glucosa, con el correspondiente carbohidrato a evaluar.

El stock de carbohidratos estuvo constituido por 10g/L de: Glucosa, Xilosa, Sorbitol, Manitol, Lactosa, Maltosa, Sacarosa, Fructosa, Myo-inositol, Glucosamina, Galactosa, Celobiosa y Glicerol como fuentes de carbono y esterilizado por filtración (0,20µm de diámetro de poro). Se añadió parafina caliente privando al cultivo del contacto con el oxígeno. La batería de tubos fue incubada por 24h a 37°C. La reducción de pH fue registrada, determinando de esta manera si el microorganismo probiótico fue capaz de fermentar el correspondiente carbohidrato. Se utilizó como control negativo a caldos sin carbohidrato. Cada ensayo fue realizado por triplicado (Hui Cai1, 2007).

### **Determinación de parámetros cinéticos durante el crecimiento de *L. casei sp rhamnosus***

Se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento de *L. casei sp rhamnosus* en caldo MRS comercial, a través de la realización de una curva de crecimiento en condiciones anaerobias y aerobias. Para este fin, un cultivo activo de *L. casei sp rhamnosus* (de 14h de incubación a 37°C en anaerobiosis) fue inoculado (3%, v/v) en un vial de caldo MRS estéril (50mL) empleando N<sub>2</sub> libre de O<sub>2</sub> (condición anaerobia) y aire (condición aerobia) en la atmosfera gaseosa. Se incubaron a 37°C y se tomaron muestras

cada 2h por 48h seguidas, se determinó el incremento de la densidad celular a través de la lectura de densidad óptica a 540nm de longitud de onda, utilizando como blanco agua destilada estéril, realizando diluciones cuando la absorbancia sobrepasó un valor de 0,9.

Además, se determinó el pH de cada muestra recolectada. Los datos fueron graficados en Excel, extrapolando Densidad Óptica versus Tiempo. Determinando el tiempo exacto en el que los microorganismos probióticos alcanzan una mayor población viable. Todo el experimento se realizó por triplicado.

### **Perfil de resistencia antimicrobiana de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital**

Discos de antibióticos Sensidiscos-SDA (Diagnóstico Clínico Eugenio Marin V.), fueron utilizados para determinar el patrón de resistencia antibiótica de *L. casei sp rhamnosus*, *L. acidophilus* y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina. Los discos incluyeron: Amikacina (30µg), Nitrofurantoina (300µg), Norfloxacin (10µg), Acido Nalidixico (2µg), Cefotaxima (30µg). *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* fueron inoculados en caldo MRS (3%, v/v) y cepas bacterianas aisladas de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina fueron inoculadas (3%, v/v) en caldo BHI, e incubadas por 18 horas a 37°C.

*L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus*, cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina con 24h de crecimiento, fueron seleccionadas colonias que se encontraban aisladas y con la misma morfología, con un asa se transfirió a un tubo con caldo BHI e incubo por 4h a 37°C. La densidad celular fue ajustada al tubo 0,5 de la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), fueron inoculadas con un hisopo estéril en placas Petri (9mm de diámetro) en agar Mueller Hinton, se colocó asépticamente cada disco de antibiótico en la superficie del agar. *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* fueron incubadas por 48h a 37°C en anaerobiosis. Sin embargo, las cepas bacterianas aisladas de infecciones urogenitales y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina fueron incubadas por 24h a 37°C en condiciones aerobias.

Se midió el diámetro de las zonas de inhibición alrededor de los discos para cada cepa bacteriana en estudio.

### **Determinación de Actividad Antagónica**

#### **Estandarización de técnicas para evaluar la actividad antagónica**

La actividad antagónica *in vitro* producida por *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* sobre el banco de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina, descrito previamente, fue estudiado evaluando la capacidad inhibitoria en medio sólido, en co-cultivo en caldo y el sobrenadante probiótico en microplacas con las cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital.

### **Evaluación de la actividad antagónica en placa: *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* contra cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital**

La actividad antagónica de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* contra las cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina fue estudiada usando el método de spot test en agar (P. Hu <sup>tt</sup> J. S., 2005). *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* fueron activados en caldo MRS en condiciones anaerobias durante 14h a 37 °C. 20 µL de suspensión celular en NaCl (0,9%, p/v), correspondiente al tubo 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) y una dilución 1:10 obteniendo una población de  $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, fueron depositados en horadaciones (3mm de diámetro) realizadas sobre agar MRS e incubados durante 18h a 37°C en anaerobiosis (GasPak system; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.).

10mL de un cultivo activo en caldo BHI, de 12h de incubación previas, de cada cepa bacteriana aislada de proceso de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina fue centrifugado a 5000rpm durante 5min y re-suspendido en NaCl al 0,9% (p/v). Cada suspensión celular fue mezclada con agar soft BHI (0,5% de agar) a 45 °C, con una concentración celular resultante de  $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, esta mezcla fue vertida sobre el agar MRS conteniendo *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus*, e incubada durante 18h a 37°C. Nitrofurantoina (300µg) en disco fue empleado como control positivo de inhibición.

La actividad antagónica del probiótico fue evaluada midiendo el diámetro de la zona de inhibición (en mm) causada por el probiótico alrededor de cada horadación. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

### **Evaluación de la actividad antagónica en microplaca empleando sobrenadantes de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* contra cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital**

La actividad antagónica del sobrenadante del cultivo de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* fue evaluada contra *E.coli* (cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital), utilizando la técnica de cultivo en microplaca del agente infeccioso con el sobrenadante probiótico libre de células (Fayol D, 2005).

En ese sentido, *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* fueron cultivados en caldo MRS a 37°C por 14h. 10mL de este cultivo fue centrifugado a 5000rpm por 5min y el sobrenadante fue recuperado. El pH fue determinado para cada sobrenadante. Los sobrenadantes fueron separados en dos fracciones, ajustando el pH de una fracción a 7,0 +/- 0,1 con NaOH (0,1N). Posteriormente, los sobrenadantes fueron filtrados utilizando una membrana de 0,20µm de diámetro de poro y alicuotados en volúmenes iguales. 100µL del sobrenadante de los cultivos de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* de pH ajustado a 7,0 +/- 0,1 y no ajustado, fueron vertidos en una microplaca conteniendo 100µL de medio BHI.

Paralelamente, las cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital fueron cultivadas en caldo BHI a 37°C por 12h en condiciones aerobias e inoculadas a una concentración de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL. Controles axénicos conteniendo sobrenadante probiótico (100uL) y medio BHI (100uL) fueron empleados. Posteriormente la microplaca fue incubada en condiciones aerobias a 100 rpm, 37°C, y se evaluó la turbidez del medio a 540nm de longitud de onda, a las 0, 3, 6, 9, 12, 24h de incubación.

Adicionalmente, se evaluaron sobrenadantes artificiales ácidos y neutros, empleando soluciones de ácido láctico (0,5%) a pH 3,25 y ácido acético (0,05%) a pH 3,10 y pH ajustado a 7,0 con NaOH (0,1N) en ambos casos, empleando como control el sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* a pH 3,96 y pH ajustado. Siguiendo el protocolo descrito anteriormente se procedió a evaluar la viabilidad de *E.coli* en función al recuento de UFC/mL, para determinar la reducción de ciclos logarítmicos a las 0, 24, 48 y 72h de incubación, mediante recuento en placa empleando agar BHI. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

### **Evaluación de la actividad antagónica empleando co-cultivo de *L. casei sp rhamonosus* contra cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital**

Para evaluar la actividad antagónica de la cepa probiótica seleccionada, *L. casei sp rhamnosus* en co-cultivo (P. Hu <sup>tt</sup> J. S., 2005) con cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas bacterianas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina, *L. casei sp rhamnosus* fue activada en caldo MRS en condiciones anaerobias durante 14h a 37°C. Así mismo, las cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas aisladas de la microbiota normal de la vagina, fueron activadas en caldo BHI, durante 12h de incubación a 37°C.

*L. casei sp rhamnosus*, cada cepa bacteriana aislada de procesos de infección urogenital y las cepas aisladas de la microbiota normal de la vagina, fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5min y re-suspendidas en NaCl al 0,9% (p/v). La concentración celular para cada cepa fue ajustada al tubo 0,5 de la escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) adicionalmente se realizó una dilución de 1:10 obteniendo una población de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL. *L. casei sp. rhamnosus* (150μL) y cada cepa bacteriana aisladas de procesos de infección urogenital y las cepas aisladas de la microbiota normal de la vagina (150μL) fueron co-cultivados en volúmenes iguales de caldo MRS y BHI (volumen final 15mL) a 37°C por 24h bajo condiciones anaerobias y aerobias.

El número de unidades formadoras de colonia (UFC) de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y las cepas aisladas de la microbiota normal de la vagina, después del co-cultivo, fue determinado mediante un recuento en placa en agar BHI. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

### **Formulación y evaluación del formulado probiótico vaginal con *L. casei rhamnosus***

De acuerdo con la Farmacopea Portuguesa 9.0, las preparaciones vaginales pueden ser líquidas, sólidas, semi-sólidas, estas pueden contener una o varias sustancias activas y tener un número de excipientes apropiado. La preparación vaginal evaluada en el presente estudio fue del formulado de *L. casei sp rhamnosus* activo e inmovilizado (Formulado 1) y liofilizado de *L. casei sp rhamnosus* (Formulado 2), los cuales fueron sometidos a evaluación de características organolépticas, geométricos, físicas y ensayos microbiológicos.

#### **Formulado probiótico vaginal con células activas de *L. casei sp rhamnosus* inmovilizadas**

De un cultivo de *L. casei sp rhamnosus* de 14h de incubación a 37°C en caldo MRS, se centrifugo 10mL a 3500rpm por 10min, se desechó el sobrenadante y resuspendió las células en tampón PBS (Phosphate buffered saline) (pH 7,4), este lavado celular fue realizado dos veces.

Para la elaboración del formulado conteniendo células de *L. casei sp rhamnosus* activas e inmovilizadas en vehículo de gelatina, se tomó como referencia la formulación descrita en la farmacopea USP-39 (United States Pharmacopeia) para capsulas intravaginales empleando 20% gelatina, 70% glicerol y 10% agua. Sin embargo, se realizó una modificación a esta formulación disminuyendo la concentración de gelatina al 16% e incrementando al 14% el contenido de agua (Formulado 1).

Esta matriz fue disuelta a una temperatura de 70°C. El cultivo preparado de *L. casei sp rhamnosus* se mezcló con la matriz cuando esta estaba atemperada a 45°C +/-1°C. La mezcla se agitó gentilmente y fue vertida en un molde previamente estéril (esterilizado con alcohol etílico al 70% e irradiado con luz UV por 20 min) con el cuidado de no formar burbujas. Las cápsulas fabricadas conteniendo *L. casei rhamnosus* activo e inmovilizado fue secada a temperatura ambiente por 10 a 15 min, para promover la gelificación. Posteriormente, se retiraron las cápsulas (formulado 1) de *L. casei sp rhamnosus* con cuidado de no realizar rupturas o grietas (Rodrigues F. , 2011).

#### **Formulado probiótico vaginal con células liofilizadas de *L. casei sp rhamnosus***

De un cultivo de *L. casei sp rhamnosus* de 14h de incubación a 37°C en caldo MRS, se centrifugo 60mL a 3500rpm por 10min, se desechó el sobrenadante y resuspendió las células en tampón PBS (pH 7,4), este lavado celular fue realizado dos veces. El pellet obtenido fue mantenido por una hora a temperatura ambiente, una hora a 4°C, 18h a -20°C y preservó a -80°C hasta la liofilización. Las células fueron liofilizadas en un liofilizador (Marca VIRTIS modelo ADVANTAGE XL, USA.), con un ciclo completo de 48 horas,

iniciando a una temperatura de congelación de -40 °C durante 4 horas, seguido por un secado primario de 24h a -40°C y 12h de secado secundario a -20 °C.

El polvo fino conteniendo células liofilizadas de *L. casei sp rhamnosus* (almacenado a temperatura ambiente 20±2 °C) fue pesado y se realizaron los cálculos necesarios para determinar la dosis probiótica del formulado. Se mezcló las células liofilizadas (aprox. 4mg) de forma uniforme en condiciones estériles con lactosa anhidra (aprox. 496mg) empleada como excipiente, y esta mezcla fue rellena en capsulas de gelatina duras vacías (tapa y base) y se procedió a pesar (Capsula más formulado) (Rodrigues F. , 2011).

### **Evaluación de la actividad antagónica del formulado probiótico vaginal con *L. casei rhamnosus* inmovilizado y liofilizado**

Para determinar la actividad antagónica de los formulados probióticos 1 y 2 conteniendo *L.casei sp rhamnosus* en co-cultivo con *E. coli* (cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital). *E. coli* fue activado en caldo BHI, durante 12h de incubación a 37°C, se centrifugo a 5000 rpm durante 5min y re-suspendio en NaCl al 0,9% (p/v). La concentración celular fue ajustada al tubo 0,5 de la escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) adicionalmente se realizó una dilución de 1:10 obteniendo una población de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL. *E. coli* (150µL) y una capsula del formulado 1 y 2 conteniendo *L. casei sp rhamnosus* fueron co-cultivados en volúmenes iguales de caldo MRS y BHI (volumen final 15mL) a 37°C por 24h bajo condiciones aerobias.

El número de unidades formadoras de colonia (UFC) de *E. coli*, después del co-cultivo, fue determinado mediante un recuento en placa en agar BHI. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

### **Evaluación de los formulados probióticos: *L. casei sp rhamnosus* activo e inmovilizado (Formulado 1) y liofilizado de *L. casei sp rhamnosus* (Formulado 2)**

### **Ensayos organolépticos de los formulados probióticos 1 y 2**

De acuerdo a lo establecido por la farmacopea USP-39 (United States Pharmacopeia), las capsulas se evaluaron por observación empleando una lupa, y características como: apariencia, brillantez, homogeneidad de la superficie, presencia de fisuras, irregularidades o deformaciones, y color, fueron determinadas para los formulados probióticos 1 y 2.

### **Ensayos geométricos y uniformidad de peso de los formulados probióticos 1 y 2**

Se evaluaron las dimensiones geométricas de cada capsula (formulados probióticos 1 y 2) empleando un nonio (vernier), midiendo la longitud (mm) y el diámetro de cada capsula (mm).

Se pesó en una balanza analítica cada una de las capsulas (formulados probióticos 1 y 2) conteniendo a *L.casei sp rhamnosus* y capsulas que no contenían a *L.casei sp rhamnosus*, determinando la uniformidad de peso de cada cápsula.

### **Perfiles de liberación *in vitro* y evaluación de la viabilidad de *L. casei rhamnosus* a partir de los formulados probióticos 1 y 2**

Para determinar el tiempo de liberación de *L. casei sp rhamnosus* de las capsulas (formulados probióticos 1 y 2), se preparó el medio simulado de fluido vaginal (FVS, Owen y Watz 1999), el cual estuvo constituido por (1L): Cloruro de sodio 3,51g, hidróxido de potasio 1,4g, hidróxido de calcio 0,22g, ácido láctico 2g, ácido acético glacial 1g, glicerina 0,16g, urea 0,4g, glucosa 5g, ácido clorhídrico (0,1N) en una cantidad necesaria hasta alcanzar un pH 4,2 +/- 0,1.

Las capsulas recién preparadas con una población aproximada de  $1 \times 10^7$  UFC/mL, fueron disueltas en 20 mL de medio FVS e incubadas a 37°C, se recolectaron muestras a los 0, 30 y 60min. Cada muestra fue sembrada en agar MRS e incubada en aerobiosis por 48h a 37°C. Se observó la disolución de la capsula y se realizó el recuento de colonias, determinando de esta manera no solo la disolución de la capsula sino también la población viable que contiene, este procedimiento fue realizado por triplicado. Este experimento permitió determinar también la viabilidad de *L. casei rhamnosus* de los Formulados 1 y 2, para asegurar la dosis efectiva probiótica (Juárez M., 2007).

### **Ensayos Microbiológicos**

Para formas farmacéuticas semi-sólidas se realiza el control microbiológico a través del recuento de microorganismos aerobios totales, mohos y levaduras, y *Escherichia coli* mediante la técnica de recuento en placa por extensión en superficie.

#### **Recuento de microorganismos aerobios totales y de mohos levaduras**

Se colocó una capsula de formulado probiótico 1 y 2, y se disolvió en 9 mL de tampón PBS a pH 7,4. Se sembró 100 µL de la muestra en placas de Agar Soya Trypticase (TSA) para el recuento microorganismos aerobios totales y de Agar Sabouraud para recuento de mohos y levaduras. Se incubo para recuento de microorganismos aerobios totales a 37°C durante 3 días y para el recuento de mohos y levaduras de 3-5 días a 25°C. Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Cada ensayo fue realizado por triplicado

#### **Recuento de *Escherichia coli***

Se colocó una capsula de formulado probiótico 1 y 2, y se disolvió en 9 mL de caldo Soya Trypticase. Se incubo durante 1h a temperatura ambiente, se agito el recipiente y se

transfirió 1mL a 100mL de caldo MacConkey, e incubo este a 37°C durante 24h. Se subcultivo en agar MacConkey e incubo de 37°C durante 48h. El crecimiento de colonias típicas indicó la presencia de *Escherichia coli*.

## **11. Procesamiento de los datos**

### **Recolección**

Los datos se recopilaron en el transcurso o al final de cada prueba según lo requerido, los mismos fueron transcritos en la bitácora de laboratorio y tablas Excel elaborando una base de datos.

### **Elaboración**

Se elaboraron tablas, cuadros y gráficas a partir de los datos obtenidos en los experimentos realizados durante la investigación, utilizando el programa GraphPad, prisma versión 6.0 y Microsoft office Excel 2016.

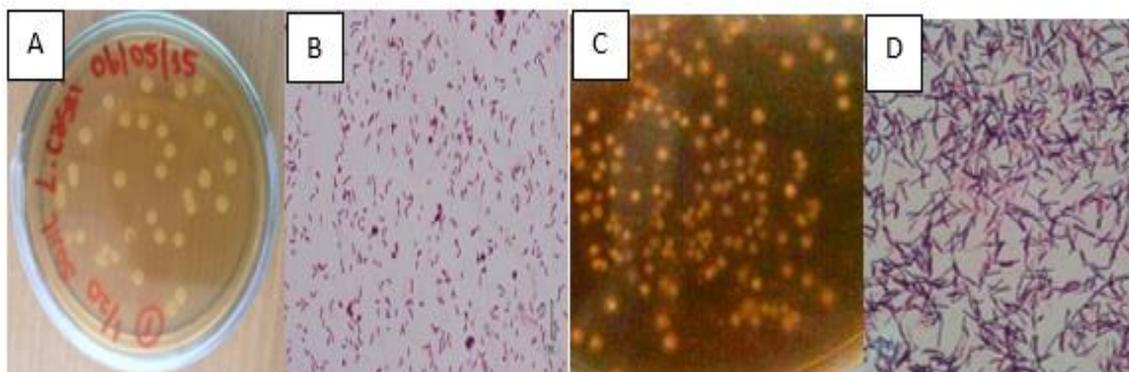
### **Análisis Estadístico**

Los datos se analizaron mediante *t-student* pareado usando el programa GraphPad, prisma versión 6.0 y Microsoft office Excel 2016. Diferencias significativas se determinaron en  $P < 0,05$ . Todos los análisis fueron realizados por duplicado o triplicado.

## **12. Resultados y discusión**

### **Caracterización de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus***

*L. casei sp rhamnosus* crecido en agar MRS comercial (OXOID), se desarrolla en colonias circulares de 1,5mm, blanquecinas, de superficie convexa y aspecto mucoso (Fig. 1A). La morfología microscópica de *L. casei sp rhamnosus* sometido a tinción Gram, presenta bacilos cortos G (+) dispuestos en pares (Fig. 1B). Sin embargo, *L. acidophilus* crecido en medio MRS preparado por ingredientes, presenta dos variantes en colonias, un tipo de colonia de forma circular, color blanquecino, con una superficie convexa, de aspecto mucoso y brillante y un segundo tipo de colonia de forma irregular, de color blanquecino-opaco y con una superficie granular (Fig. 1C). La morfología de *L. acidophilus* bajo observación microscópica (100X) corresponde a bacilos largos G (+) dispuestos en cadena (Fig. 1D).



**Figura 1.** A. Colonias de *L. casei sp rhamnosus* cultivado en agar MRS. B. Morfología de *L. casei sp rhamnosus* bajo observación microscópica (100X). C. Colonias de *L. acidophilus* cultivado en agar MRS por ingredientes. D. Morfología de *L. acidophilus* bajo observación microscópica (100X).

*L. casei sp rhamnosus* empleado en este estudio corresponde a la cepa LCR35 caracterizada como bacilos de Döderlein, el cual fue aislado por Hansen en el año 1968 (Hansen 1968, Collins et al. 1989) y forma parte de la microbiota vaginal normal, por ello se fundamenta su aplicación como restaurador de microbiota en el presente estudio. La caracterización de *L. casei sp rhamnosus* en otros estudios revela su crecimiento en colonias circulares y blanquecinas, bajo observación microscópica son bacilos G (+) rectos o curvos que están sueltos o en cadena corta (Am. J. Obst. & Gynec. December, 1948), características que contrastan con las observadas en el presente estudio, sin embargo, la morfología macroscópica varía dependiendo de la edad del cultivo y la naturaleza del medio de cultivo. Adicionalmente, en algunos casos *L. acidophilus* se presenta en forma de bacilos largos normalmente dispuestos en cadenas, esto cuando es cultivado en medio sólido MRS por ingredientes.

Fenotípicamente, especies de Lactobacilos responden a condiciones variables durante su crecimiento *in vitro* a través de cambios morfológicos que se hacen evidentes bajo observación microscópica e incluso cambios macroscópicos que se reflejan en la morfología de las colonias en medio sólido (Huys, 2013). *L. acidophilus* crecido en MRS agar presenta dos variantes en colonias, un tipo de colonia de forma circular, color blanquecino, con una superficie convexa, de aspecto mucoide y brillante y un segundo tipo de colonia de forma irregular, de color blanquecino-opaco y con una superficie granular. Estudios realizados por (Endo, 2015) reportaron esta característica de heterogeneidad durante el crecimiento de *L. acidophilus* en MRS agar, que usualmente se presenta en formas R (colonia irregular y opaca) y S (colonia de borde definido y brillante).

Por lo cual, en el presente estudio esta variante en la morfología de las colonias no se debe a contaminación en el cultivo de *L. acidophilus*, ya que examinado microscópicamente permanece invariable, sino más bien a una diferencia fenotípica como resultado del efecto de las condiciones de cultivo. Así mismo, la caracterización bioquímica de los dos morfotipos S y R, de *L. acidophilus* reveló su homología de especie (datos no mostrados).

## **Caracterización bioquímica de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus***

La fermentación de carbohidratos para *L. casei sp rhamnosus* se determinó en base a la acidificación del medio de cultivo donde se desarrolló, se evaluó la capacidad metabólica de *L. casei sp rhamnosus* de fermentar sustratos presentes en el medio incrementando la turbidez del mismo, y ocasionando un descenso de pH.

Los resultados muestran formación de ácido a partir de glucosa, sorbitol, manitol, lactosa, fructosa, glucosamina, galactosa, celobiosa, maltosa y sacarosa con un descenso de pH inicial de 6,95 a 4,33. *L. casei sp rhamnosus* no fermenta myo-inositol ni glicerol con un pH inicial de 6,95 a 6,06. La fermentación de xilosa conduce a una limitada reducción de pH del medio en comparación a otros sustratos que fueron fermentados con un pH inicial de 6,95 a 5,88 (Tabla 1). Otros estudios reportan que xilosa no es fermentada y myo-inositol es fermentado por *L. casei sp rhamnosus* (Denkova, 2012) resultados que no contrastan con el presente estudio.

Por otro lado, la fermentación de carbohidratos por parte de *L. acidophilus*, fue evaluado por medio del descenso de pH ocasionado por la actividad metabólica de *L. acidophilus*. Los resultados muestran que hubo fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa, fructosa, glucosamina, celobiosa y galactosa con un descenso de pH de 6,85 a 4,31. Sorbitol, manitol, myo-inositol y glicerol no fueron fermentados por *L. acidophilus* con un descenso de pH de 6,85 a 6,17. Maltosa y xilosa mostraron un limitado descenso de pH en el medio en comparación a los demás carbohidratos partiendo de un pH de 6,85 a 5,62 (Tabla 1). Sin embargo, otros estudios demuestran que maltosa es fermentada por *L. acidophilus* y xilosa no puede ser metabolizada (Boyd, 2005).

Las técnicas fenotípicas como el sistema de fermentación de carbohidratos todavía se toman como poderosas herramientas capaces de discriminar entre las especies de Lactobacilos, el producto de fermentación de cada especie de Lactobacilos depende de donde se aíslen estas cepas, por lo cual la variación de resultados de fermentación con otros estudios.

**Tabla 1.** Caracterización bioquímica de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus*.

Sustrato 10g/L	<i>L. casei sp rhamnosus</i>			<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
	Este Estudio	Succi 2005	Denkova 2012	Este Estudio	Melo 2011	Boyd 2005
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Xilosa	-/+	-	-	+/-	-	-
Sorbitol	+	+	+	-	-	-
Manitol	+	+	+	-	ND	ND
Lactosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+/-	+	+	+/-	+	+
Sacarosa	+/-	+	+	+	ND	ND
Fructosa	+	+	ND	+	ND	+
Myo-inositol	+	+	+/-	-	ND	ND
Glucosamina	-	+	ND	+	ND	ND
Galactosa	+	+	ND	+	+	+
Celobiosa	+	+	ND	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	ND	ND

+: Positivo, -: negativo y +/-: variable, escasa acidificación del medio, ND: no determinado

### **Determinación de parámetros cinéticos durante el crecimiento de *L. casei sp rhamnosus***

Debido a que *L. casei sp rhamnosus* es un anaerobio facultativo, los parámetros cinéticos durante el crecimiento de este en condiciones anaerobias y aerobias, fueron evaluados. El monitoreo de la curva de crecimiento de *L. casei rhamnosus* en condiciones aerobias y anaerobias, reveló el crecimiento bacteriano en tres fases: a) Fase de adaptación, en este periodo *L. casei sp rhamnosus* se adapta a las condiciones de crecimiento, y no posee la capacidad de dividirse, esta fase ocurre tanto en condiciones aerobias y anaerobias y dura alrededor de 4h. b) Fase Exponencial. Este periodo es caracterizado por la duplicación celular, esta fase en condiciones aerobias es de 10h, aproximadamente. Sin embargo, en condiciones anaerobias esta fase dura alrededor de 8h. c) Fase estacionaria, caracterizada por la tasa de crecimiento de *L. casei sp rhamnosus* estable, esta fase es alcanzada cuando las bacterias empiezan a agotar los nutrientes disponibles.

Para *L. casei casei sp rhamnosus* ocurre después de las 12h de cultivo en aerobiosis y 14h de cultivo en anaerobiosis. Comparando los resultados se determinó que no existe diferencia significativa en cuanto a la cinética de crecimiento de *L. casei sp rhamnosus* en condiciones aerobias y anaerobias ( $p < 0,05$ , Tabla 2). (Siaterlis, 2009) reporta que la fase logarítmica de *L. casei sp rhamnosus* es alcanzada a las 4-5h y la fase estacionaria alrededor de las 14h de cultivo, concordando así con nuestros resultados.

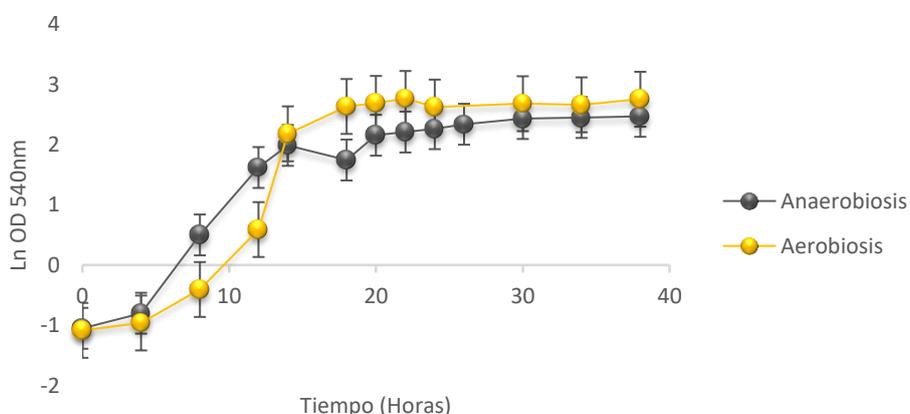
En la Fig. 3, se muestra que la población bacteriana máxima en la fase exponencial tardía de crecimiento (18h de cultivo) es de alrededor de  $4,20 \times 10^9$  UFC/mL en anaerobiosis y  $2,50 \times 10^9$  UFC/mL en aerobiosis, resultados obtenidos por recuento en placa. Otros estudios reportan, que en el recuento bacteriano de *L. casei sp. rhamnosus* no existe diferencia cuando estas son incubadas en condiciones anaerobias o aerobias ya que esta bacteria es anaerobia facultativa). (Siaterlis, 2009) y (Annuk et. al., 2005).

En este estudio la fase estacionaria temprana fue a las 12h en anaerobiosis y 14h en aerobiosis. (Jurado G., 2015) reporta un resultado similar de 16h de la fase estacionaria. La velocidad de crecimiento de *L. casei sp rhamnosus* en anaerobiosis fue de  $0,30 \text{ h}^{-1}$  y aerobiosis de  $0,29 \text{ h}^{-1}$ . El tiempo de generación en anaerobiosis fue de 3,3h y en aerobiosis de 3,4h. (Valik, 2008), reportaron una velocidad de crecimiento de *L. casei sp rhamnosus* de  $0,28 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de generación de 1,23h. Se pudo observar que existe variabilidad con los resultados obtenidos esto pudo deberse a que en otros estudios se utilizó medio MRS formulado en ingredientes, por lo cual estuvo sujeto a variaciones en composición, ocasionando un efecto en el crecimiento del microorganismo.

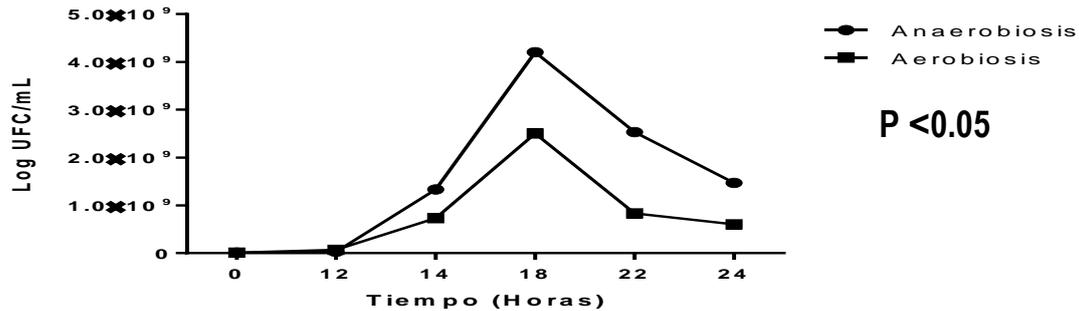
En nuestro estudio los resultados de ambas condiciones tanto anaerobias y aerobias muestran que *L. casei sp rhamnosus* logro generar mayor número de UFC/mL en anaerobiosis.

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos de la curva de crecimiento de *L. casei sp rhamnosus*.

Parámetro Cinético	Aerobiosis	Anaerobiosis
Fase de adaptación (h)	0-4	0-4
Fase Exponencial (h)	4-14	4-12
Fase Estacionaria (h)	14-24	12-24
Velocidad de crec.(h <sup>-1</sup> )	0,29	0,30
Tiempo de generación (h)	3,4	3,3



**Figura 2.** Cinética de crecimiento del probiótico *L. casei sp rhamnosus* en condiciones aerobias y anaerobias a 37°C.



**Figura 3.** Población bacteriana máxima del probiótico *L. casei sp rhamnosus* en condiciones aerobias y anaerobias a 37°C.

### **Perfil de resistencia antimicrobiana de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus***

Los agentes probióticos muestran gran resistencia a antibióticos preescritos comúnmente en infecciones urogenitales (Tabla 3). *L. casei sp rhamnosus* muestra resistencia a Amikacina (30µg), Norfloxacin (10µg), Ac. Nalidixico (2µg) y es sensible a Nitrofurantoina (300µg) con un halo de inhibición de 24mm y Cefotaxima (30µg) con un halo de inhibición de 18mm. *L. acidophilus* es resistente a Amikacina (30µg), Norfloxacin (10µg) y Ac. Nalidixico (2µg) y muestra sensibilidad a Nitrofurantoina (300µg) con un halo de inhibición de 20mm y Cefotaxima (30µg) con un halo de inhibición de 20mm. Mostrando similar perfil de resistencia y sensibilidad en otros estudios (Halder, 2016) (Tabla. 3).

El antibiograma a cepas probióticas se realizó con el fin de determinar el efecto de los antibióticos frente a los microorganismos que forman parte de la microbiota normal de la vagina. Dando como resultado la inhibición de los probióticos frente a Nitrofurantoina (300µg) y Cefotaxima (30µg), antibióticos prescritos en infección urogenital. Además, se determinó que el antibiótico Nitrofurantoina (300µg) inhibía a los probióticos en estudio, por lo cual se utilizó como control positivo a este antibiótico en la prueba de actividad antagonista en placa.

Los microorganismos probióticos mantienen un ecosistema vaginal sano. Además, reduce la incidencia de infecciones, asociada al consumo de antibióticos. Este depende en gran medida de su capacidad para sobrevivir a las condiciones estresantes junto con el antibiótico dado. En consecuencia, la selección de una cepa probiótica para una aplicación como agente profiláctico debe tener en cuenta los cambios en su susceptibilidad a los antibióticos debido a diversos factores estresantes encontrados en el tracto vaginal (Kheadr, 2006).

**Tabla 3.** Perfil de resistencia antimicrobiano de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus*

Cepa	Antibiótico				
	Amikacina (30µg)	Nitrofurantoina (300µg)	Norfloxacin (10µg)	Ac. Nalidixico (2µg)	Cefotaxima (30µg)
<i>L. casei sp rhamnosus</i>	R	S (24mm)	R	R	S(18mm)
<i>L. acidophilus</i>	R	S (20mm)	R	R	S(20mm)

### Características morfológicas y fisiológicas de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina

Estudios reportan que *E. coli* es el uropatogeno predominante ya que es frecuentemente aislado de pacientes con infecciones urogenitales. Además, es capaz de desarrollar multi-resistencia a los diversos antibióticos prescritos causando infecciones urogenitales complicadas (Ouno, 2013).

Como se puede observar en la tabla 4, los resultados en nuestro estudio muestran que *E. coli* fue predominante durante el aislamiento de cepas bacterianas en muestras de mujeres (18 a 45 años) con infecciones urogenitales. Después de coleccionar las cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina del laboratorio de Bacteriología del Instituto SELADIS, se procedió a realizar la caracterización de las mismas, cuyas características morfológicas macroscópicas y microscópicas son descritas en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Caracterización morfológica de cepas de bacterias aisladas en procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal, cultivos enriquecidos en medio BHI.

Cepa	Características Macroscópicas				Características Microscópicas
	N.º de muestras	Tamaño de la colonia	Forma de la colonia	Color de la colonia	Tinción Gram
<i>E. coli</i>	10	2mm	Plana irregular	Grisácea	Bacilo corto G (-)
<i>Proteus sp</i>	2	1,5mm	Convexa	Grisácea	Bacilo corto G (-)
<i>Corynebacterium sp</i>	12	1 mm	Convexa	Grisácea	Bacilo Recto G (+) en Forma de V
<i>S. epidermidis</i>	8	1,5	Convexa	Blanca	Cocos G (+) en racimos

## Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina

En el perfil de resistencia y sensibilidad con antibióticos comúnmente prescritos en infecciones urogenitales realizado a las cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina en pacientes mujeres entre 18 a 45 años que asistieron al instituto SELADIS con diagnóstico de infección urogenital, los resultados se reportan como S: microorganismos sensibles al antibiótico (diámetro de inhibición en mm) y R: microorganismos resistentes al antibiótico (con halo de inhibición por debajo de lo aceptable por la norma de la NCCLS para antibiogramas de difusión o sin halo de inhibición) como se muestra en la Tabla 5.

*E. coli* es resistente a Ac. Nalidixico (2µg), Norfloxacin (10µg) y Cefotaxima (30µg) y sensible a Amikacina (30µg), Nitrofurantoina (300µg). *Corynebacterium sp*, *S. epidermidis* y *Proteus sp* muestran resistencia a Ac. Nalidixico (2µg), Norfloxacin (10µg) y Cefotaxima (30µg) y son sensibles a Amikacina (30µg) y Nitrofurantoina (300µg) (Tabla 5).

Los resultados obtenidos del perfil antimicrobiano son similares a otros estudios (Darquea Leoro, 2014). Las cepas bacterianas aisladas en procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal exhibieron una mayor sensibilidad hacia Nitrofurantoina (300µg), por lo cual se utilizó como control positivo a este antibiótico en la prueba de actividad antagónica en placa. El antibiograma realizado a cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina de igual manera mostraron ser inhibidas por los antibióticos prescritos comúnmente en infecciones urogenitales demostrando de esta manera una disminución en la población de estos en la vagina.

**Tabla 5.** Perfil de resistencia antimicrobiano de cepas bacterianas aisladas en procesos de infección urogenital y cepas pertenecientes a la microbiota normal de la vagina.

Cepa	Antibiótico				
	Amikacina (30µg)	Nitrofurantoina (300µg)	Norfloxacin (10µg)	Ac. Nalidixico (2µg)	Cefotaxima (30µg)
<i>E. coli</i>	S (20mm)	S (25mm)	R	R	R
<i>Corynebacterium sp</i>	S (20mm)	S (22mm)	R	R	R
<i>Proteus sp</i>	S (20mm)	S (20mm)	R	R	R
<i>S. epidermidis</i>	S (24mm)	S (20mm)	R	R	R

**S:** sensible (diámetro del halo de inhibición en mm), **R:** resistente

## Determinación de Actividad Antagónica

### Pruebas de actividad antagónica en Placa: *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* contra cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital

Como se observa en la tabla 6, figura 4, el microorganismo probiótico *L. casei sp rhamnosus* (20 µL con 10<sup>7</sup>UFC/mL), produjo una zona de inhibición contra *E. coli* (28mm), *Proteus sp* (20mm) *Corynebacterium sp* (20mm) y *S. epidermidis* (14mm). El halo inhibición de nitrofurantoina (300µg), empleado como antibiótico control, fue de 20-25mm para las cepas mencionadas. El crecimiento de las cepas bacterianas aisladas de muestras urogenitales, fue inhibido efectivamente por la presencia de *L. casei sp rhamnosus* a las 24h de incubación.

La inhibición causada por *L. casei sp rhamnosus* hacia el microorganismo causante de infección *E. coli* fue mayor, ya que los halos de inhibición obtenidos, fueron superiores comparados con el halo de inhibición del antibiótico control, por tanto, se registró una inhibición superior a la producida por Nitrofuratoína, antibiótico que es usualmente recomendado en el tratamiento de infecciones urogenitales. Este experimento ha procurado proporcionar una visión general de la actividad inhibitoria de *L. casei sp rhamnosus* contra bacterias aisladas del ecosistema de la vagina humana.

Por otro lado, la cepa *L. acidophilus* (20µL con 10<sup>7</sup>UFC/mL), produjo una zona de inhibición contra *E.coli* (20mm), *Corynebacterium sp* (14mm), *Proteus sp* (12mm), *S. epidermidis* (10mm). El halo de inhibición de nitrofurantoina (300µg), el cual fue empleado como antibiótico control, fue de 20-25mm para las cepas mencionadas. La inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas aisladas de muestras urogenitales, fue menor en presencia de *L. acidophilus* en comparación a *L. casei sp rhamnosus* y nitrofurantoina (300µg) después de 24h de incubación.

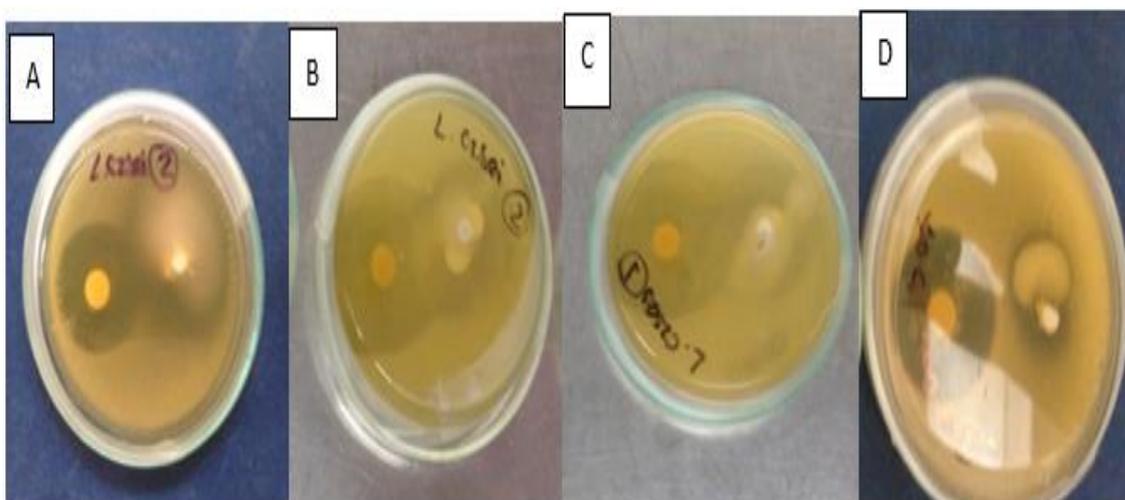
Los resultados de la técnica de evaluación de actividad antagónica en placa demostraron que tanto *L. casei sp rhamnosus* como *L. acidophilus*, y su relación 1:1 con las cepas bacterianas aisladas de infecciones urogenitales, muestran una inhibición de G (-) como *E. coli* y *Proteus sp*.

Como los resultados indican, los diámetros de las zonas de inhibición variaron, oscilando entre 20 a 28mm (Tabla 6,7). Esto reveló que tanto *L. casei sp rhamnosus* como *L. acidophilus* inhibieron a las cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital. Teniendo en cuenta que las cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital *E. coli* G (-), la mayor actividad inhibitoria del crecimiento fue observada cuando se empleó *L. casei sp rhamnosus*, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, después de 24h de incubación, mostrando resultados similares a lo descrito por (Pascual L., 2008). Schillinger mencionó que la inhibición era positiva si la anchura de la zona clara alrededor de las colonias de la cepa productora era de 20mm o mayor. Un estudio similar fue realizado por Kalalou que estudió la actividad de los Lactobacilos sobre algunas bacterias patógenas G (+) y G (-) tales como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus* y las zonas de inhibición oscilaron entre 14 a 28 mm.

La presente investigación demostró que *L. casei sp rhamnosus* posee actividad inhibitoria superior, lo cual podría ser explicado debido a que es capaz de producir sustancias inhibitorias del crecimiento de bacterias uropatógenas. El uso de placas en spot test proporcionó una forma de examinar la interacción de dos bacterias y de determinar algunas propiedades generales del efecto inhibitor sin excluir los efectos de ácido y pH.

**Tabla 6.** Inhibición de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital por el microorganismo probiótico *L. casei sp rhamnosus*

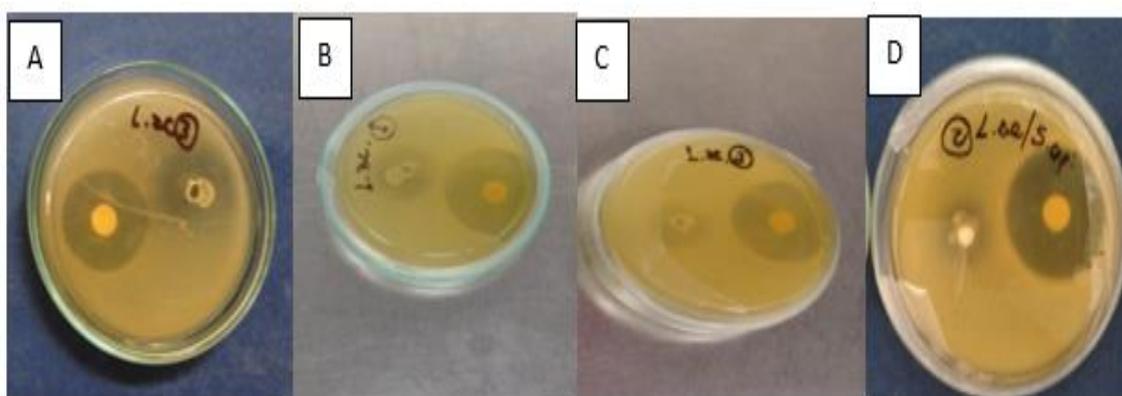
Cepas bacterianas aisladas de infección urogenital	Número de cepas	Halos de inhibición (mm)		Número de cepas inhibidas (%)
		Nitrofurantoína (300 µm)	<i>L. casei sp rhamnosus</i> (10 <sup>7</sup> UFC/mL)	
<i>E. coli</i>	10	20	28	100
<i>Corynebacterium sp</i>	12	25	20	100
<i>Proteus sp</i>	2	23	20	100
<i>S. epidermidis</i>	5	25	14	100



**Figura 4.** Actividad antagónica en placa mostrando los halos de inhibición de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital por el microorganismo probiótico *L. casei sp rhamnosus* usando como control positivo al antibiótico Nitrofurantoina (300µg) **A.** *E. coli* **B.** *Corynebacterium sp.* **C.** *Proteus sp.* **D.** *S. epidermidis.*

**Tabla 7.** Inhibición de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital por el microorganismo probiótico *L. acidophilus*.

Cepas bacterianas aisladas en infección urogenital	Numero de cepas	Halos de inhibición (mm)		Numero de cepas inhibidas (%)
		Nitrofurantoina (300µg)	<i>L. acidophilus</i> (10 <sup>7</sup> UFC/mL)	
<i>E. coli</i>	10	20	20	100
<i>Corynebacterium sp</i>	12	24	14	100
<i>Proteus sp</i>	2	23	12	100
<i>S. epidermidis</i>	5	25	10	100



**Figura 5.** Actividad antagonista en placa mostrando los halos de inhibición de cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital por el microorganismo probiótico *L. acidophilus* usando como control positivo al antibiótico Nitrofurantoina (300µg) A. *E. coli* B. *Corynebacterium sp*. C. *Proteus sp*. D. *S. epidermidis*.

### Pruebas de actividad antagonista en microplaca empleando sobrenadante *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* contra cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital

En este experimento, se evaluó la actividad de los sobrenadantes de: *L. casei sp rhamnosus* de pH 3,96 y pH ajustado a 7,0, y *L. acidophilus* de pH 4,09 y pH ajustado a 7,0. Los sobrenadantes fueron filtrados a través de una membrana de poro 0,20µm, para su evaluación de actividad antagonista contra cepas aisladas de procesos de infección urogenital. El objetivo del presente experimento fue determinar si la actividad antagonista fue debida al efecto del pH acidificado durante el crecimiento de las cepas probióticas.

Los resultados mostraron que el sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* con un pH de 3,96 tiene actividad inhibidora contra *E. coli* retardando su crecimiento, registrado por leve incremento de la turbidez (DO: 0,171 a 0,429). En contraste, el sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* con un pH ajustado de 7,0 no tiene actividad inhibidora contra *E. coli*, debido a que se registró un marcado incremento de la turbidez del cultivo (DO: 0,299 a 1,479). Por tanto, el crecimiento de *E. coli* se afectó significativamente ( $P < 0,05$ ) empleando el sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* con un pH de 3,96 (Tabla 8).

Por otro lado, el sobrenadante de *L. acidophilus* no inhibió el crecimiento de *E. coli* significativamente ( $P > 0,05$ ), observando un incremento de la turbidez de 0,284 a 1,280 (pH 4,09) y 0,335 a 1,401 (pH 7,0) (Tabla 9).

El sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* de pH de 3,96, afectó el crecimiento de *E. coli* significativamente ( $P < 0,05$ ), si es comparado con el sobrenadante de *L. acidophilus* de pH de 4,09. Además, no existió inhibición cuando los sobrenadantes del cultivo de Lactobacilos se neutralizaron con NaOH (0,1N) a un pH de 7,0, lo que sugiere que la inhibición del crecimiento de las cepas de *E. coli* fue resultado de la producción de ácidos orgánicos liberados por el metabolismo fermentativo de ambas cepas que conducen a la acidificación del medio. Resultados similares a los obtenidos a Hutt et al. (2005) que describen una reducción del efecto inhibitor de 6 ciclos logarítmicos del sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* libre de células pH ácido.

La inhibición del crecimiento de cepas de *E. coli* en este estudio se debió muy probablemente a la producción de ácidos orgánicos por *L. casei sp rhamnosus*. Esto coincide con los resultados de (A. Berenice Arias O., 2013), reportando que el crecimiento de cepas de *E. coli* y *Salmonella* fue inhibido debido a la producción de ácidos orgánicos por aislados de Lactobacilos. Por otra parte, (Lebeer, 2008) informo que la acción antibacteriana producida por *L. casei sp rhamnosus* se debió probablemente a una combinación de factores incluyendo ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y otras sustancias inhibitoras tales como bacteriocinas.

Debe observarse que las cepas de *L. casei sp rhamnosus* y *L. acidophilus* están compuestas de grupos heterogéneos sobre la base de la homología ADN-ADN (Berger, 2006). Por lo tanto, es probable que las actividades antibacterianas variables contra cepas de *E. coli* puedan reflejar tal heterogeneidad de estos probióticos. Estos resultados sugieren que *E. coli* es más resistente a los ácidos que produjo *L. acidophilus*, que posee un metabolismo heterofermentativo. Los investigadores han asociado una alta actividad antagónica de los lactobacilos con la producción de ácidos orgánicos dando como resultado una disminución del pH (Ouwehand, 2004).

**Tabla 8.** Actividad antagónica del sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* frente *E. coli* (D.O. 540nm).

Densidad Óptica a 540nm				
Tiempo (Horas)	Control Abiótico	Control (+)	pH Neutro	pH Ácido
0	0,095	0,176	0,299	0,171
3	0,094	0,319	0,425	0,234
6	0,094	0,893	1,020	0,224
9	0,094	1,128	1,211	0,214
12	0,094	1,168	1,229	0,214
24	0,092	1,354	1,479	0,429

Control abiótico. Caldo BHI con sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus*

Control (+). Caldo BHI conteniendo a *E.coli*

pH neutro. Sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* a pH 7,0 conteniendo *E. coli*

pH ácido. Sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* a pH 3,96 conteniendo *E. coli*.

**Tabla 9.** Actividad antagonica del sobrenadante de *L. acidophilus* frente *E. coli* (D.O. 540nm).

Densidad Óptica a 540nm				
Tiempo (Horas)	Control Abiótico	Control (+)	pH Neutro	pH Acido
0	0,095	0,176	0,335	0,284
3	0,094	0,319	0,561	0,471
6	0,094	0,893	0,957	0,844
9	0,094	1,128	1,037	0,921
12	0,094	1,168	1,041	0,926
24	0,092	1,354	1,401	1,280

Control abiótico. Caldo BHI más sobrenadante de *L. acidophilus*

Control (+). Caldo BHI conteniendo a *E. coli*

pH neutro. Sobrenadante de *L. acidophilus* a pH 7,0 conteniendo *E. coli*

pH acido. Sobrenadante de *L. acidophilus* a pH 4,09 conteniendo *E. coli*

Los resultados obtenidos en este experimento permitieron seleccionar a *L. casei sp rhamnosus* por su mayor actividad antagonica contra *E. coli*. Sin embargo, para determinar su efecto en la reducción de la viabilidad de *E. coli*, se evaluó la reducción del número de sus ciclos logarítmicos, en base a la técnica de recuento en placa, la cual proporciona resultados exactos del número de bacterias viables después del contacto con el sobrenadante probiótico, a diferencia de una medida de turbidez, la cual no discrimina entre bacterias viables y no viables.

Como se puede ver en la Tabla 10, no se observó efecto inhibitorio cuando se emplea el sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* con pH ajustado a 7,0, frente a *E. coli*, debido a que no existió una reducción de la población, manteniendo 7 ciclos logarítmicos (Log UFC/mL) de 0 a 72 h de contacto entre el sobrenadante y *E. coli*, en contraste a una disminución de 7 ciclos logarítmicos a las 48 h cuando se emplea el sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* con pH 3,96. Así mismo, se pudo observar que el ácido inhibitorio probablemente producido por *L. casei sp rhamnosus* es ácido láctico (0,5%) ya que hubo una disminución significativa de ciclos logarítmicos al igual que en el control (reducción de 7 ciclos logarítmicos a las 48h de contacto) y no así con el ácido acético (sin reducción de ciclos logarítmicos a las 72h).

Se revelaron las correlaciones positivas entre el pH, el tipo y la concentración de ácido producido y el rango de actividad antagonica para los probióticos evaluados. Es posible, que *L. casei sp rhamnosus* produjera ácido láctico en mayor concentración para lograr un efecto inhibitorio más fuerte frente a las bacterias seleccionadas en este estudio, sin embargo, es necesario determinar la concentración de ácido láctico producida por este microorganismo para aseverar esta hipótesis. La inhibición del crecimiento bacteriano debido al ácido láctico puede explicarse por una fuga eficiente de iones hidrógeno a través de la membrana celular que provoca la acidificación del citoplasma y la disipación del gradiente de pH (Pehrson1, 2015).

**Tabla 10.** Efecto antagonico de: sobrenadantes artificiales de ácido láctico 0,5% y ácido acético 0,05% y de *L. casei sp rhamnosus* en contacto con *E. coli* (Log UFC/mL).

Ciclos Logarítmicos							
Tiempo	<i>E. coli</i>	Ácido Láctico 0,5%		Ácido Acético 0,05%		Sobrenadante de <i>L. casei sp rhamnosus</i>	
Horas	Control (+)	pH ácido	pH neutro	pH Acido	pH Neutro	pH Acido	pH Neutro
0	7	7	7	7	7	7	7
24	9	4	7	7	9	6	7
48	9	0	7	7	7	0	7
72	10	0	7	7	7	0	7

Control (+). Crecimiento de *E. coli* en caldo BHI  
 Ácido Láctico 0,5% pH ácido 3,25 y pH neutro 7.  
 Ácido Acético 0,05% pH ácido 3,10 y pH neutro 7.  
 Sobrenadante *L. casei sp rhamnosus* pH ácido 3,96 y pH neutro 7.

### **Prueba de actividad antagonica empleando co-cultivo *L. casei sp rhamnosus* y *E. coli***

En este experimento se seleccionó *L. casei sp rhamnosus*, para evaluar su actividad antagonica en co-cultivo contra bacterias aisladas de infección urogenital, y determinar la reducción cuantitativa de su población viable causante de infección y el tiempo de acción del probiótico. Es importante mencionar, que al determinar la concentración activa con capacidad antagonica de *L. casei rhamnosus*, se estaría estableciendo la dosis activa probiótica capaz de combatir infecciones si esta dosis fuera administrada en formulaciones intravaginales.

En este experimento, se evaluó la actividad antagonica del co-cultivo de *L. casei sp rhamnosus* contra *E. coli*. La inhibición del crecimiento de *E. coli* se estableció debido a la reducción del número de ciclos logarítmicos (log10 UFC/mL) de ésta (Tabla 11). El objetivo del experimento fue determinar la reducción de la viabilidad de *E. coli* y el tiempo en el que se alcanza la reducción total, esto fue realizado en base a la técnica de recuento en placa posterior al co-cultivo de los microorganismos, es decir, después del contacto con el probiótico.

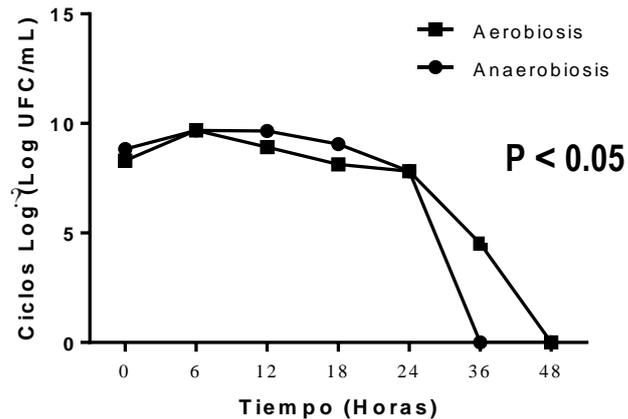
Se ha determinado en estudios previos que las cepas vaginales de Lactobacilos controlan la microbiota vaginal, colonizando el epitelio e inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos (Michalkiewicz, 2006). Es así que las cepas de Lactobacilos, como candidatos para probióticos vaginales, se evalúan *in vitro* por su capacidad para adherirse al epitelio vaginal, su actividad antimicrobiana y su producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, según varios autores, pueden ser los responsables de la actividad inhibitoria (Reid G. J., 2009). *L. casei sp rhamnosus* revela diferentes mecanismos antimicrobianos mostrados en ensayos *in vitro*.

La actividad antagonista en co-cultivo en caldo es favorecida por la rápida difusión de compuestos antimicrobianos, incluyendo los ácidos orgánicos y la co-agregación de Lactobacilos con los patógenos. Adicionalmente, se ha demostrado que los lactobacilos producen ácidos orgánicos y bacteriocinas de manera diferente en condiciones anaerobias y aerobias (Annuk et al., 2006). En este sentido, fue necesario evaluar la actividad antagonista de *L. casei rhamnosus* contra *E. coli* en condiciones aerobias y anaerobias, para determinar si las condiciones de crecimiento favorecerían la actividad antagonista de *L. casei rhamnosus* en co-cultivo.

Utilizando este enfoque se determinó que *L. casei sp rhamnosus* ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL) en co-cultivo con *E. coli* ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL), en condiciones anaerobias y aerobias (tabla 11), fue capaz de inhibir totalmente a *E. coli*, con una reducción de 7 ciclos logarítmicos, a las 36h y 48h de co-incubación, en anaerobiosis y aerobiosis, respectivamente. Además, que no existió diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) de la actividad antagonista en ambas condiciones (Fig. 6), por lo cual se realizó los demás experimentos en condiciones aerobias. En este estudio, la inhibición total de *E. coli* ocurrió debido al efecto antagonista del probiótico, ya que ésta no fue inhibida y desarrollo óptimamente en el medio control carente de probiótico. Alain L., (2008) concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que *L. casei sp rhamnosus* logra reducir hasta 7 ciclos logarítmicos de *E. coli*, aislado de infecciones urogenitales.

**Tabla 11.** Actividad antagonista co-cultivo en caldo en condiciones anaerobias y aerobias de *L. casei sp rhamnosus* contra *E. coli* (Log UFC/mL).

Tiempo (Horas)	Control (+) <i>E.coli</i> (Log UFC/mL)	Co-cultivo en Anaerobiosis (Log UFC/mL)	Co-cultivo en Aerobiosis (Log UFC/mL)
0	7	7	7
6	8	8	8
12	9	8	8
18	9	8	8
24	10	7	7
36	10	0	5
48	10	0	0



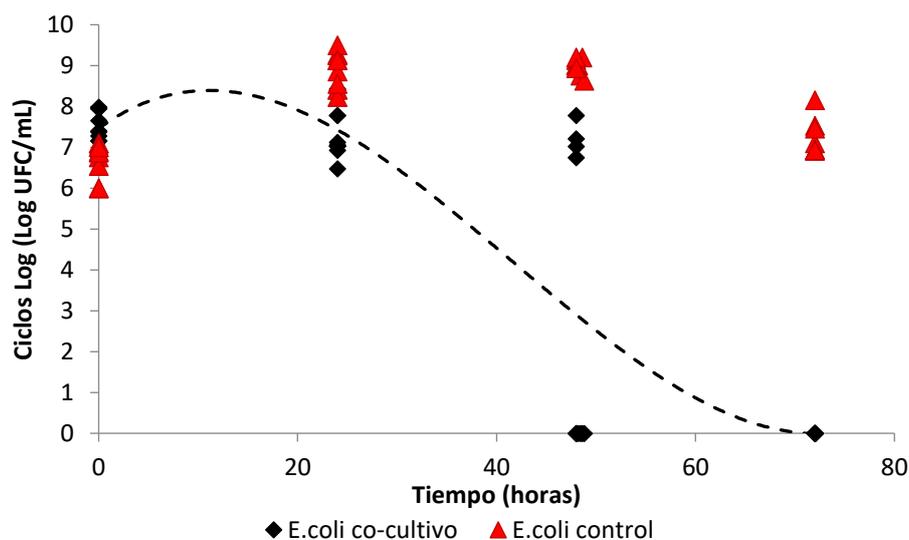
**Figura 6.** Actividad antagónica en co-cultivo de *L. casei sp rhamnosus* y *E. coli* en condiciones anaerobias y aerobias.

**Prueba de actividad antagónica empleando co-cultivo *L. casei sp rhamnosus* con cepas que conforman la microbiota normal de la vagina y cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital**

*L. casei sp rhamnosus* se seleccionó para la evaluación antagónica en co-cultivo con todas las cepas bacterianas aisladas de procesos de infección urogenital. Los resultados de la actividad antagónica de *L. casei sp rhamnosus* contra las cepas bacterianas aisladas en procesos de infección urogenital y cepas de la microbiota normal de la vagina: *E. coli*, *Proteus sp*, *Corynebacterium sp*, *S. epidermidis* se resumen en las Figuras 7, 8, 9, 10, respectivamente.

En la Figura 7 se observa la inhibición de 10 cepas de *E. coli* aisladas de muestras infecciosas. La reducción total de los ciclos logarítmicos de *E. coli* (7 ciclos logarítmicos =  $1,13 \times 10^7$  UFC/mL iniciales reducidos a 0 ciclos = 0 UFC/mL) varía en función al tiempo. 6 de las 10 cepas de *E. coli* fueron inhibidas a las 48h de incubación en co-cultivo, otras 4 fueron inhibidas a las 72h de incubación. Esta diferencia puede ser explicada debido a que las 4 cepas inhibidas a las 72h presentan mayor resistencia. A pesar de ser este un fenómeno natural de los microorganismos, el proceso de inhibición puede ser retardado por diversos factores, entre ellos, un inadecuado uso de los antibióticos en el control de enfermedades (Martínez-Pacheco D, 2013).

La inhibición de las cepas de *E. coli* fue debida al probiótico empleado, ya que, en controles carentes de *L. casei rhamnosus*, *E. coli* desarrolló normalmente alcanzando una población de 9 ciclos logarítmicos (de una población inicial de  $1,13 \times 10^7$  UFC/mL a  $1,43 \times 10^9$  UFC/mL a las 72h de incubación). Adicionalmente, se evaluó la población probiótica resultante del co-cultivo, para determinar si *E. coli* afectó el crecimiento de *L. casei sp rhamnosus*, (anexos 1), y se determinó que *E. coli* no altera la viabilidad *L. casei sp rhamnosus* la cual alcanza de  $1,10 \times 10^7$  UFC/mL a  $1,23 \times 10^9$  UFC/mL en 72h de co-cultivo, anexos 1.

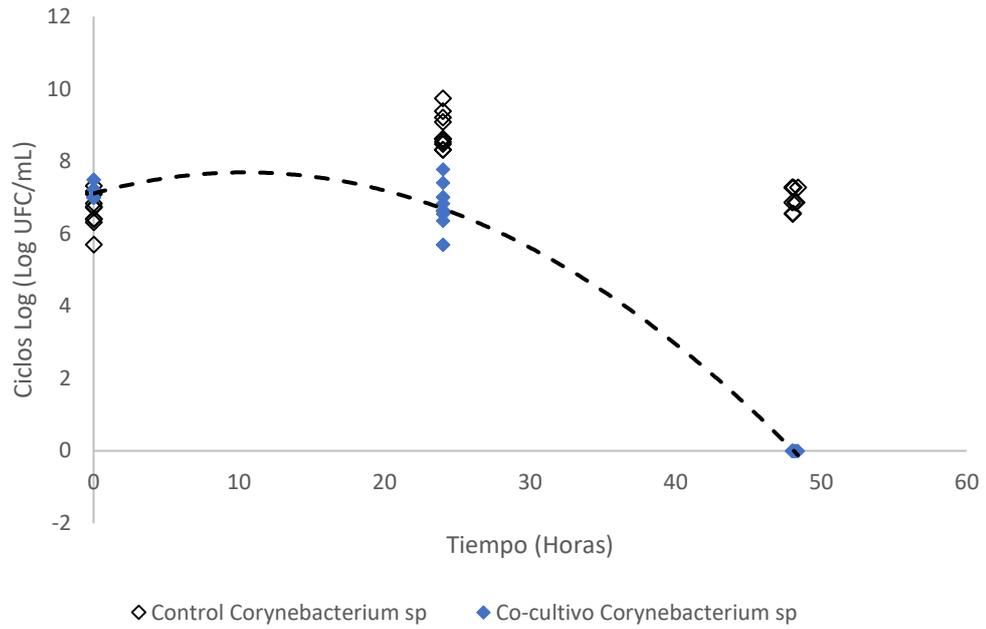


**Figura 7.** Actividad antagonista en co-cultivo en caldo de *L. casei sp rhamnosus* y *E. coli*.

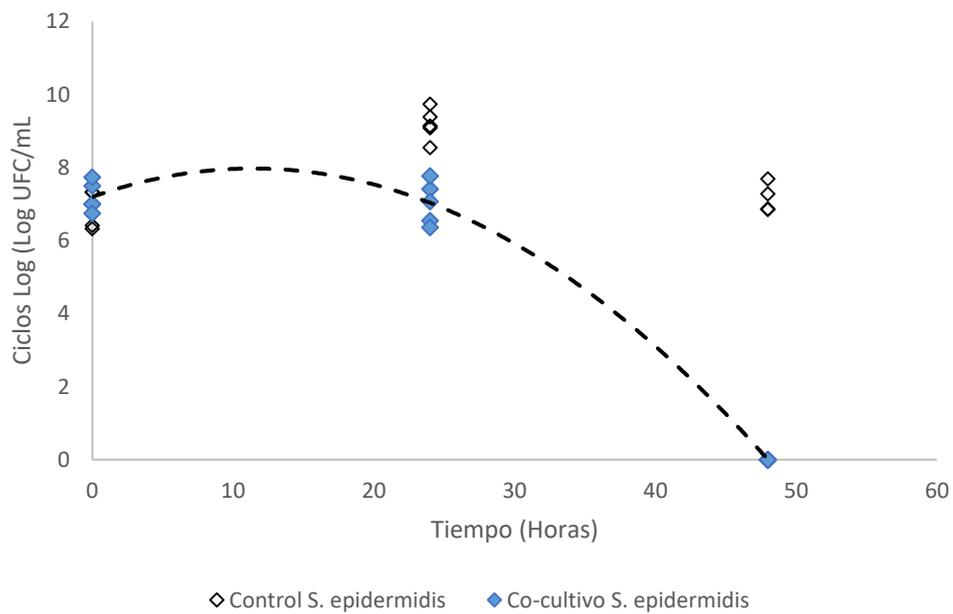
El efecto antagonista de *L. casei sp rhamnosus* contra *Corynebacterium sp*, *S. epidermidis* y *Proteus sp* se evaluó en ensayos de co-cultivo en caldo y se comparó con la capacidad de crecimiento de cada cepa en el mismo medio de cultivo carente de la cepa probiótica (Figuras 8, 9, 10). Una disminución en la tasa de división celular de los tres microorganismos se observó a partir de 24 horas de co-incubación. Cuando se determinó la viabilidad de las 3 cepas aisladas sometidas a co-cultivo durante un periodo de tiempo más prolongado, se detectó actividad antagonista total a las 48h de incubación para todas las 3 cepas aisladas, (disminución de 7 ciclos logarítmicos después de 48 h de incubación).

En ningún caso hubo efecto inhibitorio contra *L. casei sp rhamnosus*, ya que el número de células viables se incrementó durante el período de incubación (anexos 2,3,4). En un estudio anterior, (Servin F. A., 2006), demostró que la actividad inhibitoria de Lactobacilos contra cepas aisladas de infección urogenital era dependiente de la cepa de Lactobacilos y se produjo dentro de las primeras horas de co-cultivo (24h). En nuestros experimentos, se requirió un mayor tiempo de incubación para observar la actividad inhibitoria, probablemente debido a los diferentes parámetros experimentales utilizados en los ensayos. El mecanismo o mecanismos que subyacen a esta actividad no se han aclarado, pero es probable que sea multifacético y probablemente incluya la producción de peróxido de hidrógeno, ácido láctico y compuestos antibacterianos.

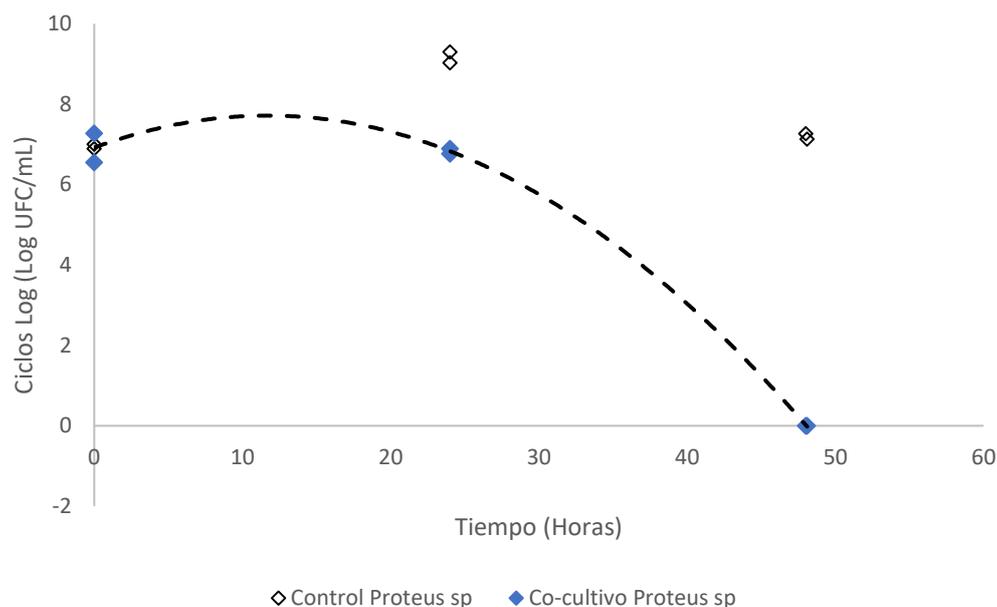
Se debe tomar en cuenta que *Corynebacterium sp* y *S. epidermidis*, fueron inhibidos por el probiótico *L. casei sp rhamnosus* el cual también es considerado parte de la microbiota normal de la vagina, por lo cual se recomienda determinar en estudios posteriores el efecto real que tienen los restauradores probióticos sobre la vagina y sus consecuencias al afectar la viabilidad de *Corynebacterium sp* y *S. epidermidis*.



**Figura 8.** Actividad Antagónica en co-cultivo en caldo de *L. casei sp rhamnosus* y *Corynebacterium sp.*



**Figura 9.** Actividad Antagónica en co-cultivo en caldo de *L. casei sp rhamnosus* y *S. epidermidis.*



**Figura 10.** Actividad antagonista en co-cultivo en caldo de *L. casei sp rhamnosus* y *Proteus sp.*

## **Formulación y Evaluación de un formulado probiótico vaginal con *L. casei rhamnosus***

### **Formulado probiótico vaginal con células activas de *L. casei sp rhamnosus* inmovilizadas**

Diversos estudios revelan que la disminución de viabilidad de microorganismos probióticos después del proceso de inmovilización es evidente, debido a que durante la inmovilización los probióticos son expuestos a condiciones de estrés que afectan su supervivencia (Lujan M., 2010).

Los resultados de investigación muestran que *L. casei sp rhamnosus* sobrevive al proceso de encapsulación, registrándose una reducción de 2 ciclos logarítmicos al evaluar su viabilidad pre- y post- encapsulación. Estudios realizados en nuestra institución (Choque J., 2015), muestran una reducción de 2 ciclos logarítmicos después del proceso de post-encapsulación y post-secado, resultados similares a los obtenidos en la presente investigación. A pesar de la reducción de ciclos logarítmicos, este estudio demuestra que la población de *L. casei rhamnosus* viable después del proceso de encapsulación, es correspondiente a una dosis de  $6,4 \times 10^7$  UFC/mL.

Respecto a la dosis probiótica empleada en formulaciones farmacéuticas, resulta difícil hacer una generalización, sin embargo, la dosis administrada fluctúa en un rango amplio de  $10^6$  y  $10^9$  UFC diarias. En el presente estudio se demostró que una dosis probiótica de  $1,5 \times 10^7$  a  $6,4 \times 10^7$  UFC/mL es suficiente para inhibir totalmente poblaciones circulantes de *E. coli* y *Proteus sp.* recuperadas de pacientes con diagnóstico de infección urogenital.

### **Formulado probiótico vaginal con células liofilizadas de *L. casei sp rhamnosus***

Priyanka (2011), demostró que las células libres siempre tienden a disminuir su viabilidad cuando son sometidas a algún tipo de estrés, en comparación a las células encapsuladas que mantienen su viabilidad en las mismas condiciones de estrés. Así mismo, se debe considerar la evaluación de la población probiótica (UFC inicial y final) comprobando de esta forma que la pérdida o disminución de los microorganismos no afecte la dosis recomendada. En el presente estudio se determinó experimentalmente la reducción microbiana durante el proceso de liofilización de las células de *L. casei sp rhamnosus*, la misma que inició con una población microbiana de  $2,09 \times 10^9$  UFC/mL y después de este proceso alcanzó una viabilidad de  $6,83 \times 10^7$  UFC/mL, aun con esta reducción (aproximada de 2 ciclos logarítmicos) se mantuvo la dosis con capacidad antagonica.

### **Evaluación de la actividad antagonica de un formulado probiótico vaginal con *L. casei rhamnosus* inmovilizado y liofilizado**

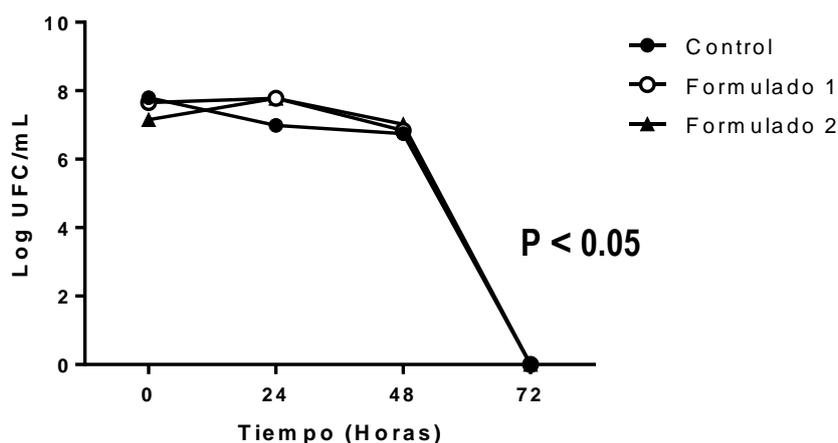
(Sanae, 2011), sugieren que la inserción de Lactobacilos liofilizados en la vagina a través de una cápsula restauradora es un método eficaz para incrementar el contenido de Lactobacilos en la microbiota vaginal y conducir a su equilibrio, superando la población de algunos patógenos y/o reduciendo su capacidad de sobrepoblación, que normalmente conduciría a un proceso infeccioso, limitando de esta manera la ocurrencia de infecciones urogenitales. (Hussain, 2005), sugiere una dosis oral que requiere alrededor de  $10^9$  bacterias viables, suministrada una o dos veces por semana, aunque también se demostró que una administración vaginal, una vez por día durante tres días inicialmente, podría ser requerida para tratar infecciones del tracto urogenital.

Se ha demostrado, que la administración de probióticos incluso normalizaría la microbiota, abriendo oportunidades de un posible tratamiento a largo plazo para mujeres embarazadas y aquellas susceptibles a infecciones del tracto urogenital. Estos estudios revelan la posible aplicación de probióticos liofilizados en dosis de  $10^9$  células por cápsula.

En esta investigación, se ha determinado la dosis probiótica necesaria para reducir la población de las cepas aisladas de procesos de infección urogenital *in vitro* con una población de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL de *L. casei sp rhamnosus* (resultados descritos en la Sección 4).

Por lo cual, se elaboraron dos tipos de restaurador, el primero (Formulado 1) con probióticos viables y activos ( $6,4 \times 10^7$  UFC de *L. casei rhamnosus* por capsula) inmovilizados en una matriz diseñada a base de gelatina al 16%, glicerol al 70% y agua al 14%. Y el segundo (Formulado 2), con probióticos liofilizados ( $6,83 \times 10^7$  de *L. casei sp rhamnosus* por capsula) rellenos en una cápsula dura comercial de gelatina (tapa base). Ambas formulaciones fueron evaluadas en función a su actividad antagonica contra *E. coli* ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL) en co-cultivo, empleando células libres de *L. casei rhamnosus* ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL) como control.

Los resultados muestran que existió actividad antagonista contra *E. coli* para los tres casos (Formulado 1, 2 y control). Sin embargo, realizando un análisis de ANOVA se pudo evidenciar que no existió diferencia significativa de la actividad antagonista, empleando tanto el formulado 1, 2 y el control (Fig. 11), lo que sugiere que *L. casei rhamnosus* en su forma activa viable inmovilizada (Formulado 1) o liofilizada (Formulado 2) no pierde su actividad antagonista contra *E. coli*, resultados demostrados comparando las formulaciones con una suspensión de células libres de *L. casei rhamnosus* (control).



Control. Células libres de *L. casei rhamnosus*

Formulado 1. Células viables inmovilizadas de *L. casei rhamnosus*

Formulado 2. Células liofilizadas de *L. casei rhamnosus*

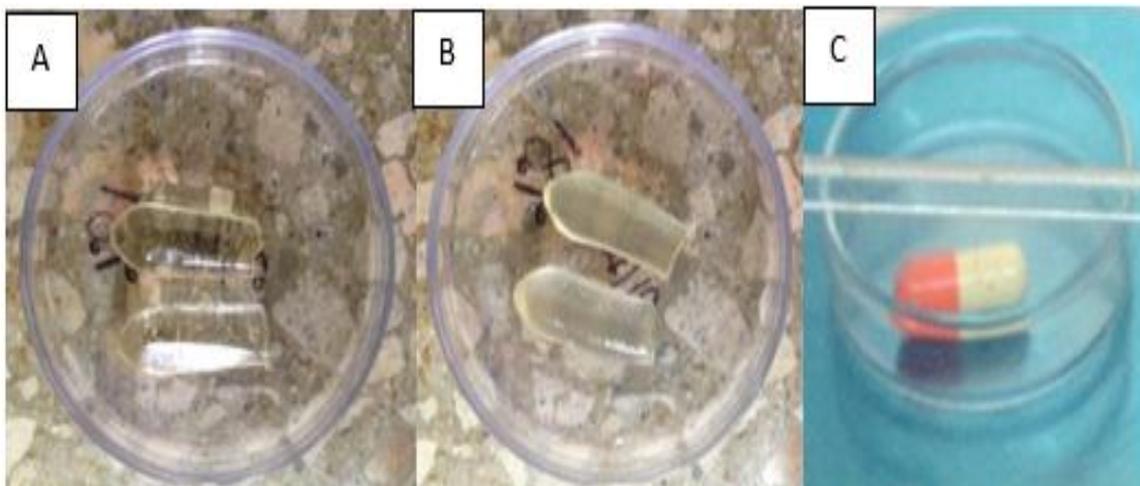
**Figura 11.** Actividad antagonista de *L. casei sp rhamnosus* en formulado 1, 2 y Control contra *E. coli* en co-cultivo.

### **Características de los formulados probióticos:**

#### **Inmovilizado de células activas inmovilizadas (Formulado 1) y liofilizado de *L. casei sp rhamnosus* (Formulado 2)**

#### **Características organolépticas de los formulados probióticos 1 y 2**

Las características organolépticas de una formulación farmacéutica determinan a menudo su aceptación por parte del consumidor final. La caracterización organoléptica de las formulaciones desarrolladas se encuentra resumida en la Tabla 12. Los Formulados probióticos 1 y 2 conteniendo *L. casei sp rhamnosus* inmovilizado y liofilizado, respectivamente (Fig. 12), presentaron características acordes a la USP-39 (United States Pharmacopeia) de acuerdo al aspecto presentado por las diferentes formulaciones, color, textura, uniformidad, superficie y presencia / ausencia de fisuras.



**Figura 12.** Formulados probióticos. A. Control Formulado 1 sin probiótico, B. Formulado 1. Células viables inmovilizadas de *L. casei rhamnosus*, C. Formulado 2. Células liofilizadas de *L. casei rhamnosus*.

**Tabla 12.** Características organolépticas de Formulados probióticos 1 y 2 con *L. casei rhamnosus*.

Características Organolépticas	Control	Formulado 1	Formulado 2
<b>Color</b>	Amarillo Translucido	Amarillo Brilloso	Amarillento
<b>Textura</b>	Suave	Suave	Suave
<b>Superficie</b>	Lisa-brillante	Lisa-opaca	Lisa
<b>Aspecto</b>	Homogéneo	Homogéneo	Polvo compacto
<b>Fisuras</b>	Ausencia	Ausencia	-

Control. Formulado 1 sin probiótico

Formulado 1. Células viables inmovilizadas de *L. casei rhamnosus*

Formulado 2. Células liofilizadas de *L. casei rhamnosus*

### **Características Geométricas y Uniformidad de Peso de los Formulados Probióticos 1 y 2**

Los controles geométricos de los Formulados probióticos 1 y 2 fueron medidos empleando un nonio (vernier), se registraron medidas de largo y diámetro homogéneas con mínima variabilidad en su tamaño lo cual contribuye a una correcta dosificación del probiótico. Así mismo, se determinaron los pesos promedio de los Formulados probióticos 1 y 2, los resultados evidenciaron que no existió variación significativa en peso ( $P < 0,05$ ), cumpliendo así con las especificaciones de la farmacopea USP-39 (Tabla 13).

**Tabla 13.** Controles Geométricos de los Formulados probióticos 1 y 2.

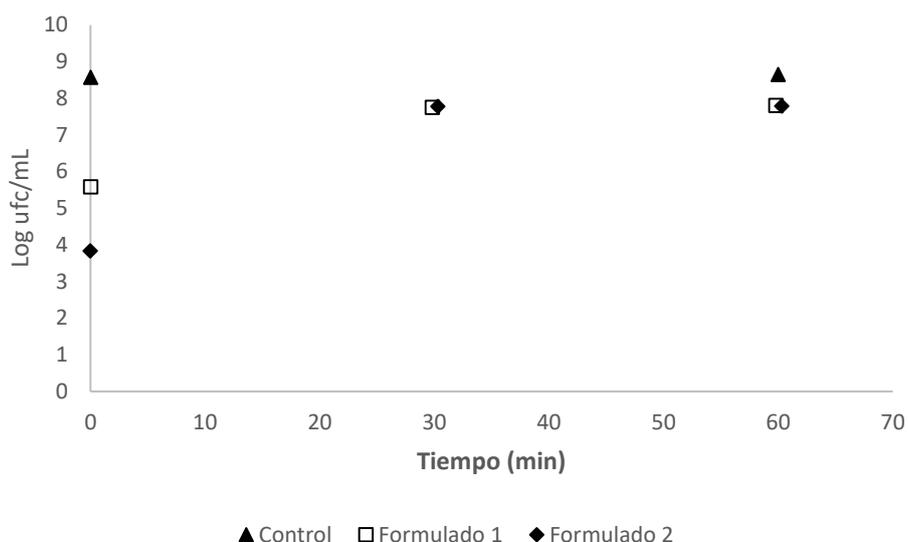
	Dimensiones	Número de Repeticiones						Promedio
<b>Control</b>	Largo (cm)	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
	Diámetro (cm)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	Peso (g)	1,57	1,58	1,57	1,57	1,58	1,58	1,57
<b>Formulado 1</b>	Largo	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
	Diámetro	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	Peso (g)	1,58	1,58	1,58	1,62	1,58	1,61	1,59
<b>Formulado 2</b>	Total (cm)	2,0		2,0		2,0		2,0
	Tapa (cm)	1,1		1,1		1,1		1,1
	Base (cm)	1,8		1,8		1,8		1,8
	Diámetro (cm)	0,7		0,7		0,7		0,7
	Peso (g)	0,47		0,46		0,48		0,47

### **Perfiles de liberación *in vitro* de *L. casei rhamnosus* a partir de los Formulados probióticos 1 y 2**

En este experimento se evaluó la liberación de *L. casei rhamnosus* a partir de los Formulados probióticos 1 y 2, determinando la población viable de *L. casei sp rhamnosus* que es liberada a partir del formulado a lo largo del tiempo (entre 0 y 60 min). El ensayo de liberación *in vitro* sirve para determinar la tasa con la que los probióticos se liberan en el medio (FVS), así como la cantidad total de sustancia activa disponible después de una liberación completa.

El tipo de formulación (inmovilizado, liofilizado encapsulado, etc.) puede afectar la tasa de liberación, por lo tanto, puede influir en la biodisponibilidad de los probióticos en el medio. Este ensayo es de extrema importancia en el desarrollo galénico, ya que permite la identificación de variables críticas durante la producción, y permite seleccionar una formulación adecuada e inclusive optimizar la misma. Un proceso de liberación inadecuada obliga a modificar la composición de la formulación para asegurar la liberación de la sustancia activa en un tiempo predeterminado y según un objetivo específico. En realidad, actualmente, cualquier trabajo de formulación y desarrollo de formas sólidas es acompañado de ensayos de liberación (Rodrigues F. , 2011).

La prueba de liberación *in vitro* de *L. casei rhamnosus* a partir de los formulados probióticos 1 y 2, demostró que el principio activo, *L. casei rhamnosus*, se libera gradualmente entre los 30 a 60 min, en el medio artificial FVS a 37°C y con agitación suave cada 10min, no existiendo una diferencia significativa en los perfiles de liberación de ambos formulados ( $P < 0,05$ ), estos resultados se hallan dentro de los parámetros establecidos por la F.P.9.0. (Farmacopea Portuguesa 9.0.) (Figura 13).



**Figura 13.** Perfil de Liberación de los Formulados 1 y 2 con *L. casei sp rhamnosus* entre 0 a 60 min.

### Control microbiológico de los formulados probióticos 1 y 2

Los ensayos de control de contaminación microbiana mediante la técnica de extensión en superficie demostraron que ninguna muestra proveniente de los formulados probióticos 1 y 2 superó los límites de contaminación microbiana establecidos por la Farmacopea USP-39 (United States Pharmacopeia), que establece un límite de: microorganismos aerobios totales  $\leq 10^3$  UFC/g o mL de formulado, mohos y levaduras  $\leq 10^3$  UFC /g o mL y ausencia de microorganismos patógenos específicos como *E. coli.*, parámetros que son indicativos de la inocuidad de los formulados probióticos 1 y 2, demostrando que fueron elaborados en un ambiente estéril y libre de contaminación, contribuyendo a la seguridad de uso del restaurador probiótico (Tabla 14).

Se debe tomar en cuenta que los formulados probióticos contaban con células de *L. casei sp rhamnosus* y estos desarrollaron en los medios de cultivo utilizados para el control microbiológico, pero se descartó la contaminación cruzada que pudiera haber con otros microorganismos fastidiosos realizando la debida caracterización morfológica por medio de tinción Gram y observación al microscopio (100X).

**Tabla 14.** Resultados de los controles microbianos a los Formulados probióticos 1 y 2.

Control Microbiológico	Control	Formulado 1	Formulado 2
<b>Microorganismos aerobios totales</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Mohos y levaduras</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b><i>E. coli</i></b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia

### 13. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se llegaron a las siguientes conclusiones:

La evaluación de la actividad antagonica en placa de *Lactobacillus casei sp rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus* demostró que *L. casei sp rhamnosus* tuvo mayor actividad contra las cepas aisladas de procesos de infección urogenital, produciendo halos de inhibición mayores al antibiótico empleado como control.

La actividad antagonica del sobrenadante probiótico de *L. casei sp rhamnosus* y de *L. acidophilus* en microplaca contra *E. coli* demostró que el sobrenadante de *L. casei sp rhamnosus* tuvo mayor efecto inhibitorio contra todas las cepas de *E. coli* ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL).

Se demostró que *L. casei sp rhamnosus* ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL) en co-cultivo con cada cepa aislada de procesos de infección urogenital ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL) inhibió totalmente las poblaciones en 48-72h de co-incubación.

El ensayo de actividad antagonica en co-cultivo determinó la dosis probiótica de *L. casei sp rhamnosus* ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL) y el tiempo necesario para inhibir a las cepas aisladas de procesos de infección urogenital (48-72h).

*L. casei sp rhamnosus* tuvo actividad antagonica sobre las cepas de *Corynebacterium sp* y *S. epidermidis* por lo cual es necesario la evaluación de *L. casei sp rhamnosus* en un futuro estudio sobre los efectos que esto podría ocasionar en la vagina.

Los Formulados probióticos 1 y 2 presentaron actividad inhibitoria contra *E. coli* reduciendo 7 ciclos logarítmicos (de 7 a 0 ciclos logarítmicos) en 72h de co-incubación.

Los Formulados probióticos cumplen con lo establecido en farmacopea portuguesa 9.0 y farmacopea americana USP-39 para su correcta administración.

## 14. Bibliografía

- A. Berenice Arias O., M. I. (2013). Antagonistic effect of probiotic strains against two pathogens: Salmonella Typhimurium and E. coli O157:H7 resistant to antibiotics. *e-Gnosis*, 1-16.
- Aldunate. (2015). Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 164-165.
- Antonia Andreua, J. C. (2011). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinari. *Elsevier*, 52-57.
- Araújo U., L. A. (2015). Tecnicas para la microencapsulacion de probioticos y el impacto en su funcionalidad: Una revision. *Revista de la asociacion colombiana de ciencia y tecnologia de alimentos*, 112-126.
- Ashraf R., S. N. (2011). Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *International Food Research Journal*, 837-853.
- Ballesteros Monrreal, M. G. (2015). Aislamiento de uropatógenos bacterianos en gestantes, su identificación y antibiograma mediante el equipo Microscan Autoscan-4. *Universidad de Sonora Unidad Regional Norte*, 14-18.
- Barroms. (2008). Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: A review. *Clinical Infectious diseases*, 453-468.
- Berger. (2006). Similarity and Differences in the Lactobacillus acidophilus Group Identified by Polyphasic Analysis and Comparative Genomics. *Journal of bacteriology*, 487-491.
- Boyd. (2005). Comparison of API 50 CH Strips to Whole-Chromosomal DNA. *International journal of Systematic Bacteriology*, 5309-5311.
- Breznak. (2007). Physicochemical factors in growth. *Methods Microbiology*, 322-324.
- Choque J. (2015). Estandarizacion de una tecnica de encapsulacion de probioticos para su adiccion en alimentos. *IIFB*, 1-25.
- Corrêa I., J. C.-S. (2012). Performance characteristics of high performance liquid chromatography, first order derivative UV spectrophotometry and bioassay for fluconazole determination in capsules. *Quím. Nova*, 1-5.
- Darquea Leoro, A. D. (2014). Tratamiento empírico de elección para infecciones de vías urinarias no complicadas en pacientes adultos de la consulta externa del Hospital de los Valles y su correlación con el patrón epidemiológico de la resistencia antimicrobiana en urocultivos y antib. *Universidad Catolica del Ecuador*, 1-100.
- Denkova. (2012). Probiotic properties of Lactobacillus casei sp rhamnosus. *Publimed*, 5-15.

- Domingo, M. L.-B. (2007). Antibioticoterapia con probióticos. *Sociedad Española de Quimioterapia*, 170-181.
- Domitille Fayol-Messaoudi, C. N.-H.-P.-L. (2005). pH-, Lactic Acid-, and Non-Lactic Acid-Dependent Activities of Probiotic Lactobacilli against Salmonella enterica Serovar Typhimurium . *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 6008-6013.
- Endo. (2015). Isolation, identification and characterization of new probiotics. *Probiotic technology*, 4-36.
- Fayol D, C. N.-H.-P.-L. (2005). pH-, Lactic Acid-, and Non-Lactic Acid-Dependent Activities of Probiotic Lactobacilli against Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *American society for microbiology*, 6008-6013.
- Florentin. (2014). Infección Urinaria: aspectos relevantes y puesta al día. *Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Asunción*, 57-64.
- G. MARELLI, E. P. (2004). Lactobacilli for prevention of urogenital infections: a review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 87-95.
- Gajer. (2012). Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Clinical Infectious diseases*, 132-152.
- Geoffrey Arasa Ouno. (2013). Isolation, Identification and Characterization of Urinary Tract Infectious Bacteria and the Effect of Different Antibiotics . *Journal of Natural Sciences Research* , 150-159.
- Gonzales, M. R. (2009). Aislamiento y seleccion de cepas del genero Lactobacillus con capacidad probiotica e inmunomoduladora . *Universidad Autonoma de Barcelona*, 1-197.
- Gregor Reid. (2007). Oral probiotics can resolve urogenital infections. *Pathogens and diseases*, 49-52.
- H. Jurado-Gómez, M. G.-I.-J. (2015). Determinacion de la cintica, pruebas de crecimiento y efecto de inhibicion in vitro de Lactobacillus lactis EN Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus agalactiae Y Escherichia coli. *Rev Med Vet Zoot*, 40-56.
- Henry Jurado-Gómez2, 3. F.-Y.-T. (2014). Determinación de parámetros cinéticos de Lactobacillus casei en dos medios probióticos1 . *Veterinaria y Zootecnia ISSN 2011-5415* , 1-21.
- Hoesl C., , A. (2005). The probiotic approach: an alternative treatment option in urology. *Publimed*, 288-296.
- Hui Cai1, B. (2007). Genotypic and phenotypic characterization of Lactobacillus casei strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity . *Microbiology*, 2655-2665.
- Hussain. (2005). The vagina as a route for systemic drug delivery . *Journal of controlled release*, 301-313.

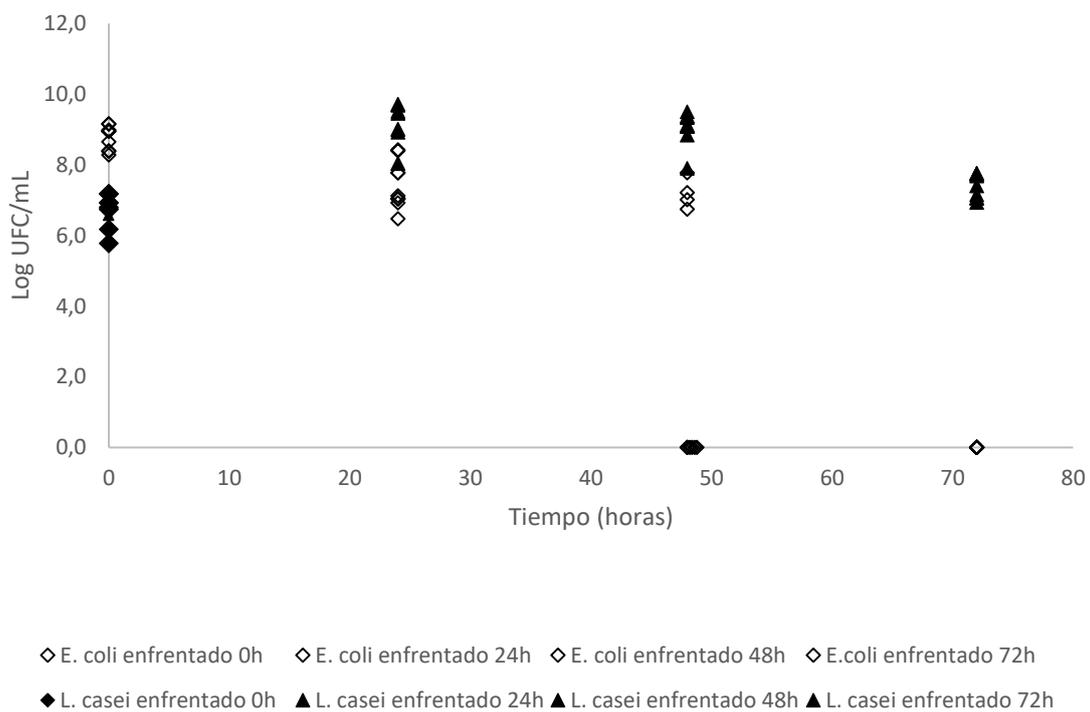
- Huys. (2013). Microbial characterization of probiotics–Advisory report. *Medline*, 1479-1504.
- J.M. Sanchez Merino, C. G. (2003). Sensibilidad microbiana de E. coli en infecciones urinarias extrahospitalarias . *Actas urológicas españolas*, 783-787.
- J.M.Bohbot, J. (2012). Vaginal Impact of the Oral Administration of Total Freeze-Dried Culture of LCR35 in Healthy Women. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* , 1-4.
- Jimenes, M. L. (2010). Microorganismos probioticos encapsulados en polimeros microbianos: evaluacion de la capacidad protectora de la encapsulacion para su administracion oral. *Universidad de Granada*, 1-298.
- Juárez M., a. M.-M. (2007). 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*, 732-739.
- Jurado G., G. I. (2015). Determinacion de la cinetica, pruebas de crecimiento y efecto de inhibicion in vitro de Lactobacillus lactis EN Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus agalactiae Y Escherichia coli. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 40-56.
- Karska-Wysocki, B. (2010). Antibacterial activity of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei against methicilin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Elsevier* , 674-686.
- Kheadr, E. E. (2006). Impact of acid and oxgall on antibiotic susceptibility of Probiotic Lactobacilli . *African Journal of Agricultural Research*, 172-181.
- Kirjavainen PV, P. S. (2009). Abnormal Immunological Profile and Vaginal Microbiota in Women Prone to Urinary Tract Infection. *Clinical Vaccine Immunology*, 29-36.
- Kizerwetter-Swida, M. (2005). Selection of potentially probiotic lactobacillus strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria . *Polish journal of microbiology*, 287-294.
- Kohar Jones, B. E. (2011). Help for recurrent bacterial vaginosis . *THE JOURNAL OF FAMILY PRACTICE*, 91-93.
- Lebeer. (2008). Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology Reviews*, 728-764.
- Leoro, A. D. (2014). Tratamiento empirico de eleccion para infecciones de vias urinarias No complicadas en pacientes adultos de la consulta externa del Hospital de los valles y su correlacion con el Patron epidemiologico de la resistencia antimicrobiana en urocultivos. *universidad catolica del Ecuador*, 1-50.
- Lim, S.-M. D.-S. (2009). Screening and Characterization of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Korean Fermented Foods. *Journal. Microbiology. Biotechnology*, 178-186.

- Lujan M. (2010). Microorganismos probióticos encapsulados en polimeros microbianos: Evaluacion de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral. *Granada*, 1-5.
- Marelli G1, P. E. (2004). Lactobacilli for prevention of urogenital infections: a review. *Publmed*, 87-95.
- Martínez-Pacheco D, C.-C. A.-F. (2013). Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los microbianos más frecuentes. *Conexión Agropecuaria JDC*, 53-73.
- Merk, K. B. (2005). Lactobacilli – bacteria-host interactions with special regard to the urogenital tract. *International Journal of Medicine Microbiology*, 9-18.
- Michalkiewicz, J. K.-G.-B. (2006). Immunomodulatory effects of lactic acid bacteria on human peripheral blood mononuclear cells. *Microb Ecol Health*, 185-192.
- Mousavi. (2016). In vitro adherence of Lactobacillus strains isolated from the vaginas of healthy Iranian women. *Medscape*, 665-671.
- Mustafa M., Z. H. (2007). Evaluation on Antibacterial Activity of Lactobacillus acidophilus Strains Isolated from Honey . *American Journal of Applied Sciences* , 807-817.
- Natalia F. Gill, R. C. (2010). Vaginal lactobacilli potential probiotics against Candida spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 6-14.
- Nomoto K. (2005). Prevention of infections by probiotics. *Publmed*, 583-592.
- Ouno, G. A. (2013). Isolation, Identification and Characterization of Urinary Tract Infectious Bacteria and the Effect of Different Antibiotics . *Journal of Natural Sciences Research* , 150-159.
- Ouwehand, A. (2004). Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. *VetMed*, 1-6.
- P. Hu "tt, J. S. (2005). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens . *Journal of Applied Microbiology* , 1324-1332.
- P. Hu "tt, J. S. (2006). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens . *Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072*, 1324-1332.
- P. Lonkar, S. D. (2005). Isolation, In vitro Antibacterial Activity, Bacterial Sensitivity and Plasmid Profile of Lactobacilli. *Department of Microbiology, Nagpur Veterinary College*, 1336-1342.
- P. Lonkar, S. D. (2005). Isolation, In vitro Antibacterial Activity, Bacterial Sensitivity and Plasmid Profile of Lactobacilli . *Department of Microbiology, Nagpur Veterinary College, Nagpur 440006, India* , 1336-1342.
- Paola Cáceres R., M. G. (2010). Alimentos probioticos en Chile: ¿Que cepas y que propiedades saludables? *Revista Chilena Nutricion*, 97-109.

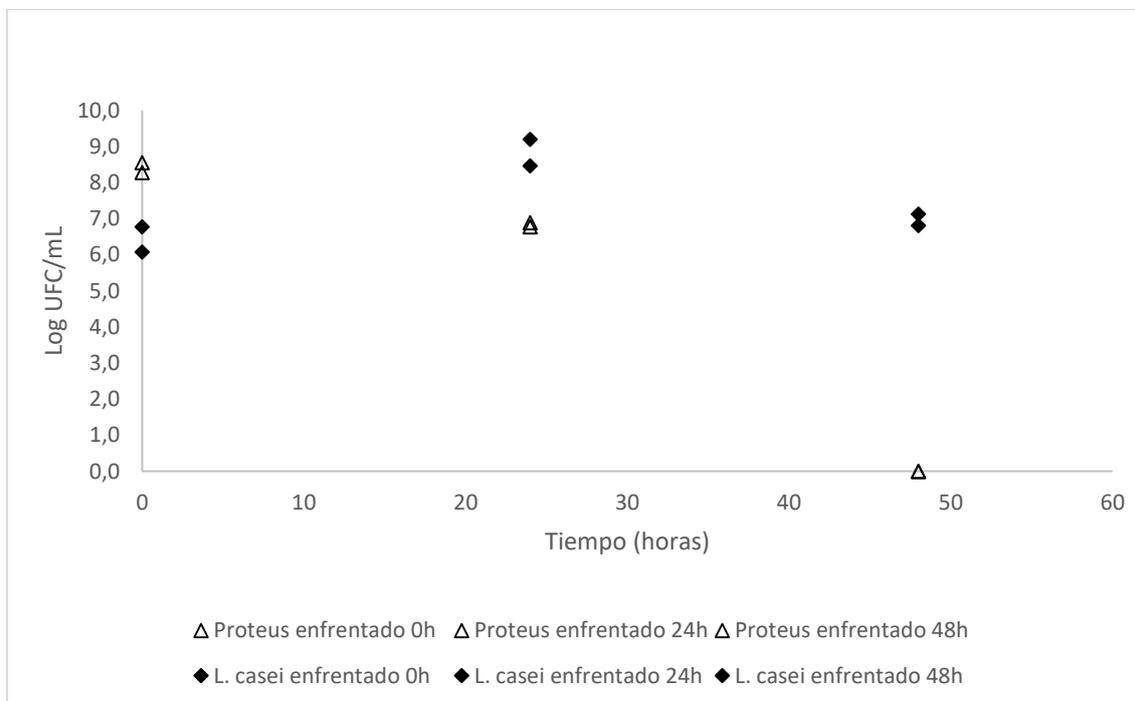
- Pascual L. (2008). Lactobacillus rhamnosus L60 a potential probiotic isolated from the human vagina. *Journal microbiology*, 141-148.
- Pascual, L. M. (2008). Lactobacillus rhamnosus L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *J. Gen. Appl. Microbiology*, 141-148.
- Pehrson<sup>1</sup>, M. E. (2015). Antimicrobial activity of probiotic Lactobacillus strains towards gram-negative enteropathogens . *European International Journal of Science and Technology* , 136-149.
- Petricevic. (2008). The role of Lactobacillus casei rhamnosus Lcr35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis. *BJOG*, 1369-1375.
- Pigrau. (2013). Infeccion del tracto urinario. *Salvat*, 1-176.
- Ravel. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Lippincott Williams*, 4680-4687.
- Reid, G. (2011). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection<sup>1,2,3</sup>. *American Society for Clinical Nutrition*, 437-443.
- Reid, G. J. (2009). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*, 658-672.
- Rodrigues, F. (2011). Desenvolvimento e Caracterização de Óvulos de L.acidophilus. *Universidade do porto*, 1-114.
- Rodrigues, F. P. (2011). Desenvolvimento e Caracterização de Óvulos de Lactobacillus acidophilus. *Universidade Do Porto*, 1-114.
- Sanae. (2011). Addition and inhibitory effects of Lactobacillus against vaginal bacteria pathogens and preparations of microbial vaginal suppository. *Publimed*, 1-137.
- Sarah Cribby, M. T. (2008). Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 1-9.
- Sarah Cribby, M. a. (2008). Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* , 1-9.
- Saxelin, M. T.-S. (2005). Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanism. *Current Opinion Biotechnology*, 204-211.
- Segura, F. F. (2013). Determinacion de la intercambiabilidad Terapeutica de capsulas de fluconazol comercializadas en el pais en relacion a su innovador DIFLUCAN. *Universidad central del Ecuador*, 1-158.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activity against lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *Elsevier*, 405-440.
- Servin, F. A. (2006). Lactobacillus strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit Prevotella bivia and Gardnerella vaginalis in coculture and cell culture. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 424-432.

- Siaterlis. (2009). Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Applied Microbiology*, 295-301.
- Sneyder Rodríguez-Barona, G. I. (2016). Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos . *Información Tecnológica* , 135-144.
- SophieCoudeyras, G. M. (2008). AdhesionofHumanProbioticLactobacillusrhamnosus toCervicalandVaginalCellsandInteractionwith Vaginosis-AssociatedPathogens. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* , 1-5.
- SophieCoudeyras, G. M. (2008). AdhesionofHumanProbioticLactobacillusrhamnosus toCervicalandVaginalCellsandInteractionwith Vaginosis-AssociatedPathogens. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* , 1-5.
- Tachedjian. (2017). The role of lactic acid production by probiotic Lactobacillus species in vaginal health. *Journal of Cancer Prevention*, 665-671.
- Thomson. (2012). *Diccionario de especialidades farmacéuticas*. Mexico: P.L.M. S.A. de C.V.
- Tironi, P. A. (2005). Viabilidad de las Cepas de Lactobacillus casei shirota y Bifidobacterium lactis en un Postre de Leche con Salsa de Cranberry . *UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE* , 1-88.
- Uehara S. (2006). A pilot study evaluating the safety and effectiveness of Lactobacillus vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Elsevier*, 30-34.
- Valik. (2008). Characterization of the growth of Lactobacillus rhamnosus GG. *Publimed*, 60-67.
- Vedran S., J. H.-K. (2010). Prevention of urogenital infections by oral administration of probiotic lactobacilli. *Prevention of urogenital infections*, 156-165.
- Voravuthikunchai, S. P. (2006). Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. *Elsevier*, 221-226.

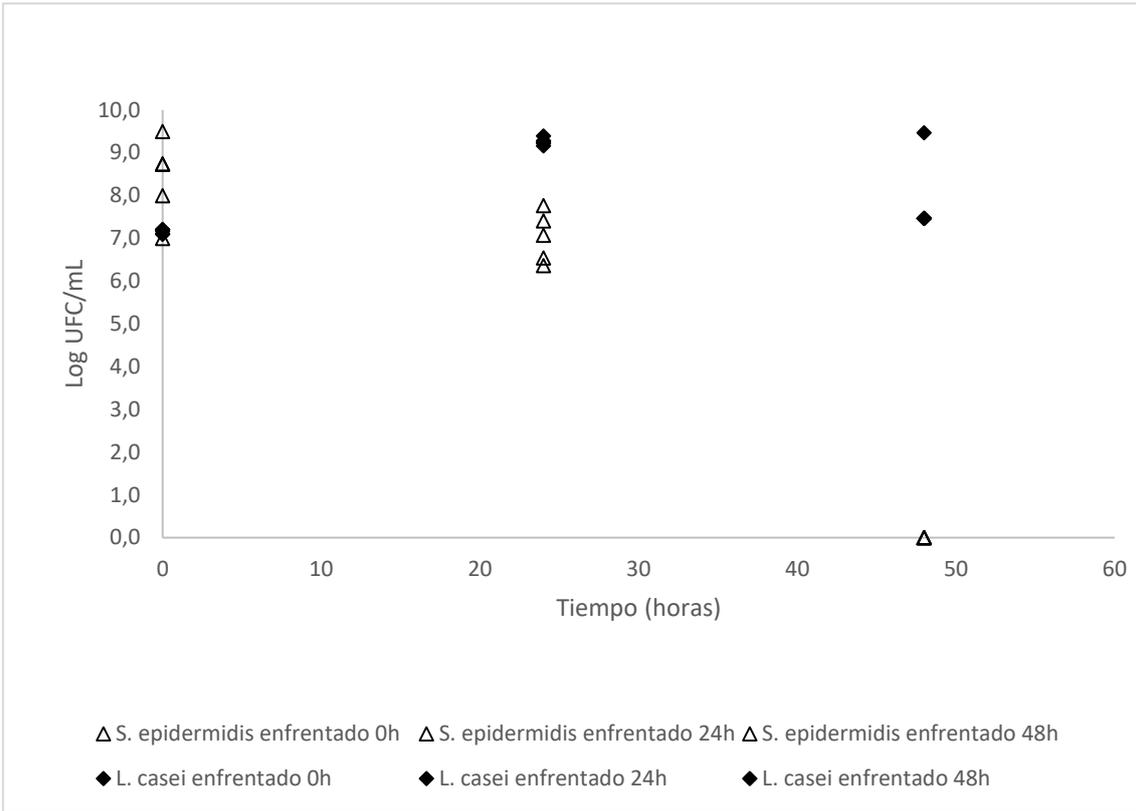
# ANEXOS



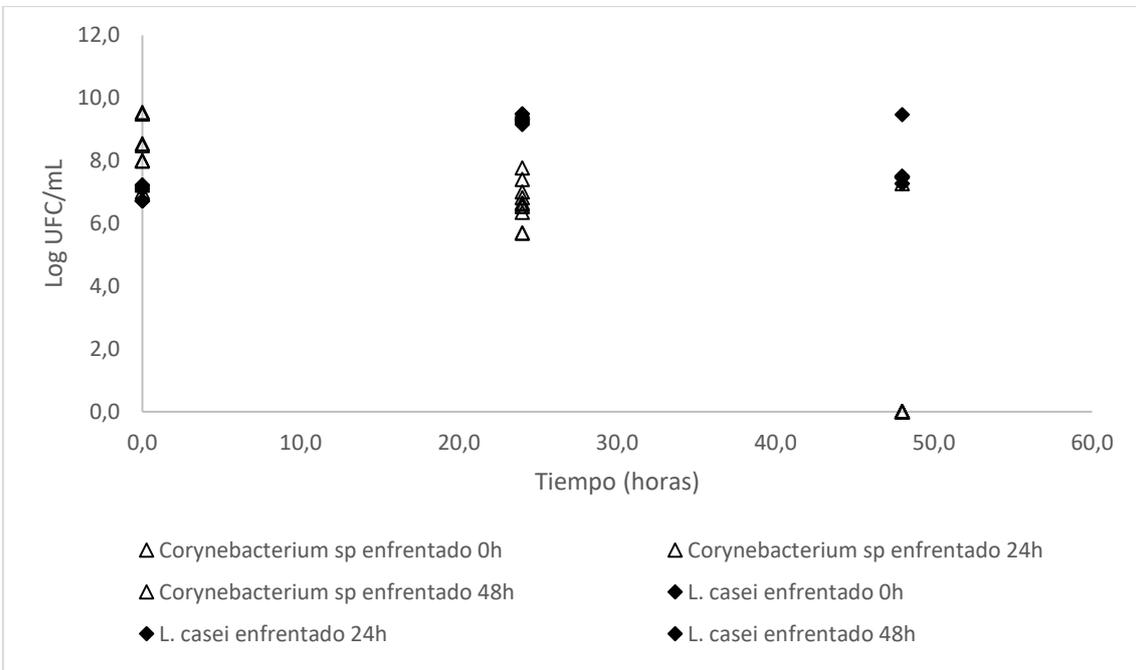
**Figura 1.** Actividad antagónica en co-cultivo en caldo de *L. casei sp rhamnosus* y *E.coli*.



**Figura 2.** Actividad antagónica en co-cultivo en caldo de *L. casei sp rhamnosus* y *Proteus sp.*



**Figura 3.** Actividad antagónica en co-cultivo en caldo de *L. casei* sp. *rhannosus* y *S. epidermidis*.



**Figura 4.** Actividad antagónica en co-cultivo en caldo de *L. casei* sp. *rhannosus* y *Corynebacterium* sp.