



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de  
Doctora en Ciencias Biológicas

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE DIFERENTES  
FORMULACIONES FARMACÉUTICAS CON ESPECIES DE  
*Lactobacillus* PROBIÓTICAS EN ÓVULOS PARA LA  
APLICACIÓN VAGINAL**

Mic. Ana Lissa Camilletti

DIRECTOR: Dra. Liliana Myriam Pascual  
CO-DIRECTOR: Dra. Isabel Lucila Barberis

Río Cuarto, 27 de Febrero de 2020

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

---

**Tesista:** Mic. Ana Lissa Camilletti

---

**Director:** Dra. Liliana Pascual

---

**Co-Director:** Dra. Lucila Barberis

**APROBADA POR EL JURADO**

---

Dra. María Silvia Di Genaro

---

Dr. Juan Carlos Valdéz

---

Dra. Lilia Cavaglieri

Río Cuarto, 27 de Febrero de 2020

*A mamá y papá, con todo mi amor*

## AGRADECIMIENTOS

Estas deben ser las líneas más difíciles de redactar de este trabajo, porque personalmente siempre fui sensible y sentimental. Si hay algo que siempre acostumbro a hacer internamente es agradecer todo, lo bueno y lo no tan bueno que se me presente, porque todo es para crecer. Pero no acostumbro a agradecer externamente, aunque hay personas que saben perfectamente que lo estoy.

Los logros nunca son individuales, SIEMPRE, pero SIEMPRE, son colectivos. Sin el apoyo incondicional de muchísimas personas que me han rodeado estos últimos años, no hubiera sido posible que pudiera llegar hasta aquí. Algunas compartieron conmigo gran parte de este trayecto, otras estuvieron durante breves períodos, pero todas fueron parte de mi construcción y deconstrucción. Y si bien este trabajo representa un logro académico, su contexto no deja de estar compuesto por una innumerable confluencia de factores personales y extra-académicos.

A mi familia, mamá, papá, Juli, abuelos... de la que tengo recuerdos desde niña en la que me estimulaban a dar lo mejor de mí y a esforzarme por ser siempre mi mejor versión. De que soy capaz de hacer y lograr absolutamente cualquier cosa que quiera, y por lo tanto me lo creí. Por convencerme de que los límites son solo mentales y que no existen límites reales, solo obstáculos y por lo tanto se esquivan o saltan. Todo esto llevó a que mis conquistas, entre ellas las académicas, fueran las mejores que podría haber imaginado. Gracias por inculcarme los valores de responsabilidad, compromiso, honestidad, dedicación y perseverancia.

A mis compañeras y colegas de Bacteriología, principalmente a Liliana y Lucila, por ser mis guías y mentoras en esta Tesis Doctoral. Por su constante empuje y apoyo incondicional a lo largo de estos años. A Jose, Pauli y Franchesca por su complicidad, consejos y amistad. Me han ayudado enormemente en todo lo que he necesitado y más. Quiero extender este agradecimiento a los miembros del Jurado de Tesis, quienes han dedicado valioso tiempo a corregir y guiar este trabajo.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por ser mi segundo hogar y brindarme la posibilidad de poder formarme en mis estudios de grado y posgrado. Realmente voy a extrañar este bello campus que me dio los buenos días, periódicamente, sin falta, durante 10 años.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y por lo tanto a toda la sociedad, por solventar esta Beca que me permitió obtener el título de Doctora en Ciencias Biológicas. Al Dr. Walter Giordano por participar como Codirector de mi Beca Doctoral.

A mis fieles amigas, que están desparramadas y son muchas, pero que han sabido estar en todas, cerca o lejos, diariamente o una vez al año, pero esas amistades que aun sin la presencia física no se disuelven. Ceci, Sofi S, Flor A, Bel, Luisi, Kati, Ani Co, Lina, Cu, Mile, Dey, Sofi R, Ili, Lau, Jenni, Anita M, Cami, Rocha, Marti, Agos, Mili. Si hay algo importante que debo agradecerle a la vida, es la gran cantidad de amistades con las que cuento. Innumerables son, a tod@s gracias!

A todos mis compañeros y amigos del becario, con quienes hemos compartido no solo complicidad y mates, sino también momentos de ocio y hasta viajes que forjaron relaciones sólidas.

A todas las personas que de una u otra forma tocaron un pedacito de mi vida en estos últimos 5 años, porque todos sumamos y nadie resta en la vida de nadie.

Nunca voy a olvidarme de esta etapa, porque considero que fue especial. Sobre todo en el último año, en donde considero que he crecido académica, personal y espiritualmente mucho más que en mucho tiempo. A todos los que consideran que fueron parte de este crecimiento,

**¡¡INFINITAS GRACIAS!!**

**Anita.**

## RESUMEN

El rol de mantener el tracto genitourinario femenino sano es llevado a cabo principalmente por especies del género *Lactobacillus*. A lo largo del mundo y durante muchos años se ha propuesto la presencia de estos microorganismos como marcador de una microbiota vaginal saludable. Existe una creciente aparición de infecciones urogenitales recurrentes o recidivas de infección debidas a microorganismos patógenos resistentes, situación que implica la necesidad del desarrollo de adyuvantes terapéuticos complementarios a la terapia convencional con antimicrobianos. El género *Lactobacillus* es de interés en la industria biotecnológica mundial ya que algunas especies poseen propiedades antimicrobianas sobre una gran diversidad de microorganismos patógenos causantes de infecciones vaginales. Las cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 han sido ampliamente estudiadas por el equipo de trabajo del laboratorio de Bacteriología y se ha demostrado que poseen un gran potencial biotecnológico como agentes reconstituyentes de la microbiota vaginal y como antagonistas de microorganismos patógenos. El objetivo de este estudio fue desarrollar diferentes formulaciones farmacéuticas conteniendo las cepas de lactobacilos probióticas y ensayar sus propiedades biológicas posformulado. Luego de la liofilización, el porcentaje de supervivencia promedio de las cepas L23 y L60 fue del 89% y 95%, respectivamente, demostrando que los lactobacilos fueron altamente resistentes a este proceso. Una vez incorporados en los óvulos conteniendo distinta composición química, los lactobacilos evidenciaron distinto perfil de sobrevivencia según la formulación farmacéutica analizada. La formulación F9' resultó la más adecuada para el mantenimiento de la viabilidad bacteriana de las cepas, cuya composición era de L23 y L60 liofilizados con leche al 10% y lactosa al 10%, como componentes base glicerina 16% y gelatina 11,8%, y leche 1,5%, lactosa 2,5% y ácido ascórbico 2% como excipientes. Con respecto a las propiedades benéficas de superficie relacionadas a la adhesión celular, las cepas contenidas en los óvulos fueron medianamente productoras de biofilm, presentaron valores de autoagregación de hasta 65% y 60% para L23 y L60, respectivamente, y mantuvieron una alta hidrofobicidad de superficie a todo lo largo del estudio, en todas las formulaciones ensayadas. Las propiedades antagonistas de los microorganismos patógenos estudiadas fueron coagregación, actividad antimicrobiana e inhibición de la formación de biofilm. L23 presentó valores de coagregación de hasta 36% y 38% con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. La cepa L60 coagregó hasta un 35% y 36% con *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alcanzaron valores de más de 30 mm utilizando las dos técnicas de detección, estrías cruzadas y difusión en pozos. El efecto antimicrobiano de L23 y L60 se debió en un 82% y un 81%, respectivamente, a la actividad de las bacteriocinas. Los metabolitos bioactivos liberados en los sobrenadantes de cultivo de los lactobacilos fueron capaces de inhibir totalmente la formación de biofilm producido por las cepas patógenas indicadoras, ya que en todos los casos los porcentajes de inhibición se encontraron en un rango comprendido entre el 94% y el 100%. Los ensayos con fluido vaginal simulado demostraron que la formulación F9 fue aquella que permitió la mayor absorción de agua y la liberación total de los lactobacilos en el menor tiempo. Finalmente, en los estudios *in situ* utilizando células epiteliales vaginales se demostró que ambos lactobacilos recuperados de la formulación F9' fueron capaces de excluir, competir y desplazar en un 62%, 70% y 56% a *S. aureus* y en un 81%, 70% y 54% a *Streptococcus agalactiae*, respectivamente. En conclusión, los lactobacilos contenidos en los óvulos vaginales fueron capaces de mantenerse viables por un extenso periodo de tiempo con todas sus propiedades biológicas intactas posformulado. Este trabajo de Tesis permitió la producción de una formulación farmacéutica con fuerte potencial biotecnológico para ser utilizada en la prevención y/o tratamiento de infecciones vaginales.

## ABSTRACT

The role of keeping healthy the female genitourinary tract is mainly carried out by *Lactobacillus* spp. Throughout the world and for many years the presence of these microorganisms has been proposed as a marker of a healthy vaginal microbiota. There is a growing occurrence of recurrent genital tract infections due to resistant pathogenic microorganisms. This situation requires the need for the development of therapeutic adjuvants complementary to conventional antimicrobial therapy. The genus *Lactobacillus* is of interest for the global biotechnology industry as some species have antimicrobial properties on a wide variety of pathogenic microorganisms that cause vaginal infections. *L. fermentum* L23 and *L. rhamnosus* L60 strains have been extensively studied by the work group of “Laboratorio de Bacteriología”. It has been demonstrated that these strains have great biotechnological potential as reconstituting agents of the vaginal microbiota and as antagonists of pathogenic microorganisms. The aim of this study was to develop different pharmaceutical formulations containing probiotic *Lactobacillus* strains and to test their post-formulated biological properties. After lyophilization, the average survival of L23 and L60 strains was 89% and 95%, respectively, demonstrating that lactobacilli were highly resistant to this process. Once incorporated into the ovules containing different chemical composition, lactobacilli showed a different survival profile according to the pharmaceutical formulation analyzed. Formulation F9' was the most suitable for the maintenance of bacterial viability, whose composition was L23 and L60 lyophilized with 10% milk and 10% lactose, 16% glycerin and 11.8% gelatin as base components and 1.5% milk, 2.5% lactose and 2% ascorbic acid as excipients. With respect to beneficial surface properties related to cell adhesion, the strains contained in the ovules were moderately biofilm-producers, presented autoaggregation values of up to 65% and 60% for L23 and L60, respectively, and maintained high surface hydrophobicity throughout the study, in all tested formulations. Coaggregation, antimicrobial activity and inhibition of biofilm formation by pathogenic microorganisms were studied as antagonistic properties. L23 strain presented coaggregation values of up to 36% and 38% with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. L60 strain coaggregated up to 35% and 36% with *E. coli* and *S. aureus*, respectively. Bacterial growth inhibition halos reached values of more than 30 mm using the two detection techniques, streak-diffusion and agar well diffusion methods. The antimicrobial effect of L23 and L60 was due in 82% and 81% to the activity of the bacteriocins, respectively. The bioactive metabolites released in culture supernatants were able to totally inhibit biofilm formation by the pathogenic strains, since the inhibition percentages ranged between 94% and 100% in all cases. The studies with simulated vaginal fluid demonstrated that formulation F9 was the one that allowed the greatest water uptake and the total lactobacilli release in the shortest time. Finally, by *in situ* studies using vaginal epithelial cells it was shown that both lactobacilli recovered from formulation F9' were able to exclude, compete and displace *S. aureus* by 62%, 70% and 56%, and by 81%, 70% and 54% to *Streptococcus agalactiae*, respectively. In conclusion, lactobacilli contained in the vaginal ovules were able to remain viable for an extended period of time with all their post-formulated biological properties intact. This Doctoral Thesis allowed the production of a pharmaceutical formulation with strong biotechnological potential to be used in the prevention and/or treatment of vaginal infections.

## INDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Microbiota del tracto genitourinario humano	1
1.1.1 Ecosistema vaginal	1
1.2 Infecciones del tracto vaginal	6
1.3 Características del género <i>Lactobacillus</i>	8
1.4 Los lactobacilos como probióticos aplicados a la salud en el tracto urogenital	10
1.4.1 Definición y aplicaciones de los probióticos	10
1.4.2 Mecanismos bioprotectores de los lactobacilos probióticos en el nicho vaginal	11
1.4.2.1 Exclusión competitiva y mecanismos de adhesión al epitelio	13
1.4.2.2 Coagregación con microorganismos patógenos	14
1.4.2.3 Inhibición de la formación de biofilm producido por microorganismos patógenos	14
1.4.2.4 Producción de sustancias con actividad antagonista	16
Ácidos orgánicos	16
Peróxido de hidrógeno	16
Biosurfactantes	17
Bacteriocinas	17
1.5 Antecedentes de las cepas de lactobacilos en estudio: <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	19
1.5.1 Primeros parámetros estudiados <i>in vitro</i>	19
1.5.2 Estudios <i>in situ</i> con células epiteliales vaginales	23
1.5.3 Modelos experimentales preclínicos <i>in vivo</i>	23
1.6 Formulaciones farmacéuticas	24
1.6.1 Composición química	24
1.6.2 Bioformulados farmacéuticos conteniendo <i>Lactobacillus</i> spp.	25
1.6.2.1 Antecedentes reportados	25
1.6.2.2 Disponibilidad y desarrollo de bioformulados de aplicación vaginal en el mundo	26
1.6.2.3 Estudios físico químicos y reológicos	28
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31



2.1. Hipótesis	31
2.2. Objetivo general	31
2.3. Objetivos específicos	31
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	32
3.1 Cepas utilizadas y medios de cultivo	33
3.2 Conservación de las cepas	34
3.3 Preparación de suspensiones de lactobacilos en glicerina	34
3.4 Diseño, elaboración y caracterización físico química de los óvulos vaginales	35
3.4.1 Obtención de la biomasa bacteriana	35
3.4.2 Diseño y composición de las formulaciones farmacéuticas	36
3.4.3 Elaboración de los óvulos vaginales	38
3.5 Estudio de viabilidad de los lactobacilos en las formulaciones farmacéuticas	38
3.6 Estudio de las propiedades benéficas de superficie relacionadas a la adhesión celular	39
3.6.1 Ensayo de producción de biofilm por las cepas probióticas	39
3.6.2 Detección de la autoagregación <i>in vitro</i> de lactobacilos	40
3.6.3 Evaluación cualitativa de la hidrofobicidad de superficie	40
3.7 Actividad antagonista de los lactobacilos sobre microorganismos patógenos	41
3.7.1 Ensayo de coagregación de los lactobacilos con <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	41
3.7.2 Detección de la actividad antimicrobiana de <i>L. fermentum</i> y <i>L. rhamnosus</i>	42
3.7.2.1 Técnica de estrías cruzadas	42
3.7.2.2 Técnica de difusión en pozos	42
Obtención del sobrenadante libre de células	42
Ensayo de actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en pozos	43
3.7.3 Evaluación de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes puros y neutralizados de los lactobacilos aislados de los óvulos sobre la producción de biofilm de microorganismos patógenos	43
3.8 Ensayos <i>in vitro</i> utilizando fluido vaginal simulado	44
3.8.1 Preparación del fluido vaginal simulado	44
3.8.2 Ensayo de absorción de agua de los óvulos vaginales	44
3.8.3 Estudio de liberación de lactobacilos de los óvulos vaginales	45
3.9 Estudios de adherencia de microorganismos a células epiteliales vaginales	45

3.9.1 Obtención y lavado de células vaginales	45
3.9.2 Ensayo de adherencia de lactobacilos a células vaginales	45
3.9.3 Adherencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y SGB	46
3.10 Determinación del efecto inhibitorio de los lactobacilos sobre la adherencia de bacterias patógenas a células del epitelio vaginal	46
3.10.1 Ensayo de exclusión	46
3.10.2 Ensayo de competencia	47
3.10.3 Ensayo de desplazamiento	47
3.11 Análisis estadístico de los resultados	47
3.12 Medios de cultivo	48
<b>CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
4.1 Cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	51
4.2 Cepas de microorganismos patógenos indicadores	52
4.3 Viabilidad de los lactobacilos en soluciones de glicerina	53
4.4 Resistencia de los lactobacilos al proceso de liofilización	55
4.5 Óvulos vaginales conteniendo diferentes formulaciones farmacéuticas: caracterización macroscópica del producto final	57
4.6 Viabilidad de las cepas de lactobacilos en los óvulos vaginales	59
4.7 Propiedades benéficas de superficie relacionadas a la adhesión celular	72
4.7.1 Producción de biofilm de las cepas probióticas aisladas de los óvulos	72
4.7.2 Autoagregación <i>in vitro</i> de los lactobacilos probióticos contenidos en los óvulos vaginales	76
4.7.3 Evaluación cualitativa de la hidrofobicidad de superficie celular	81
4.8 Actividad antagonista de los lactobacilos sobre microorganismos patógenos	85
4.8.1 Coagregación <i>in vitro</i> de los lactobacilos probióticos contenidos en óvulos con <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	85
4.8.2 Estudio de la actividad antimicrobiana por la técnica de estrías cruzadas de los lactobacilos aislados de los óvulos vaginales	91
4.8.3 Actividad antimicrobiana de los metabolitos producidos por los lactobacilos aislados de los óvulos vaginales por el método de difusión en pozos	97
4.8.4 Inhibición de la formación de biofilm producido por <i>Staphylococcus aureus</i> y SGB por los metabolitos bioactivos de las cepas de lactobacilos	103

4.9 Propiedades físico-químicas de los formulados farmacéuticos utilizando fluido vaginal simulado	108
4.9.1 Cuantificación de la absorción de agua de los óvulos vaginales	109
4.9.2 Liberación <i>in vitro</i> de lactobacilos en los óvulos de las distintas formulaciones farmacéuticas	111
4.10 Inhibición <i>in situ</i> de la adherencia de bacterias patógenas a células del epitelio vaginal por los lactobacilos	113
<b>CAPITULO 5: CONCLUSIONES</b>	<b>119</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>122</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>124</b>
<b>ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>145</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies de microorganismos considerados probióticos	11
<b>Tabla 2.</b> Sensibilidad de distintas especies bacterianas patógenas a las bacteriocinas L23 y L60 producidas por los lactobacilos probióticos	20
<b>Tabla 3.</b> Tipo de interacción entre bacteriocinas producidas por la cepa L23 y la cepa L60 sobre microorganismos patógenos	22
<b>Tabla 4.</b> Efectos benéficos del empleo de probióticos en patología ginecológica y obstétrica	26
<b>Tabla 5.</b> Suspensiones de <i>L. fermentum</i> L23 o <i>L. rhamnosus</i> L60 en glicerina	35
<b>Tabla 6.</b> Principios activos estudiados en cada formulación farmacéutica	36
<b>Tabla 7.</b> Composición química de las formulaciones farmacéuticas en forma de óvulos vaginales	37
<b>Tabla 8.</b> Conservación de las cepas L23 y L60 en soluciones glicerinadas	54
<b>Tabla 9.</b> Observación macroscópica de las formulaciones farmacéuticas en forma de óvulos vaginales	58
<b>Tabla 10.</b> Producción <i>in vitro</i> de biofilm por <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 aislados a distintos tiempos de óvulos vaginales	74
<b>Tabla 11.</b> Hidrofobicidad de superficie de los lactobacilos contenidos en los óvulos mediante el test de agregación salina	83
<b>Tabla 12.</b> Actividad antimicrobiana de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 aislados de óvulos vaginales sobre <i>E. coli</i> por el método de estrías cruzadas	93
<b>Tabla 13.</b> Actividad antimicrobiana de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 aislados de óvulos vaginales sobre <i>E. coli</i> por el método de difusión en pozos	99
<b>Tabla 14.</b> Inhibición de la producción de biofilm de SGB y <i>Staphylococcus aureus</i> por los sobrenadantes libres de células de los lactobacilos contenidos en los óvulos por el método en tubo	105

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Microbiota y mucosa vaginal según grupos etarios	2
<b>Figura 2.</b> Fluctuaciones de la microbiota vaginal en función de los cambios fisiológicos que aparecen en las diferentes etapas de la vida de la mujer	3
<b>Figura 3.</b> Microbiota vaginal según vaginotipos	5
<b>Figura 4.</b> Estimación de la incidencia de algunas de las ETS por región y por sexo	6
<b>Figura 5.</b> Morfología microscópica y macroscópica de un cultivo puro de lactobacilos	9
<b>Figura 6.</b> Mecanismos bioprotectores de <i>Lactobacillus</i> spp. cuando coloniza la mucosa vaginal	13
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de acción de las bacteriocinas en la formación de poros en la membrana de células sensibles	18
<b>Figura 8.</b> Interacción sinérgica entre las bacteriocinas L23 y L60 sobre cepas de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	21
<b>Figura 9.</b> Cepas de lactobacilos probióticas adheridas a células epiteliales vaginales	23
<b>Figura 10.</b> Observación macroscópica de las colonias de un cultivo en agar MRS de <i>Lactobacillus</i> spp	51
<b>Figura 11.</b> Microfotografía de un cultivo de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 en agar MRS (1000x)	52
<b>Figura 12.</b> Microfotografía de un cultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 en agar Man Rogosa Sharpe (1000x)	52
<b>Figura 13.</b> Coloración de Gram a partir de los cultivos de los microorganismos patógenos indicadores en Agar Tripticasa Soya	53
<b>Figura 14.</b> Viabilidad de las cepas de lactobacilos probióticas en cinco experiencias de liofilización	56
<b>Figura 15.</b> Aspecto macroscópico de las formulaciones farmacéuticas elaboradas	58
<b>Figura 16.</b> Recuento absoluto de células viables de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas	60
<b>Figura 17.</b> Supervivencia relativa de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas	61
<b>Figura 18.</b> Recuento absoluto de células viables de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas	66

<b>Figura 19.</b> Supervivencia relativa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas	67
<b>Figura 20.</b> Recuento absoluto de células viables de la mezcla <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas	70
<b>Figura 21.</b> Supervivencia relativa de la mezcla <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas	70
<b>Figura 22.</b> Recuento bacteriano de la formulación F12 con la mezcla de lactobacilos a los 120 días de almacenamiento	71
<b>Figura 23.</b> Producción de biofilm por los lactobacilos aislados de la Formulación 5 con 90 días de almacenamiento	73
<b>Figura 24.</b> Observación macroscópica de test de autoagregación cualitativo positivo para las cepas L23 y L60 contenidas en los óvulos vaginales	76
<b>Figura 25.</b> Observación microscópica de autoagregados de las cepas probióticas aisladas de la F6 a los 120 días de almacenamiento (1000x)	77
<b>Figura 26.</b> Autoagregación <i>in vitro</i> de <i>L. fermentum</i> L23 por el método cuantitativo en PBS	78
<b>Figura 27.</b> Autoagregación <i>in vitro</i> de <i>L. rhamnosus</i> L60 por el método cuantitativo en PBS	79
<b>Figura 28.</b> Autoagregación <i>in vitro</i> de la mezcla de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 en la formulación F12 por el método cuantitativo en PBS	80
<b>Figura 29.</b> Test de hidrofobicidad con sulfato de amonio	82
<b>Figura 30.</b> Observación macroscópica del test de coagregación cualitativo de las cepas L23 y L60 contenidas en las formulaciones farmacéuticas con <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	85
<b>Figura 31.</b> Observación microscópica de coagregados de lactobacilos con microorganismos patógenos (1000x)	86
<b>Figura 32.</b> Coagregación <i>in vitro</i> de <i>L. fermentum</i> L23 con <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	88
<b>Figura 33.</b> Coagregación <i>in vitro</i> de <i>L. rhamnosus</i> L60 con <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	89
<b>Figura 34.</b> Coagregación <i>in vitro</i> de la mezcla de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 con <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> en la formulación F12	90
<b>Figura 35.</b> Fotografía de la técnica de estrías cruzadas para la detección de actividad antimicrobiana en placas de agar MRS	92
<b>Figura 36.</b> Fotografía de la técnica de difusión en pozos para la detección de actividad antimicrobiana en placas de agar MRS	97

<b>Figura 37.</b> Actividad antimicrobiana relativa promedio de los metabolitos bioactivos producidos por la cepa <i>L. fermentum</i> L23 en cada formulación farmacéutica	102
<b>Figura 38.</b> Actividad antimicrobiana relativa promedio de los metabolitos bioactivos producidos por la cepa <i>L. rhamnosus</i> L60 en cada formulación farmacéutica	102
<b>Figura 39.</b> Inhibición de la formación de biofilm de SGB por los sobrenadantes de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 aislado de los óvulos por la técnica en tubo	104
<b>Figura 40.</b> Inhibición de la formación de biofilm de SGB y <i>Staphylococcus aureus</i> por los sobrenadantes de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 aislados de los óvulos por la técnica en microplaca	104
<b>Figura 41.</b> Inhibición de la producción de biofilm de SGB y <i>S. aureus</i> por los sobrenadantes libres de células de los lactobacilos aislados de los óvulos	107
<b>Figura 42.</b> Óvulo vaginal sometido al ensayo de absorción de agua	109
<b>Figura 43.</b> Variación en el peso de los óvulos en el ensayo de absorción de agua	110
<b>Figura 44.</b> Perfil de absorción de agua de las formulaciones farmacéuticas	110
<b>Figura 45.</b> Muestras del ensayo de liberación <i>in vitro</i> de lactobacilos en fluido vaginal simulado de la formulación F9	112
<b>Figura 46.</b> Liberación <i>in vitro</i> de la mezcla de lactobacilos contenidos en los óvulos al fluido vaginal simulado	112
<b>Figura 47.</b> Adherencia de <i>L. fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 aislados de la F9' a células epiteliales vaginales	114
<b>Figura 48.</b> Inhibición de la adherencia de <i>S. aureus</i> a células epiteliales vaginales por la mezcla de lactobacilos aislados de la Formulación 9'	115
<b>Figura 49.</b> Inhibición de la adherencia de SGB a células epiteliales vaginales por la mezcla de lactobacilos aislados de la Formulación 9'	115
<b>Figura 50.</b> Inhibición <i>in situ</i> de la adherencia de <i>S. aureus</i> y SGB a células epiteliales vaginales por la mezcla de lactobacilos aislados de la Formulación 9'	116

# *Introducción*



---

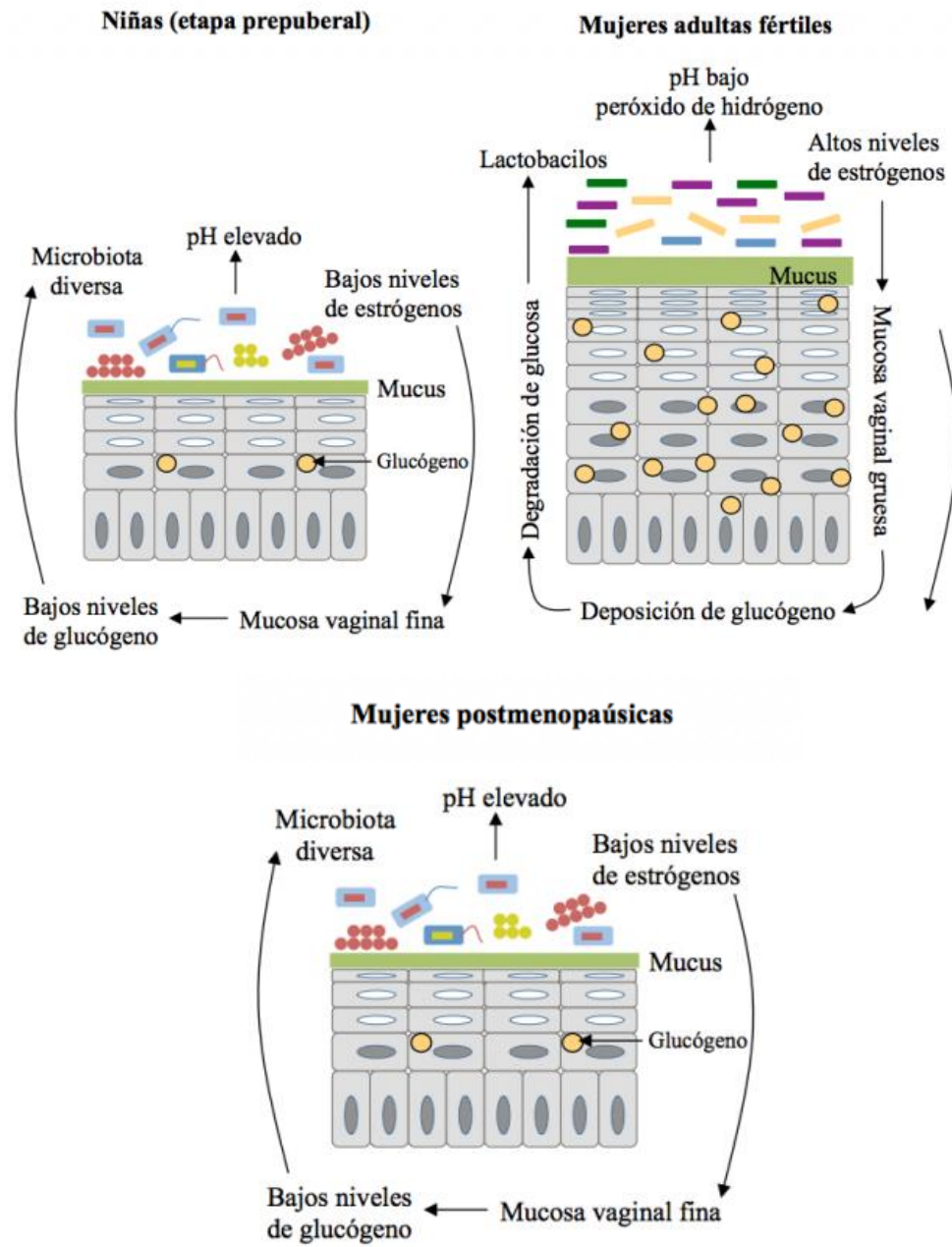
## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Microbiota del tracto genitourinario humano

En condiciones fisiológicas normales, la orina es estéril y por el mecanismo de micción se eliminan mecánicamente los microorganismos que pudieran encontrarse en la porción uretral próxima a la vejiga, impidiendo así su colonización. Tanto en el hombre como en la mujer, en la porción anterior de la uretra pueden encontrarse algunos microorganismos como estafilococos coagulasa negativos (SCN), *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp. y bacilos Gram negativos como *E. coli* y otras especies de enterobacterias. A su vez, en los genitales externos pueden colonizar microorganismos que son microbiota habitual de la piel, como pueden ser difteroides, *Streptococcus* spp., SCN, *Micrococcus* spp. y *Enterococcus* spp. En la mujer, la cercanía anatómica de la uretra con el ano favorece la posible colonización de microorganismos entéricos en la porción cercana al tracto urinario, lo que en determinadas circunstancias puede traducirse en infecciones urinarias. El rol de mantener el tracto genitourinario femenino sano es llevado a cabo principalmente por especies del género *Lactobacillus*. A todo lo largo del mundo y durante muchos años se ha propuesto la presencia de estos microorganismos como marcador de una microbiota vaginal saludable (Ruíz y col., 2009; Pendharkar y col., 2013; Castro y col., 2015; Rodrigues y col., 2015).



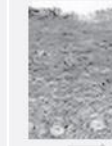
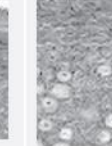
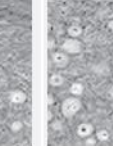
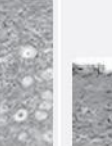
#### 1.1.1 Ecosistema vaginal

La microbiota vaginal es un ecosistema complejo de más de 200 especies bacterianas influenciadas por genes, antecedentes étnicos, factores ambientales y de comportamiento. La microbiota es uno de los componentes de un sistema de defensa que en conjunto con fagocitos, linfocitos y factores solubles como citoquinas, defensinas, lactoferrina, proteínas del sistema complemento e inmunoglobulinas de tipo A, protegen la vagina de la disbiosis e infecciones (Mendling, 2016). Durante las distintas etapas de la vida de una mujer ocurren cambios en la mucosa vaginal y, por lo tanto, en la microbiota. Durante la pre pubertad, los bajos niveles de estrógenos resultan en una mucosa delgada, con bajos niveles de glucógeno y una microbiota diversa. En la etapa adulta de la vida, los niveles de estrógenos y de glucógeno aumentan y proliferan los lactobacilos. En la postmenopausia, los niveles de estrógenos descienden otra vez, disminuye la concentración de lactobacilos y aumenta la diversidad bacteriana (Figuras 1 y 2).



Beltrán, 2015.

Figura 1. Microbiota y mucosa vaginal según grupos etarios.

	NEONATO	1 MES	PUBERTAD	MADUREZ SEXUAL	EMBARAZO	MENOPAUSIA
ESTRÓGENOS	++	-	+	++	+++	-
EPITELIO						
GLUCÓGENO	+	-	-+	+	++	-
pH	4-5	7	7-5	4-5	3,5-4,5	6-7
MICROBIOTA	Estéril <i>Lactobacillus</i> spp.	Escaso	Mixta	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp.	Mixta

Álvarez, Calatayud y col., 2015.

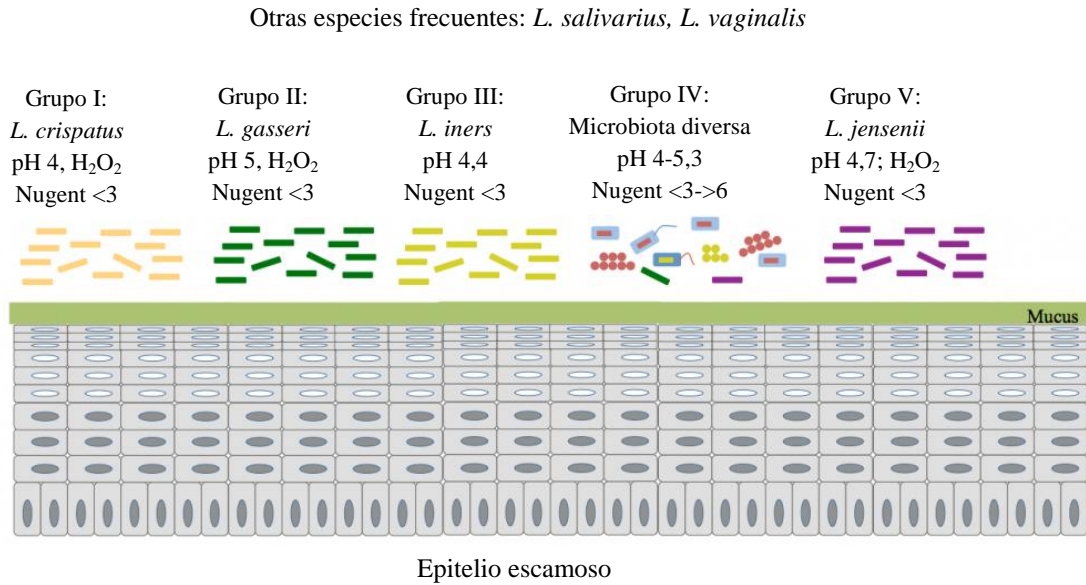
**Figura 2.** Fluctuaciones de la microbiota vaginal en función de los cambios fisiológicos que aparecen en las diferentes etapas de la vida de la mujer.

La microbiota del cuerpo humano comienza a adquirirse a partir del momento del nacimiento, y se va modificando en base a factores hormonales y del entorno. El parto natural favorece la colonización de los recién nacidos por la microbiota vaginal materna. Por el contrario, el parto por cesárea interrumpe esta exposición y los bebés adquieren una microbiota oral, intestinal, genital y de la piel que difiere de la de los neonatos por parto vaginal. Existen estudios que comprueban que la transferencia de fluidos vaginales maternos a los nacidos por cesárea puede restaurar parcialmente la microbiota (Dominguez Bello y col., 2016). La vulva de una niña recién nacida comienza dentro de las primeras 24 h de vida a ser colonizada por un bajo número de microorganismos no patógenos similares a los que habitan en la piel y mucosa oral materna, como *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., y escasos lactobacilos. Luego de 2-3 días, el estrógeno de la circulación materna transferido pasivamente en la lactancia induce el depósito de glucógeno en el epitelio vaginal favoreciendo el desarrollo de *Lactobacillus* spp. Además, la leche materna contiene una microbiota única, principalmente dominada por lactobacilos, que se transfieren al niño lactante (Mendling, 2016).

Antes de la pubertad, el glucógeno disponible y los lactobacilos desaparecen, la vagina femenina se torna alcalina y la microbiota está compuesta por microorganismos

aerobios y anaerobios facultativos entre los que se encuentran especies de *Veillonella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Corynebacterium*. En la menarca y en el inicio de la fase reproductiva de las mujeres aumenta la circulación de estrógenos y progesterona producto de la actividad ovárica, con un consecuente engrosamiento de las capas del epitelio vaginal. Los estrógenos estimulan la proliferación de las células epiteliales y el desarrollo de glucógeno intracelular, mientras que la progesterona induce la citólisis de las células de la mucosa vaginal, que liberan el glucógeno al lumen. Los lactobacilos y otras bacterias son capaces de metabolizar este glucógeno en glucosa y maltosa y, además, en ácido láctico. De esta forma, el pH vaginal alcanza valores entre 3,8 y 4,6 en condiciones fisiológicas normales (Madigan y col., 2004; Mendling y col., 2016). Las adolescentes presentan entonces una microbiota vaginal dominada por *Lactobacillus* spp., frecuentemente con otras bacterias ácido lácticas (BAL) y algunos anaerobios que, sin causar infección, habitan como especies comensales de la vagina.

La microbiota vaginal en mujeres adultas sanas consiste en una amplia variedad de géneros microbianos, donde se destaca el género *Lactobacillus*. Las especies más relevantes son: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. vaginalis*, entre otras. Otros microorganismos en menor número son *S. epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Anaerococcus* spp., entre otros (Borges y col., 2014). En el estudio realizado por Ravel y col. (2011) se observó que la microbiota vaginal se podía dividir en cinco grandes comunidades microbianas (vaginotipos) a partir de muestras de mujeres sexualmente activas y asintomáticas de cuatro grupos étnicos: caucásico, negro, hispano y asiático (Figura 3).



Ravel y col. (2011); Beltrán (2015).

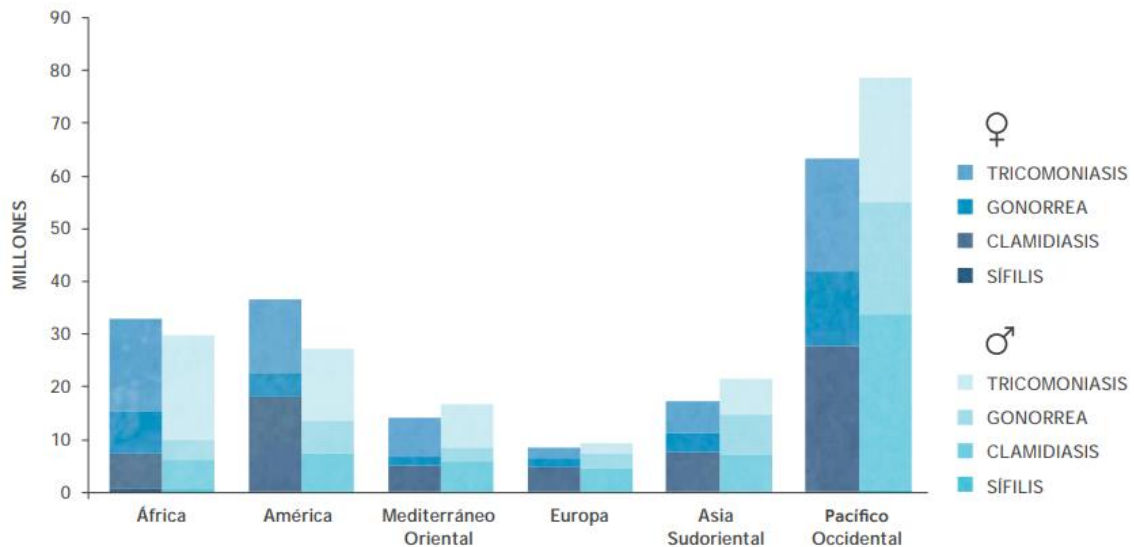
**Figura 3.** Microbiota vaginal según vaginotipos.

Las comunidades microbianas o vaginotipos pertenecientes al grupo I, II, III y V estaban dominadas principalmente por *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*, respectivamente, mientras que el grupo IV se caracterizó por poseer una microbiota con bacterias estrictamente anaerobias, incluyendo especies de *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Megasphaera* y *Peptoniphilus* (Ravel y col., 2011). A su vez, aparecen con gran frecuencia otros lactobacilos como *L. rhamnosus*, *L. casei* o *L. plantarum*, entre otras especies. Como regla general, se ha propuesto que una vagina deficiente en especies de *Lactobacillus* está asociada con el desarrollo de numerosas infecciones, como vaginosis bacteriana, vaginitis y aumento en el riesgo de adquirir una enfermedad de transmisión sexual (Leccese Terraf y col., 2017; Mezzasalma y col., 2017; Sánchez y col., 2018).

En las mujeres postmenopáusicas se interrumpe el ciclo estrogénico, con la consecuente desaparición del glucógeno y exudado vaginal, y la disminución de los nutrientes disponibles. Como consecuencia, la microbiota lactobacilar se reduce drásticamente (alcanzando valores de hasta un 1% del correspondiente al período fértil), se eleva el pH y la microbiota se asemeja a la de las niñas premenáuricas en donde los microorganismos predominantes son *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp. y bacterias entéricas (Madigan y col., 2004; Martín y col., 2008; Datcu, 2014; Madhivanan y col., 2014; van de Wijgert y col., 2014).

## 1.2 Infecciones del tracto vaginal

Según los datos actualizados de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), existen más de 30 diferentes bacterias, virus y parásitos causantes de enfermedades de transmisión sexual (ETS). Pueden dar lugar a enfermedades crónicas, SIDA, complicaciones durante el embarazo, infertilidad, entre otras. Ocho de los agentes patógenos que pueden ser transmitidos por contacto sexual se han relacionado con la mayor incidencia de ETS. Según las estadísticas de la OMS, más de 1 millón de personas adquieren una ETS todos los días. Cada año, un estimado de 357 millones de personas se enferma con una de las cuatro ETS actualmente curables (Figura 4).



OMS, 2016.

**Figura 4.** Estimación de la incidencia de algunas de las ETS por región y por sexo

Además de las ETS, existen otras infecciones del tracto vaginal que afectan la salud de las mujeres sexualmente activas. La descarga menstrual y el semen poseen un pH tendiente a la neutralidad o ligeramente alcalino (Borges y col., 2013). Esta condición afecta la población de lactobacilos del lumen, lo cual puede verse también agravado por el arrastre mecánico del fluido menstrual y, en numerosos casos, por la utilización de tampones. De esta manera, el equilibrio del nicho se ve afectado y en muchos casos se favorece la proliferación de microorganismos patógenos y/u oportunistas como



*Gardnerella vaginalis* y *Candida* spp., dando lugar a infecciones esporádicas como vaginosis bacteriana y vaginitis (Ma y col., 2017; Mur Pérez y col., 2017).

La disminución de la microbiota representada principalmente por lactobacilos también puede ser afectada por el uso de la antibióticoterapia que se utiliza para controlar las enfermedades de tracto genital. La administración de antibióticos como cefalosporinas disminuye los estreptococos y lactobacilos, mientras que la clindamicina puede erradicar por completo la mayor parte de las especies anaerobias o microaerófilas como *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. La mayoría de los lactobacilos (90%) poseen resistencia intrínseca a la vancomicina (Brooks y col., 2014; Hazirolan y col., 2019). Los espermicidas y dispositivos intrauterinos también suelen ser tóxicos para los lactobacilos (Pascual y col., 2006). A su vez, la aparición de infecciones genitales recurrentes o recidivas de infección debidas a cepas resistentes implica la necesidad del desarrollo de adyuvantes terapéuticos complementarios a la terapia convencional con antimicrobianos (Vitali y col., 2016). La creciente evidencia científica de la biología de los microorganismos patógenos ha permitido el desarrollo de muchas posibles estrategias alternativas a la utilización de antibióticos para tratar enfermedades infecciosas. En este sentido, las estrategias bactericidas o bacteriostáticas tradicionales ocasionan el desarrollo de mecanismos de resistencia, debido a que representan una mayor presión selectiva del ambiente sobre las especies patógenas. En comparación, la utilización de agentes biológicos que impidan el desarrollo de infecciones es una alternativa eficaz ya que no existen reportes de mecanismos de resistencia (Surendran y col., 2017). Algunas especies del género *Lactobacillus* son de interés en la industria biotecnológica mundial para dicha finalidad, ya que numerosos trabajos de investigación evidencian que los lactobacilos poseen propiedades antimicrobianas sobre una gran diversidad de agentes patógenos causantes de patologías como gonorrea, clamidiasis, infecciones por *Streptococcus agalactiae* (SGB), candidiasis, vaginosis bacteriana, entre otras (Mastromarino y col., 2009, 2014; Asurmendi, 2010; Daniele y col., 2011, 2014; Ruíz y col., 2012, 2015; Vicariotto y col., 2012; Murina y col., 2014; Ortiz y col., 2014).

En Argentina, el 74% de las mujeres sexualmente activas cuentan con un episodio de infección vaginal (no ETS) en algún momento de su vida, con lo que se convierte en una de las razones de mayor consulta al ginecólogo. Estadísticamente, en el 45% de los casos la etiología resulta ser de origen bacteriano, el 25% es candidiasis vulvovaginal, el 15% tricomoniasis y el resto infecciones polimicrobianas. Cuando las infecciones

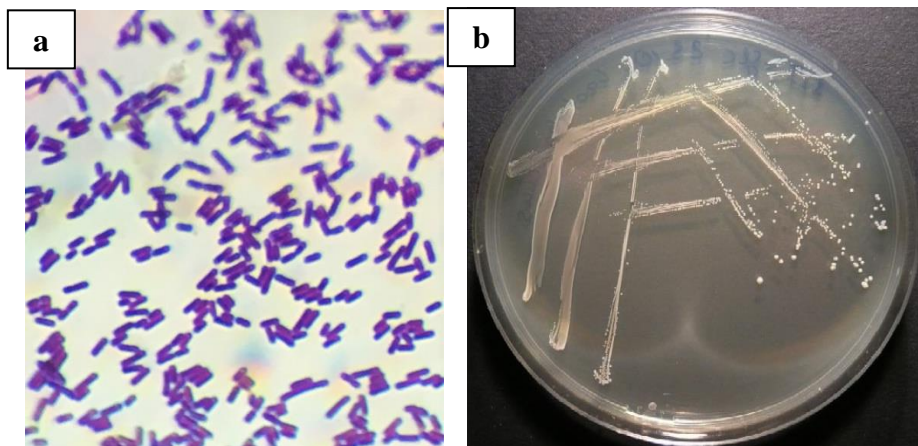
vaginales no son tratadas por el profesional de la salud pueden afectar la fertilidad de las mujeres en edad reproductiva, y también perjudicar un embarazo si es que está en curso. La elaboración de productos farmacéuticos conteniendo microorganismos reconstituyentes de la microbiota urogenital es un campo científico prometedor en Argentina, donde su comercialización es escasa (Galiñanes y col., 2011; Paolino y col., 2011; Ministerio de Salud de la Nación, 2014; De Gregorio y col., 2019). En el mundo, estudios científicos *in vivo* demuestran la efectividad de algunos lactobacilos para prevenir la adhesión o estimular la eliminación de agentes patógenos vaginales (Vicariotto y col., 2014; de Vrese y col., 2019).

### 1.3 Características del género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* se clasifica en el filo *Firmicutes* en la clase *Bacilli* del orden propuesto *Lactobacillales*. En este orden, se incluyen los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, pertenecientes a la familia *Lactobacillaceae* (Procop y col., 2017). El género *Lactobacillus* está compuesto por numerosas especies que forman parte de la microbiota normal de la vagina, el tubo digestivo y la bucofaringe. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (agua, alcantarillado, ensilaje), en la microbiota de muchas especies de animales, así como en diversos alimentos (productos lácteos, cereales, carnes, pescados, chucrut), en gran parte debido a sus amplias capacidades de fermentación (Procop y col., 2017). Algunas especies de *Lactobacillus* son notablemente importantes en la producción de alimentos fermentados y se utilizan como cultivos iniciadores o conservantes de alimentos (Salveti y col., 2012).

Morfológicamente, son bacilos Gram positivos que pueden disponerse de forma aislada, formando grupos o cadenas cortas y largas. Las células individuales de los miembros de este género son largas y delgadas, aunque según la especie, estado nutricional y etapa de crecimiento pueden observarse como coco-bacilos, bacilos delgados largos, bacilos gruesos cortos y tipo corineforme (Figura 5a). En su mayoría son inmóviles, y las colonias típicas de este género en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), circulares, convexas, claras, con márgenes lisos, opacas y sin pigmentos (Figura 5b). Algunas especies forman colonias rugosas (Samaniego Fernández y Sosa del Castillo, 2000; Rodríguez González, 2009; Lasserrot Cuadrado, 2015).





**Figura 5.** Morfología microscópica y macroscópica de un cultivo puro de lactobacilos

(a) Tinción de Gram a 1000x. (b) Colonias en agar MRS.

Los miembros del género *Lactobacillus* tienen una temperatura de crecimiento óptima a 37°C y son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer hasta pH 4. El crecimiento óptimo de la mayoría de las especies de lactobacilos se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas, especialmente en aislamiento primario. Esto quiere decir que un incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) favorece el crecimiento bacteriano (Madigan y col., 2004; Procop y col., 2017). Los lactobacilos adquieren su nombre porque el principal producto final de la fermentación de glucosa que producen es el ácido láctico (fermentación homoláctica); algunas especies pueden también producir ácido acético, fórmico y succínico, junto con CO<sub>2</sub> (fermentación heteroláctica) (Salvetti y col., 2012). Normalmente no reducen los nitratos, no licúan la gelatina ni digieren la caseína, no producen indol ni sulfhídrico. Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La producción de pigmentos por estas bacterias es rara y cuando ocurre, éstos pueden ser de color amarillo o naranja hacia un tono ferroso o rojizo. Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica (Samaniego Fernández y Sosa del Castillo, 2000; Madigan y col., 2004). Sin embargo, algunas cepas presentan proteasas ligadas a su pared o libres en el espacio extracelular, y pueden presentar ligera actividad proteolítica alrededor de la colonia. También existen cepas con débil actividad lipolítica debido a lipasas intracelulares. Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo

compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno y aminas en el queso (Law y Kolstad, 1983).

Cada especie de *Lactobacillus* spp. presenta requerimientos nutricionales particulares, ya que además de los carbohidratos como fuente de carbono y energía, algunas de ellas necesitan que el medio contenga aminoácidos, péptidos, o derivados de ácidos nucleicos (Vos y col., 2009). Otras necesitan vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo de *Lactobacillus* spp. contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y ésteres del ácido oleico resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies. Estos compuestos se incluyen en el medio Man-Rogosa-Sharpe (MRS), que es el medio de elección para lactobacilos (Pendharkar y col., 2013; Arakawa y col., 2014).

## **1.4 Los lactobacilos como probióticos aplicados a la salud en el tracto urogenital**

### **1.4.1 Definición y aplicaciones de los probióticos**

Muchas BAL son consideradas microorganismos probióticos, que de acuerdo a la definición adoptada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud, el término probiótico es una palabra que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar a microorganismos vivos que al administrarse en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped (Sánchez y col., 2018; Archacka y col., 2019). El modo de acción de los probióticos para la eliminación de microorganismos patógenos incluye la inhibición de los mismos mediante la producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, exclusión competitiva de los receptores de la mucosa, competencia por nutrientes disponibles, efectos antiadhesivos y antinvasivos, estimulación de la función barrera del epitelio, entre otros. Aunque se ha documentado mucho acerca de la capacidad de los probióticos para promover la salud del huésped, existe poca información sobre sus efectos sobre los microorganismos patógenos. Debido a la progresiva resistencia antibiótica se han desarrollado otras estrategias para el control de las infecciones. Es fundamental realizar futuros estudios que tiendan a lograr una mejor comprensión de esta compleja interacción probiótico-patógeno (Surendran y col., 2017).

Los microorganismos probióticos pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos. Numerosos trabajos de investigación han demostrado el potencial efecto preventivo y en muchos casos terapéutico de los probióticos en enfermedades infecciosas del tracto genitourinario, gastrointestinal y respiratorio de humanos y animales (Pascual y col., 2010; Vicariotto y col., 2014; Deng y col., 2015; Mezzasalma y col., 2017; Eguchi y col., 2019). Otros beneficios asociados al consumo de microorganismos probióticos son: modulación de la microbiota intestinal de humanos y animales, aumento de la absorción de nutrientes, fortalecimiento del sistema inmunológico, entre otros (Jäger y col., 2018; Shokri y col., 2018; Cerdó y col., 2019; Li y col., 2019; Peters y col., 2019; Eslami y col., 2019; Piyadeatsoontorn y col., 2019). Son numerosos los géneros de bacterias que actualmente se considera que tienen características probióticas, entre ellos se destacan los mencionados en la Tabla 1. El género *Lactobacillus* es el de mayor relevancia, y se han descrito numerosas cepas probióticas. La importancia de utilizar el género *Lactobacillus* como probiótico se debe a que carece de bacterias enzimáticas relacionadas a la patogenicidad y virulencia de los microorganismos (Madigan y col., 2004).

**Tabla 1.** Especies de microorganismos considerados probióticos.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bacillus</i> y otros géneros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>L. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>	<i>B. coagulans</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. diacetylactis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>	<i>L. lactis</i>		<i>Saccharomyces</i> spp.
<i>L. casei</i>	<i>B. infantis</i>			<i>Leuconostoc</i> spp.
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>			
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. rhamnosus</i>				
<i>L. salivarius</i>				

Lukjancenko y col., 2012.

#### 1.4.2 Mecanismos bioprotectores de los lactobacilos probióticos en el nicho vaginal

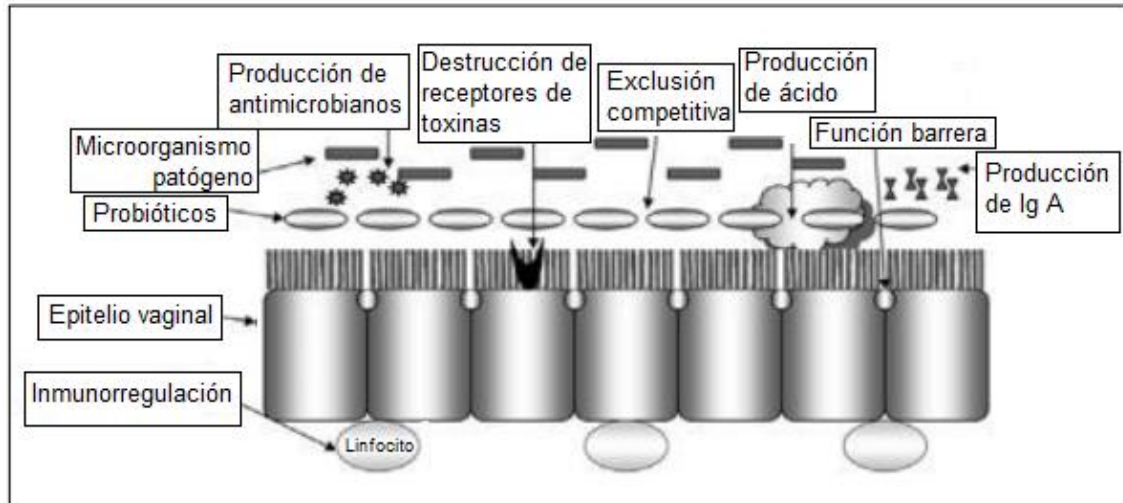
Los lactobacilos son los microorganismos de mayor predominancia en la microbiota vaginal, donde cohabitan con otras especies en menor número, formando un

---

ecosistema equilibrado. Cuando ese equilibrio se rompe, puede deberse a una reducción en la población bacteriana autóctona o a un sobrecrecimiento de otras especies, que se traduce en la aparición de enfermedades infecciosas. Las especies de *Lactobacillus* probióticas pueden llegar a ser un tratamiento de elección en los ecosistemas con microbiota alterada, ya que restituyen la microbiota normal. Dicha terapia se considera natural y sin efectos colaterales, en contraste con los tratamientos farmacéuticos convencionales. Existen evidencias científicas en todo el mundo que indican que la administración de lactobacilos representa una alternativa a las terapias antibióticas actualmente prescritas para infecciones a repetición o recidivas de infección. Estos probióticos se han establecido recientemente como un método natural, seguro, económico y alternativo para la protección del tracto genital de la mujer adulta (Reid y Burton, 2002; Pérez Leonard, 2007; Rodríguez González, 2009; Ruíz y col., 2009; Pascual y col., 2010; Kaewnopparat y col., 2013; Castro y col., 2015).

Las infecciones a repetición que ocasionan problemas en las mujeres no sólo son vaginales sino también urinarias. En un estudio realizado recientemente en nuestro país, el 53% de las mujeres encuestadas manifestó que tuvo una infección genitourinaria (IU) alguna vez, de las cuales el 41,1% tuvo un solo episodio, 19,4% dos episodios, 12,9% tres y el resto más de cuatro (Orrego Arnolt y col., 2018). Esta problemática ha llevado a la implementación de terapias que restituyan la microbiota normal. Si bien no se ha descrito en la bibliografía que los microorganismos probióticos tengan la capacidad de reemplazar el uso de antimicrobianos en el tratamiento de infecciones genitales como vaginosis bacteriana y vaginitis, se proponen y recomiendan como una estrategia importante para prevenir infecciones recurrentes y recidivas de infección, a la vez que permitirían una recuperación más rápida del entorno vaginal normal por restitución de la microbiota (Álvarez Calatayud y col., 2015; Ma y col., 2017; Mur Pérez y col., 2017).

Son varios los mecanismos por los cuales el género *Lactobacillus* se comporta como bioprotector contra microorganismos patógenos cuando coloniza la vagina de la mujer, entre los que se encuentran la exclusión competitiva de microorganismos patógenos de receptores celulares epiteliales, coagregación con dichos microorganismos patógenos, la producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos orgánicos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inmunorregulación por estimulación de linfocitos y de producción de inmunoglobulina A, (Figura 6).



Vera Cusme, 2013.

**Figura 6.** Mecanismos bioprotectores de *Lactobacillus* spp. cuando coloniza la mucosa vaginal.

Si bien estos efectos benéficos son numerosos, muchos de ellos se relacionan entre sí y se fundamentan en dos mecanismos principales: los intrínsecos de la cepa probiótica, y los antagonistas sobre microorganismos patógenos u oportunistas.

#### 1.4.2.1 Exclusión competitiva y mecanismos de adhesión al epitelio

La microbiota vaginal dominada por lactobacilos y el ser humano evolucionan simultáneamente, por lo que las especies comensales de la vagina presentan un alto grado de adaptación al nicho. Esto muestra así una ventaja en la competencia con otros microorganismos cuya colonización sólo ocurriría cuando disminuye notablemente la microbiota autóctona protectora (por ejemplo, tras un tratamiento con antibióticos) (Álvarez Calatayud y col., 2015). Este efecto de competencia es por los sitios de unión a los receptores epiteliales y se denomina exclusión competitiva. En paralelo a este mecanismo, también existe un conjunto de fenómenos que dificultan la adhesión de cepas patógenas al epitelio y que tienen que ver con las propiedades de superficie celular de los lactobacilos: impedimento estérico, autoagregación, hidrofobicidad de superficie, producción de biofilm y adhesión intrínseca de los lactobacilos a las células epiteliales.

La autoagregación de lactobacilos es un fenómeno en el que las células bacterianas se adhieren entre sí. Para que la autoagregación ocurra, deben existir en la superficie celular sustancias tensoactivas (Bouridane y col., 2016). A medida que los lactobacilos autoagregan, ocurre el fenómeno de adhesión a las células epiteliales vaginales, lo que a su vez estimula aún más la autoagregación microbiana y la proliferación para formar

microcolonias. En el proceso de adhesión de estos microorganismos están involucrados dos mecanismos: uno no-específico y otro específico. El primero depende de las propiedades físico-químicas de las bacterias y de la mucosa, lo que origina diferentes tipos de interacciones entre ellas. Por ejemplo, el perfil de ácidos grasos de la membrana bacteriana determina la hidrofobicidad de superficie celular que, cuando aumenta, está relacionado con una mayor fuerza de adhesión al epitelio. El segundo mecanismo involucra la interacción o unión de las estructuras externas de la bacteria (adhesinas) a receptores específicos del epitelio. Además, los lactobacilos producen y excretan un exopolisacárido que fortalece la unión a la superficie, y los microagregados se diferencian entonces en biofilms característicos. De esta manera, estas bacterias pueden participar en la competencia con microorganismos patógenos por los sitios específicos de adherencia o utilizar los nutrientes disponibles, evitando así el ingreso, crecimiento o multiplicación de los microorganismos patógenos (Boris y col., 1997, 1998; Ocaña y Nader Macías, 2002; Nader Macías y col., 2007; Pascual y col., 2008b; Martín y col., 2012; Malik y col., 2013; Leccese Terraf y col., 2014).

#### **1.4.2.2 Coagregación con microorganismos patógenos**

Algunas cepas de lactobacilos muestran una fuerte adhesión a microorganismos patógenos, fenómeno conocido como coagregación. Se ha observado *in vitro* que esta propiedad podría explicar el bloqueo de los mecanismos de adhesión de los microorganismos patógenos y la consecuente eliminación de los mismos ayudada por el arrastre mecánico del fluido vaginal (Ekmekci y col., 2009). La coagregación es una de las propiedades reconocidas a través de la cual los lactobacilos pueden ejercer su actividad antimicrobiana y crear un micro-ambiente hostil alrededor del agente patógeno. Por otra parte, el fortalecimiento de estas fuerzas de adhesión por aumento en la población de lactobacilos resulta en coagregados significativamente más duraderos y se ha visto que la adhesión entre las cepas se produce en el mismo instante en que entran en contacto, lo que demuestra el potencial de los probióticos para producir un rápido efecto anti-patógeno (Boris y col., 1998; Younes y col., 2012; Verdenelli y col., 2014).

#### **1.4.2.3 Inhibición de la formación de biofilm producido por microorganismos patógenos**

El biofilm producido por microorganismos patógenos genera problemas debido a



que son comunidades estructuradas de microorganismos inmersos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo, que muestran alta resistencia a agentes antibacterianos (Salas Jara y col., 2016). El biofilm confiere protección a las células bacterianas y disminuye tanto la eficiencia de los procedimientos de limpieza y desinfección de superficies inertes, como la eficiencia en la respuesta del sistema inmune o la terapia antimicrobiana cuando se encuentran colonizando tejidos y mucosas. Una vez adheridos a la superficie de la célula huésped, los microorganismos patógenos inician sus procesos bioquímicos y fisiológicos específicos, incluida la proliferación, la secreción de toxinas, la invasión de la célula huésped y la activación de las cascadas de señalización de la misma, que resulta finalmente en la aparición de la enfermedad. En consecuencia, surge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias y agentes anti-biofilms que permitan la prevención y el control de la formación de biofilm por diversos microorganismos patógenos (Ait Ouali y col., 2014; Rybalchenko y col., 2015; Surendran y col., 2017; Shokri y col., 2018).

Existe abundante bibliografía que describe a muchas cepas de SGB y de *S. aureus* como excelentes formadores de biofilm, lo que está íntimamente relacionado con su patogenicidad (Baba y Aydın, 2016; Jiang y col., 2016; Parker y col., 2016; Alonso y col., 2017; Azara y col., 2017; Figueiredo y col., 2017; Pérez Montarelo y col., 2017). Dicho factor de virulencia se encuentra regulado por mecanismos de *quorum sensing* (QS), que se refiere a la comunicación célula a célula entre miembros de una población bacteriana mediante la producción de moléculas-señal (Salas Jara y col., 2016; Surendran y col., 2017). Estas moléculas señal en bacterias Gram negativas se denominan N-acil homoserina lactonas (AHLs). A pesar de que existen algunas bacterias Gram positivas que exhiben sistemas QS, la naturaleza de las moléculas de señal utilizadas es diferente de las bacterias Gram negativas. De hecho, aún no se conoce ninguna bacteria Gram positiva que produzca AHL. Los sistemas QS Gram-positivos suelen utilizar pequeñas moléculas-señal de naturaleza peptídica que son procesadas post-traduccionalmente, denominadas péptidos autoinductores (Lopes y col., 2017). Se ha descrito en algunos trabajos de investigación que algunas cepas de *Lactobacillus* son capaces de producir metabolitos bioactivos con propiedades inhibitorias de la formación de biofilm por microorganismos patógenos del tracto urogenital humano, lo cual constituye una propiedad benéfica deseada para una cepa probiótica (Chapman y col., 2014; Chew y col., 2015b; Rybalchenko y col., 2015).

#### 1.4.2.4 Producción de sustancias con actividad antagonista

Los lactobacilos son capaces de producir diversos metabolitos bioactivos entre los que se encuentran los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno, biosurfactantes y bacteriocinas.

##### *Ácidos orgánicos*

El pH ácido de la vagina es producido por los productos finales del metabolismo fermentativo de los glúcidos, que llevan a cabo las especies del género *Lactobacillus*. Las células vaginales tienden a acumular glucógeno, especialmente durante el período comprendido entre la menarca y la menopausia (edad fértil), por lo que se considera que este glúcido es la fuente de la que deriva la acidez vaginal. La producción de ácido láctico es el principal mecanismo de protección de la mucosa vaginal, lo que hace que el pH de la misma sea de 3,8-4,6 y da lugar a ciertas condiciones que resultan ser tóxicas para la mayoría de los agentes patógenos (Álvarez Calatayud y col., 2015). Otros ácidos orgánicos producidos por los lactobacilos son el ácido fórmico y ácido acético, que en conjunto con el ácido láctico disminuyen el pH de medio. Dicho mecanismo de protección de la mucosa es muy eficaz, ya que inhibe parcial o totalmente el desarrollo de la mayor parte de las bacterias procedentes del tracto digestivo y de las de origen ambiental (Beerepoot y Geerlings, 2016).

##### *Peróxido de hidrógeno*

Algunos lactobacilos, mantenidos en condiciones aeróbicas, liberan cantidades relativamente altas de  $H_2O_2$  al medio ambiente. Este  $H_2O_2$  es un subproducto de la oxidación de hidratos de carbono, y al ser una especie reactiva del oxígeno (ERO), podría ser un indicador de la aparición de otras sustancias de este grupo, como el superóxido radical ( $O_2^{\bullet}$ ), o radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ). El efecto bactericida del  $H_2O_2$  está determinado por su alta capacidad de reaccionar sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, causando un daño celular oxidativo permanente. A pesar de que los lactobacilos no producen la típica catalasa que utiliza como cofactor al grupo hemo, poseen otro mecanismo de protección en contra de su propio  $H_2O_2$ , basado en la síntesis de una catalasa hexamérica o tetramérica que utiliza manganeso, a veces descrita como pseudocatalasa o catalasa/peroxidasa (Ramos y col., 2015; Álvarez Calatayud y col., 2015; Leccese Terraf y col., 2017).



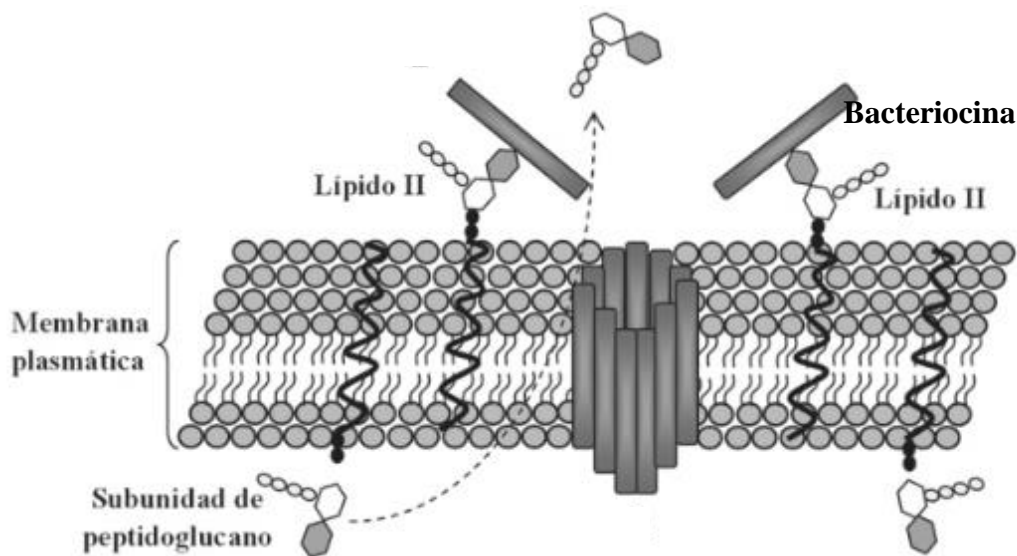
---

### *Biosurfactantes*

Los biosurfactantes microbianos son un grupo de agentes tensoactivos liberados extracelularmente que incrementan la disponibilidad de compuestos orgánicos para la cepa productora. Se trata de moléculas anfifílicas de distinta naturaleza, como pueden ser glicolípidos, fosfolípidos, lipopéptidos y compuestos poliméricos (Sharma y col., 2014). Los biosurfactantes producidos por algunos *Lactobacillus* spp. inhiben la adherencia bacteriana por exclusión competitiva, poseen propiedades antimicrobianas y tienen la capacidad de atraer macrófagos, leucocitos, citoquinas y otras defensas del huésped (Gudiña y col., 2010; Zakaria Gomaa, 2013; Jiménez Pacheco y Jiménez Pacheco, 2013; Satpute y col., 2016). Si bien existe escasa bibliografía que describa aplicaciones de biosurfactantes producidos por lactobacilos, Abruzzo y col. (2018) desarrollaron en Italia una formulación conteniendo vesículas de un biosurfactante producido por una cepa de *L. gasseri* para el tratamiento de vaginitis. No se han encontrado trabajos científicos que describan el potencial uso de biosurfactantes producidos por lactobacilos para el tratamiento de infecciones vaginales en Argentina.

### *Bacteriocinas*

Las bacteriocinas son definidas como sustancias antimicrobianas producidas por bacterias Gram positivas o Gram negativas, químicamente presentan un núcleo proteico (al cual se unen glúcidos, lípidos, ARN, etc.) y cuyo espectro de acción abarca tanto especies relacionadas como otras especies no relacionadas filogenéticamente. Se sintetizan en los ribosomas aunque algunas requieren una extensa modificación post-traducciona. La síntesis de estos compuestos antimicrobianos se lleva a cabo gracias al metabolismo secundario de las BAL y son de peso molecular y propiedades bioquímicas variables. El mecanismo de acción de las bacteriocinas es complejo, y la acción letal tiene lugar en dos fases: primero la bacteriocina se absorbe a receptores específicos en la envoltura celular y posteriormente ocurre la destrucción de la integridad de la membrana a través de la formación de poros (Figura 7), lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (Stern y col., 2006; Martín y col., 2008; Pérez y col., 2014).



*López y col., 2008.*

**Figura 7.** Mecanismo de acción de las bacteriocinas en la formación de poros en la membrana de células sensibles

Algunas bacteriocinas producidas por BAL son tolerantes a altas temperaturas, lo que les permite mantener su actividad antimicrobiana tras someterlas a temperaturas de pasteurización para su utilización en la industria alimenticia. A su vez existen bacteriocinas resistentes a pH bajos, como el característico de la mucosa vaginal. Además, no se han reportado efectos secundarios ni resistencia bacteriana a las bacteriocinas producidas por lactobacilos, lo que resalta la importancia de este compuesto como metabolito antimicrobiano. Esto se debe a que además de actuar a muy bajas concentraciones (específicamente a nivel nanomolar), las bacteriocinas de las BAL pierden su actividad en algunos días y no permanecen activas en el ambiente, por lo que las cepas que se encuentren allí tienen pocas probabilidades de desarrollar resistencia (Dobson y col., 2012; Wang y col., 2013; Zendo, 2013). Estas características de las bacteriocinas representan una serie de ventajas y resaltan la importancia de este compuesto como metabolito antimicrobiano ya que, por el contrario, la mayoría de los antibióticos utilizados en medicina clínica no resisten altas temperaturas, generan resistencia microbiana y tienen actividad en concentraciones más altas (del orden micromolar) (Zendo, 2013).

Existen estudios referidos a aislamiento y caracterización de bacteriocinas producidas por BAL aisladas de vagina que demostraron que las mismas poseían actividad antimicrobiana sobre microorganismos patógenos vaginales humanos (Juárez Tomás y col., 2002; Pascual y col., 2008a). Dentro de este grupo de bacterias, se ha reportado que

existen bacteriocinas producidas por el género *Lactobacillus* que poseen acción inhibitoria sobre una gran diversidad de géneros bacterianos como *Prevotella bivia*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *G. vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, SGB y *Pseudomonas aeruginosa* (Alpay Karaoğlu y col., 2002; Matu y col., 2010; Daniele y col., 2011; Ruíz y col., 2012).

### **1.5 Antecedentes de las cepas de lactobacilos en estudio: *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60**

El grupo de investigación del laboratorio de Bacteriología, perteneciente al departamento de Microbiología e Inmunología, ha estudiado ampliamente a dos cepas de lactobacilos aisladas de humanos, *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60, y a partir de numerosos estudios *in vitro*, *in situ* e *in vivo* se han caracterizado y clasificado como dos cepas probióticas con fuerte potencial biotecnológico.

#### **1.5.1 Primeros parámetros estudiados *in vitro***

A partir del aislamiento de las cepas L23 y L60 de vaginas de mujeres sanas en edad reproductiva (Pascual 2008*a;b*), se han realizado numerosos trabajos de investigación describiendo las propiedades benéficas y probióticas de estos lactobacilos.

La síntesis de metabolitos bioactivos con actividad antimicrobiana es una de las propiedades probióticas de gran relevancia encontrada en ambas cepas (Tabla 2).

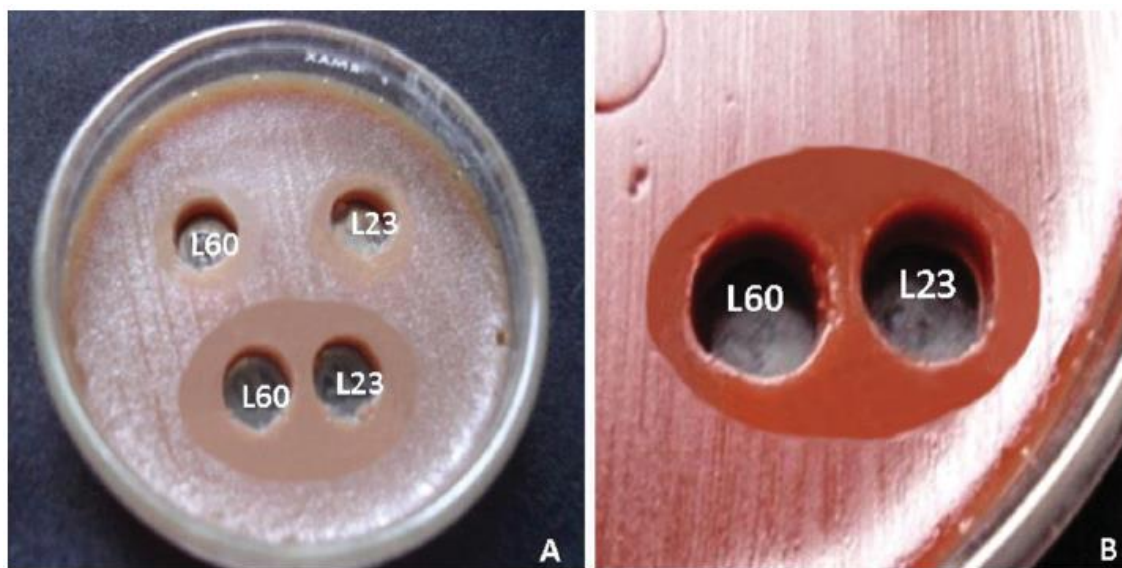
**Tabla 2.** Sensibilidad de distintas especies bacterianas patógenas a las bacteriocinas L23 y L60 producidas por los lactobacilos probióticos

	Nº cepas	Halo de inhibición (mm)	Cepas inhibidas (%)
<b>Bacteriocina L23</b>			
<i>Escherichia coli</i>	100	41	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	44	100
<i>Proteus mirabilis</i>	15	40	100
<i>Proteus vulgaris</i>	5	38	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	34	100
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	30	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8	49	100
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	3	46	100
<i>Serratia marcescens</i>	4	54	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15	21	100
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	6	30	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	36	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	31	100
<i>Gardnerella vaginalis</i>	120	32	100
<i>Candida albicans</i>	30	15	95
<i>Candida glabrata</i>	8	13	62
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	26	30	100
<i>Mycoplasma hominis</i>	29	+	100
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	68	+	100
<b>Bacteriocina L60</b>			
<i>Escherichia coli</i>	98	39	100
<i>Proteus mirabilis</i>	12	40	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	36	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5	49	100
<i>Gardnerella vaginalis</i>	8	32	100
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	3	12	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	21	100
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4	30	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	36	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	31	100
<i>Candida albicans</i>	10	20	100
<i>Candida glabrata</i>	3	0	0

Pascual y col., 2008a;b

Se demostró la actividad inhibitoria del crecimiento sobre una amplia gama de microorganismos patógenos tales como *G. vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, SGB, *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, enterobacterias (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Acinetobacter* spp.), otros bacilos Gram negativos no fermentativos (*Pseudomonas* spp.) y diferentes especies de *Candida* (Pascual y col., 2006; Ruíz y col., 2009, 2012, 2015; García

y col., 2015). Con respecto a esta propiedad antimicrobiana, el grupo de Bacteriología ha descrito previamente que los metabolitos bioactivos producidos por ambas cepas de lactobacilos se liberan en sus sobrenadantes libres de células (SLCs). A partir de estos ensayos, se demostró que la actividad inhibitoria del SLC neutralizado (SLCN) de L23 es producida exclusivamente por su bacteriocina L23. En el caso del SLCN de L60, la actividad inhibitoria es causada por dos metabolitos,  $H_2O_2$  y la bacteriocina L60. Cabe destacar que ambas bacteriocinas L23 y L60 fueron los principales biometabolitos responsables de la actividad antimicrobiana encontrada frente a la variedad de microorganismos ensayados (Pascual y col., 2008b; Ruíz y col., 2009, 2015; Daniele y col., 2011). A su vez se demostró que los metabolitos bioactivos sintetizados por ambas cepas de lactobacilos probióticas presentan una interacción de tipo sinérgica con respecto a su actividad antimicrobiana sobre la mayoría de los microorganismos estudiados (Ruíz y col., 2009) (Figura 8, Tabla 3).



Ruíz y col., 2015

**Figura 8.** Interacción sinérgica entre las bacteriocinas L23 y L60 sobre cepas de *Neisseria gonorrhoeae*

(A) *N. gonorrhoeae* cepa 1, (B) *N. gonorrhoeae* cepa 2.

## INTRODUCCIÓN

**Tabla 3.** Tipo de interacción entre bacteriocinas producidas por la cepa L23 y la cepa L60 sobre microorganismos patógenos

	N° cepas	Indiferencia (%)	Antagonismo (%)	Sinergismo (%)
<i>Escherichia coli</i>	100	45	-	55
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	25	-	75
<i>Klebsiella oxytoca</i>	10	10	-	90
<i>Proteus mirabilis</i>	14	64	-	36
<i>Proteus vulgaris</i>	2	-	-	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	14	7	-	93
<i>Citrobacter freundii</i>	5	40	-	60
<i>Serratia marcescens</i>	4	25	-	75
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5	-	-	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	-	-	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	-	-	100
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	15	20	-	80
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	-	-	100
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	-	-	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	-	-	100
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	8	-	-	100
% total de interacciones observadas		31	0	69

Ruíz y col., 2009

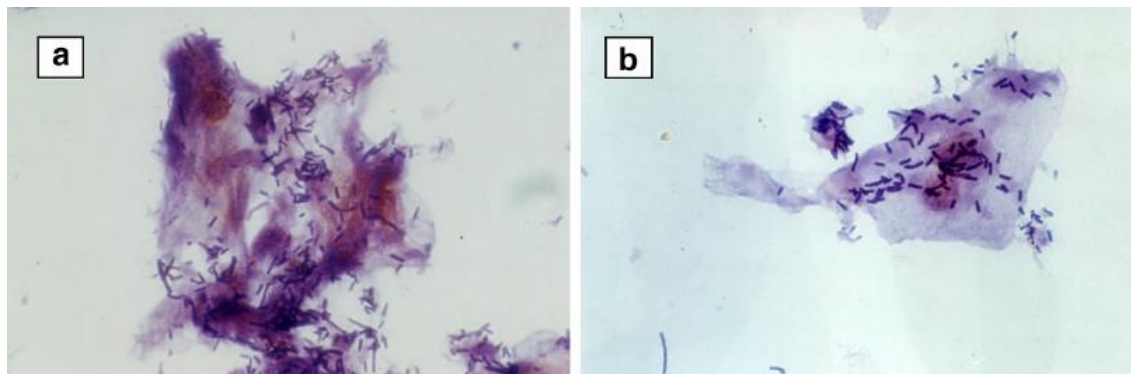
La potencial capacidad de las cepas de lactobacilos de adherirse a células epiteliales vaginales se estudió preliminarmente utilizando diferentes técnicas *in vitro* (Pascual y col., 2004; 2008a;b). En dichos estudios se comprobó no sólo la alta eficacia de estas cepas de formar autoagregados macro y microscópicos, sino también su alta hidrofobicidad de superficie y su capacidad de formar biofilm. Estas propiedades se encuentran íntimamente relacionadas con la fuerza de adhesión bacteriana al epitelio celular, lo cual indicaría la capacidad potencial de colonizar el nicho vaginal en terapia preventiva y/o curativa (Chapman y col., 2014). Estos resultados fueron luego demostrados y corroborados utilizando técnicas *in situ* con células vaginales sanas en suspensión.

La coagregación de los lactobacilos con microorganismos patógenos podría ser otro factor importante para mantener la salud vaginal, propiedad que fue demostrada *in vitro* para *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60. Esta característica no sólo impediría la adhesión y aceleraría la eliminación del agente patógeno, sino que también produciría un área alrededor del mismo donde la concentración de sustancias antimicrobianas producidas por los lactobacilos se incrementaría (Pascual y col., 2008b).



### 1.5.2 Estudios *in situ* con células epiteliales vaginales

En esta etapa de investigación se buscó corroborar los resultados de las técnicas *in vitro* del potencial de adhesión (Figura 9). Las cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 fueron capaces de adherirse fuertemente a las células eucariotas en suspensión.



Ortiz y col., 2014.

**Figura 9.** Cepas de lactobacilos probióticas adheridas a células epiteliales vaginales

(A) *L. fermentum* L23, (B) *L. rhamnosus* L60.

Posteriormente, se demostró *in situ* su antagonismo mediante los ensayos de exclusión, competencia y desplazamiento de agentes patógenos como *L. monocytogenes*, SGB y *S. aureus* empleando células vaginales en suspensión (Ortiz y col., 2014). En los ensayos de exclusión y competencia los lactobacilos inhibieron hasta en un 96% la adhesión de los tres agentes patógenos ensayados. Los porcentajes de reducción de la adhesión en el ensayo de desplazamiento fueron menores, con valores de hasta el 71%, lo cual siguió evidenciando el alto potencial de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 de reducir la adherencia de cepas patógenas de vagina.

### 1.5.3 Modelos experimentales preclínicos *in vivo*

Para poder demostrar los efectos benéficos *in vivo* de las cepas en estudio se diseñaron modelos experimentales murinos de infección vaginal, donde se demostró no sólo la alta capacidad de colonización vaginal de estas cepas L23 y L60, sino también sus efectos preventivos y curativos. La mayoría de las cepas de lactobacilos necesitan un estado hormonal con ciertos niveles de estrógenos para poder adherirse al epitelio vaginal. Resulta de importancia destacar que, a diferencia de la mayor parte de la bibliografía consultada, en estos ensayos no fue necesaria la inducción con estrógenos para estimular la colonización bacteriana de los lactobacilos, sino que se adhirieron y colonizaron el tejido

sin dificultades. Los modelos de infección vaginal fueron realizados utilizando como agentes patógenos *E. coli*, *G. vaginalis* y SGB, todos de gran importancia en cuadros clínicos de infecciones urogenitales en mujeres adultas y/o embarazadas. Estos estudios demostraron que los lactobacilos probióticos impidieron la colonización vaginal de estos tres microorganismos patógenos ensayados, es decir las cepas L23 y L60 presentaron un efecto bactericida (Pascual y col., 2010; Ruíz y col., 2010; Daniele y col., 2014). Es de destacar que con una única dosis de lactobacilos ( $10^6$  UFC/ml) se logró erradicar los microorganismos patógenos de la vagina de ratones BALB/c, en comparación con estudios realizados por otros autores que necesitaron mayor número de dosis y concentraciones más altas de otros lactobacilos en estudio ( $10^9$  UFC/ml) (Zárate y col., 2009).

## 1.6 Formulaciones farmacéuticas

### 1.6.1 Composición química

Según la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), un Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) consiste en una sustancia química conocida, bien definida, con actividad biológica específica (Farmacopea Argentina, 2013). Para estudiar microorganismos probióticos en un medicamento es más conveniente utilizar el término Principio Activo, ya que son agentes responsables de más de una respuesta biológica, por tratarse de un microorganismo vivo. Reemplazando entonces los términos, un principio activo junto con el/los excipiente/s seleccionado/s constituyen un medicamento, que según sus características físico-químicas condiciona la selección del envase apropiado para contenerlo. Así, se obtiene finalmente un producto envasado compuesto por una serie de tres fracciones: principio activo + excipiente/s + envase. Para poder estudiar las propiedades del producto, se necesita someterlo a factores externos bien definidos (temperatura, luz, oxígeno, humedad, tiempo). Todos estos factores influyen en la estabilidad del medicamento y su principio activo, y deben controlarse cuidadosamente a lo largo de su formulación, manipulación, almacenamiento y transporte. Es importante estudiar la estabilidad del medicamento a través del tiempo para poder establecer si mantiene o no sus propiedades y características desde el momento de su manufactura hasta su uso (Peng y col., 2015; Abrantes y col., 2016; Atouf, 2016; Irwin y col., 2017).



## 1.6.2 Bioformulados farmacéuticos conteniendo *Lactobacillus* spp.

### 1.6.2.1 Antecedentes reportados

Las primeras investigaciones sobre microorganismos probióticos para su aplicación en Urología se remontan a la primera mitad del siglo XX. Los estudios que se han reportado se refieren al efecto benéfico de los probióticos para la prevención de las infecciones genitourinarias en mujeres. Sin embargo, algunos autores afirman que son necesarios más estudios y con mayor número de muestras, para poder considerarlos una alternativa terapéutica fiable y efectiva, ya que el número de ensayos clínicos de este tipo es escaso hasta la fecha (Jiménez Pacheco y Jiménez Pacheco, 2013).

Los primeros estudios utilizando formulaciones farmacéuticas conteniendo cepas probióticas de *Lactobacillus* spp. fueron realizados dos décadas atrás. Reid y col. (1992) realizaron una terapia conjunta de antibióticos con supositorios vaginales de *Lactobacillus* spp., logrando una erradicación de infecciones agudas y recurrentes pero del tracto urinario inferior (UTI) de mujeres. Este fue uno de los primeros estudios clínicos que daba indicios de la importancia de la reconstitución de la microbiota para la prevención de recurrencias o recidivas de infecciones genitourinarias. Posteriormente, en ciertos países del mundo comenzaron a desarrollarse algunas estrategias tecnológicas de formulaciones conteniendo lactobacilos: óvulos en doble capa con diferentes propiedades de liberación (Maggi y col., 2000), bioproductos con distintos ácidos grasos con ciertas propiedades físicas de fusión y solidificación (Uehara y col., 2006), utilización de polímeros no citotóxicos como excipientes (Rodríguez y col., 2015), entre otros. En los últimos años existe una tendencia en la utilización de principios activos liofilizados en conjunto con compuestos derivados o no de microorganismos, para lograr combinaciones que permitan mantener la estabilidad de las cepas liofilizadas durante el almacenamiento del medicamento (Vera Pingitore y col., 2015). Otras investigaciones sugieren la incorporación de sustancias prebióticas en conjunto con lactobacilos en los bioformulados (Vitali y col., 2016). Los prebióticos son compuestos que estimulan el desarrollo o crecimiento de los microorganismos probióticos, para así potenciar su acción benéfica (Davani Davari y col., 2019).

Recientemente, han sido publicados numerosos trabajos de investigación con ensayos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* utilizando lactobacilos como posibles candidatos probióticos humanos y animales. Sólo algunos de estos trabajos caracterizan detalladamente las propiedades benéficas requeridas en un probiótico y, en los casos en

que se detecta la presencia de metabolitos bioactivos, pocos describen el tipo de sustancias antimicrobianas producidas (Vicariotto y col., 2014; Bouridane y col., 2016; Verdenelli y col., 2016; Chervinets y col., 2018; Pan y col., 2017; Prabhurajeshwar y Chandrakanth, 2017; Santos y col., 2018). Si bien existe bibliografía disponible describiendo soluciones alternativas o complementarias al tratamiento con antimicrobianos utilizando cepas de lactobacilos, su eficiencia se ha demostrado principalmente para las infecciones urinarias agudas o recurrentes, y sigue siendo escaso el desarrollo biotecnológico para la profilaxis y terapia de infecciones vaginales (Amin y col., 2017; Foschi y col., 2017; Sessa y col., 2017; Sánchez y col., 2018). Otras funciones benéficas descritas cuando los probióticos son empleados en patologías ginecológicas y obstétricas se describen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Efectos benéficos del empleo de probióticos en patología ginecológica y obstétrica

<i>Tratamiento</i>	<i>Prevención</i>	<i>Patología ginecológica/ obstétrica</i>
✓	✓	Recurrencias vaginosis bacteriana
✓	✓	Vulvovaginitis candidiásica
✓		Atrofia vaginal postmenopáusica
	✓	Recurrencias de las infecciones del tracto urinario
✓		Mastitis subagudas y subclínicas
	✓	Preclampsia
✓		Síndrome del shock tóxico
	✓	Parto pretérmino

*Álvarez Calatayud y col. (2015)*

### 1.6.2.2 Disponibilidad y desarrollo de bioformulados de aplicación vaginal en el mundo

En Argentina sólo se comercializa un medicamento (Lactinex) de aplicación vaginal con lactobacilos como reconstituyente de la microbiota, conteniendo *L. acidophilus* y dióxido de silicio y Witepsol S55 como excipientes. También se encuentran disponibles en el mercado de Argentina Urosedac Candida, Urosedac Probiotic y Uridon Max como reconstituyentes de la microbiota vaginal, pero son medicamentos formulados para administración oral.

Existen numerosas marcas comerciales extranjeras de óvulos vaginales conteniendo cepas probióticas de *Lactobacillus*, tales son los casos de Lactin-V, Synbio, Normogin, AntiCand 30, Muvagyn, Bactocin, Florisia, Ecocillin, Gynoflor, Doberbac, Ginil, Lactiflora Fem, Bion Intime, Tropivag, entre muchos otros.

Desde el punto de vista industrial, es de primordial interés mantener la mayor estabilidad del principio activo de un bioformulado. A su vez, es necesario asegurar un recuento de células relativamente constante a través del tiempo de producción y almacenamiento del producto hasta su utilización por los consumidores (Vera Pingitore y col., 2012). Para asegurar una acción terapéutica efectiva, resulta de primordial interés no sólo la viabilidad bacteriana, sino también el mantenimiento de las características probióticas y benéficas de los lactobacilos a través de la vida de estante del producto (Chervinets y col., 2018; Pessoa y col., 2017). Actualmente, existe un medicamento probiótico disponible comercialmente en Estados Unidos e Italia llamado VSL#3, que en su composición contiene la mezcla de múltiples cepas de bifidobacterias y lactobacilos con propiedades benéficas. Sin embargo, se ha evidenciado que la mezcla disponible comercialmente en Italia tiene problemas biotecnológicos con respecto a la original patentada en Estados Unidos, ya que se ha detectado que la primera contiene un porcentaje mucho menor de bacterias viables (Cinque y col., 2016; Trinchieri y col., 2017). Esta evidencia científica recalca la necesidad de estudiar el proceso de producción de masa bacteriana y posterior demostración del número de células viables en el período de estante del medicamento, ya que se trata de un producto conteniendo células vivas (Mathaes y col., 2018).

Para desarrollar un producto biofarmacéutico conteniendo el microorganismo de interés, la biomasa a utilizar puede ser líquida (almacenados refrigerados), congelada (almacenados a diferentes temperaturas bajo cero) o liofilizada. A diferencia de los medicamentos convencionales, los productos biofarmacéuticos de nueva generación a menudo requieren la liofilización del principio activo para garantizar la estabilidad de almacenamiento durante el tiempo de vida útil (Mathaes y col., 2018). La tecnología de liofilización de microorganismos vivos tiene como objetivo remover el agua celular para inactivarlos reversiblemente y así facilitar su almacenamiento (Wessman y col., 2013). Sin embargo, durante la producción de cultivos por fermentación, concentración y posterior liofilización, las células se someten a tensiones que pueden inducir autólisis, lo que podría explicar por qué algunos microorganismos muestran baja supervivencia a la liofilización

(Koch y col., 2008; Peiren y col., 2015). Esto se debe a que el proceso de liofilización es crítico para asegurar la criostabilidad de los microorganismos, ya que el secado en frío con vacío puede inducir severos daños estructurales y lisis de las células. La temperatura del material congelado debe aumentarse cuidadosamente a través de un gradiente prolongado de tiempo. El objetivo es obtener una sublimación altamente eficaz ayudada por vacío, para obtener la supervivencia celular máxima (Shao y col., 2014). El congelamiento y la liofilización son metodologías que se utilizan comúnmente en la conservación y el almacenamiento de BAL para la producción de cultivos iniciadores concentrados con aplicación en la industria alimentaria (Mäyra Mäkinen y Bigret, 1998). En los últimos años, se han reportado trabajos sobre la liofilización de microorganismos aislados de otros nichos ecológicos, como la vagina, para aplicaciones farmacéuticas (Juárez Tomás y col., 2004; Ampatzoglou y col., 2010; Borges y col., 2013; Dhewa y col., 2014).

Existe una tendencia a utilizar compuestos para formar matrices protectoras, las cuales promueven la supervivencia a bajas temperaturas mediante la estabilización de los constituyentes de la membrana celular y la formación de un revestimiento protector que se intercala entre las células bacterianas (Borges y col., 2013). Para poder asegurar una alta tasa de recuperación de células viables en algunos casos es necesario utilizar, además, sustancias crioprotectoras (Dhewa y col., 2014). En base a esto, se ha demostrado que la leche descremada funciona excelentemente como matriz, aunque en muchos casos resulta indispensable utilizar además crio y lioprotectores como glicerina, dimetilsulfóxido, extracto de malta, trehalosa, manitol, glutamato de sodio, inulina, sucrosa, sacarosa, lactosa, entre otros (Maggi y col., 2000; Zárate y Nader-Macias, 2006*b*; Otero y col., 2007; Koch y col., 2008; Tsuda y col., 2011; Vera Pingitore y col., 2012; Dhewa y col., 2014; Juárez Tomás y col., 2015; Romano y col., 2016; Vitali y col., 2016).

### **1.6.2.3 Estudios físico químicos y reológicos**

Además del estudio de las características del principio activo en un producto farmacéutico, resulta importante analizar las propiedades de la matriz o excipientes que lo protegen y contienen. Esto se debe a que son los responsables de las propiedades físico-químicas del medicamento y por ende condicionan procesos como la absorción, distribución, fundición, con su consecuente respuesta biológica. El área de estudio que

correlaciona las propiedades físicas, químicas y biológicas aplicadas a los fármacos, las formulaciones y su acción se denomina biofarmacia (González Andrade, 2017).

Existe abundante bibliografía disponible que informa los resultados de estudios destinados al análisis del comportamiento reológico de formulaciones farmacéuticas. Esto es, el estudio de la deformación y el flujo de los materiales (propiedades mecánicas). Analizar este tipo de comportamientos permite predecir si la fluidez de las formulaciones facilita o no su administración y contacto con la mucosa vaginal (Dos Santos Ramos y col., 2015, 2016). Otro tipo de estudios aplicables a estos bioproductos son los del tipo físico químico como absorción de agua, peso, consistencia, adhesión al mucus, estudios de textura y gravimétricos, entre otros (Sanz y col., 2018). Para realizar este tipo de estudios existe una opción muy utilizada por distintos autores, que consiste en utilizar fluido vaginal simulado para analizar el comportamiento físico químico de los bioformulados, imitando bajo condiciones *in vitro* el microambiente vaginal de una mujer sana (Vitali y col., 2016; Sanz y col., 2018).

# *Hipótesis y Objetivos*

## CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

- ⌘ Las diferentes formulaciones farmacéuticas mantienen viables y constante el número de lactobacilos probióticos.
- ⌘ Los lactobacilos mantienen sus propiedades antimicrobianas y benéficas en los óvulos a través del tiempo.

### 2.2. Objetivo general

- ⌘ Desarrollar diferentes formulaciones farmacéuticas conteniendo dos cepas de lactobacilos probióticas y ensayar sus propiedades biológicas posformulado.

### 2.3. Objetivos específicos

- ⌘ Elaborar diferentes formulaciones farmacéuticas con cada una de las cepas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* con características probióticas.
- ⌘ Estudiar diferentes formulaciones farmacéuticas con la mezcla de las cepas de lactobacilos probióticos en cada formulación farmacéutica.
- ⌘ Estudiar en el tiempo la viabilidad y la concentración de las cepas de lactobacilos probióticos en cada formulación farmacéutica.
- ⌘ Evaluar la actividad antimicrobiana de los lactobacilos a través del tiempo en las diferentes formulaciones farmacéuticas.
- ⌘ Estudiar *in vitro* la preservación de las propiedades benéficas de los lactobacilos en las formulaciones farmacéuticas.
- ⌘ Evaluar el efecto probiótico de los lactobacilos sobre la adherencia de bacterias patógenas mediante los ensayos de exclusión, competencia y desplazamiento microbiano en las formulaciones a través del tiempo.
- ⌘ Medir *in vitro* la capacidad de producir biofilm de las cepas probióticas a través del tiempo en las distintas formulaciones.
- ⌘ Estudiar *in vitro* la conservación de la capacidad de los probióticos presentes en las preparaciones farmacéuticas de inhibir la formación de biofilms por los microorganismos patógenos.
- ⌘ Evaluar los resultados y analizar los mismos estadísticamente.

*Metodología*



## CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

### 3.1 Cepas utilizadas y medios de cultivo

Se utilizaron dos cepas de lactobacilos productoras de bacteriocinas aisladas de vagina de mujeres sanas en edad reproductiva: *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60. En numerosos trabajos previos las cepas fueron estudiadas y posteriormente seleccionadas por sus características probióticas. En dichos estudios fue demostrado que *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 sintetizan ácidos orgánicos, y que *L. rhamnosus* L60 produce, además, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las bacteriocinas producidas por estas cepas fueron caracterizadas y purificadas (Pascual, 2004; Pascual y col., 2006, 2008a,b). La identidad de estas cepas fue confirmada en una primera instancia mediante la utilización del sistema de galerías API 50 CH (bioMérieux®) de identificación de lectura automatizada (Ruíz y col., 2009). Este último sistema consta de 49 azúcares, que permiten identificar al microorganismo mediante el estudio de la fermentación de carbohidratos y sus derivados heterósidos, polialcoholes y ácidos urónicos. La bacteria aislada a identificar con este sistema es suspendida en el medio API 50 CHL, llenando cada una de las 49 cápsulas de la galería. Algunos carbohidratos y derivados contenidos en la galería son: Erytriol, L-Xilosa, D-Adonitol, Dulcitol, Inositol, Inulina, D-Rafinosa, Xilitol, D-Lixosa, D-Fructosa, D-Arabitol, L-Arabitol. Por otra parte, se realizó la secuenciación del gen 16S del ARNr de ambas cepas de lactobacilos, y las secuencias se registraron en GenBank bajo los números de acceso GQ455406.1 y EF495247.1 para *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, respectivamente.

Como medio de cultivo para el aislamiento de los lactobacilos se utilizó agar MRS de Britania®, y fueron incubados en microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>) a 37°C, durante 18 h. A las colonias aisladas se les realizó tinción de Gram. Para confirmar la identificación a nivel de género se realizaron las pruebas bioquímicas sugeridas en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Vos y col., 2009).

En las experiencias del presente trabajo se utilizaron como microorganismos patógenos indicadores a *E. coli*, *S. aureus* 168 (Sa168) y SGB 6. Como medio de cultivo para su aislamiento se utilizó agar o caldo tripticasa soya (ATS y CTS, respectivamente) de Britania®, y fueron incubados en atmósfera aeróbica a 37°C, durante 18 h. A las colonias aisladas se les realizó la tinción de Gram.

### 3.2 Conservación de las cepas

La conservación de las cepas de lactobacilos se realizó cultivando las cepas L23 y L60 en caldo MRS (18h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Pasado ese tiempo se adicionó a los caldos 30% de glicerina estéril y fueron conservados a -20°C.

Para la conservación de las cepas de microorganismos indicadores *E. coli*, *S. aureus* y SGB se utilizó CTS y se incubó a 37°C durante 18 h, en aerobiosis. Los caldos fueron adicionados con 30% de glicerina estéril como crioprotector y conservados a -20°C.

### 3.3 Preparación de suspensiones de lactobacilos en glicerina

Previo al diseño de las formulaciones farmacéuticas fue necesario comprobar el efecto de la glicerina sobre la viabilidad de los lactobacilos a través del tiempo, para así seleccionar aquellas concentraciones que no resultaran perjudiciales para dicho parámetro. Se realizaron suspensiones de cultivos de las cepas L23 y L60 en distintas concentraciones de glicerina. Para ello, las cepas de lactobacilos se inocularon en caldos estériles de MRS y se los incubó 24 h a 37°C en microaerofilia. Estos cultivos se utilizaron para ajustar la turbidez al tubo 1 de la escala de Mc Farland, y a estas suspensiones se le agregó glicerina estéril en distintas cantidades para obtener diferentes concentraciones finales (Tabla 5). Las suspensiones se almacenaron a 4°C y se efectuó el control de viabilidad por la técnica de estrías por agotamiento cada 20 días, durante 60 días. A partir de esta experiencia, se estableció un rango de concentraciones en las que se consideró que la glicerina no ejercía efectos tóxicos rápidos (60 días) sobre los lactobacilos. Estas concentraciones fueron las seleccionadas para diseñar la composición de las formulaciones farmacéuticas.

**Tabla 5.** Suspensiones de *L. fermentum* L23 o *L. rhamnosus* L60 en glicerina

Cultivo de lactobacilos (ml)	Glicerina (ml)	Glicerina (% v/v)
3,0	12,0	80
4,5	10,5	70
6,0	9,0	60
7,5	7,5	50
9,0	6,0	40
10,5	4,5	30
12,6	2,4	16

### 3.4 Diseño, elaboración y caracterización físico química de los óvulos vaginales

#### 3.4.1 Obtención de la biomasa bacteriana

Se preparó un inóculo de cada cepa de lactobacilos conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se estrió por agotamiento en agar MRS (pH 5,5) para su aislamiento. Se incubó durante 18 h a  $37^{\circ}\text{C}$  con una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  y a las colonias obtenidas se les realizó tinción de Gram. Posteriormente, se realizaron tres cultivos sucesivos de 2 ml, 4 ml y 20 ml de caldo MRS a pH 5,5, respectivamente, para obtener abundante masa bacteriana (Juárez Tomás y col. 2015; Vera Pingitore y col., 2015), incubándose en las mismas condiciones. A continuación, los cultivos del tercer repique fueron centrifugados durante 20 min a 3000 rpm, se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos bacterianos fueron recuperados en tubos estériles. Algunos sedimentos fueron utilizados para realizar las formulaciones que poseían como principio activo a los lactobacilos como cultivo fresco. Los sedimentos que serían utilizados para realizar las formulaciones conteniendo los lactobacilos liofilizados fueron resuspendidos en leche descremada estéril al 10% o bien en leche al 10% y lactosa al 10%, en ampollas de vidrio (Maggi y col., 2000; Shao y col., 2014; Rodrigues y col., 2015). Las ampollas fueron guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , luego a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente fueron liofilizadas; ambos procesos de refrigeración y secado se realizaron durante 24 h cada uno (Shao y col., 2014). El liofilizado obtenido fue conservado a  $4^{\circ}\text{C}$  al resguardo de la luz y

humedad hasta su utilización (Dhewa y col., 2014; Rodrigues y col., 2015; Camilletti y col., 2018).

### 3.4.2 Diseño y composición de las formulaciones farmacéuticas

Para cada formulación se realizaron óvulos conteniendo como principio activo a la cepa L23, L60 o la mezcla 1:1 de ambas (Tabla 6). Los excipientes de cada preparación farmacéutica eran de calidad especificada por la Farmacopea Argentina y se describen en detalle y concentración en la Tabla 7 (Zárate y col., 2005; Zárate y Nader-Macias, 2006b). Cada formulación estaba constituida por el principio activo (lactobacilos), por componentes base que le dan el soporte (glicerina y gelatina) y por otros excipientes variados que definieron los distintos formulados. Se trabajó con 16 formulaciones diferentes, que se designaron con la letra F y un número. Algunas de ellas se nombraron con el símbolo “prima” (’), para señalar la diferencia de la suspensión a ser liofilizada, pero no la composición de la formulación farmacéutica. Por ejemplo, la F8 contenía la misma base y excipientes que la F8’, con la diferencia que la primera fue elaborada con los lactobacilos liofilizados en leche 10%, mientras que la segunda con los lactobacilos liofilizados en leche 10% + lactosa 10%. A su vez, en las formulaciones correspondientes, los lactobacilos se liofilizaron durante 24 h; a excepción de la F5 cuyos lactobacilos se liofilizaron por 48 h.

**Tabla 6.** Principios activos estudiados en cada formulación farmacéutica

	Formulaciones															
	1	2	3	4	5	6	7	8	8’	9	9’	10	11	11’	12	13
L23	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
L60	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
L23:L60									x		x				x	x

**Tabla 7.** Composición química de las formulaciones farmacéuticas en forma de óvulos vaginales

Principio activo ( <i>Lactobacillus</i> )		Excipientes															
Cultivo fresco	Liofilizado		Base					Otros									
	Leche	Lactosa	Glicerina			Gelatina		Leche	Lactosa	Tween 80	Ácido ascórbico		Manitol	Glutamato			
	10%	10%	50%	30%	16%	9,5%	11,8%	1,5%	2,5%	10%	0,5%	0,5%	2%	2,5%	4%	4%	
<b>F1</b>	x		x			x											
<b>F2</b>	x			x			x										
<b>F3</b>	x				x		x										
<b>F4</b>		x			x		x										
<b>F5</b>		x			x		x										
<b>F6</b>		x			x		x	x	x								
<b>F7</b>		x			x		x	x	x	x							
<b>F8</b>		x			x		x	x	x			x					
<b>F8'</b>		x	x		x		x	x	x			x					
<b>F9</b>		x			x		x	x	x				x				
<b>F9'</b>		x	x		x		x	x	x				x				
<b>F10</b>		x			x		x	x	x					x			
<b>F11</b>		x			x		x	x	x						x		
<b>F11'</b>		x	x		x		x	x	x						x		
<b>F12</b>		x	x		x		x	x		x		x					
<b>F13</b>		x	x		x		x		x			x					x

### 3.4.3 Elaboración de los óvulos vaginales

El proceso de elaboración de los óvulos con probióticos reconstituyentes de la microbiota vaginal se llevó a cabo bajo condiciones que garantizaran la calidad del producto. Para la preparación de los óvulos se utilizó el método de fusión (Kaewsrichan y col., 2007; Kaewnopparat y Kaewnopparat, 2009; Rodrigues y col., 2015). Esta metodología consistió en fundir los excipientes y disolver en estos el principio activo para después solidificar la masa en los moldes. Como diluyente para la base y excipientes se utilizó agua destilada a 100°C, a la que se le agregó en fina lluvia la gelatina, con el objetivo de evitar la formación de grumos. A continuación, se disminuyó la temperatura a 65 °C y se procedió a agregar uno a uno y lentamente los diferentes excipientes según la composición de cada formulación, homogeneizando constantemente. Se esterilizó la mezcla (base + excipientes) en autoclave a vapor fluente (100°C) durante 30 min. Las soluciones obtenidas se mantuvieron a 38-40°C y se agregó el sedimento de lactobacilos o el polvo liofilizado según correspondiera. Se mezcló hasta obtener una solución homogénea, se procedió al envasado de las formulaciones en los porta-óvulos de plástico previamente pincelados con vaselina líquida estéril y se verificó la uniformidad de contenido comprobando que no se englobaran burbujas de aire. A su vez, a todos los óvulos obtenidos se les determinaron ciertas características preliminares macroscópicas adaptadas de Pereira y col. (2011) y Sanz y col. (2018): color, aspecto, textura de la superficie y consistencia. Las formulaciones obtenidas se conservaron a 4°C al resguardo de la luz y humedad hasta el momento de su procesamiento.

### 3.5 Estudio de viabilidad de los lactobacilos en las formulaciones farmacéuticas

Las preparaciones farmacéuticas en óvulos almacenados a 4°C fueron examinados desde el tiempo cero de producción y cada 30 días, con el fin de establecer su viabilidad a través del tiempo (Rodrigues y col., 2015; Vitali y col., 2016). A su vez se evaluó el efecto de la liofilización sobre la viabilidad de las cepas, realizando el recuento de células viables en el momento previo y posterior al proceso de secado (Juárez Tomás y col., 2015; Vera Pingitore y col., 2015).

Para el recuento total de lactobacilos se utilizó el método de dilución en placas por triplicado sobre agar MRS (Maggi y col., 2000; Jiménez Pranteda y col., 2012). El método consistió en disolver 0,2 g de óvulo en 1,8 ml de solución fisiológica (NaCl 0,85%). A

continuación, se efectuaron diluciones seriadas y se sembró 100 µl en la superficie de placas de agar MRS con espátula de Drigalsky. Se incubaron las placas en microaerofilia durante 24 h, a 37°C. Finalmente se realizó el recuento de UFC/ml y los resultados fueron transformados a sus respectivos log UFC/ml (límite de detección <math>3 \times 10^2</math> UFC/ml). Si bien algunos recuentos se encontraron por debajo del límite de detección de esta técnica, se tuvieron en cuenta de todas maneras a los fines de identificar si las cepas aun mantenían su viabilidad en los bioformulados.

### **3.6 Estudio de las propiedades benéficas de superficie relacionadas a la adhesión celular**

#### **3.6.1 Ensayo de producción de biofilm por las cepas probióticas**

Para evaluar si las cepas contenidas en los óvulos mantenían la capacidad de producción de biofilm en el tiempo, se procedió a examinarlas cada 90 días. Se empleó el ensayo cuantitativo en tubo modificado utilizando el método de tinción con cristal violeta (Terraf y col., 2012; Ramos y col., 2015; Fuochi y col., 2019). El método consistió en pesar 0,5 g de cada óvulo y realizar con él un cultivo overnight en caldo MRS (18 h, 37 °C, microaerofilia). Los cultivos obtenidos se ajustaron a la turbidez correspondiente al tubo 1 de la escala de Mc Farland. Alícuotas de 200 µl fueron transferidos a tubos de hemólisis estériles y se incubaron a 37°C en microaerofilia durante 6 h. Una vez finalizado el período de incubación, se descartó el medio de cultivo y se adicionaron 25 µl de cristal violeta al 1% agitando suavemente, dejándolo actuar 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se quitó el excedente de colorante con 4 lavados con 200 µl de buffer fosfato salino (PBS), para remover las células no adheridas al fondo del tubo y quitar el exceso de colorante. Se dejaron secar los tubos a temperatura ambiente durante 15 min. Pasado este tiempo, el colorante adherido al biofilm en las paredes del tubo se extrajo con dos lavados de 200 µl de alcohol etílico y se traspasó a otro tubo conteniendo 1,2 ml de alcohol etílico. Se midió DO a 540 nm en espectrofotómetro UV. El proceso se realizó utilizando como control negativo caldo de cultivo estéril. Las cepas se clasificaron en altamente productoras de biofilm (DO mayor a 0,5), productoras (DO entre 0,5 y 0,1) y escasamente productoras (DO menor de 0,1).

### 3.6.2 Detección de la autoagregación *in vitro* de lactobacilos

La determinación *in vitro* de la capacidad autoagregativa de las cepas probióticas aisladas de los óvulos vaginales es de gran relevancia, ya que es una de las propiedades que permite predecir cualitativamente su potencial para tapizar rápidamente el epitelio vaginal cuando son administradas en el huésped. Dicha determinación se realizó por el método cualitativo y por el método cuantitativo. Para el primero, se tomó una alícuota de 0,2 g de cada óvulo, se inoculó en caldo MRS y se incubó 18 h a 37°C, en microaerofilia. Los caldos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en PBS estéril (pH 6,2) hasta una concentración final de  $5 \times 10^9$  UFC/ml. Del fondo del tubo se tomó una gota y se la colocó en un portaobjetos. Se realizó en una primera instancia una observación macroscópica, evidenciando o no la formación de autoagregados visibles, y a continuación se observó microscópicamente. El test de autoagregación se consideró positivo cuando se observó la formación de gránulos finos (Andreu y col., 1995; Pascual y col., 2008b; Kaewnopparat y col., 2013). Para el método cuantitativo se utilizó la técnica descrita por Abdulla y col. (2014), modificada. Se tomó una alícuota de 0,2 g de cada óvulo que se inocularon en caldos MRS y fueron incubados 24 h a 37°C, en microaerofilia. Los caldos se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 min a 4°C, y se lavaron dos veces con PBS estéril. Se resuspendieron las células en PBS hasta una concentración final de  $10^8$  UFC/ml, y se traspasaron 4 ml de cada suspensión a tubos de hemólisis estériles. Se vortearon las suspensiones durante 10 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 5 h. Se tomaron muestras de la superficie de los tubos a las 0, 2 y 5 h y se midió la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro de luz UV. Los cálculos se realizaron utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Autoagregación} = 1 - \frac{A_t}{A_0} \cdot 100$$

Donde  $A_t$  es la absorbancia a cada tiempo de toma de muestra, y  $A_0$  es la absorbancia a tiempo cero (Ocaña y Nader-Macías, 2002; Leccese Terraf y col., 2014).

### 3.6.3 Evaluación cualitativa de la hidrofobicidad de superficie

Esta propiedad fue estudiada utilizando el test de agregación salina (SAT), empleando un cultivo en caldo MRS de 18 h de las cepas aisladas de los óvulos. Luego del periodo de incubación, los microorganismos se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min se lavaron con PBS estéril (pH 6,8) y fueron resuspendidos en el mismo a una



concentración de  $5 \times 10^9$  UFC/ml. Se realizaron soluciones (4, 2, 1,5 y 0,5 mol/l) de sulfato de amonio ( $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ) que fueron mezcladas con igual volumen de las suspensiones bacterianas sobre un portaobjetos. Se definió al valor SAT como la mayor dilución que producía la agregación de microorganismos. Se determinó si las cepas aisladas de los óvulos poseían alta hidrofobicidad de superficie ( $\text{SAT} < 0,9$  mol/L), intermedia hidrofobicidad de superficie ( $\text{SAT} 0,9-1,5$  mol/L) o si eran hidrofílicas ( $\text{SAT} > 1,5$  mol/L) a través del tiempo de almacenamiento de los óvulos (Andreu y col., 1995; Pascual y col., 2008b; Kaewnopparat y col., 2013; do Carmo y col., 2016).

### 3.7 Actividad antagonista de los lactobacilos sobre microorganismos patógenos

#### 3.7.1 Ensayo de coagregación de los lactobacilos con *E. coli* y *S. aureus*

Se realizaron cultivos overnight de todas las cepas utilizadas en este ensayo. Los lactobacilos aislados de los óvulos se cultivaron en caldo MRS y las cepas de *E. coli* y *S. aureus* en CTS. Para el método cualitativo, los cultivos se centrifugaron 10 min a 3000 rpm y los sedimentos bacterianos se resuspendieron en PBS estéril hasta una concentración de  $10^9$  UFC/ml. Se realizaron mezclas de 4 ml conteniendo igual volumen de lactobacilos y microorganismo patógeno (2ml:2ml), se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 h a 100 rpm. La presencia de coagregados se determinó microscópicamente realizando la coloración de Gram de gotas obtenidas del fondo de los tubos y colocadas en portaobjetos. Se consideró como coagregación positiva cuando las células de las cepas en estudio se encontraran muy próximas a los microorganismos patógenos y coagregación negativa cuando ambos microorganismos se observaran libremente (Reid y col., 1990; Pascual y col., 2008b). Para el método cuantitativo las suspensiones bacterianas se realizaron de la misma forma, y volúmenes iguales (2 ml) de cada cepa de BAL y de cada microorganismo patógeno se mezclaron en vórtex durante 10 segundos. Los ensayos controles se realizaron con tubos conteniendo 4 ml de cada suspensión bacteriana por separado. Se incubaron los tubos durante 5 h a temperatura ambiente y a continuación se tomaron muestras de la superficie de cada mezcla para realizar la lectura de absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro de luz UV. Los cálculos se realizaron aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Coagregación} = 1 - \frac{A(x+y)}{\left(\frac{Ax+Ay}{2}\right)} \cdot 100$$

Donde  $A_x$  y  $A_y$  representan la absorbancia de la cepa X e Y en su respectivo tubo control y  $A_{(x+y)}$  es la absorbancia del tubo mezcla de las cepas X-Y (Keller y col., 2011; Abdulla y col., 2014).

### 3.7.2 Detección de la actividad antimicrobiana de *L. fermentum* y *L. rhamnosus*

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los lactobacilos contenidos en las distintas formulaciones se utilizó como control una cepa de *E. coli* sensible a las bacteriocinas de cada cepa. Para su cultivo se utilizó el medio agar tripticasa soya (ATS) de Britania®. La detección de actividad antimicrobiana de los lactobacilos se realizó por la técnica de estrías cruzadas y/o por la técnica de difusión en pozos (Pascual y col., 2008b).

#### 3.7.2.1 Técnica de estrías cruzadas

Un taco de 0,5 g de óvulo se dejó disolver en forma de estría central sobre la superficie de una placa de agar MRS. Se incubó a 37°C en microaerofilia durante 18 h. El cultivo de la cepa se esterilizó por exposición a vapores de cloroformo durante 20 min. Posteriormente se sembró en línea perpendicular la cepa de *E. coli* sensible cultivada previamente en caldo CTS durante 24 h a 37°C en aerobiosis. Se incubó 18 h a 37°C y se midió el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano (Pascual y col., 2008b; Barberis y col., 2003).

#### 3.7.2.2 Técnica de difusión en pozos

Para realizar esta experiencia se debió obtener en una primera etapa el sobrenadante libre de células (SLC) de las cepas de L23 y L60 contenidas en los óvulos. Luego, se realizó el estudio de actividad antimicrobiana sobre *E. coli* para comprobar si los sobrenadantes mantenían dicha propiedad (Pascual y col., 2008b).

##### *Obtención del sobrenadante libre de células*

Se tomaron dos tacos de 0,5 g de los óvulos, los cuales se inocularon en 2 ml de caldo MRS y se incubaron 18 h a 37°C en atmósfera húmeda y en microaerofilia (5% CO<sub>2</sub>). Luego se colocó 0,5 ml del cultivo en 9,5 ml de caldo MRS (5% v/v), y se incubó en las mismas condiciones. Para la obtención del sobrenadante libre de células se centrifugaron los cultivos a 7.500 rpm a 4°C, durante 20 min. El SLC obtenido se fraccionó en viales estériles, se expuso a vapores de cloroformo durante 20 min y fue refrigerado a 4°C hasta su procesamiento.

*Ensayo de actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en pozos*

Para realizar esta técnica se utilizó un cultivo de *E. coli* sensible en CTS con una densidad óptica correspondiente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland con el que se sembró homogéneamente la superficie de una placa de agar Müller Hinton. A continuación, se realizaron pozos de 7 mm en el agar. Los mismos fueron inoculados con 100 µl de SLC de cada una de las cepas de lactobacilos presentes en las formulaciones farmacéuticas. A determinados sobrenadantes previamente seleccionados se les agregó hidróxido de sodio 1N hasta pH 6 (SLC neutralizados (SLCN)), para neutralizar los ácidos orgánicos producidos por las cepas L23 y L60 y así evaluar sólo la actividad antimicrobiana de sus correspondientes bacteriocinas. Las placas fueron incubadas durante 18 h a 37°C en aerobiosis y posteriormente se midieron los halos de inhibición del crecimiento de las colonias de *E. coli*. Además, se calculó la actividad antimicrobiana relativa de los biometabolitos activos según las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Actividad antimicrobiana SLC} = \frac{SLC (mm) - SLCN(mm)}{SLC (mm)} \times 100$$

$$\% \text{ Actividad antimicrobiana SLCN} = \frac{SLCN(mm)}{SLC (mm)} \times 100$$

### **3.7.3 Evaluación de la actividad inhibitoria de los sobrenadantes puros y neutralizados de los lactobacilos aislados de los óvulos sobre la producción de biofilm de microorganismos patógenos**

Se realizaron cultivos de SGB y de *S. aureus* en CTS, incubados a 37°C en aerobiosis durante 18 h. Se ajustaron las suspensiones de microorganismos al tubo 0,5 de Mc Farland utilizando CTS estéril. La obtención de los sobrenadantes libres de células puros (SLC) y neutralizados (SLCN) de las cepas probióticas aisladas de los óvulos se realizó siguiendo la técnica detallada anteriormente. Para evaluar el efecto de las sustancias antimicrobianas sobre la producción de biofilm de las cepas patógenas, 100 µl del microorganismo correspondiente se mezclaron con 100 µl del SLC o SLCN de las cepas de lactobacilos, inoculando celdillas de una placa de microtitulación estéril de 96 pocillos. Como controles negativos se utilizaron el medio de cultivo sin inocular y los sobrenadantes libres de células, mientras que cultivos de los microorganismos patógenos fueron utilizados como controles positivos. Se incubó la placa de

microtitulación durante 24 h a 37°C, y se reveló utilizando la técnica de tinción con cristal violeta descrita previamente. A continuación, se analizó la DO a 540 nm utilizando un lector de ELISA y se expresaron los resultados en porcentaje de inhibición de la producción de biofilm utilizando como referencia la DO promedio obtenida de los controles positivos. Este ensayo se realizó cada 180 días de almacenamiento de los óvulos a 4°C (Pérez Ibarreche y col., 2014; Ramos y col., 2015; Shokri y col., 2018; Pino y col., 2019).

### 3.8 Ensayos *in vitro* utilizando fluido vaginal simulado

#### 3.8.1 Preparación del fluido vaginal simulado

El fluido vaginal simulado (FVS) fue preparado siguiendo la metodología original de Owen y Kazt (1999) y utilizada luego por numerosos autores (Juárez Tomás y col., 2015; Dos Santos Ramos y col., 2015, 2016; Vitali y col., 2016; Sánchez y col., 2018). La composición cuali y cuantitativa para un litro de FVS fue la siguiente: NaCl 3,51 g, KOH 1,40 g, Ca(OH)<sub>2</sub> 0,222 g, albúmina sérica bovina (ASB) 0,018 g, ácido láctico 2 g, ácido acético 1 g, glicerol 0,16 g, urea 0,4 g, glucosa 5 g, pH final 4,2. El FVS se utilizó para realizar los estudios de absorción de agua y liberación *in vitro* de lactobacilos de los óvulos vaginales.

#### 3.8.2 Ensayo de absorción de agua de los óvulos vaginales

Con el objetivo de estudiar el comportamiento físico químico de los óvulos vaginales en cuanto a su capacidad de absorber agua, se procedió siguiendo la metodología descrita por Luppi y col. (2010) y Vitali y col. (2016) modificada. Se calculó la captación de agua midiendo el incremento de peso de los óvulos en puntos de tiempo predeterminados, durante 8 h de incubación a 25°C. Los óvulos se colocaron en papeles de filtro pesados y empapados en el FVS y colocados sobre una esponja (5 cm x 5 cm x 2 cm). Este sistema se sumergió en una placa de Petri conteniendo FVS a una altura de 0,5 cm. La absorción de agua se determinó como el aumento de peso de los óvulos luego de 8 h de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Absorción de agua} = \frac{P_{of} - P_f - P_{oi}}{P_{oi}} \times 100$$

Donde  $P_{of}$  es el peso del óvulo con el filtro hidratados en cada tiempo,  $P_f$  es el peso del filtro hidratado y  $P_{oi}$  es el peso inicial del óvulo seco.

### 3.8.3 Estudio de liberación de lactobacilos de los óvulos vaginales

Para realizar este estudio se modificaron las metodologías descritas por Juárez Tomás y col. (2015) y Vitali y col. (2016). Se utilizaron tres formulaciones farmacéuticas con la mezcla de lactobacilos para realizar este estudio, que consistió en colocar los óvulos vaginales en tubos de ensayo conteniendo 20 ml de FVS (un tubo para cada punto de toma de muestra y por cada formulación), que se incubaron a 37°C en baño maría sin agitación. Se tomaron muestras de 1 ml cada 1 min durante 8 min y se las analizó por espectrofotometría de luz UV a 600 nm. La liberación de lactobacilos al medio conteniendo FVS se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Liberación} = \frac{Abs_t}{Abs_f} \times 100$$

Donde  $Abs_t$  representa la absorbancia medida en cada tiempo de muestreo, y  $Abs_f$  la absorbancia final del sistema al concluir la experiencia.

## 3.9 Estudios de adherencia de microorganismos a células epiteliales vaginales

### 3.9.1 Obtención y lavado de células vaginales

Las células del epitelio vaginal se obtuvieron por hisopado, siguiendo la técnica descrita por Chan y col. (1985), a partir de mujeres jóvenes sexualmente activas. Las células se suspendieron en una solución Earle 1X y agua bidestilada estéril en una proporción 1:1 y fueron lavadas 2 veces con dicha solución mediante centrifugación a 3500 rpm durante 20 min a fin de remover los lactobacilos indígenas.

### 3.9.2 Ensayo de adherencia de lactobacilos a células vaginales

Para esta determinación se empleó una modificación de la técnica descrita por Ortiz y col. (2014) y Verdenelli y col. (2014). Se realizó un cultivo de la mezcla de lactobacilos contenidos en los óvulos durante 18 h en caldo MRS y se resuspendió a una concentración de  $10^8$  UFC/ml en la solución Earle 1X + agua bidestilada estéril

1:1 antes mencionada. Igual volumen de la suspensión bacteriana y de células vaginales lavadas resuspendidas en dicha solución se mezclaron e incubaron a 37°C con agitación suave durante 30 min. Las células se lavaron 2 veces bajo las condiciones mencionadas previamente con el fin de remover aquellos microorganismos que no se adhirieron a la superficie de las células eucariotas. Posteriormente se tomaron las muestras con alícuotas de 50 µl del fondo de los tubos y se dejaron secar en portaobjetos, para luego ser fijadas con etanol y coloreadas con la técnica de Gram.

### **3.9.3 Adherencia de *Staphylococcus aureus* y SGB**

El ensayo se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, utilizando para este caso cultivos overnight en CTS de *S. aureus* y SGB incubados bajo las condiciones óptimas para cada cepa, respectivamente.

## **3.10 Determinación del efecto inhibitorio de los lactobacilos sobre la adherencia de bacterias patógenas a células del epitelio vaginal**

### **3.10.1 Ensayo de exclusión**

Cultivos frescos de la mezcla 1:1 de lactobacilos en los óvulos se lavaron 4 veces con solución Earle siguiendo la misma metodología previamente descrita. La concentración de lactobacilos se ajustó a  $10^8$  UFC/ml y se mezclaron con la suspensión de células epiteliales previamente lavadas en una proporción 1:1. Se incubaron a 37°C con agitación suave durante 60 min. Posteriormente, cultivos overnight de los microorganismos patógenos *S. aureus* y SGB a estudiar, previamente lavados, se adicionaron a la mezcla anterior a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml y se incubaron por 60 min. Se lavó varias veces para remover aquellos microorganismos no adheridos a la superficie celular y se realizó la toma de muestra del fondo de los tubos como se explicó anteriormente, luego se fijó con etanol y se coloreó con la técnica de Gram. Se realizó un recuento de los lactobacilos y microorganismos patógenos adheridos a por lo menos 10 células observadas a 1000x (Ortiz y col., 2014).

### 3.10.2 Ensayo de competencia

Para este estudio se realizó la misma metodología descrita en el ensayo de exclusión. Se mezclaron simultáneamente las células, los lactobacilos y los microorganismos patógenos para así crear un microambiente de competencia. Se incubó la mezcla durante 60 min a 37°C en agitación y se determinó la adherencia de los microorganismos patógenos a las células como se describió previamente (Ortiz y col., 2014).

### 3.10.3 Ensayo de desplazamiento

En este caso, se incubaron en primer lugar los microorganismos patógenos en contacto con las células epiteliales vaginales durante 60 min. Luego se adicionó una suspensión de lactobacilos a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/ml, para determinar si los mismos eran capaces de desplazar a los microorganismos patógenos inicialmente adheridos a las células eucariotas. Los resultados se examinaron siguiendo los mismos procedimientos mencionados en los ensayos anteriores para *S. aureus* y SGB (Ortiz y col., 2014).

### 3.11 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina). Los datos expresados en unidades formadoras de colonias (UFC) se transformaron al log. Cuando se hubo verificado que los datos se distribuían normalmente y tenían homogeneidad de varianza, se sometieron los mismos a los test de múltiple comparación de Tukey (HSD) o de Fisher (LSD). El nivel de significancia con el que se trabajó fue de  $p \leq 0,05$ .

### 3.12 Medios de cultivo

<b>Caldo Trypticase Soya (Britania)</b>	
Tripeína	17,00 g
Peptona de soya	3,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Fosfato dipotásico	2,50 g
Glucosa	2,50 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7,3±0,2	

<b>Agar Trypticase Soya (Britania)</b>	
Tripeína	17,00 g
Peptona de soya	3,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Fosfato dipotásico	2,50 g
Glucosa	2,50 g
Agar	12,00 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7,3±0,2	



<b>Caldo Man Rogosa Sharpe (M.R.S) (Britania)</b>	
Proteosa peptona N° 3	10,00 g
Extracto de carne	10,00 g
Extracto de levadura	5,00 g
Glucosa	20,00 g
Sorbitán monoleato	1,00 ml
Fosfato dipotásico	2,00 g
Acetato de sodio	5,00 g
Citrato de amonio	2,00 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Agua destilada	1000 ml
pH 6,5±0,2	

<b>Agar Man Rogosa Sharpe (M.R.S) (Britania)</b>	
Proteosa peptona N° 3	10,00 g
Extracto de carne	10,00 g
Extracto de levadura	5,00 g
Glucosa	20,00 g
Sorbitán monoleato	1,00 ml
Fosfato dipotásico	2,00 g
Acetato de sodio	5,00 g
Citrato de amonio	2,00 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Agar	12,00 g
Agua destilada	1000 ml
pH 6,5±0,2	

# *Resultados y Discusión*

## CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

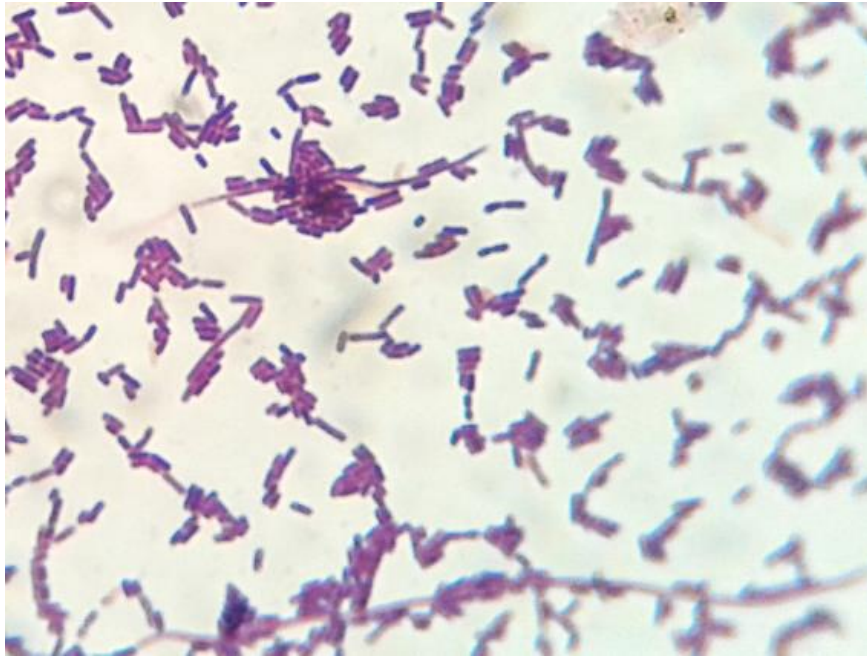
### 4.1 Cepas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60

En el presente trabajo se utilizaron las cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, que previamente habían sido estudiadas comprobándose sus propiedades benéficas y probióticas frente a distintos microorganismos patógenos vaginales (Pascual y col. 2008*a,b*, 2010; Ruíz y col., 2009; Asurmendi, 2010; Daniele y col., 2011; Ortiz y col., 2014).

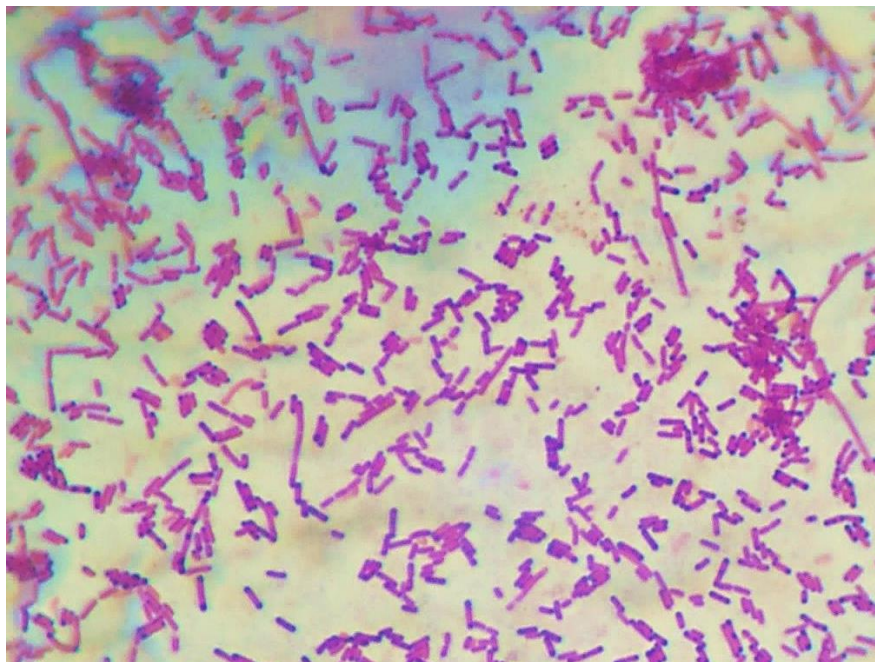
A partir de las cepas de lactobacilos conservadas a -20°C, se aislaron en agar MRS y posteriormente a la incubación se observaron colonias circulares pequeñas, cremosas, claras, convexas y con márgenes definidos (Figura 10). La tinción de Gram reveló la presencia de bacilos Gram positivos de distinta longitud con morfología típica de lactobacilos (Figura 11 y 12). Se realizaron las pruebas bioquímicas de género y finalmente se identificó a nivel de especie a *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 mediante la utilización de galerías API 50 CH (bioMérieux) de identificación de lectura automatizada.



**Figura 10.** Observación macroscópica de las colonias de un cultivo en agar MRS de *Lactobacillus* spp.



**Figura 11.** Microfotografía de un cultivo de *Lactobacillus fermentum* L23 en agar MRS (1000x).

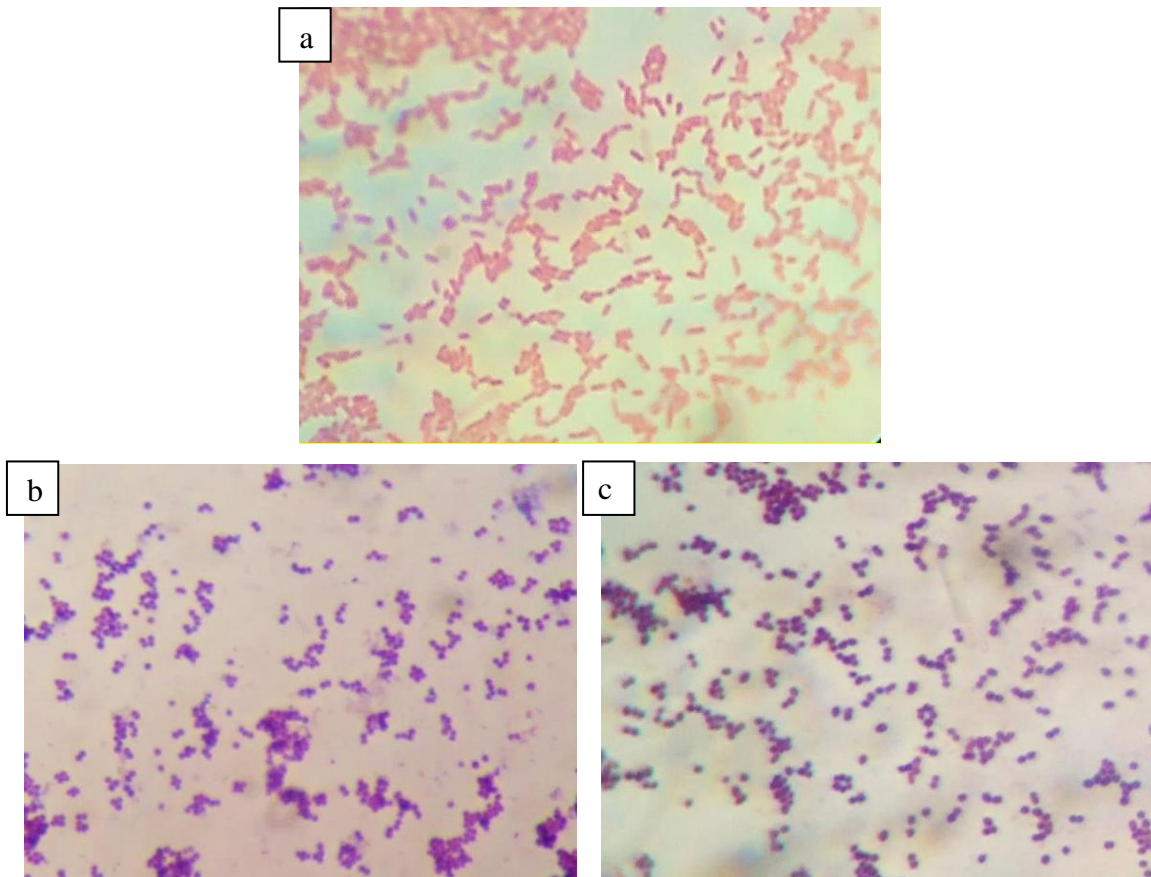


**Figura 12.** Microfotografía de un cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* L60 en agar Man Rogosa Sharpe (1000x).

#### 4.2 Cepas de microorganismos patógenos indicadores

La morfología de los microorganismos patógenos utilizados en este estudio se muestra en las microfotografías de la Figura 13. Se observó la presencia de bacilos Gram

negativos cortos en el caso de *E. coli*, y cocos Gram positivos en los cultivos de *S. aureus* y SGB.



**Figura 13.** Coloración de Gram de cultivos de microorganismos patógenos en Agar Tripticasa Soya

(a) *E. coli*, (b) *S. aureus* y (c) SGB.

#### 4.3 Viabilidad de los lactobacilos en soluciones de glicerina

La glicerina forma parte de la composición de las formulaciones farmacéuticas estudiadas en este trabajo de Tesis. Sin embargo, se ha descrito que este compuesto puede resultar tóxico en determinadas concentraciones sobre ciertas cepas de microorganismos (Lopes y col., 2019). Por este motivo, con el objeto de estudiar el efecto de este excipiente sobre la viabilidad de las cepas de lactobacilos, cultivos frescos de los mismos fueron enfrentados a una serie de soluciones glicerinadas. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Conservación de las cepas L23 y L60 en soluciones glicerinadas

% v/v de glicerina	0 d		20 d		40 d		60 d	
	L23	L60	L23	L60	L23	L60	L23	L60
80	D	D	D	D	SD	SD	SD	SD
70	D	D	D	D	SD	SD	SD	SD
60	D	D	D	D	SD	D	SD	SD
50	D	D	D	D	SD	D	SD	SD
40	D	D	D	D	D	D	SD	SD
30	D	D	D	D	D	D	D	D
16	D	D	D	D	D	D	D	D

D: se observó desarrollo de colonias con morfología de bacilos Gram positivos en agar MRS.

SD: no se observó desarrollo de colonias.

Al analizar los resultados obtenidos, se observó que concentraciones de 70% y 80% de glicerina afectaron rápidamente la viabilidad de ambas cepas de lactobacilos, no se recuperaron colonias luego de los 20 días de conservación a 4°C. La viabilidad de la cepa L23 fue afectada a los 40 días por las concentraciones de glicerina al 50% y 60%. La suspensión al 40% permitió la recuperación de lactobacilos viables hasta los 40 días de almacenamiento. Las soluciones al 16% y 30% se seleccionaron como las más adecuadas para ser utilizadas en la preparación de los óvulos, ya que permitieron la recuperación de los lactobacilos por más tiempo. La solución de glicerina al 50% fue utilizada como control negativo para una formulación.

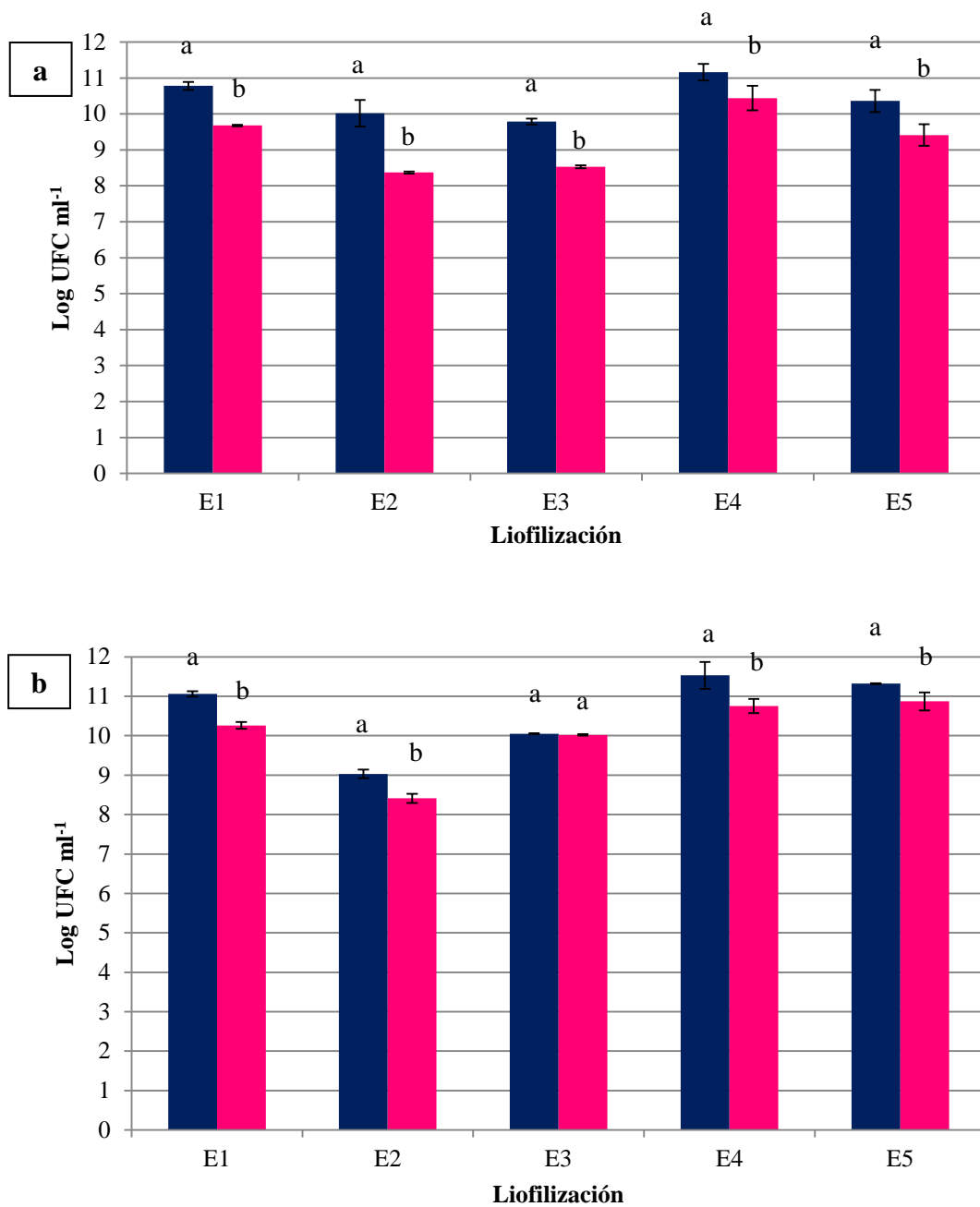
Fonseca y col., (2006) utilizaron una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para estudiar los efectos de la temperatura de almacenamiento, utilizando suspensiones de glicerina como crioprotector. Los autores determinaron que la suspensión con glicerina al 10% v/v era la ideal para mantener viables a los lactobacilos en el tiempo, lo que concuerda parcialmente con los resultados obtenidos en este experimento. Si bien altas concentraciones de glicerina pueden disminuir la actividad acuosa de una solución y afectar la supervivencia bacteriana, su incorporación en concentraciones óptimas puede resultar beneficiosa en procesos como la liofilización o



almacenamiento en frío por largos períodos de tiempo, ya que estabiliza la membrana celular de los microorganismos (Gomaa, 2016).

#### **4.4 Resistencia de los lactobacilos al proceso de liofilización**

La liofilización es el método más utilizado de preservación de células, tejidos, químicos, fármacos, entre otros (Ampatzoglou y col., 2010). Este proceso puede afectar significativamente la viabilidad celular cuando se lo aplica para la preservación de células bacterianas, y el grado de resistencia a la liofilización es cepa dependiente (Koch y col., 2008). Para poder asegurar una alta tasa de recuperación de viables es necesario utilizar una matriz protectora y/o sustancias crioprotectoras (Dhewa y col., 2014; Yeo y col., 2018; Piyadeatsoontorn y col., 2019). En este trabajo se seleccionó como matriz leche descremada al 10%, la cual resultó ser adecuada para ambas cepas de lactobacilos. Se ha reportado en otros trabajos de investigación que la leche promueve la supervivencia a bajas temperaturas mediante la estabilización de los constituyentes de la membrana celular y la formación de un revestimiento protector de las proteínas de la pared celular (Chen y col., 2019; Stefanello y col., 2019). En la Figura 11 se detalla el logaritmo del recuento de células viables de las cepas L23 y L60 antes y después de la liofilización, por quintuplicado, en experimentos independientes.



**Figura 14.** Viabilidad de las cepas de lactobacilos probióticos en cinco experiencias de liofilización (a) *Lactobacillus fermentum* L23. (b) *Lactobacillus rhamnosus* L60. Recuento previo (■) y posterior (■) al proceso de liofilización. E1: experiencia N°1, E2: experiencia N°2, E3: experiencia N°3, E4: experiencia N°4, E5: experiencia N°5. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). El análisis estadístico se realizó comparando los recuentos previos y posteriores a la liofilización en cada experiencia por separado.



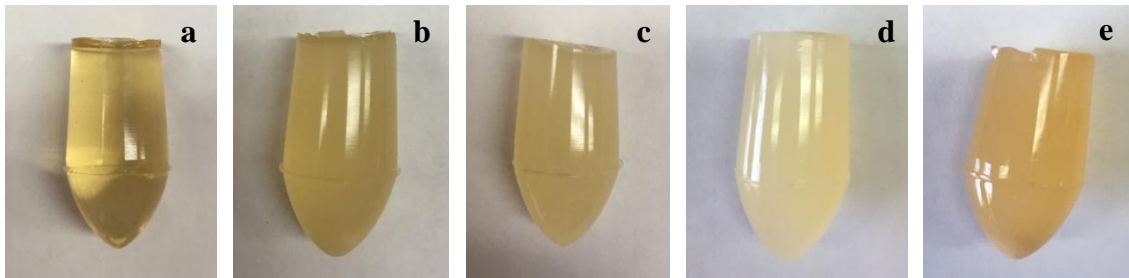
Luego del proceso de liofilización, la disminución promedio en la viabilidad de las cepas en todas las experiencias fue de aproximadamente 1 log y 0,5 log para las cepas L23 y L60, respectivamente. El porcentaje de supervivencia de la cepa L23 en los cinco experimentos fue del 90%, 84%, 87%, 94% y del 91% respectivamente, con un promedio de 89%. La cepa L60, en cambio, demostró porcentajes de supervivencia de 92%, 93%, 100%, 93% y 96% en las cinco experiencias, respectivamente, presentando un promedio de 95%. A partir de estos resultados puede fácilmente observarse que ambas cepas de lactobacilos poseen altos porcentajes de recuperación de células viables, es decir, son altamente resistentes al proceso de liofilización al que se las sometió ( $p > 0,05$ ). En particular, el proceso prácticamente no afectó la viabilidad de la cepa L60, que permaneció estable en su número de UFC/ml en la experiencia N°3.

Koch y col. (2008) ensayaron 51 cepas de otra especie de *Lactobacillus* pero obtuvieron tasas de supervivencia al proceso de liofilización que no superaron el 63%. Debido a que los porcentajes de supervivencia de las cepas reportadas en este trabajo de Tesis son mayores al 84% para L23 y al 93% para L60, los resultados de este ensayo son alentadores. Los hallazgos de este trabajo de Tesis difieren con lo descrito por Otero y col. (2007), quienes usando leche descremada como matriz protectora de otras especies de lactobacilos obtuvieron disminución de viabilidad mucho más acentuada, siendo de hasta 3 log UFC/ml. Sin embargo, otros estudios demostraron una tasa de supervivencia post-liofilización de *Lactobacillus* spp. similar a las observadas en este trabajo (Ampatzoglou y col., 2010; Juárez Tomás y col., 2015; Vera Pingitore y col., 2015; Piyadeatsoontorn y col., 2019). Recientemente, Stefanello y col. (2019) demostraron la supervivencia de una cepa de *L. fermentum* antes y después de la liofilización con distintos crioprotectores, determinando que las mezclas conteniendo leche descremada fueron las más adecuadas para la preservación bacteriana. Dichos autores informaron tasas de recuperación de células viables post-liofilización similares a las encontradas para la cepa *L. fermentum* L23.

#### **4.5 Óvulos vaginales conteniendo diferentes formulaciones farmacéuticas: caracterización macroscópica del producto final**

El inóculo bacteriano de todas las formulaciones se mantuvo constante en las tres fracciones de los óvulos (fondo, medio y superficie), en todos los casos. El contenido de los óvulos presentó una consistencia uniforme, semi-sólida, lisa, con ausencia de burbujas de aire en el interior o superficie. Los resultados de la observación macroscópica de los

óvulos se presentan en la Figura 15 y Tabla 9.



**Figura 15.** Aspecto macroscópico de las formulaciones farmacéuticas elaboradas (a) F5, (b) F8, (c) F9, (d) F11 y (e) F13.

**Tabla 9.** Observación macroscópica de las formulaciones farmacéuticas en forma de óvulos vaginales

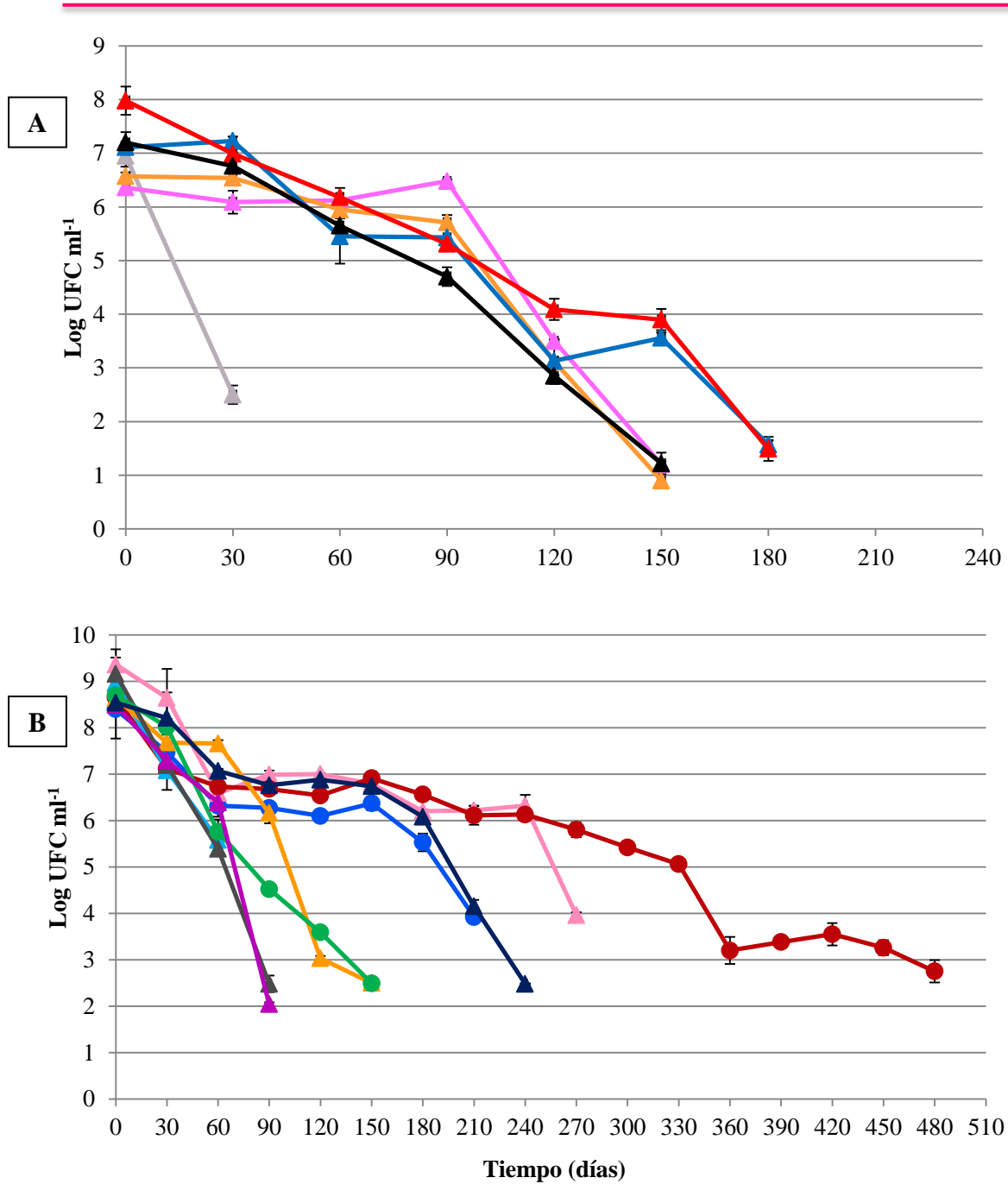
	Color	Aspecto	Burbujas		Consistencia
			Presencia	Ausencia	
<b>F1</b>	Ámbar	Translúcido		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F2</b>	Ámbar	Translúcido		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F3</b>	Ámbar	Translúcido		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F4</b>	Ámbar	Translúcido		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F5</b>	Ámbar	Translúcido		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F6</b>	Blancuzco	Opaco		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F7</b>	Ámbar claro	Opaco		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F8</b>	Ámbar claro	Opaco		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F9</b>	Ámbar claro	Opaco		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F10</b>	Blancuzco	Opaco		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F11</b>	Blancuzco	Opaco		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F12</b>	Blancuzco	Opaco		X	Semi sólida, lisa, uniforme
<b>F13</b>	Ámbar claro	Opaco		X	Semi sólida, lisa, uniforme

La optimización del proceso de producción es particularmente crítico para preservar la viabilidad bacteriana (Yeo y col., 2018). Los componentes base de las formulaciones son

los responsables de la consistencia final de las mismas, mientras que los demás excipientes pueden cumplir distintas funciones: estabilizantes de la membrana celular, macronutrientes, micronutrientes, antioxidantes, crioprotectores, entre otros. A partir de la investigación bibliográfica, en este estudio se eligieron gelatina y glicerina como componentes base para las formulaciones farmacéuticas. Por otra parte, la elección de los excipientes se realizó en base a antecedentes reportados por distintos autores, donde se demostró que cada cepa de *Lactobacillus* se comporta de manera diferente ante la presencia de distintas sustancias que puedan encontrarse en el producto almacenado a 4°C (Kale y col., 2005; Zárata y col., 2005; Zárata y Nader-Macías, 2006b; Dhewa y col., 2014; Juárez Tomás y col., 2015; Vera Pingitore y col., 2015; Vitali y col., 2016). La variación en la naturaleza química y proporción de cada componente dio como resultado distinta consistencia y apariencia en el producto final. Las formulaciones F1, F2, F3, F4 y F5 (conteniendo sólo componentes base) presentaron un aspecto semi-límpido o translúcido color ámbar, mientras que las formulaciones F6 a F13 (base + excipientes) resultaron opacas y blanquecinas. En el presente trabajo de Tesis se diseñaron formulaciones de distribución uniforme, mientras que en otros trabajos ha sido reportado el estudio de formulaciones en más de una capa (Maggi y col., 2000, Kaewnopparat y Kaewnopparat, 2009; Sánchez y col., 2018).

#### **4.6 Viabilidad de las cepas de lactobacilos en los óvulos vaginales**

Las formulaciones farmacéuticas en estudio fueron almacenadas a 4°C y procesadas cada 30 días para establecer la viabilidad de los lactobacilos. El recuento absoluto de células viables de la cepa *L. fermentum* L23 transformado a logaritmo se muestra en la Figura 16. Los resultados se presentan en dos figuras para lograr una mejor apreciación de las curvas. Dependiendo de cada formulación, el recuento de células viables al tiempo cero de producción resultó comprendido entre  $10^6$  y  $10^9$  UFC/ml.



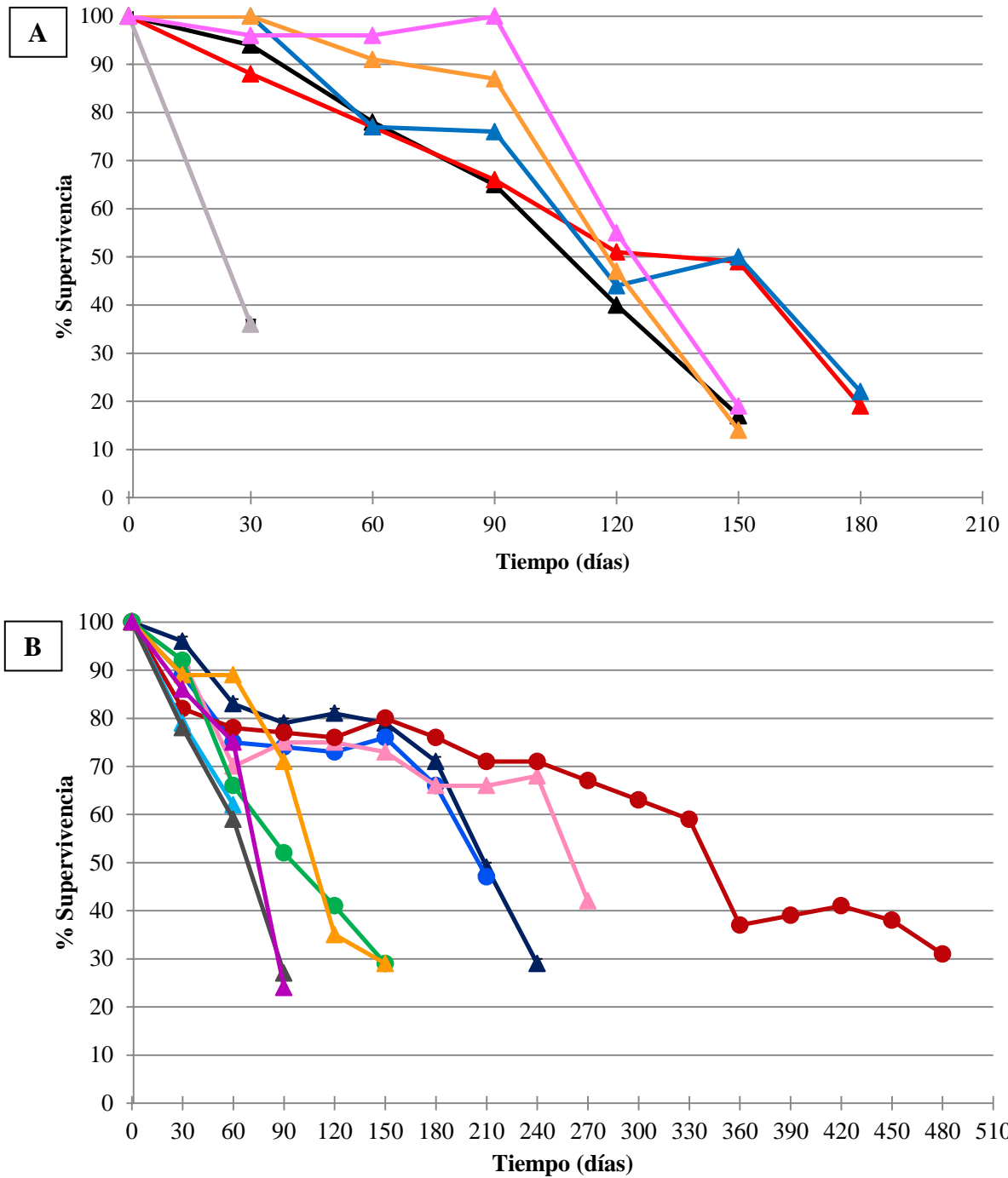
**Figura 16.** Recuento absoluto de células viables de *Lactobacillus fermentum* L23 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas

(A): Formulaciones 1-7. F1 (▲), F2 (▲), F3 (▲), F5 (▲), F6 (▲), F7 (▲).

(B): Formulaciones 8-13. F8 (▲), F8' (●), F9 (▲), F9' (●), F10 (▲), F11 (▲), F11' (●), F12 (▲), F13 (▲).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para poder comparar entre formulaciones, los resultados fueron transformados a porcentajes relativos de supervivencia en cada intervalo de tiempo (Figura 17).



**Figura 17.** Supervivencia relativa de *Lactobacillus fermentum* L23 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas

(A): Formulaciones 1-7. F1 (▲), F2 (▲), F3 (▲), F5 (▲), F6 (▲), F7 (▲).

(B): Formulaciones 8-13. F8 (▲), F8' (●), F9 (▲), F9' (●), F10 (▲), F11 (▲), F11' (●), F12 (▲), F13 (▲).

La F1 no resultó ser apropiada para la preservación de la viabilidad bacteriana de la cepa L23, ya que a los 60 días los lactobacilos perdieron su viabilidad. Estos hallazgos coinciden con lo informado en el inciso 4.3 de este trabajo de Tesis, ya que el alto contenido de glicerina (50%) afectó notablemente la viabilidad bacteriana a 4°C a través del tiempo, con respecto a porcentajes de glicerina más bajos como los contenidos en la F2 (30%) y el resto de las formulaciones en estudio (16%). El elevado contenido de glicerina disminuye la actividad acuosa del óvulo, factor importante para la viabilidad y desarrollo de los microorganismos (Madigan y col., 2004; Gomaa, 2016). Los resultados de la F4 no se presentan, ya que la liofilización durante 48 h no resultó ser apropiada para la preservación de la viabilidad bacteriana.

La cepa *L. fermentum* L23 se mantuvo con altos recuentos absolutos en todas las formulaciones dentro de los primeros 90 días de almacenamiento, tiempo a partir del cual se comenzaron a observar distintos perfiles de viabilidad según los excipientes presentes. Estos resultados no son comparables con los informados por Kaewnopparat y Kaewnopparat (2009), quienes reportaron índices similares de supervivencia a los 90 días de almacenamiento, con otra especie de *Lactobacillus* y distintos excipientes a los utilizados en este trabajo. Luego de los 180 días las formulaciones F2 y F3 no permitieron mantener viable la cepa L23, mientras que la F5 (idéntica a F3 pero con los lactobacilos liofilizados) lo hizo hasta los 210 días. Este resultado demostró que la liofilización mejoró significativamente la estabilidad de la cepa dentro de los óvulos con respecto al cultivo bacteriano fresco. Además, el agregado de leche y lactosa a la formulación con la cepa L23 liofilizada (F6) no mejoró significativamente la sobrevivencia de la cepa, ya que el perfil de supervivencia fue similar al de la F5. En la F7 (lactosa + leche + Tween80) se evidenció una disminución en la viabilidad de *L. fermentum* L23 con respecto a la F6 (sin Tween80). Estos resultados coinciden con lo reportado por Zárate y col. (2005), en cuyo estudio se afirma que ni la leche ni el Tween80 protegieron a los lactobacilos vaginales de la muerte celular a través del tiempo. En el mismo trabajo se postuló que: 1) la leche favorece la supervivencia bacteriana a bajas temperaturas no porque aporte nutrientes, sino porque proporciona condiciones físicas que protegen a las bacterias; 2) la exposición a Tween 80 cambia la composición de ácidos grasos de la membrana celular de las BAL, y este cambio influye positiva o negativamente en su resistencia a las condiciones de estrés, siendo un comportamiento cepa-dependiente.

Posteriormente, se observó que el agregado de ácido ascórbico al 0,5% (F8) mejoró notablemente la viabilidad en el tiempo de *L. fermentum* L23. Por ejemplo, es notable que a los 180 días de almacenamiento en esta formulación la cepa presentara un 70% de supervivencia, mientras que en F5 y F6 en ese tiempo la sobrevida era de aproximadamente 20%. Además, al incrementar la concentración de ácido ascórbico (2%) como excipiente en la F9 se logró una mayor recuperación de la cepa L23, ya que a los 240 días (8 meses) se evidenció un valor de supervivencia del 68%, lo que representa un 40% más que la misma formulación pero con ácido ascórbico al 0,5% en el mismo período de tiempo. Según estos resultados, parecería que a largo plazo el principal daño que sufre *L. fermentum* L23 a través del tiempo es del tipo oxidativo, lo que se traduce en una pérdida de viabilidad progresiva que se enlentece notablemente al agregar un antioxidante fuerte como el ácido ascórbico (Vitali y col., 2016).

La lactosa es frecuentemente utilizada para liofilizar microorganismos destinados a la industria farmacéutica. Existen dos hipótesis aceptadas para explicar el efecto protector de los azúcares, una de ellas propone que pueden reemplazar las moléculas de agua durante la deshidratación y mantener las estructuras biológicas en condiciones hidratadas. La otra hipótesis se basa en la capacidad de los azúcares para formar matrices vítreas (vitricación) en las que la alta viscosidad y la baja movilidad molecular restringen las interacciones moleculares (Romano y col., 2016). Se ha reportado en otros trabajos de investigación que el agregado de excipientes como ácido ascórbico, manitol y glutamato podría incrementar la estabilidad de los liofilizados bajo condiciones de almacenamiento (Zárate y col., 2005; Zárate y Nader-Macias, 2006b; Vera Pingitore y col., 2012; Vitali y col., 2016). Resulta interesante observar que las mismas formulaciones utilizando lactobacilos liofilizados con leche y lactosa (F8' y F9') parecen no tener un efecto significativo sobre la viabilidad de la cepa L23 en los primeros 240 días de almacenamiento, en comparación con la F8 y F9, respectivamente. Luego de ese tiempo, los lactobacilos se mantuvieron viables en la F9' durante otros 240 días (480 días en total), por lo que se dedujo que la liofilización con leche y lactosa y el posterior almacenamiento con ácido ascórbico al 2% permitió una mejora significativa de la viabilidad bacteriana.

Por otra parte, el reemplazo de ácido ascórbico por el crioprotector manitol al 2,5% (F10) o 4% (F11) no resultó propicio para la supervivencia de *L. fermentum* L23, ya que en ambos casos ocurrió un rápido descenso en la viabilidad de la cepa. Sin embargo, la liofilización con lactosa (F11') mostró una mejora en la supervivencia de este

microorganismo, ya que logra sobrevivir hasta los 180 días de almacenamiento, al contrario de su respectiva F11, donde sobrevive hasta los 120 días. Al tener en cuenta estos hallazgos con los resultados expuestos en el párrafo anterior, podría deducirse que existe un claro beneficio a largo plazo que producen tanto la liofilización con lactosa como la adición del antioxidante ácido ascórbico.

Además, el aumento en la concentración de lactosa como excipiente de un 2,5% a un 10% en presencia de ácido ascórbico al 0,5% (F12) produce un efecto positivo sobre la viabilidad a corto plazo, ya que se observa que a los 60 días de almacenamiento es la formulación con mayor sobrevivencia (90%), pero luego los recuentos caen rápidamente. Estos resultados sugieren que el daño celular a corto plazo de la cepa L23 se debería al almacenamiento en frío, lo que provoca una deshidratación que se contrarresta con la adición de un crioprotector como la lactosa, que funciona según lo explicado anteriormente reemplazando las moléculas de agua (Juárez Tomás y col., 2015; Romano y col., 2016; Sánchez y col., 2018). Si bien a corto plazo la alta concentración de lactosa (10%) como excipiente protegió a la cepa del daño por frío, a largo plazo esta misma concentración produciría que el azúcar ocupe grandes superficies fuera de la célula liofilizada, impidiendo así que la baja concentración de ácido ascórbico (0,5%) ocupe ese lugar y no pueda ejercer su efecto antioxidante (Zárate y col., 2005, Zárate y Nader-Macias, 2006b). De esta manera, con esta hipótesis se explicaría por qué la F12 no se comporta a largo plazo de manera similar a las formulaciones F8 y F8' que tienen la misma concentración de ácido ascórbico.

Asimismo, resulta evidente que la leche descremada como excipiente también ejerció un efecto protector relevante a través del tiempo, ya que la F13 (que carece de la misma) no resultó propicia para mantener la viabilidad de *L. fermentum* L23. El glutamato no proporcionó resultados favorables para la preservación de la viabilidad de esta cepa.

En resumen, a partir de los resultados obtenidos puede afirmarse que las condiciones adecuadas para mantener la viabilidad bacteriana de esta cepa probiótica son la liofilización con leche descremada al 10% y lactosa al 10%, y como excipientes de la formulación: leche 1,5%, lactosa 2,5% y ácido ascórbico 2%. Esta formulación corresponde a la F9', la cual permitió recuperar a *L. fermentum* L23 viable durante 16 meses.

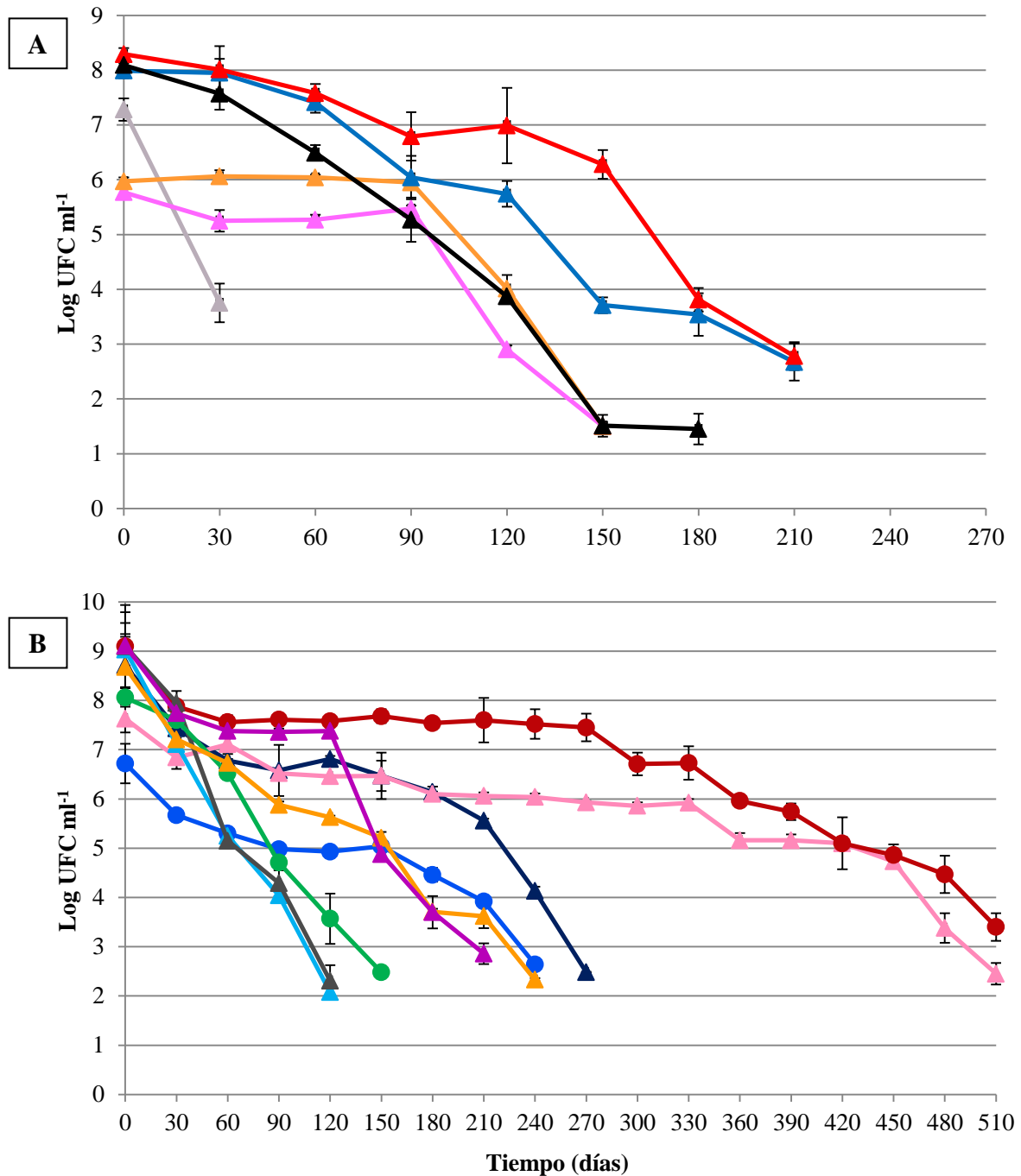
El recuento absoluto de células viables de la cepa *L. rhamnosus* L60 transformado a logaritmo se presenta en la Figura 18. Al igual que para la cepa L23, los hallazgos son



**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

expuestos en dos figuras para lograr apreciar claramente los resultados de cada una de las formulaciones estudiadas. El recuento de células viables al tiempo cero de producción en todas las formulaciones resultó comprendido entre  $10^6$  y  $10^9$  UFC/ml.

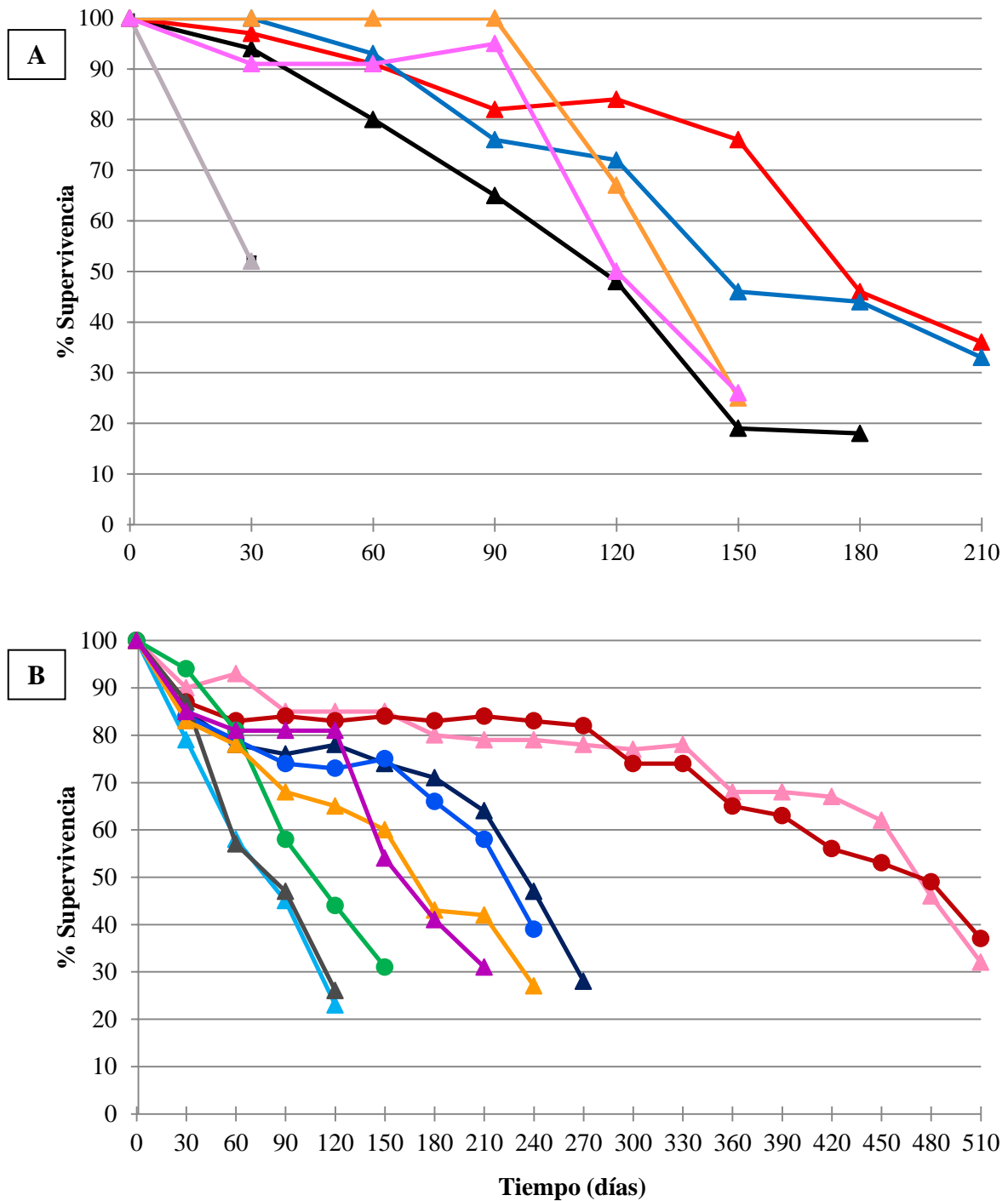


**Figura 18.** Recuento absoluto de células viables de *Lactobacillus rhamnosus* L60 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas

(A): Formulaciones 1-7. F1 (▲), F2 (▲), F3 (▲), F5 (▲), F6 (▲), F7 (▲).

(B): Formulaciones 8-13. F8 (▲), F8' (●), F9 (▲), F9' (●), F10 (▲), F11 (▲), F11' (●), F12 (▲), F13 (▲).

Los porcentajes relativos de supervivencia en cada intervalo de tiempo se muestran en la Figura 19.



**Figura 19.** Supervivencia relativa de *Lactobacillus rhamnosus* L60 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas

(A): Formulaciones 1-7. F1 (▲), F2 (▲), F3 (▲), F5 (▲), F6 (▲), F7 (▲).

(B): Formulaciones 8-13. F8 (▲), F8' (●), F9 (▲), F9' (●), F10 (▲), F11 (▲), F11' (●), F12 (▲), F13 (▲).

En general, el comportamiento de las curvas de supervivencia de la cepa L60 se

asemeja bastante a las de la cepa L23, aunque se observa que *L. rhamnosus* L60 resistió mucho mejor que *L. fermentum* L23 el almacenamiento a 4°C en todas las formulaciones farmacéuticas. Al igual que lo observado en el perfil de la cepa L23, la liofilización (F5) mejoró significativamente la estabilidad de la cepa L60 dentro de los óvulos con respecto al cultivo bacteriano fresco (F2 y F3). Por otra parte, en las formulaciones con la cepa L60 liofilizada se comprobó que la adición de ciertos excipientes como lactosa y leche descremada (F6) incrementó en un 70% su viabilidad durante los primeros meses de almacenamiento (150 días), con respecto a la F5. En ese tiempo, la sobrevida relativa de la cepa L60 en F6 fue del 75% con respecto al tiempo cero de producción. La adición de Tween 80 (F7) provocó un decrecimiento progresivo en la viabilidad de la cepa L60, alcanzando un máximo de disminución del 60% comparado a la F5 a los 150 días.

Al igual que lo observado para la cepa L23, el agregado de ácido ascórbico 0,5% (F8) mejoró aún más la sobrevida de *L. rhamnosus* L60. Hasta los 180 días, el porcentaje de supervivencia de la cepa L60 fue similar al de la cepa L23, pero a partir de este momento la primera evidenció una supervivencia superior a la segunda. Por ejemplo, a los 210 días de almacenamiento, la cepa L23 alcanzó valores de supervivencia del 49%, mientras que la cepa L60 del 65%. Esto le permitió a la cepa L60 sobrevivir en la formulación F8 hasta los 300 días (10 meses). Al aumentar la concentración de ácido ascórbico del 0,5% al 2% (F9) se observaron resultados muy relevantes, ya que este cambio permitió mantener la sobrevida de la cepa en casi un 80% durante 11 meses. En comparación con la F6, el sólo agregado de ácido ascórbico 2% a la F9 permitió mantener altos los recuentos de la cepa L60 durante 7 meses más. Esto se evidenció en la F6 y F9, donde la cepa se mantuvo con un 80% de supervivencia durante 120 días y 330 días, respectivamente. Además, no se observaron diferencias en los recuentos de la cepa L60 al liofilizarla con leche y lactosa e incluirla en las formulaciones F8' y F9' en comparación a la liofilización únicamente con leche (F8 y F9, respectivamente).

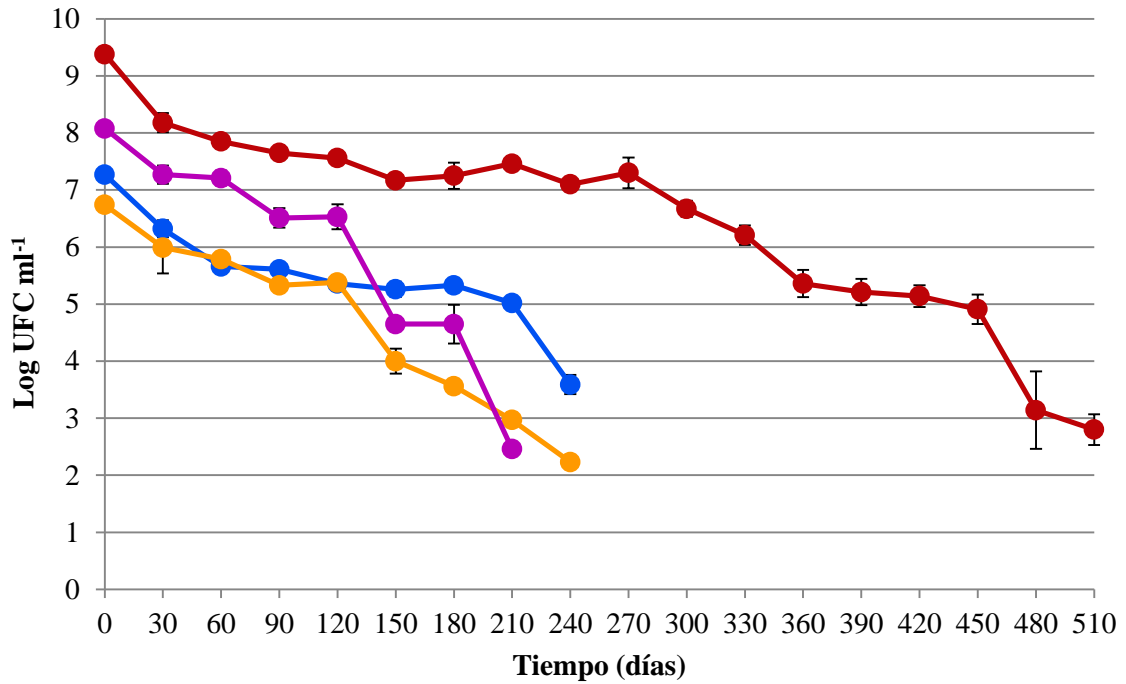
El reemplazo de ácido ascórbico por el crioprotector manitol al 2,5% (F10) o 4% (F11) no resultó propicio para la supervivencia de *L. rhamnosus* L60, al igual que lo observado anteriormente para la cepa L23, ya que en ambos casos se observó un descenso brusco en la viabilidad de los microorganismos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la cepa L60 soportó estas condiciones de almacenamiento durante más tiempo que la cepa L23 (150 y 90 días, respectivamente). Otra similitud entre cepas es que la liofilización de L60 con leche y lactosa en la F11' también mostró una leve mejoría en la

sobrevida del microorganismo, que se mantuvo viable hasta los 180 días.

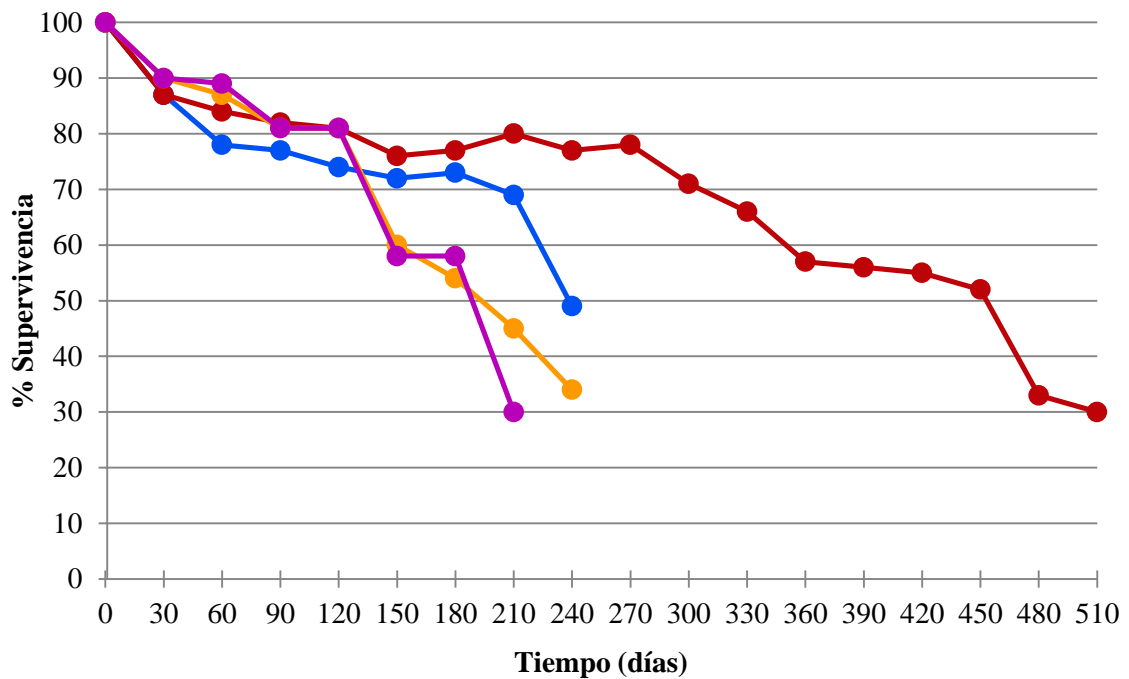
Durante los primeros 90 días, la formulación F12 (con leche 1,5%, lactosa 10% y ácido ascórbico 0,5%) se comportó similar a la F8 y F8' (leche 1,5%, lactosa 2,5% y ácido ascórbico 0,5%). Luego de este tiempo y hasta los 240 días, la F12 se mantuvo con recuentos de células viables un 20% por debajo de los correspondientes a la F8. Esto podría explicarse de la misma forma que para la cepa L23, donde el aumento del porcentaje de lactosa podría estar interfiriendo con la acción antioxidante del ácido ascórbico, que se encuentra en baja concentración (Vera Pinguitore y col., 2015).

Finalmente, durante los primeros 120 días, en la formulación F13 (con ácido ascórbico 0,5% y glutamato pero sin leche), se observó el mismo comportamiento que en la F8. Luego de ese tiempo, en la F13 los recuentos de células viables descendieron aproximadamente un 10% cada mes, manteniéndose viable hasta los 240 días. Esto evidencia que la leche descremada cumple un rol protector, ya que se observa claramente que al retirarla como excipiente de la formulación, la viabilidad de la cepa L60 disminuye. Sin embargo, sobrevive el doble de tiempo que la cepa L23 bajo las mismas condiciones, lo que vuelve a demostrar que la cepa L60 resiste mejor las condiciones de estrés por frío, deshidratación y oxidación.

Con el fin de estudiar si la mezcla de ambas cepas mejoraba la sobrevivencia de las mismas en las formulaciones con respecto a las mismas por separado, se analizaron óvulos conteniendo la mezcla 1:1 de ambas cepas de lactobacilos. El recuento absoluto de células viables transformado a logaritmo y los porcentajes relativos de supervivencia en cada intervalo de tiempo se muestran en las Figuras 20 y 21, respectivamente. Dependiendo de cada formulación, el recuento de células viables al tiempo cero de producción de los óvulos resultó entre  $10^7$  y  $10^9$  UFC/ml.



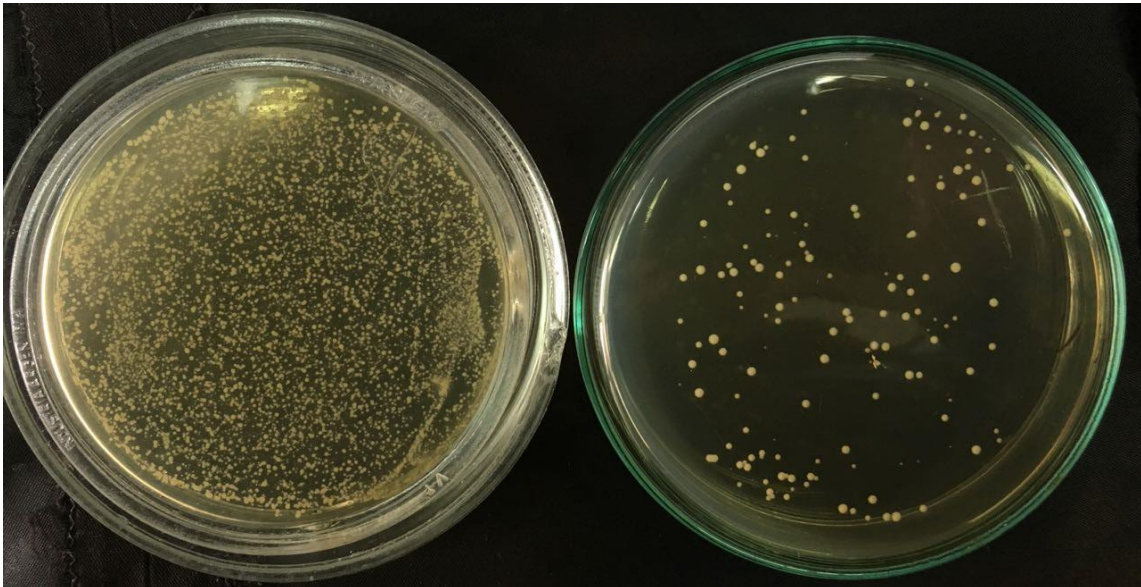
**Figura 20.** Recuento absoluto de células viables de la mezcla *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas F8' (●), F9' (●), F12 (●) y F13 (●).



**Figura 21.** Supervivencia relativa de la mezcla *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 a través del tiempo en las formulaciones farmacéuticas F8' (●), F9' (●), F12 (●) y F13 (●).

En general, se observó que en las cuatro formulaciones seleccionadas para este ensayo existió un comportamiento muy similar durante los primeros 120 días, donde se registró un porcentaje de supervivencia entre 73% y 80%. Luego de este tiempo, en los cuatro casos se evidenció un comportamiento similar al descrito para la cepa L60. Esto es esperable debido a que se trató de la cepa que mejor se adaptó a las condiciones de almacenamiento según lo analizado anteriormente.

Cabe destacar que en la observación macroscópica de las placas correspondientes a los óvulos con la mezcla de lactobacilos se observaron dos tipos de colonias distintas (Figura 22). Esto indicó que ambas cepas de lactobacilos se encontraban viables y que los resultados presentados en las Figuras 20 y 21 corresponden efectivamente al promedio de ambas.



**Figura 22.** Recuento bacteriano de la formulación F12 con la mezcla de lactobacilos a los 120 días de almacenamiento

Sin diluir (izquierda), dilución  $10^{-3}$  (derecha).

Luego del análisis de los resultados presentados, puede advertirse que en todos los casos se observó un descenso en la viabilidad bacteriana durante los primeros 30-60 días de almacenamiento de los óvulos a 4°C, tiempo a partir del cual comenzaron a verse diferencias en la supervivencia entre cada formulación y cada cepa. Este tiempo podría representar un período de adaptación de los lactobacilos a las condiciones de almacenamiento donde luego, según la composición de las formulaciones, algunas se

mantuvieron estables y otras disminuyeron el recuento de células viables.

Como conclusión, las condiciones más indicadas para la preservación de la viabilidad de la mezcla de las cepas L23 y L60 en los óvulos fue la liofilización con leche descremada 10% + lactosa 10% y la posterior combinación de gelatina 11,8% y glicerina 16% como componentes base, y lactosa 2,5%, leche 1,5% y ácido ascórbico 2% como excipientes (formulación F9’).

La determinación de la viabilidad de las cepas de interés en un producto biofarmacéutico resulta de vital importancia, ya que son el principio activo del medicamento y deben permanecer en condiciones óptimas durante la vida de estante del producto. A diferencia de lo expuesto en este estudio, existe bibliografía que sólo informa resultados de supervivencia de lactobacilos contenidos en óvulos durante cortos períodos de tiempo, entre 60-90 días (Uehara y col., 2006; Kaewnopparat y Kaewnopparat, 2009; Vitali y col., 2016).

En este trabajo de Tesis se evaluó la viabilidad de la mezcla y de cada una de las cepas de lactobacilos en óvulos diferentes. En algunos reportes, también se analizan las propiedades posformulado de cepas de lactobacilos solas con respecto a mezclas de varias especies (Maggi y col., 2000). En la bibliografía consultada de los últimos años, se encontraron trabajos que reportan la supervivencia de lactobacilos probióticos en formulaciones por períodos iguales o menores a 180 días de almacenamiento (Zárate y col., 2005; Verdenelli y col., 2014; Vitali y col., 2016; Sánchez y col., 2018). Esto demuestra la relevancia de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, donde fue posible diseñar formulaciones con lactobacilos viables hasta un año y medio post producción de los óvulos. El perfil de supervivencia de las cepas dependió de la composición química de las formulaciones farmacéuticas, sin embargo es de destacar que L23 y L60 contenidas en los óvulos se mantuvieron con recuentos muy significativos a lo largo de la experiencia ( $p < 0,05$ ).

#### **4.7 Propiedades benéficas de superficie relacionadas a la adhesión celular**

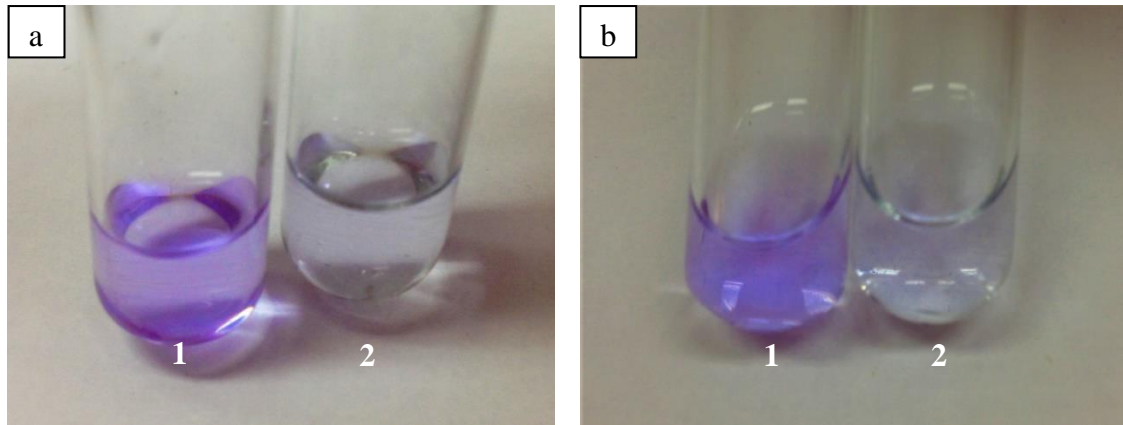
##### **4.7.1 Producción de biofilm de las cepas probióticas aisladas de los óvulos**

El estudio de la presencia de exopolisacáridos mediante la técnica de tinción con cristal violeta reveló la presencia de biofilm bacteriano en los tubos de hemólisis. El alcohol de lavado remueve el colorante adherido al biofilm en las paredes de los tubos de



**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

vidrio, por lo que a mayor absorbancia ( $540_{nm}$ ), mayor formación de biofilm (Figura 23). En la Tabla 10 se detallan los resultados obtenidos. Cabe destacar que las formulaciones F1, F2 y F3 se analizaron realizando 4 lavados con PBS, mientras que F5, F6 y F7 con 3 lavados de PBS. Se realizó esta modificación según lo sugerido por Fernández Ramírez y col. (2015) y Ramos y col. (2015), para favorecer la lectura en el espectrofotómetro y que los datos fueran más precisos.



**Figura 23.** Producción de biofilm por los lactobacilos aislados de la Formulación 5 con 90 días de almacenamiento

(a) *Lactobacillus fermentum* L23. (b) *Lactobacillus rhamnosus* L60. (1) Alcohol de lavado. (2) Alcohol de lavado control.

**Tabla 10.** Producción *in vitro* de biofilm por *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aislados a distintos tiempos de óvulos vaginales

Tiempo (días)	Densidad óptica (540 nm) Media											
	F1		F2		F3		F5		F6		F7	
	L23	L60	L23	L60	L23	L60	L23	L60	L23	L60	L23	L60
<b>0</b>	0,088 <sup>a</sup>	0,061 <sup>a</sup>	0,061 <sup>a</sup>	0,058 <sup>a</sup>	0,056 <sup>a</sup>	0,057 <sup>a</sup>	0,154 <sup>a</sup>	0,152 <sup>a</sup>	0,116 <sup>a</sup>	0,148 <sup>a</sup>	0,145 <sup>a</sup>	0,127 <sup>a</sup>
<b>90</b>	-	-	0,058 <sup>a</sup>	0,058 <sup>a</sup>	0,060 <sup>a</sup>	0,061 <sup>a</sup>	0,164 <sup>a</sup>	0,128 <sup>a</sup>	0,138 <sup>a</sup>	0,139 <sup>a</sup>	0,138 <sup>a</sup>	0,124 <sup>a</sup>
<b>180</b>	-	-	0,059 <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>	0,058 <sup>a</sup>	0,059 <sup>a</sup>	0,169 <sup>a</sup>	0,154 <sup>a</sup>	0,122 <sup>a</sup>	0,134 <sup>a</sup>	0,118 <sup>a</sup>	0,152 <sup>a</sup>
<b>270</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,138 <sup>a</sup>	-	-
<b>Promedio</b>	<b>0,058</b> ± 0,005	<b>0,061</b> ± 0,005	<b>0,059</b> ± 0,005	<b>0,060</b> ± 0,005	<b>0,058</b> ± 0,005	<b>0,059</b> ± 0,003	<b>0,162</b> ± 0,015	<b>0,145</b> ± 0,013	<b>0,125</b> ± 0,017	<b>0,140</b> ± 0,015	<b>0,134</b> ± 0,015	<b>0,134</b> ± 0,014

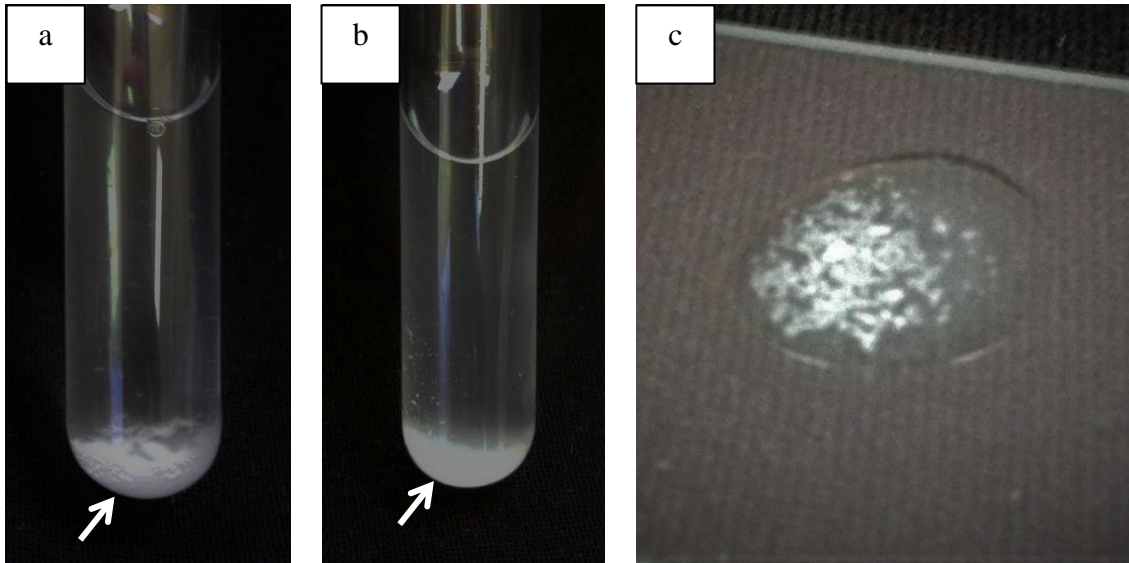
(-): Corresponde a los tiempos de almacenamiento donde no se recuperaron lactobacilos viables para realizar esta técnica. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Se realizó el análisis estadístico para los datos de una misma formulación y cepa a través del tiempo.

La formación de biofilm por bacterias no patógenas es una de las características responsables de su mantenimiento en ecosistemas estables *in vivo* y podría ser considerado beneficioso, promoviendo la colonización y permanencia a largo plazo en la mucosa vaginal del huésped (Ventolini y col., 2015). Estas bacterias se adhieren fuertemente a la superficie del epitelio gracias a la producción de una matriz de esta sustancia polimérica extracelular (Slížová y col., 2015). Las cepas L23 y L60 contenidas en las formulaciones farmacéuticas fueron medianamente productoras de biofilm (DO entre 0,5 y 0,1). Esta propiedad benéfica se mantuvo constante a través del tiempo en todas las formulaciones farmacéuticas, independientemente de la composición de base y excipientes de las mismas. Estos resultados fueron similares para la cepa L23 y para la cepa L60. En su trabajo de investigación, Pino y col. (2019) describieron otra cepa de *L. rhamnosus* aislada de vagina como productora de biofilm utilizando una técnica comparable a la empleada en este estudio. Es importante que esta característica benéfica de los lactobacilos se mantenga a través del tiempo de almacenamiento del medicamento vaginal, ya que si bien por sí sola no permite describir la adhesión *in vivo* está íntimamente relacionada. Para ello, es necesario realizar otros ensayos *in vitro* como los que se detallan a continuación (autoagregación, hidrofobicidad de superficie) y estudios de adhesión *in situ* a células vaginales. El estudio *in vivo* de estos parámetros en conjunto permitiría corroborar la adhesión de estos lactobacilos al epitelio vaginal de mujeres sexualmente activas (Salas Jara y col., 2016).

Terraf y col. (2012) y Slížová y col. (2015) reportaron que la formación de biofilm por diferentes especies de *Lactobacillus* es cepa-dependiente, y que además es una característica influenciada por el medio de cultivo, la concentración de inóculo, el crecimiento microbiano y la naturaleza química de la superficie utilizada para el ensayo de producción de biofilm (Speranza y col., 2018). Existen otros reportes que, al igual que en este estudio, informan la presencia de biofilms en cultivos *in vitro* de algunas cepas de lactobacilos, aunque no se encontraron reportes previos de lactobacilos contenidos en óvulos que mantengan esta propiedad a través del tiempo, destacando la importancia de este trabajo (Fernández Ramírez y col., 2015; Jalilsood y col., 2015; Slížová y col., 2015; Leccese Terraf y col., 2016).

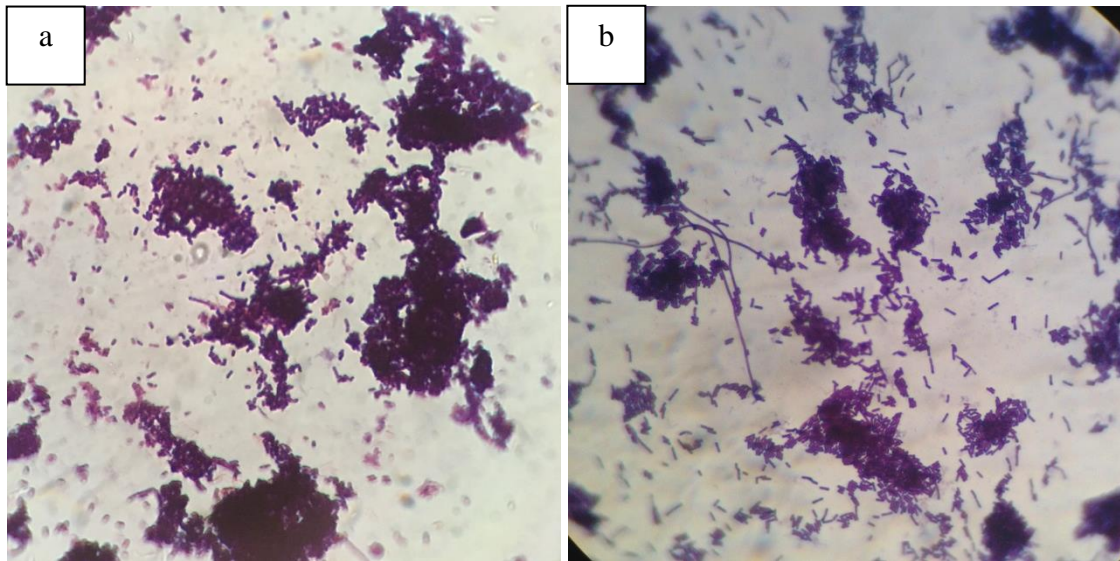
#### 4.7.2 Autoagregación *in vitro* de los lactobacilos probióticos contenidos en los óvulos vaginales

La formación de autoagregados de las cepas probióticas contenidas en los formulados se evaluó cualitativamente de manera macroscópica (Figura 24). Se observaron abundantes autoagregados visibles en forma de grumos, tanto en tubo (Figura 24a y 24b) como en portaobjetos (Figura 24c). Los autoagregados se formaron en el instante que la masa bacteriana se resuspendió en PBS, y fueron difíciles de disgregar con vórtex, indicando que los autoagregados eran estables y mantenían fuertes fuerzas de adhesión. Al ser observados al microscopio óptico, se advirtió la presencia de abundantes autoagregados microscópicos de distintos tamaños, en forma de grandes y pequeñas masas de lactobacilos adheridos entre sí (Figura 25). Estos resultados se repitieron para ambas cepas de lactobacilos probióticas, en las formulaciones farmacéuticas seleccionadas y a través del tiempo de almacenamiento de las mismas.



**Figura 24.** Observación macroscópica de test de autoagregación cualitativo positivo para las cepas L23 y L60 contenidas en los óvulos vaginales

(a) *L. fermentum* L23 y (b) *L. rhamnosus* L60 en tubo, (c) *L. rhamnosus* L60 en portaobjetos.



**Figura 25.** Observación microscópica de autoagregados de las cepas probióticas aisladas de la F6 a los 120 días de almacenamiento (1000x)

(a) *Lactobacillus fermentum* L23. (b) *Lactobacillus rhamnosus* L60.

A continuación, se determinó de forma cuantitativa la autoagregación de las cepas contenidas en los distintos formulados a través del tiempo. Los resultados de este ensayo se detallan en las Figuras 26, 27 y 28 para las cepas *L. fermentum* L23, *L. rhamnosus* L60 y para la mezcla de ambas, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

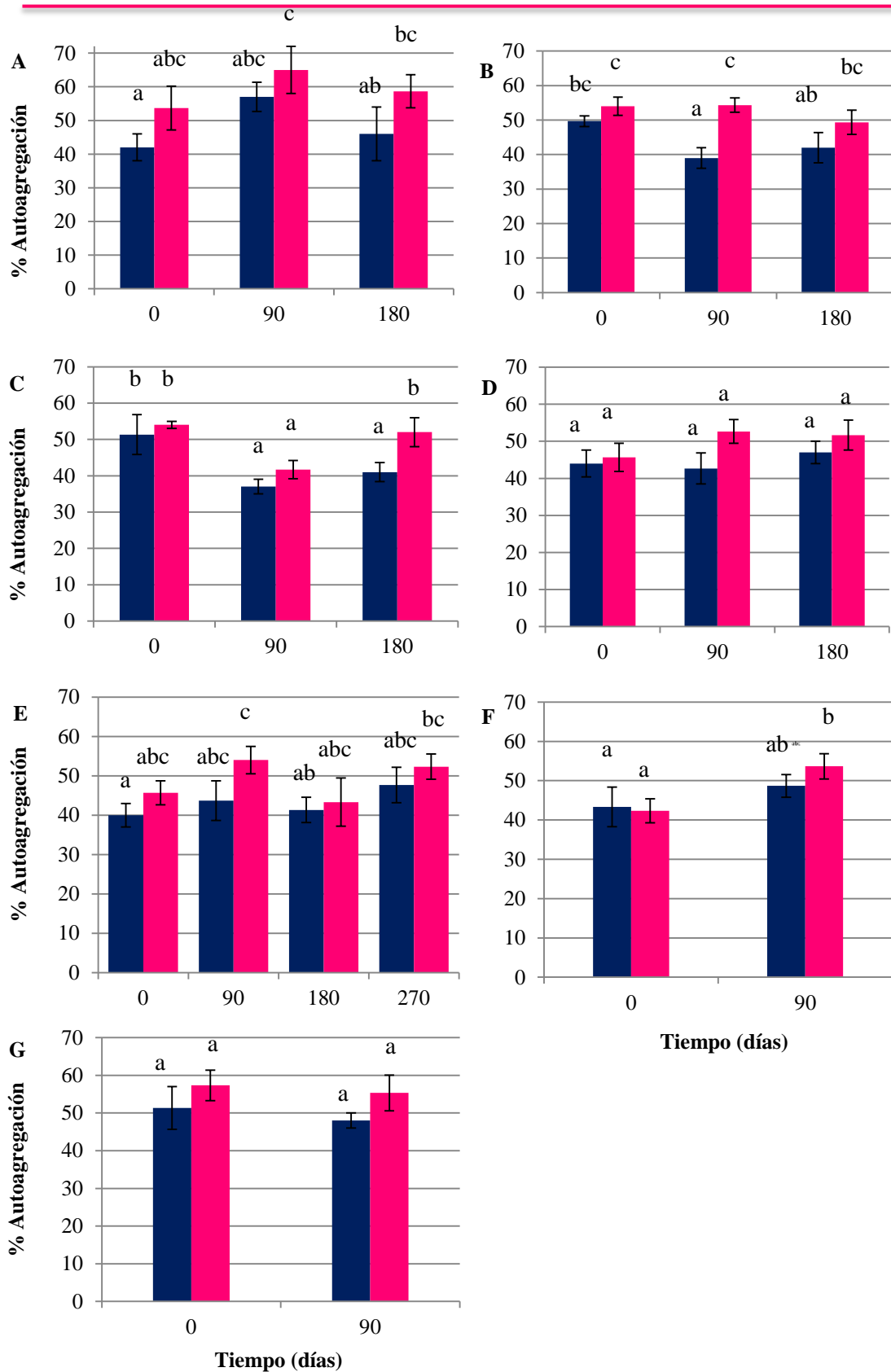
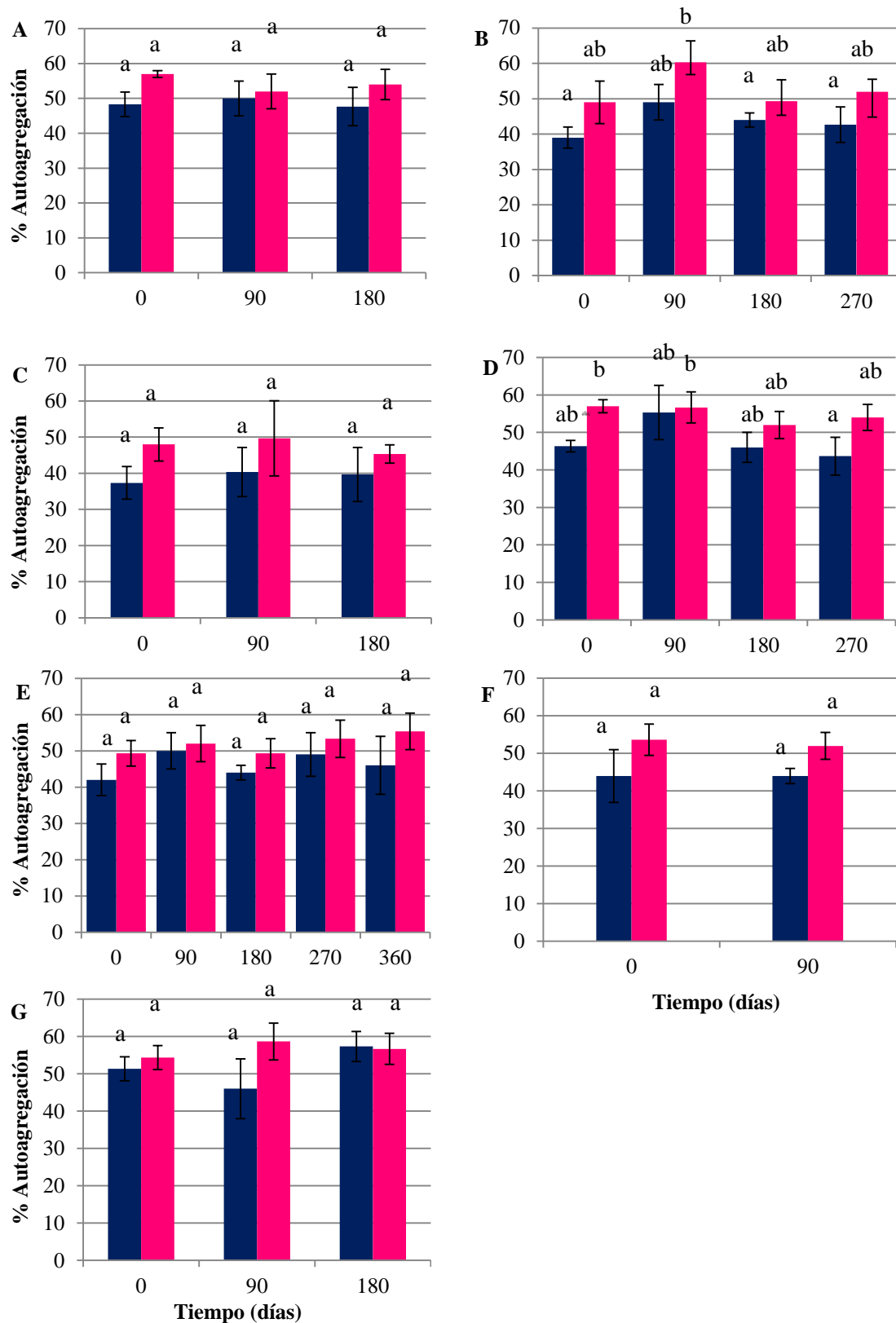


Figura 26. Autoagregación *in vitro* de *L. fermentum* L23 por el método cuantitativo en PBS

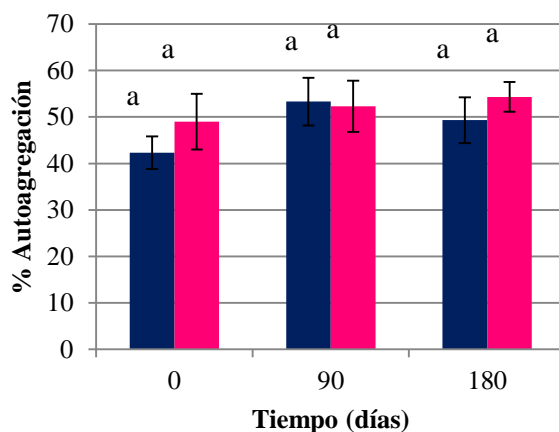
(A) F5, (B) F6, (C) F7, (D) F8, (E) F9, (F) F11, (G) F12. 2 h (■) y 5 h (■) de incubación. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 27.** Autoagregación *in vitro* de *L. rhamnosus* L60 por el método cuantitativo en PBS

(A) F5, (B) F6, (C) F7, (D) F8, (E) F9, (F) F11, (G) F12. 2 h (■) y 5 h (■) de incubación. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 28.** Autoagregación *in vitro* de la mezcla de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 en la formulación F12 por el método cuantitativo en PBS

2 h (■) y 5 h (■) de incubación. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

El rango de autoagregación a las 2 h de incubación se encontró comprendido entre 38% y 57% y entre 37% y 56% para las cepas L23 y L60, respectivamente. A las 5 h de incubación, los porcentajes de formación de autoagregados oscilaron entre 42% y 65% y entre 45% y 60% para *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, respectivamente. En todos los casos, la autoagregación a las 5 h fue levemente superior a la de las 2 h de incubación, y en algunas determinaciones estos valores no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Dichos resultados demuestran que a las 2 h de incubación se alcanzaron porcentajes de autoagregación cercanos al máximo medido, indicando que las cepas tienen capacidad de autoagregar rápidamente *in vitro*. No se detectaron diferencias significativas con respecto a la mezcla (Anexo), que alcanzó valores de autoagregación similares al de las cepas de lactobacilos por separado ( $p > 0,05$ ). Estos resultados permitieron deducir que las diferentes formulaciones farmacológicas no alteraron las propiedades autoagregativas de las cepas contenidas en los óvulos vaginales a través del tiempo de almacenamiento.

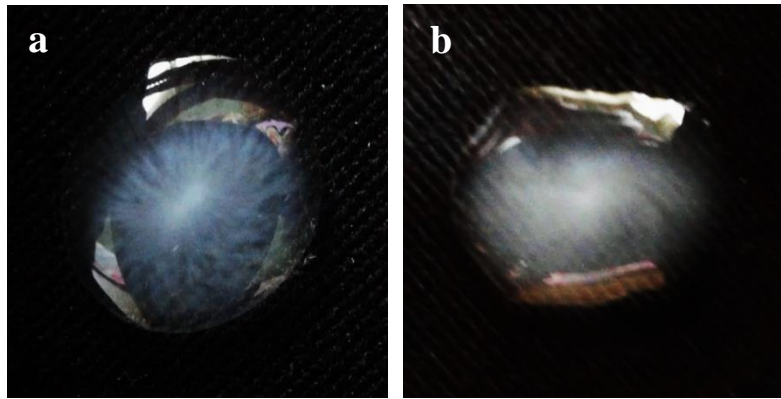
Los resultados obtenidos realizando el método de detección de autoagregación cualitativo concuerdan con los informados por Kaewnopparat y col. (2013), quienes utilizando la misma técnica observaron la presencia de aglutinados macroscópicos de una cepa de *L. fermentum* en menos de 2 min. Chew y col. (2015a) y Leccese Terraf y col. (2014) evaluaron otras cepas de *L. rhamnosus*, obteniendo valores de autoagregación entre



21% y 24% y entre 25% y 35% a las 4 h de incubación, respectivamente, utilizando una metodología similar a la descrita en este trabajo. Es de destacar que la cepa *L. rhamnosus* L60 a las 2 h de incubación presentó porcentajes de autoagregación muy superiores a los reportados por dichos autores. Del mismo modo, Abdulla y col. (2014) y Melgaço y col. (2018) informaron tasas de autoagregación mucho menores a las halladas en este trabajo de Tesis. Dichos autores afirman que un mínimo de 30% de autoagregación representa valores muy significativos para probióticos de importancia clínica, resaltando el potencial de las cepas L23 y L60. Recientemente, Pessoa y col. (2017) y Prabhurajeshwar y Chandrakanth (2017) describieron cepas de lactobacilos con capacidad autoagregativa, cuantificada por la misma técnica descrita en este trabajo. Los autores informaron valores de autoagregación máximos de 30% a las 5 h, y de 23% a las 4 h de incubación, respectivamente. Resulta importante destacar que en este trabajo se alcanzaron valores mínimos de aproximadamente un 40%, con máximos de hasta 60% de autoagregación en el mismo tiempo de incubación que los autores mencionados. Dichos resultados coinciden parcialmente con lo informado por Pino y col (2019), quienes describieron una cepa distinta de *L. rhamnosus* pero con porcentajes de autoagregación similares a L60.

#### **4.7.3 Evaluación cualitativa de la hidrofobicidad de superficie celular**

La hidrofobicidad de superficie es una medida del grado de carga en las superficies celulares y es, entre otros, un importante factor involucrado en la fuerza de adhesión bacteriana y una propiedad que puede determinarse cualitativamente mediante técnicas *in vitro* (Figura 29). Cuando los iones de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) están dentro de la solución acuosa, son atraídos por las cargas opuestas de la superficie celular. Esta atracción de cargas opuestas evita que las moléculas de agua interactúen con la membrana, lo que lleva a la formación de grumos o precipitados. De esta manera, a mayor hidrofobicidad de membrana, mayor formación de grumos (Chapman y col., 2014) Ambas cepas de lactobacilos probióticas dieron reacción positiva con todas las concentraciones de sulfato de amonio, en todas las formulaciones ensayadas y a través del tiempo. Los resultados se muestran en la Tabla 11.



**Figura 29.** Test de hidrofobicidad con sulfato de amonio

(a) Resultado positivo, (b) resultado negativo.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****Tabla 11.** Hidrofobicidad de superficie de los lactobacilos contenidos en los óvulos mediante el test de agregación salina

		Reacción con $S0_4(NH_4)_2$				Hidrofobicidad
		4 mol/l	2 mol/l	1,5 mol/l	0,5 mol/l	
L23	F5	+	+	+	+	ALTA
	F6	+	+	+	+	ALTA
	F7	+	+	+	+	ALTA
	F8	+	+	+	+	ALTA
	F8'	+	+	+	+	ALTA
	F9	+	+	+	+	ALTA
	F9'	+	+	+	+	ALTA
	F10	+	+	+	+	ALTA
	F11	+	+	+	+	ALTA
	F11'	+	+	+	+	ALTA
	F12	+	+	+	+	ALTA
	F13	+	+	+	+	ALTA
	L60	F5	+	+	+	+
F6		+	+	+	+	ALTA
F7		+	+	+	+	ALTA
F8		+	+	+	+	ALTA
F8'		+	+	+	+	ALTA
F9		+	+	+	+	ALTA
F9'		+	+	+	+	ALTA
F10		+	+	+	+	ALTA
F11		+	+	+	+	ALTA
F11'		+	+	+	+	ALTA
F12		+	+	+	+	ALTA
F13		+	+	+	+	ALTA
M		F8'	+	+	+	+
	F9'	+	+	+	+	ALTA
	F12	+	+	+	+	ALTA
	F13	+	+	+	+	ALTA

Alta hidrofobicidad de superficie (SAT<0,9 mol/L), intermedia hidrofobicidad de superficie (SAT 0,9-1,5 mol/L), cepa hidrofílica (SAT> 1,5 mol/L).

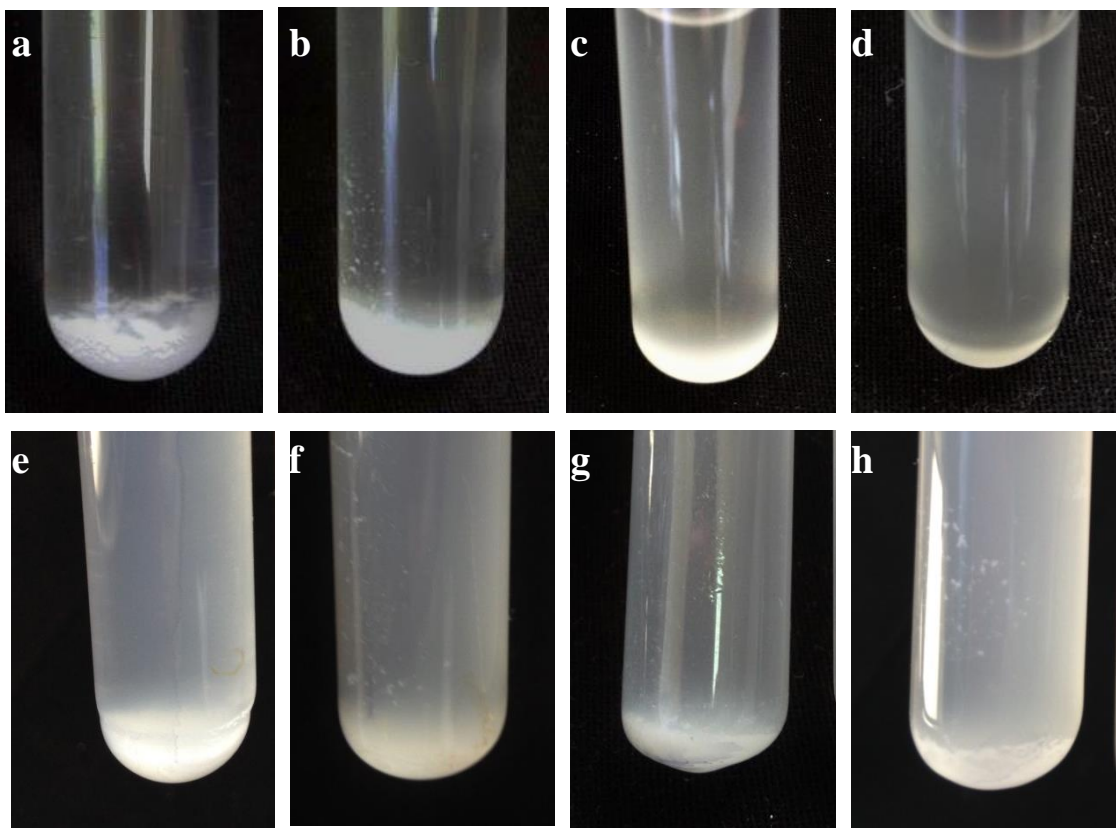
La hidrofobicidad de superficie en conjunto con las propiedades de producción de biofilm y formación de autoagregados son características que están asociadas a propiedades de membrana, y por lo tanto están íntimamente relacionadas con la adherencia de los lactobacilos al epitelio. Por ello, a la hora de diseñar un bioformulado vaginal, todas estas características son relevantes para la adhesión de los lactobacilos a dicha mucosa (Chervinets y col., 2018). Esta característica está determinada por la composición de ácidos grasos de la membrana celular bacteriana, y las condiciones de conservación de los óvulos vaginales pueden afectarla (Pessoa y col., 2017). Castro y col. (1996) reportaron que el congelamiento y liofilización de lactobacilos puede inducir cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana celular. A diferencia de estos autores, en esta Tesis se comprobó que la hidrofobicidad de superficie de las cepas L23 y L60 no fue afectada por los procesos de liofilización y almacenamiento posterior a 4°C en las distintas formulaciones farmacéuticas. Las cepas probióticas presentaron alta hidrofobicidad de superficie independientemente de la composición química de las mismas.

Chervinets y col. (2018) emplearon el test de SAT e informaron, al igual que en este estudio, alta hidrofobicidad de superficie en las cepas de lactobacilos estudiadas. Mediante el uso de otras técnicas hay autores que también destacan la importancia de la detección de la hidrofobicidad celular de lactobacilos probióticos (Pan y col., 2017; Prabhurajeshwar y Chandrakanth, 2017, Piyadeatsoontorn y col., 2019). Hay investigaciones en donde se informa que la adición de sustancias prebióticas permitiría obtener resultados relevantes en propiedades como la actividad antimicrobiana, autoagregación o hidrofobicidad de superficie (Pan y col., 2017). En este trabajo se demostró que *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 no sólo mantuvieron sus características de adherencia deseables a la hora de desarrollar un bioproducto vaginal mediante el mantenimiento de una alta hidrofobicidad de superficie a través del tiempo, sino que además no fue necesaria la adición de sustancias prebióticas para obtener resultados relevantes y/o incrementar esta propiedad de las cepas.

## 4.8 Actividad antagonista de los lactobacilos sobre microorganismos patógenos

### 4.8.1 Coagregación *in vitro* de los lactobacilos probióticos contenidos en óvulos con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Los coagregados de las cepas probióticas con microorganismos patógenos se observaron macroscópicamente en el fondo de los tubos, donde se apreciaron precipitados cada vez más abundantes a medida que transcurría el tiempo de incubación de la mezcla de las cepas. Dichos resultados se pueden observar en la Figura 30.



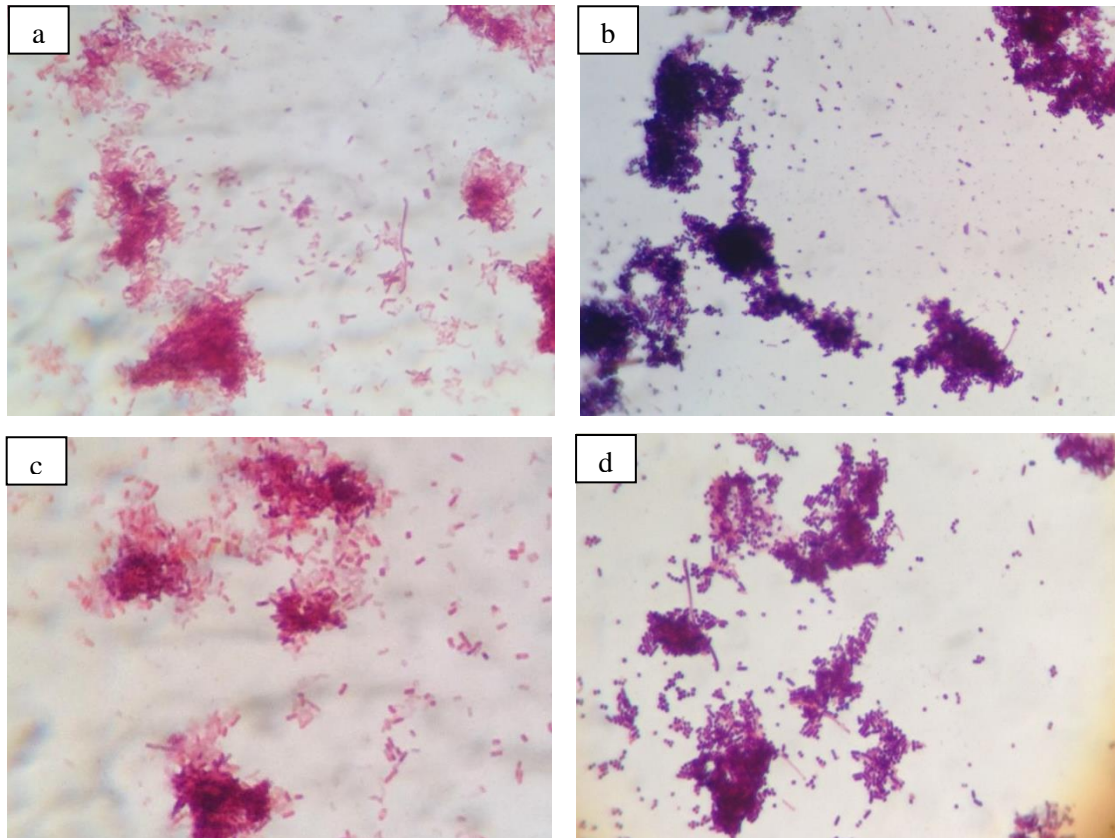
**Figura 30.** Observación macroscópica del test de coagregación cualitativo de las cepas L23 y L60 contenidas en las formulaciones farmacéuticas con *E. coli* y *S. aureus*

Controles: *L. fermentum* L23 (a), *L. rhamnosus* L60 (b), *E. coli* (c), *S. aureus* (d).

Tratamientos: L23 + *E. coli* (e), L23 + *S. aureus* (f), L60 + *E. coli* (g), L60 + *S. aureus* (h).

Cuando los precipitados fueron observados al microscopio óptico, se advirtió la presencia de abundantes coagregados microscópicos de distintos tamaños, en forma de grandes y pequeñas masas de lactobacilos adheridos a *E. coli* y a *S. aureus*. En todas las formulaciones farmacéuticas y a los distintos tiempos de muestreo se observó el mismo

comportamiento de lactobacilos adheridos. En la Figura 31 se observan algunos de los resultados de la observación microscópica de los coagregados bacterianos.



**Figura 31.** Observación microscópica de coagregados de lactobacilos con microorganismos patógenos (1000x)

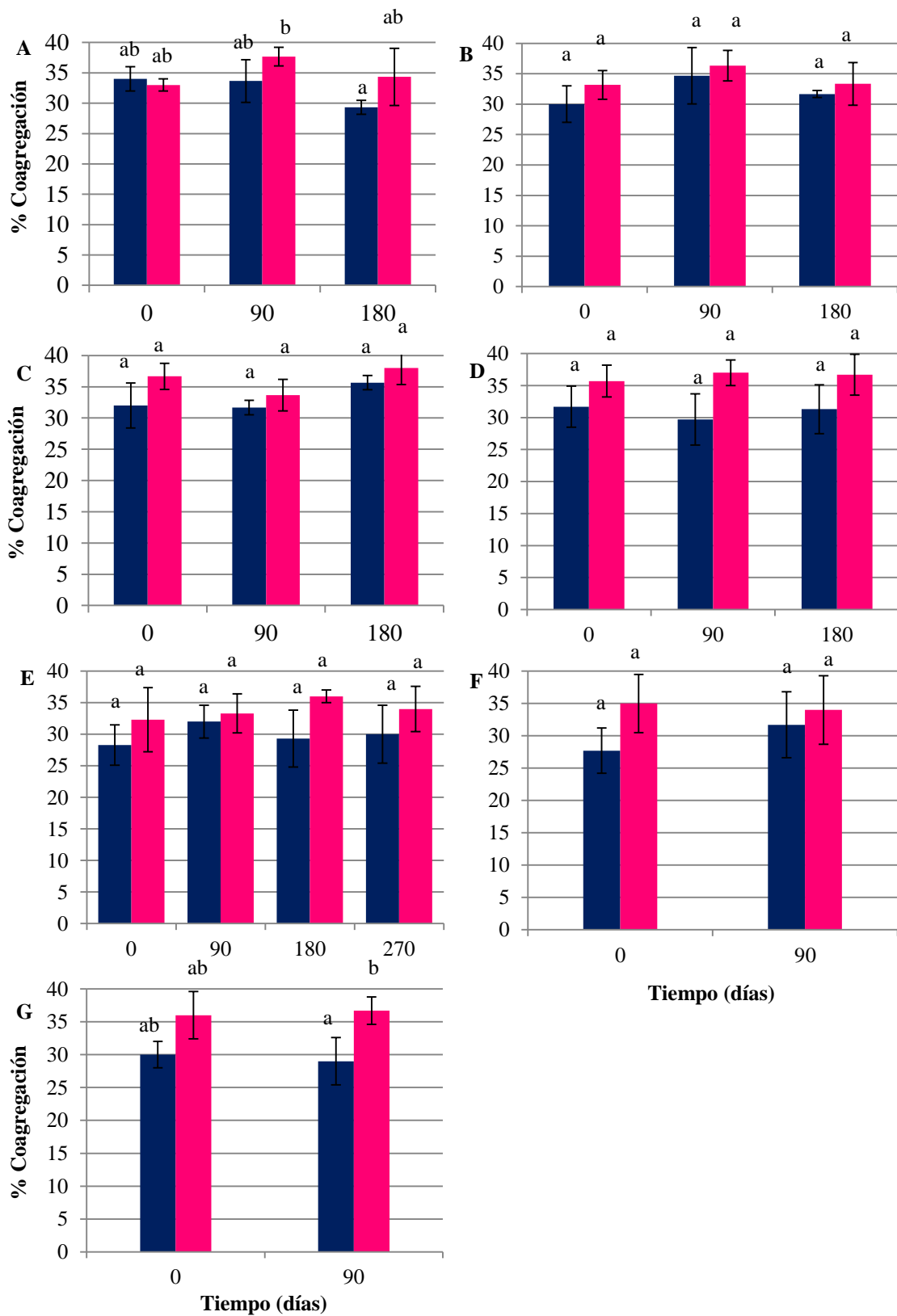
(A) *L. fermentum* L23 + *E. coli*, (B) *L. fermentum* L23 + *S. aureus*, (C) *L. rhamnosus* L60 + *E. coli*, (D) *L. rhamnosus* L60 + *S. aureus*.

A partir de la observación microscópica de las muestras obtenidas del fondo de los tubos, se obtuvieron coagregados de diversos tamaños de la cepa L23 y L60 con *E. coli* y *S. aureus*, observados como acúmulos de lactobacilos adheridos a bacilos Gram negativos o cocos Gram positivos. Este comportamiento se observó en todas las formulaciones en estudio y a través del tiempo de almacenamiento de los óvulos. Resultados similares se obtuvieron con la mezcla de lactobacilos. Chervinets y col. (2018) describieron otra cepa de *L. fermentum* capaz de coagregar con *S. aureus*, pero incapaz de coagregar con *E. coli*. A diferencia de estos autores, los resultados de este trabajo no sólo demuestran la coagregación de las cepas probióticas aisladas de los óvulos con un microorganismo Gram

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

positivo sino que también con uno Gram negativo. Además, los autores describieron el comportamiento cualitativo de coagregación mientras que en este trabajo de Tesis esta capacidad coagregativa se cuantificó (Figura 32 para la cepa L23, Figura 33 para la cepa L60 y Figura 34 para la mezcla de ambas).

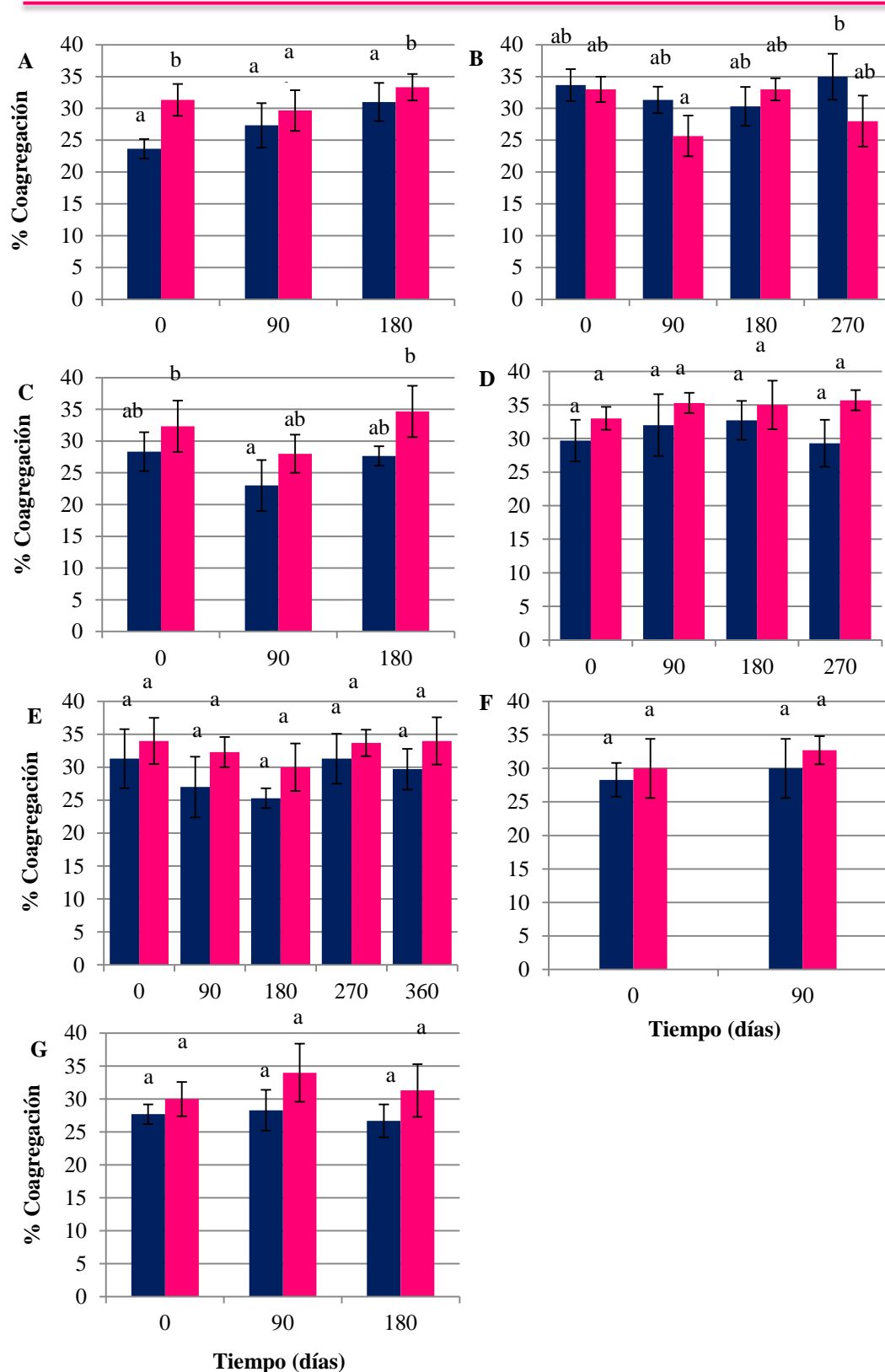


**Figura 32.** Coagregación *in vitro* de *L. fermentum* L23 con *E. coli* y *S. aureus*

(A) F5, (B) F6, (C) F7, (D) F8, (E) F9, (F) F11, (G) F12. L23 + *E. coli* (■) y L23 + *S. aureus* (■). Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

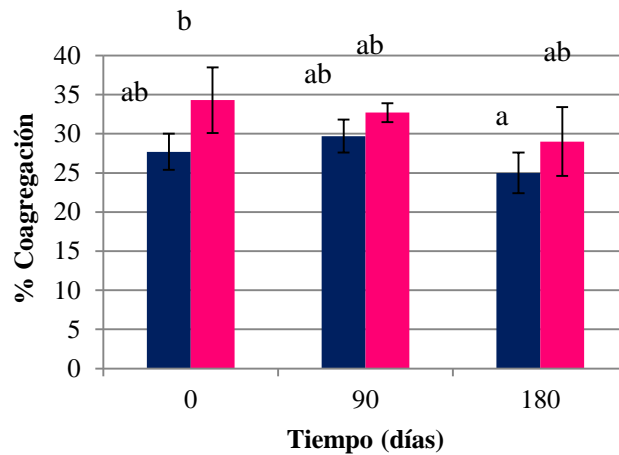


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 33.** Coagregación *in vitro* de *L. rhamnosus* L60 con *E. coli* y *S. aureus*

(A) F5, (B) F6, (C) F7, (D) F8, (E) F9, (F) F11, (G) F12. L60 + *E. coli* (■) y L60 + *S. aureus* (■). Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 34.** Coagregación *in vitro* de la mezcla de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 con *E. coli* y *S. aureus* en la formulación F12

L23 + L60 + *E. coli* (■) y L23 + L60 + *S. aureus* (■). Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

El rango de coagregación de la cepa L23 con *E. coli* 1 estuvo comprendido entre 27% y 36%, mientras que para *S. aureus* 168 entre 33% y 38%. La cepa L60, por otro lado, presentó porcentajes de coagregación que oscilaron entre 23% y 35% con *E. coli* 1, y entre 26% a 36% con *S. aureus* 168. Para la mezcla, el rango de coagregación con las cepas de *E. coli* y *S. aureus* osciló entre 25% y 30% y entre 28% y 34%, respectivamente. Es de destacar que en este ensayo se observó muy poca formación de agregados en los tubos control de ambos microorganismos patógenos (Figura 27c y 27d), lo cual indicaría que estas cepas no poseen alta capacidad autoagregativa. Por el contrario, sí se observaron precipitados en los tubos control de lactobacilos (Figura 27a y 27b). Los agregados observados en el fondo de los tubos mezcla se deben a que a medida que transcurre el tiempo, los lactobacilos van coagregando con los microorganismos patógenos en suspensión. Los lactobacilos probióticos mantuvieron su propiedad coagregativa a través del tiempo en que se mantuvieron viables en los óvulos con distintas formulaciones farmacéuticas, independientemente de la composición química de las mismas. No se observaron diferencias entre los valores de coagregación de la mezcla de lactobacilos con respecto a las cepas por separado (Anexo) ( $p > 0,05$ ).

Keller y col. (2011) evaluaron la coagregación de diferentes cepas de lactobacilos con cepas de *S. mutans*, y reportaron porcentajes entre 9% y 24%. Prabhurajeshwar y Chandrakanth (2017), estudiaron la coagregación de aislados de *Lactobacillus* spp. que oscilaron entre 7% y 19% y entre 5% y 25% con *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.

Abdulla y col. (2014) y Bouridane y col. (2016) utilizaron otras cepas de *Lactobacillus* en coagregación con otros microorganismos, y obtuvieron resultados similares a los hallados en este trabajo, los cuales a su vez difieren con lo expuesto recientemente por Pino y col. (2019), quienes describieron dos cepas de *L. rhamnosus* altamente coagregativas con *E. coli* (53%-60%). En este trabajo de Tesis, se reportaron valores de coagregación muy por encima de los porcentajes informados en la mayoría de la bibliografía consultada, utilizando otros lactobacilos y/o microorganismos patógenos indicadores, lo que continúa resaltando la importancia de estas cepas probióticas L23 y L60.

La elección de cepas de lactobacilos que sean capaces de mantener sus propiedades probióticas y benéficas a través del tiempo cuando se los incorpora como principio activo a una formulación farmacéutica es de vital importancia, ya que sus capacidades de adhesión y competencia con microorganismos patógenos son parámetros esenciales para asegurar una acción terapéutica efectiva.

#### **4.8.2 Estudio de la actividad antimicrobiana por la técnica de estrías cruzadas de los lactobacilos aislados de los óvulos vaginales**

Al realizar la técnica de estrías cruzadas se observó un halo de inhibición del crecimiento microbiano en la zona de intersección de la estría central (lactobacilos) con las estrías perpendiculares de la cepa indicadora (*E. coli*) (Figura 35). La Tabla 12 describe detalladamente el tamaño promedio de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* producidos por los lactobacilos mediante la técnica de estrías cruzadas.



**Figura 35.** Fotografía de la técnica de estrías cruzadas para la detección de actividad antimicrobiana en placas de agar MRS

Estría vertical: *L. fermentum* L23 aislada de la formulación F8 a los 120 días de incubación. Estrías perpendiculares: cepa *E. coli* indicadora

**Tabla 12.** Actividad antimicrobiana de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aislados de óvulos vaginales sobre *E. coli* por el método de estrias cruzadas

Tiempo (días)	Halos de inhibición del crecimiento Media (mm)											
	F1		F2		F3		F5		F6		F7	
	L23	L60	L23	L60	L23	L60	L23	L60	L23	L60	L23	L60
0	23,3 <sup>a</sup>	19,7 <sup>a</sup>	22,0 <sup>ab</sup>	20,7 <sup>a</sup>	30,7 <sup>b</sup>	29,0 <sup>a</sup>	31,0 <sup>a</sup>	33,0 <sup>b</sup>	27,0 <sup>ab</sup>	30,3 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	28,0 <sup>a</sup>
30	21,3 <sup>a</sup>	23,3 <sup>b</sup>	25,0 <sup>ab</sup>	23,0 <sup>a</sup>	30,7 <sup>b</sup>	27,7 <sup>a</sup>	27,7 <sup>a</sup>	28,3 <sup>ab</sup>	31,0 <sup>b</sup>	30,0 <sup>a</sup>	26,0 <sup>a</sup>	30,3 <sup>a</sup>
60	23,7 <sup>a</sup>	25,0 <sup>b</sup>	21,3 <sup>a</sup>	21,0 <sup>a</sup>	28,0 <sup>ab</sup>	27,7 <sup>a</sup>	29,0 <sup>a</sup>	29,3 <sup>ab</sup>	29,7 <sup>ab</sup>	31,0 <sup>a</sup>	30,3 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>
90	-	-	26,3 <sup>b</sup>	25,7 <sup>a</sup>	25,3 <sup>ab</sup>	24,0 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>	27,7 <sup>ab</sup>	28,7 <sup>ab</sup>	27,7 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>	27,0 <sup>a</sup>
120	-	-	22,0 <sup>ab</sup>	23,0 <sup>a</sup>	26,3 <sup>ab</sup>	25,3 <sup>a</sup>	27,0 <sup>a</sup>	29,0 <sup>ab</sup>	27,0 <sup>ab</sup>	27,7 <sup>a</sup>	28,3 <sup>a</sup>	27,7 <sup>a</sup>
150	-	-	22,7 <sup>ab</sup>	20,7 <sup>a</sup>	22,7 <sup>a</sup>	24,7 <sup>a</sup>	31,7 <sup>a</sup>	27,0 <sup>a</sup>	25,0 <sup>a</sup>	29,3 <sup>a</sup>	30,0 <sup>a</sup>	30,7 <sup>a</sup>
180	-	-	24,0 <sup>ab</sup>	25,3 <sup>a</sup>	23,7 <sup>a</sup>	25,7 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	30,7 <sup>ab</sup>	31,0 <sup>b</sup>	29,7 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	31,0 <sup>a</sup>
210	-	-	-	-	-	-	27,0 <sup>a</sup>	25,0 <sup>a</sup>	28,3 <sup>ab</sup>	31,0 <sup>a</sup>	-	27,0 <sup>a</sup>
240	-	-	-	-	-	-	-	28,0 <sup>ab</sup>	-	30,3 <sup>a</sup>	-	31,7 <sup>a</sup>
270	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,7 <sup>a</sup>	-	-
Promedio	22,8	22,7	23,3	22,8	26,8	26,3	29,3	28,7	28,5	29,7	29,3	29,4

(-): Corresponde a los tiempos de almacenamiento donde no se recuperaron lactobacilos viables para realizar esta técnica. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Se realizó el análisis estadístico para los datos de una misma formulación y cepa a través del tiempo.

**Tabla 12 (continuación).** Actividad antimicrobiana de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aislados de óvulos vaginales sobre *E. coli* por el método de estrías cruzadas

Tiempo (días)	Halos de inhibición del crecimiento											
	Media (mm)											
	F8		F8'			F9		F9'			F10	
	L23	L60	L23	L60	M	L23	L60	L23	L60	M	L23	L60
0	30,0 <sup>a</sup>	32,3 <sup>a</sup>	30,3 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	33,3 <sup>a</sup>	28,0 <sup>a</sup>	31,7 <sup>a</sup>	29,3 <sup>a</sup>	29,3 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>	29,3	31,3 <sup>a</sup>
90	30,0 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	29,0 <sup>a</sup>	30,7 <sup>a</sup>	31,7 <sup>b</sup>	29,3 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>	30,0 <sup>a</sup>	32,3 <sup>a</sup>	-	30,0 <sup>a</sup>
180	28,7 <sup>a</sup>	31,0 <sup>a</sup>	30,7 <sup>a</sup>	30,7 <sup>a</sup>	32,3 <sup>a</sup>	27,7 <sup>a</sup>	29,0 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>	32,7 <sup>a</sup>	-	-
270	-	28,7 <sup>a</sup>	29,0 <sup>a</sup>	30,0 <sup>a</sup>	34,0 <sup>a</sup>	30,0 <sup>ab</sup>	31,0 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	30,0 <sup>a</sup>	32,7 <sup>a</sup>	-	-
360	-	-	30,3 <sup>a</sup>	30,0 <sup>a</sup>	32,7 <sup>a</sup>	-	30,7 <sup>a</sup>	28,7 <sup>a</sup>	29,3 <sup>a</sup>	32,0 <sup>a</sup>	-	-
Promedio	29,6	30,4	30,0 <sup>a</sup>	29,9 <sup>a</sup>	32,6 <sup>b</sup>	29,3	30,3	29,7 <sup>a</sup>	30,0 <sup>a</sup>	32,2 <sup>b</sup>	29,3	30,7

M: mezcla 1:1 de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60. (-): Corresponde a los tiempos de almacenamiento donde no se recuperaron lactobacilos viables para realizar esta técnica. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Se realizó un primer análisis estadístico para los datos de una misma formulación y cepa a través del tiempo. El segundo análisis se realizó comparando los promedios de las formulaciones F8' y F9' para comprobar si la mezcla de las cepas ejercía el mismo efecto que las cepas por separado en cada formulación.

**Tabla 12 (continuación).** Actividad antimicrobiana de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aislados de óvulos vaginales sobre *E. coli* por el método de estrías cruzadas

Tiempo (días)	Halos de inhibición del crecimiento									
	Media ± DE (mm)									
	F11		F11'		F12			F13		
	L23	L60	L23	L60	L23	L60	M	L23	L60	M
<b>0</b>	29,3 <sup>a</sup>	31,7 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	30,7 <sup>a</sup>	30,0 <sup>a</sup>	29,3 <sup>a</sup>	32,7 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	30,7 <sup>a</sup>	32,0 <sup>a</sup>
<b>90</b>	30,7 <sup>a</sup>	30,7 <sup>a</sup>	30,3 <sup>a</sup>	29,0 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	29,7 <sup>a</sup>	32,3 <sup>a</sup>	29,3 <sup>a</sup>	28,7 <sup>a</sup>	31,0 <sup>a</sup>
<b>180</b>	-	-	-	-	-	31,3 <sup>a</sup>	30,7 <sup>a</sup>	-	29,3 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>
<b>270</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Promedio</b>	30,0	31,2	30,0	29,8	29,8 <sup>a</sup>	30,1 <sup>a</sup>	31,9 <sup>b</sup>	29,5 <sup>a</sup>	29,3 <sup>a</sup>	31,4 <sup>b</sup>

M: mezcla 1:1 de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60. (-): Corresponde a los tiempos de almacenamiento donde no se recuperaron lactobacilos viables para realizar esta técnica. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Se realizó un primer análisis estadístico para los datos de una misma formulación y cepa a través del tiempo. El segundo análisis se realizó comparando los promedios de las formulaciones F12 y F13 para comprobar si la mezcla de las cepas ejercía el mismo efecto que las cepas por separado en cada formulación.

El rango de los halos de inhibición promedio producidos por las cepas L23, L60 y la mezcla sobre el crecimiento de *E. coli* en las distintas formulaciones estuvo comprendido entre 21,3 mm y 31,7 mm, 19,7 mm y 33,3 mm y 30,1 mm y 33,3 mm, respectivamente. Es de resaltar que el tamaño de los halos de inhibición obtenidos en este ensayo fue de gran relevancia, lo cual demuestra la importante actividad antimicrobiana de las cepas en estudio. Se observó que los lactobacilos fueron capaces de mantener intacta su capacidad de producir sustancias con actividad antimicrobiana mientras se encontraban en los óvulos vaginales estudiados en este trabajo.

Es notable destacar que se comprobó que la actividad antimicrobiana sinérgica reportada de estas cepas se mantuvo a través del tiempo, ya que en las formulaciones donde se estudió la combinación L23:L60 (F8', F9', F12 y F13), los halos de inhibición promedio de la mezcla superaron significativamente los valores promedio de las cepas por separado (Tabla 12).

En el año 2012, Mogna y col. evaluaron la efectividad de múltiples cepas de BAL para inhibir el crecimiento *in vitro* de 5 cepas de *E. coli*, incluyendo una cepa de *E. coli* O157:H7. En ese trabajo, los autores reportaron halos promedio de 4-6 mm, presentando valores máximos de 12 mm. Por otra parte, Verdenelli y col. (2014) comprobaron que cinco cepas de *Lactobacillus* contenidas en la marca comercial de óvulos Synbio® presentaban propiedades inhibitorias sobre el crecimiento de cepas patógenas utilizando el método de estrías cruzadas, con halos menores a 10 mm. En este trabajo de Tesis, los halos de inhibición reportados superaron ampliamente los informados por dichos autores.

Nuestros hallazgos no son comparables con los reportados por Bertuccini y col. (2017), Pessoa y col. (2017) y Prabhurajeshwar y Chandrakanth (2017) ya que dichos autores utilizaron técnicas distintas a la de esta Tesis para detectar la actividad antimicrobiana de lactobacilos. Sin embargo, Piyadeatsoontorn y col. (2019) y Pino y col. (2019) emplearon la técnica de gota, informando halos de inhibición de *E. coli* menores a los reportados en este trabajo. Este test es comparable con la técnica de estrías cruzadas ya que estudia los metabolitos totales liberados al medio de cultivo semisólido.

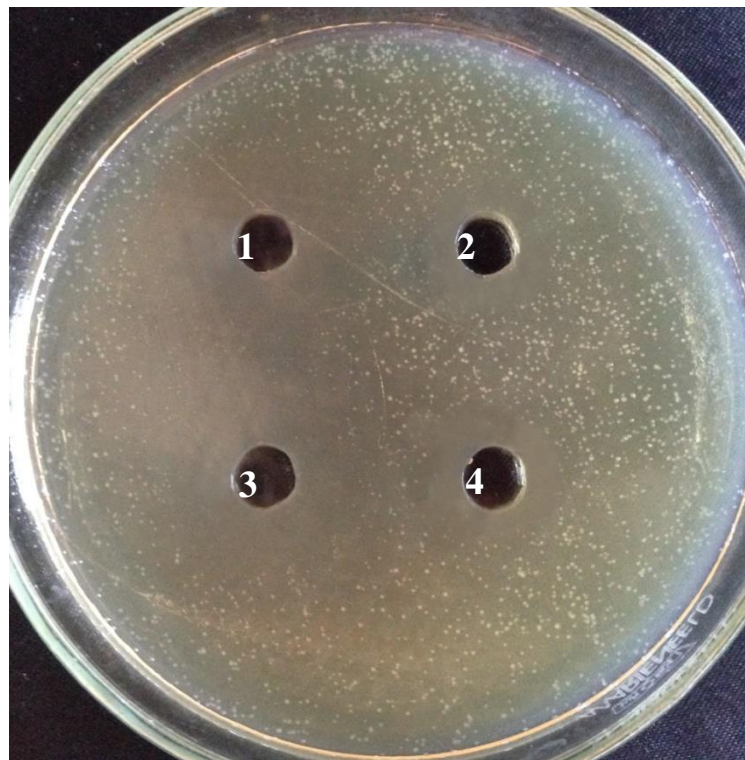
Como se expuso anteriormente, el grupo de investigación del laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo ha realizado numerosas investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de las cepas L23 y L60 frente a diversos agentes patógenos *in vitro* e *in vivo* (Pascual y col., 2008*a,b*, 2010; Ruíz y col., 2009, 2012, 2015; Asurmendi, 2010; García y col., 2015). A partir de los resultados obtenidos, puede afirmarse que ni el tiempo



ni la composición química de las formulaciones fueron factores que afectaran la capacidad de los lactobacilos de producir de sustancias antimicrobianas.

#### **4.8.3 Actividad antimicrobiana de los metabolitos producidos por los lactobacilos aislados de los óvulos vaginales por el método de difusión en pozos**

En algunas formulaciones farmacéuticas se ensayó una segunda técnica de detección de la actividad antimicrobiana, que detecta la presencia de metabolitos bioactivos liberados en los sobrenadantes libres de cultivo. Esta metodología permite distinguir qué porcentaje de la actividad antimicrobiana corresponde a cada metabolito bioactivo producido. Como fue expuesto anteriormente, *L. fermentum* L23 sintetiza ácidos orgánicos y la bacteriocina L23, mientras que *L. rhamnosus* L60 sintetiza ácidos orgánicos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la bacteriocina L60 (Figura 36).



**Figura 36.** Fotografía de la técnica de difusión en pozos para la detección de actividad antimicrobiana en placas de agar MRS

(1) SLC L23, (2) SLCN L23, (3) SLC L60, (4) SLCN L60. Colonias: cepa de *E. coli* sensible.

La Tabla 13 describe detalladamente el tamaño promedio de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* por el método de difusión en pozos, producidos

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

por el SLC y SLCN de las cepas L23 y L60 aislados de los óvulos con las formulaciones ensayadas. El tamaño de los halos de inhibición de los SLCN disminuye con respecto a sus respectivos SLC, ya que los neutralizados no presentan la actividad antimicrobiana debida a ácidos orgánicos.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****Tabla 13.** Actividad antimicrobiana de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aislados de óvulos vaginales sobre *E. coli* por el método de difusión en pozos

Tiempo (días)	Halos de inhibición del crecimiento Media (mm)											
	F1				F2				F3			
	L23		L60		L23		L60		L23		L60	
	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN
0	22,0 <sup>a</sup>	17,7 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>	17,5 <sup>a</sup>	22,8 <sup>a</sup>	18,5 <sup>a</sup>	23,0 <sup>a</sup>	19,7 <sup>a</sup>	23,3 <sup>a</sup>	16,3 <sup>a</sup>	23,7 <sup>a</sup>	19,7 <sup>a</sup>
30	22,6 <sup>a</sup>	18,0 <sup>a</sup>	23,0 <sup>a</sup>	18,3 <sup>a</sup>	24,7 <sup>a</sup>	18,6 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>	19,0 <sup>a</sup>	23,7 <sup>a</sup>	17,7 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>	18,0 <sup>a</sup>
60	23,0 <sup>a</sup>	18,7 <sup>a</sup>	22,7 <sup>a</sup>	18,7 <sup>a</sup>	25,3 <sup>a</sup>	21,3 <sup>a</sup>	23,7 <sup>a</sup>	18,3 <sup>a</sup>	21,7 <sup>a</sup>	18,3 <sup>a</sup>	23,7 <sup>a</sup>	20,7 <sup>a</sup>
90	-	-	-	-	22,3 <sup>a</sup>	18,0 <sup>a</sup>	23,7 <sup>a</sup>	17,3 <sup>a</sup>	21,0 <sup>a</sup>	16,0 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>	17,3 <sup>a</sup>
120	-	-	-	-	23,0 <sup>a</sup>	19,0 <sup>a</sup>	21,7 <sup>a</sup>	19,0 <sup>a</sup>	21,0 <sup>a</sup>	17,3 <sup>a</sup>	23,7 <sup>a</sup>	17,7 <sup>a</sup>
150	-	-	-	-	23,7 <sup>a</sup>	18,3 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>	20,0 <sup>a</sup>	23,3 <sup>a</sup>	18,7 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>	19,3 <sup>a</sup>
180	-	-	-	-	21,3 <sup>a</sup>	17,3 <sup>a</sup>	22,7 <sup>a</sup>	18,0 <sup>a</sup>	20,0 <sup>a</sup>	16,2 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>	17,7 <sup>a</sup>
<b>Promedio</b>	22,5	18,1	23,2	18,2	23,3	18,7	23,2	18,8	22,0	17,2	23,9	18,6

(-): Corresponde a los tiempos de almacenamiento donde no se recuperaron lactobacilos viables para realizar esta técnica. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Se realizó el análisis estadístico para los datos de una misma formulación y cepa a través del tiempo.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****Tabla 13 (continuación).** Actividad antimicrobiana de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aislados de óvulos vaginales sobre *E. coli* por el método de difusión en pozos

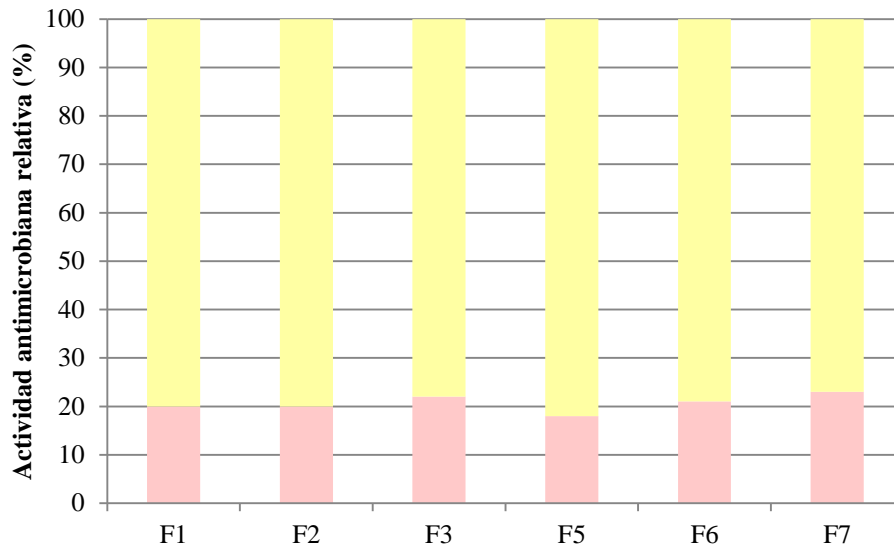
Tiempo (días)	Halos de inhibición del crecimiento Media (mm)											
	F5				F6				F7			
	L23		L60		L23		L60		L23		L60	
	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN
0	26,3 <sup>a</sup>	21,7 <sup>a</sup>	32,0 <sup>a</sup>	23,0 <sup>ab</sup>	28,3 <sup>a</sup>	22,7 <sup>ab</sup>	29,3 <sup>ab</sup>	20,7 <sup>abc</sup>	28,0 <sup>ab</sup>	20,3 <sup>a</sup>	28,3 <sup>a</sup>	20,3 <sup>a</sup>
30	29,3 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>	31,0 <sup>ab</sup>	21,0 <sup>a</sup>	27,3 <sup>a</sup>	22,3 <sup>b</sup>	30,7 <sup>ab</sup>	21,3 <sup>abc</sup>	27,7 <sup>ab</sup>	20,7 <sup>a</sup>	29,0 <sup>a</sup>	20,7 <sup>a</sup>
60	28,7 <sup>a</sup>	23,7 <sup>a</sup>	26,7 <sup>ab</sup>	21,0 <sup>a</sup>	22,0 <sup>b</sup>	17,7 <sup>d</sup>	26,3 <sup>a</sup>	19,0 <sup>a</sup>	29,3 <sup>ab</sup>	22,0 <sup>ab</sup>	27,0 <sup>a</sup>	21,7 <sup>a</sup>
90	27,3 <sup>a</sup>	22,3 <sup>a</sup>	30,7 <sup>ab</sup>	26,7 <sup>b</sup>	29,3 <sup>a</sup>	24,0 <sup>b</sup>	30,3 <sup>ab</sup>	26,0 <sup>d</sup>	31,0 <sup>ab</sup>	24,3 <sup>ab</sup>	31,0 <sup>a</sup>	24,3 <sup>a</sup>
120	29,0 <sup>a</sup>	23,7 <sup>a</sup>	30,7 <sup>ab</sup>	26,7 <sup>b</sup>	27,0 <sup>a</sup>	19,0 <sup>cd</sup>	31,0 <sup>ab</sup>	23,7 <sup>cd</sup>	28,7 <sup>ab</sup>	21,7 <sup>a</sup>	28,7 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>
150	26,0 <sup>a</sup>	22,3 <sup>a</sup>	25,7 <sup>b</sup>	20,0 <sup>a</sup>	29,0 <sup>a</sup>	21,7 <sup>bc</sup>	28,0 <sup>ab</sup>	19,7 <sup>ab</sup>	27,0 <sup>b</sup>	21,7 <sup>a</sup>	28,0 <sup>a</sup>	21,0 <sup>a</sup>
180	28,3 <sup>a</sup>	23,0 <sup>a</sup>	29,7 <sup>ab</sup>	23,7 <sup>ab</sup>	28,3 <sup>a</sup>	22,3 <sup>b</sup>	32,3 <sup>b</sup>	26,7 <sup>d</sup>	32,3 <sup>a</sup>	26,3 <sup>b</sup>	29,0 <sup>a</sup>	21,7 <sup>a</sup>
210	30,7 <sup>a</sup>	24,0 <sup>a</sup>	30,3 <sup>ab</sup>	24,7 <sup>ab</sup>	31,0 <sup>a</sup>	25,3 <sup>a</sup>	29,7 <sup>ab</sup>	23,3 <sup>bcd</sup>	-	-	27,0 <sup>a</sup>	21,3 <sup>a</sup>
240	-	-	27,3 <sup>ab</sup>	22,0 <sup>ab</sup>	-	-	29,3 <sup>ab</sup>	20,7 <sup>abc</sup>	-	-	30,0 <sup>a</sup>	22,7 <sup>a</sup>
270	-	-	-	-	-	-	28,0 <sup>ab</sup>	20,7 <sup>abc</sup>	-	-	-	-
<b>Promedio</b>	28,3	23,1	29,3	23,2	27,8	21,9	29,5	22,2	29,1	22,4	28,7	22,0

(-): Corresponde a los tiempos de almacenamiento donde no se recuperaron lactobacilos viables para realizar esta técnica. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Se realizó el análisis estadístico para los datos de una misma formulación y cepa a través del tiempo.

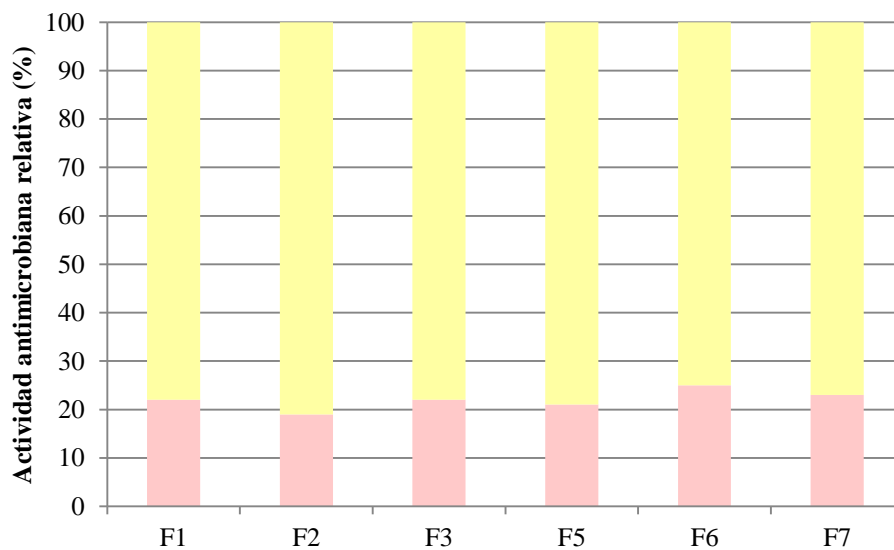
Utilizando el método de difusión en pozos, los halos de inhibición promedios obtenidos empleando el SLC y el SLCN de la cepa L23 fueron de 25,5 mm y 20,2 mm, respectivamente. En esta cepa, se destacan halos de inhibición entre 30,7 mm y 32,3 mm. La actividad antimicrobiana del SLC de L23 es debida a los ácidos orgánicos y a la bacteriocina L23, mientras que la del SLCN es debido sólo a acción de su bacteriocina. Con la cepa L60, los sobrenadantes puro y neutralizado presentaron valores promedio de 26,3 mm y 20,5 mm de inhibición, respectivamente. Para esta cepa, se destacaron halos de inhibición de entre 30,3 mm y 32,3 mm. En este caso, el SLC contiene ácidos orgánicos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la bacteriocina L60, mientras que el SLCN contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la bacteriocina. En trabajos previos realizados por el grupo de investigación se comprobó que el porcentaje de actividad antimicrobiana producida por la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es pequeña (menor al 10%), por lo que se considera que la mayor actividad inhibitoria del sobrenadante neutralizado de la cepa L60 es debida a la actividad de la bacteriocina.

El tamaño de los halos de inhibición de los sobrenadantes informados en este estudio es superior a los encontrados en diversos trabajos de investigación de otros autores. Coman y col. (2014) reportaron halos de inhibición de *E. coli* entre 16-17 mm utilizando el SLC de una mezcla de lactobacilos probióticos comercializada en óvulos vaginales, y de 10-14 mm con las cepas por separado. De manera similar, en el trabajo realizado por Leccese Terraf y col. (2017) los halos de inhibición del crecimiento de dos cepas de *E. coli* producidos por otros lactobacilos probióticos no superaron un tamaño de 10 mm. Los resultados de este trabajo de Tesis coinciden con los reportados por Saadatzaheh y col. (2013), donde los autores informan tamaños de halos de inhibición del crecimiento bacteriano similares.

El efecto inhibitorio debido a la actividad de las bacteriocinas de cada cepa de lactobacilos contenida en las formulaciones farmacéuticas osciló entre el 75% y 82% del total de la actividad antimicrobiana (Figuras 37 y 38), demostrando que la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por los lactobacilos no fue afectada por las distintas formulaciones.



**Figura 37.** Actividad antimicrobiana relativa promedio de los metabolitos bioactivos producidos por la cepa *L. fermentum* L23 en cada formulación farmacéutica  
Ácidos orgánicos (■), bacteriocina L23 (■).



**Figura 38.** Actividad antimicrobiana relativa promedio de los metabolitos bioactivos producidos por la cepa *L. rhamnosus* L60 en cada formulación farmacéutica  
Ácidos orgánicos (■), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + bacteriocina L60 (■).

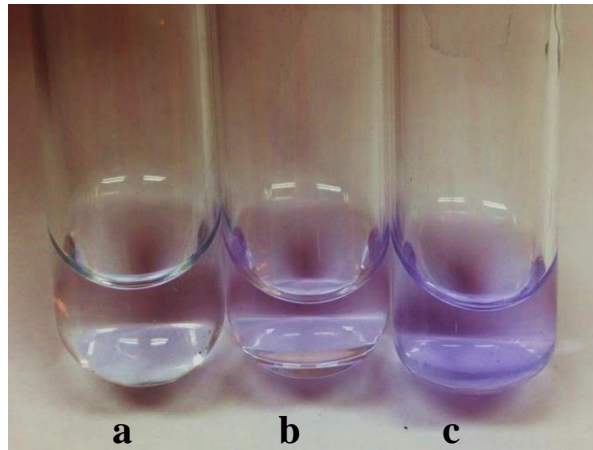
Los resultados de Kaewnopparat y col. (2013) se asemejan a los hallados en este trabajo de Tesis, pero es importante resaltar que la actividad antimicrobiana detectada por estos autores es muy inferior a la informada para las cepas L23 y L60.

Si bien las bacteriocinas L23 y L60 fueron los principales metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana producida por las cepas de lactobacilos, cabe destacar que existen limitados trabajos de investigación que describan lactobacilos contenidos en óvulos vaginales que posean la propiedad de producir sustancias inhibitorias del tipo bacteriocinas (Fuochi y col., 2019). Por lo general, en la bibliografía se encuentran trabajos que reportan actividad antimicrobiana debida sólo a ácidos orgánicos, con ausencia de actividad inhibitoria tipo bacteriocina (Lin y col., 2006; Saadatzaheh y col., 2013; Siroli y col., 2017).

Los resultados obtenidos al procesar las distintas formulaciones confirman lo hallado en las experiencias previas realizadas por el grupo de investigación en el estudio de la actividad antimicrobiana de los distintos metabolitos secundarios de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60. En este estudio se comprobó que ambas cepas de lactobacilos mantuvieron su actividad antimicrobiana en los óvulos vaginales durante los meses en que se desarrolló este estudio. Esta actividad inhibitoria se debió principalmente a la acción de las bacteriocinas de cada cepa. Los lactobacilos en los óvulos siguieron manteniendo sus propiedades antagonistas independientemente del tiempo, recuento y la composición química de las formulaciones. Esta importante propiedad antimicrobiana de las cepas probióticas en estudio resalta su potencial aplicación en posibles casos de infecciones vaginales recurrentes en Argentina.

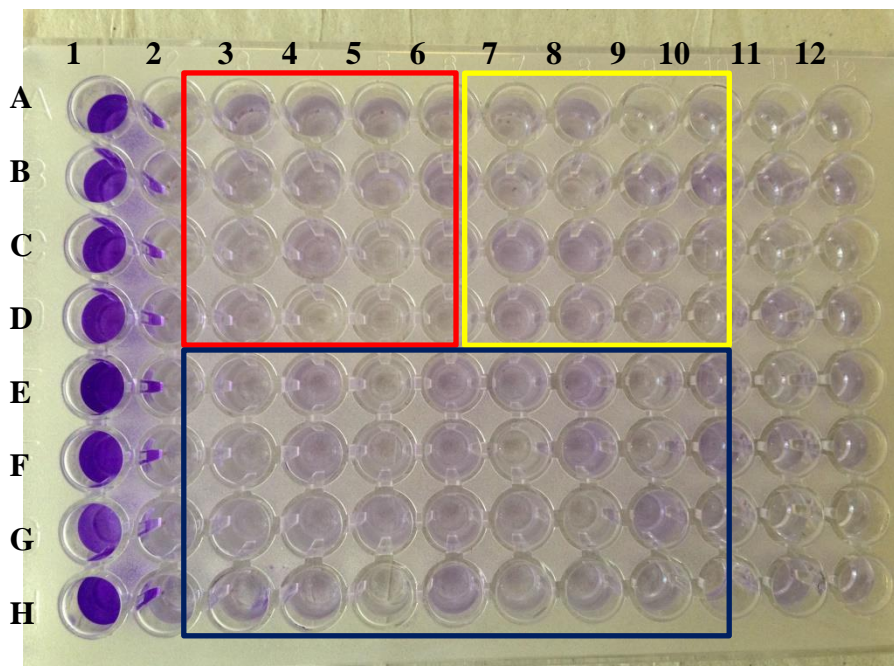
#### **4.8.4 Inhibición de la formación de biofilm producido por *Staphylococcus aureus* y SGB por los metabolitos bioactivos de las cepas de lactobacilos**

La capacidad de *S. aureus* y SGB de producir biofilm está íntimamente relacionada con su patogenicidad (Parker y col., 2016; Azara y col., 2017). Formular un bioproducto con microorganismos probióticos que además de presentar las propiedades antagonistas de coagregación y actividad antimicrobiana sean capaces de inhibir la producción de este factor de virulencia, podría contribuir a una acción bioterapéutica efectiva para el tratamiento de infecciones por cepas patógenas productoras de biofilm. Por este motivo, se estudió el efecto anti biofilm de los sobrenadantes de cultivo de los lactobacilos contenidos en los óvulos a través del tiempo. Todos los sobrenadantes (puros y neutralizados) de las cepas presentaron actividad antibiofilm *in vitro* por la técnica en tubo y en microplaca (Figuras 39 y 40).



**Figura 39.** Inhibición de la formación de biofilm de SGB por los sobrenadantes de *Lactobacillus fermentum* L23 aislado de los óvulos por la técnica en tubo

(a) SLC L23, (b) SLCN L23, (c) control positivo.



**Figura 40.** Inhibición de la formación de biofilm de SGB y *Staphylococcus aureus* por los sobrenadantes de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aislados de los óvulos por la técnica en microplaca

Controles positivos: 1 (A, B, E y F: *S. aureus*; C, D, G y H: SGB), controles negativos: 2, 11 y 12, SLC L23: 3(A-H) y 7(A-D), SLCN L23: 4(A-H) y 8(A-D), SLC L60: 5(A-H) y 9(A-D), SLCN L60: 6(A-H) y 10(A-D), SLC de la mezcla L23:L60: 7(E-H) y 8(E-H), SLCN de la mezcla L23:L60: 9(E-H) y 10(E-H). F8 (■), F9 (■), F12 (■).



**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Como puede evidenciarse macroscópicamente, las cepas de *S. aureus* y SGB estudiadas en este trabajo fueron altamente productoras de biofilm (Figura 39c y 40 calle 1), propiedad que se vio fuertemente inhibida cuando estos microorganismos fueron enfrentados a los sobrenadantes de las cepas *L. fermentum* y *L. rhamnosus* (Figura 39a y 40 calles 3 a 10) aislados de las formulaciones farmacéuticas en estudio. Los resultados de la cuantificación de esta actividad inhibitoria mediante la técnica en tubo se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Inhibición de la producción de biofilm de SGB y *Staphylococcus aureus* por los sobrenadantes libres de células de los lactobacilos contenidos en los óvulos por el método en tubo

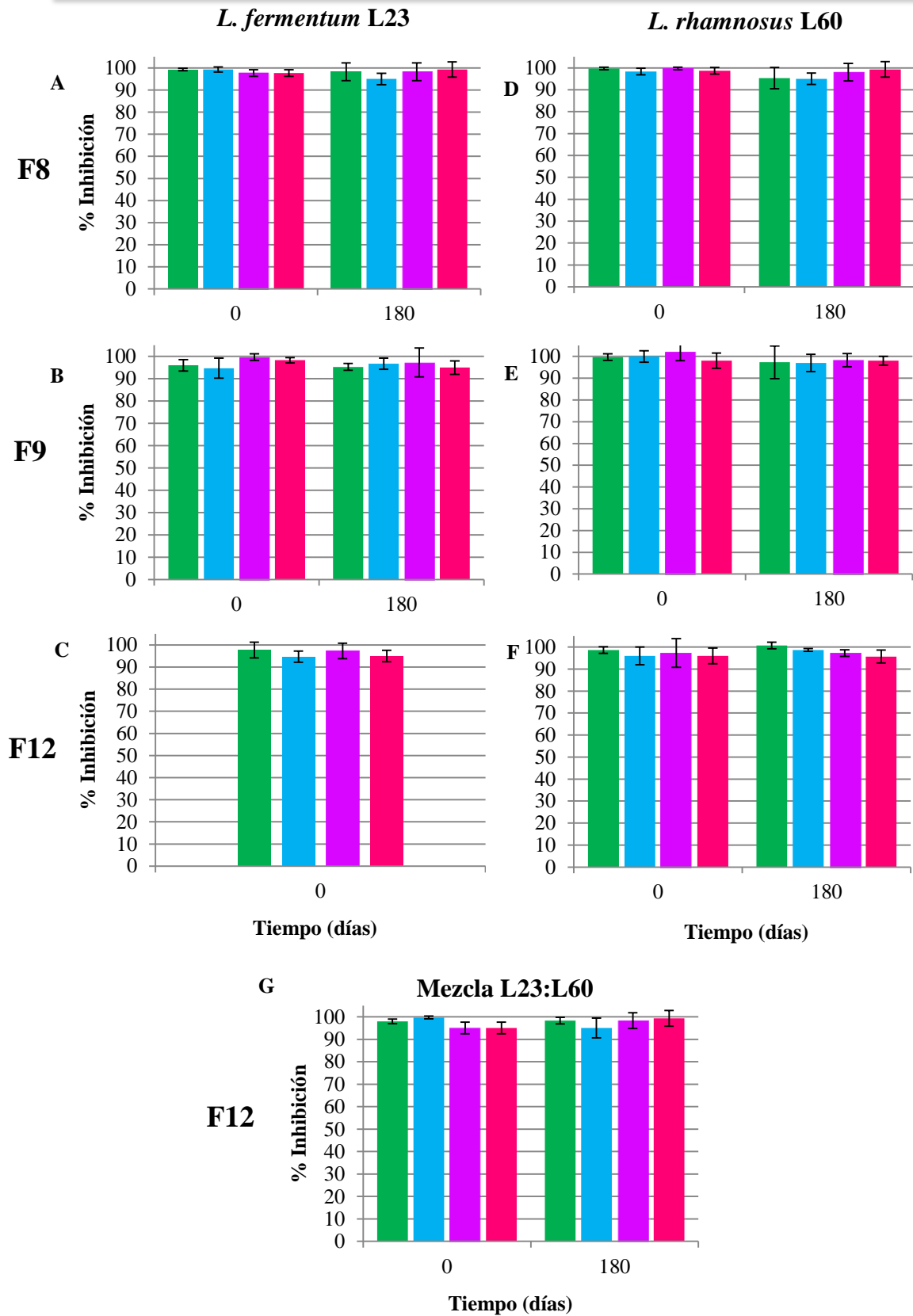
Formulación		Inhibición de la formación de biofilm (%)								
		Tiempo (días)	L23				L60			
			SGB		<i>S. aureus</i>		SGB		<i>S. aureus</i>	
			SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN	SLC	SLCN
F5	0	58	49	67	52	70	61	63	60	
	90	76	68	77	69	77	71	69	67	
	180	77	55	64	62	80	73	80	69	
F6	0	73	70	55	49	69	64	58	49	
	90	74	67	60	51	72	60	70	65	
	180	73	62	70	66	70	61	76	68	
	270	-	-	-	-	77	69	69	65	
F7	0	57	40	69	60	66	59	72	62	
	90	80	67	69	65	60	51	67	52	
	180	76	68	70	63	61	54	74	67	

(-): Corresponde a los tiempos de almacenamiento donde no se recuperaron lactobacilos viables para realizar esta técnica.

Mediante esta técnica, los metabolitos bioactivos liberados en los sobrenadantes de

cultivo de los lactobacilos aislados de los óvulos fueron capaces de inhibir la formación de biofilm por las cepas patógenas indicadoras, donde los valores de inhibición oscilaron entre 49% y 80%. Estos resultados son comparables a los reportados por Merghni y col. (2017), quienes utilizando metabolitos bioactivos de *L. casei* reportaron porcentajes de inhibición similares sobre *S. aureus*. Las diferencias entre la producción/inhibición de biofilm de cada experimento utilizando las mismas cepas están relacionadas con el inóculo inicial del cultivo del microorganismo patógeno que puede variar ligeramente, lo cual coincide con lo reportado por Terraf y col. (2012). Es de destacar que en el presente ensayo la actividad antibiofilm se debió principalmente a la acción de los compuestos inhibitorios bioactivos presentes en los SLCN de L23 y L60, ya que fue responsable del 70% al 96% del total de la actividad inhibitoria. Posteriormente, se realizó una modificación de la técnica de producción de biofilm de SGB y *S. aureus*, cuyos resultados se observan en la Figura 41.

A partir de estos hallazgos fue posible poner en evidencia que los metabolitos bioactivos liberados en los sobrenadantes de cultivo de los lactobacilos fueron capaces de inhibir totalmente la formación de biofilm por las cepas patógenas indicadoras, ya que en todos los casos los porcentajes de inhibición se encontraron en un rango comprendido entre el 94% y el 100%. Además, fue posible demostrar que cuando los sobrenadantes fueron neutralizados, se mantuvo casi inalterada la propiedad inhibitoria de la formación de biofilm. Existen trabajos de investigación que atribuyen esta propiedad a ácidos lipoteicoicos de lactobacilos (Ahn y col., 2018a,b).



**Figura 41.** Inhibición de la producción de biofilm de SGB y *S. aureus* por los sobrenadantes libres de células de los lactobacilos aislados de los óvulos  
 SLC + SGB (■), SLCN + SGB (■), SLC + *S. aureus* (■) y SLCN + *S. aureus* (■).

Ait Ouali y col. (2014) informaron resultados de inhibición de la producción de biofilm de microorganismos patógenos similares a los obtenidos en este trabajo pero utilizando otras especies de *Lactobacillus*. En su trabajo de investigación, Kang y col., (2017) también reportaron una alta actividad anti-biofilm de lactobacilos sobre el mismo microorganismo patógeno. Existen publicaciones científicas en las que fue evaluada la actividad anti-biofilm de *Lactobacillus* spp. sobre otros microorganismos, como por ejemplo otras especies del género *Streptococcus* y *Listeria* spp. (Ait Ouali y col., 2014; Melo y col., 2016, Ciandrini y col., 2017; Lin y col., 2017; Todorov y col., 2018). Asimismo, Chung y col (2004) y Söderling y col. (2011) demostraron actividad antibiofilm sobre *S. mutans* en otro nicho ecológico utilizando otras cepas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus*, respectivamente.

Es de destacar la importancia que implica seleccionar cepas probióticas para ser incluidas en una formulación vaginal que sean capaces de competir y/o desplazar a los microorganismos causantes de enfermedades genitales (Prabhurajeshwar y Chandrakanth, 2017). Los metabolitos bioactivos de las cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 demostraron inhibir en su totalidad la producción de biofilm de los agentes patógenos en estudio.

Finalmente, el mantenimiento del conjunto de propiedades probióticas y benéficas de las cepas de lactobacilos son características esperadas del producto final. La autoagregación e hidrofobicidad de superficie son propiedades directamente relacionadas a la adherencia de los lactobacilos al epitelio del huésped, mientras que la actividad antimicrobiana, coagregación e inhibición de la producción de biofilm por microorganismos patógenos contribuyen a la competencia por el nicho vaginal y a una acción protectora y bioterapéutica de estas cepas probióticas (Pan y col., 2017; Prabhurajeshwar y Chandrakanth, 2017). A partir de los resultados obtenidos, se comprobó que las cepas fueron capaces de mantener estas propiedades en todas las formulaciones a través del tiempo de almacenamiento.

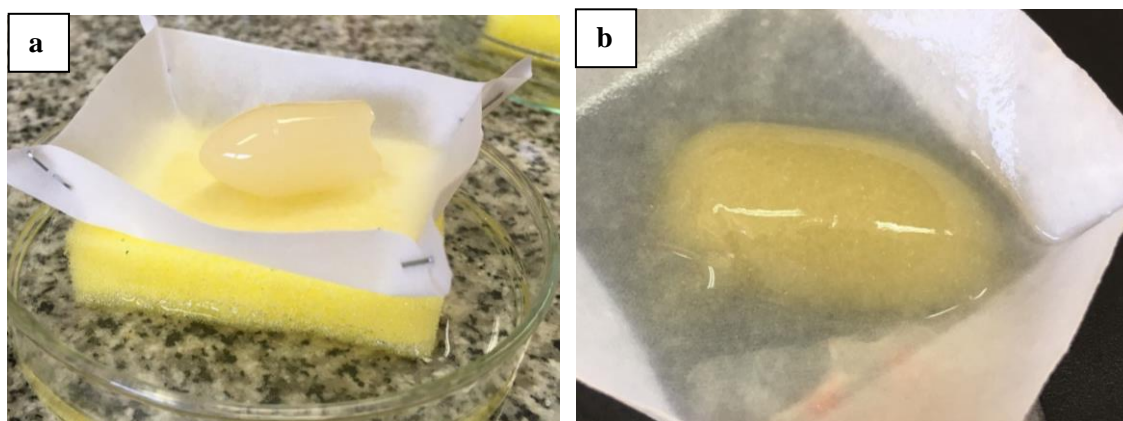
#### **4.9 Propiedades físico-químicas de los formulados farmacéuticos utilizando fluido vaginal simulado**

El estudio de las propiedades físico-químicas de los óvulos con distintas formulaciones utilizando FVS como diluyente es un aspecto muy relevante a tener en

cuenta para seleccionar una composición farmacéutica. Esto permitiría investigar presuntivamente el potencial de los óvulos para hidratarse y liberar los lactobacilos contenidos en ellos, imitando bajo condiciones *in vitro* el microambiente vaginal de una mujer sana (Vitali y col., 2016; Sanz y col., 2018).

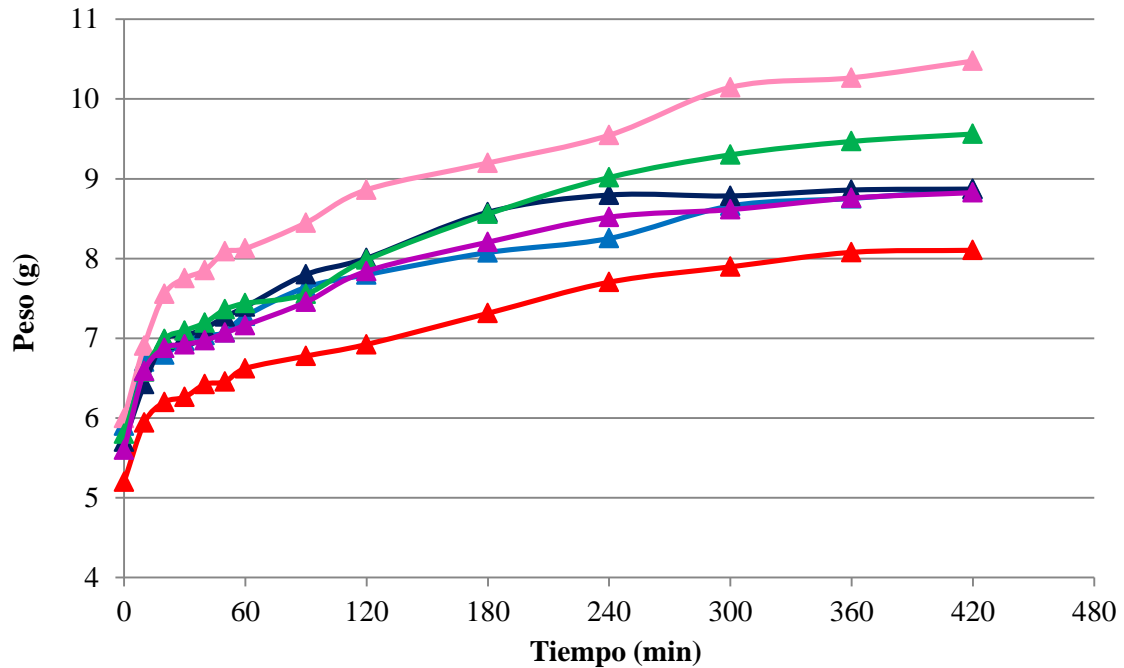
#### 4.9.1 Cuantificación de la absorción de agua de los óvulos vaginales

A medida que transcurrió el tiempo del ensayo, se observó tanto el aumento de tamaño como el cambio en la consistencia de los óvulos, debido a la absorción de agua a partir del fluido vaginal simulado (Figura 42). El peso de los óvulos analizados a cada tiempo y los perfiles de absorción de agua de las formulaciones farmacéuticas seleccionadas para este experimento se presentan en la Figura 43 y 44, respectivamente.



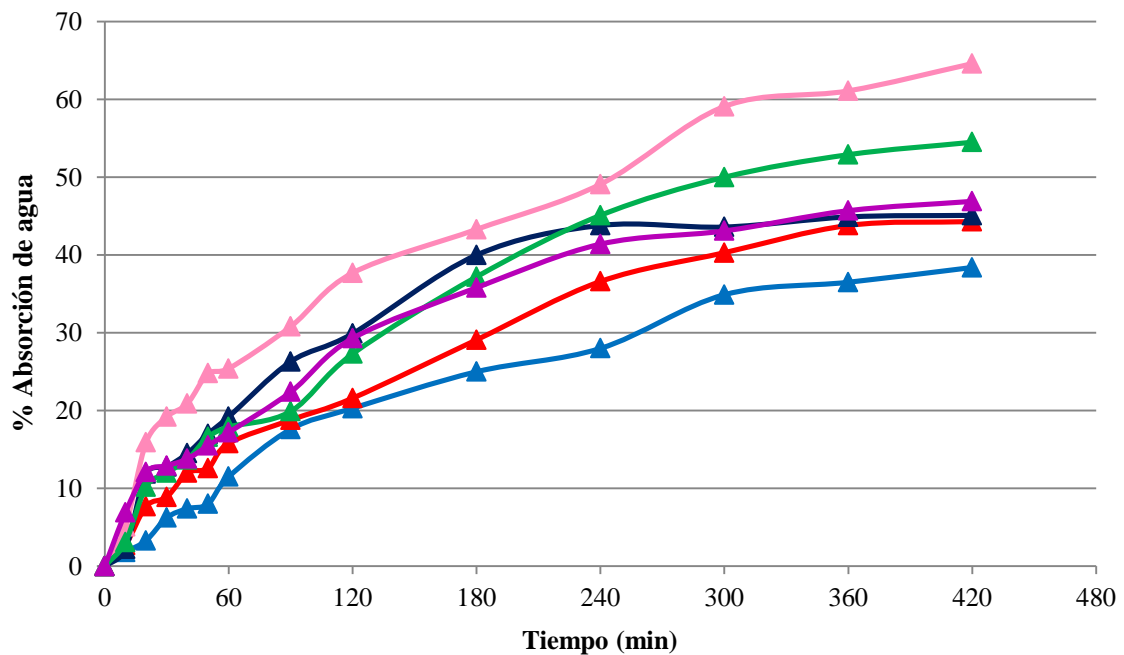
**Figura 42.** Óvulo vaginal sometido al ensayo de absorción de agua

(a) Sistema experimental al iniciar el ensayo, (b) óvulo vaginal con un 20 % de absorción de agua.



**Figura 43.** Variación en el peso de los óvulos en el ensayo de absorción de agua

F5 (▲), F6 (▲), F8 (▲), F9 (▲), F11 (▲) y F13 (▲).



**Figura 44.** Perfil de absorción de agua de las formulaciones farmacéuticas

F5 (▲), F6 (▲), F8 (▲), F9 (▲), F11 (▲) y F13 (▲).

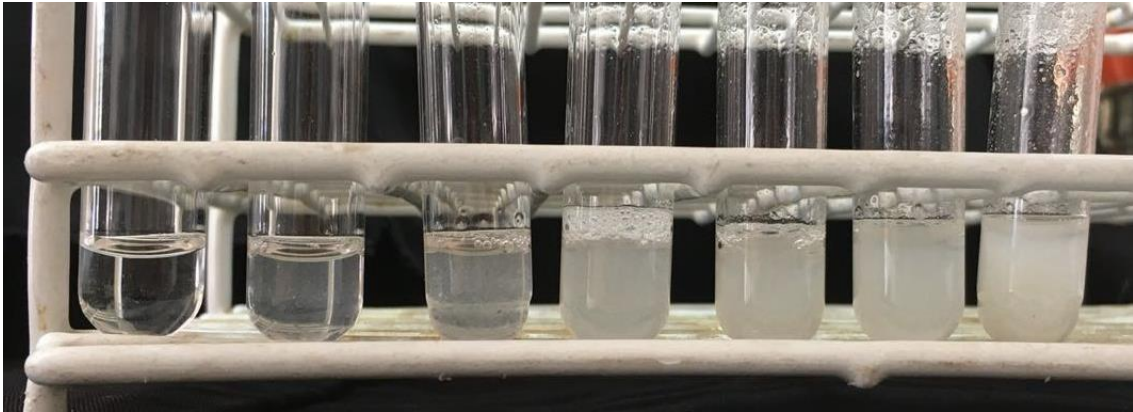
La propiedad físico-química de absorción de agua de los óvulos fue afectada por la composición de las formulaciones. La formulación farmacéutica F5 fue la que menos porcentaje de absorción de agua presentó, con un máximo registrado de 38% a las 8 h. Este

resultado fue previsible debido al bajo contenido de ingredientes en su composición, ya que sólo contenía componentes base (gelatina y glicerina) (Kale y col., 2005). A esta formulación le siguió la F6, que contenía leche y lactosa como excipientes, exhibiendo un máximo de absorción de 44% (Anexo). Por otra parte, el resto de las formulaciones presentó un porcentaje de absorción de agua máximo comprendido entre 44% y 64%, donde la F9 fue la que mayor valor registró en el tiempo que duró la experiencia. A través del tiempo, se observó que la F9 rápidamente absorbió hasta un 16% de agua en los primeros 20 min, manteniéndose por encima de las demás a todo lo largo de la experiencia y probablemente debido al alto porcentaje de ácido ascórbico que contenía, resultado que coincide con el estudio de Vitali y col. (2016). Las formulaciones F8 y F13 (conteniendo ácido ascórbico en menor proporción), mantuvieron un comportamiento similar a lo largo de las 8 h, seguidos por la F11 que si bien no contenía ácido ascórbico, presentaba alto porcentaje de manitol. En conclusión, la presencia de leche y lactosa en conjunto con ácido ascórbico al 2% (F9) o manitol al 4% (F11) fueron las condiciones que permitieron una mayor absorción de agua en el tiempo. De estas dos formulaciones, la F9 fue aquella que más rápidamente absorbió el agua del fluido vaginal simulado ( $p < 0,05$ ).

La capacidad de hidratación en FVS estuvo influenciada por la composición química de los óvulos vaginales, donde la entrada de agua en la estructura provocó un aumento de peso y volumen. La velocidad de absorción de agua de una formulación farmacéutica adquiriría importancia en condiciones *in vivo*, debido a que aseguraría una rápida adaptación al fluido vaginal y consecuente fluidificación de la formulación farmacéutica (Vitali y col., 2016; Sánchez y col., 2018).

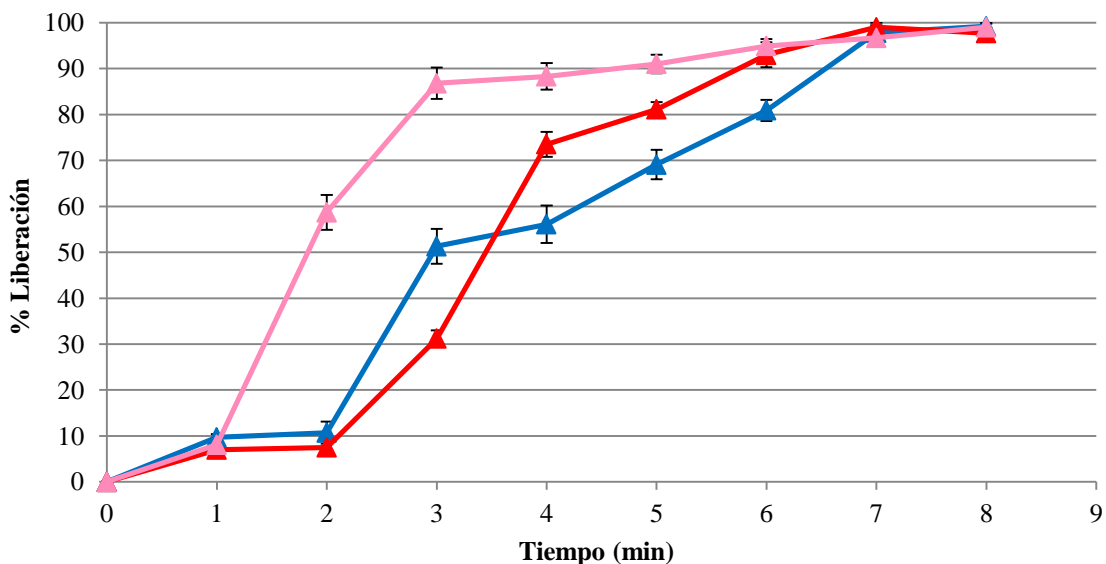
#### **4.9.2 Liberación *in vitro* de lactobacilos en los óvulos de las distintas formulaciones farmacéuticas**

Los resultados obtenidos en los ensayos previos permitieron seleccionar a la F5 como control sin excipientes y a F6 y F9 como formulaciones problema para este experimento. A medida que transcurrió el tiempo de incubación de los óvulos en FVS a 37°C, se observó un aumento progresivo de la turbidez de los tubos conteniendo las muestras (Figura 45). Los resultados del análisis del perfil de liberación de las células bacterianas se presenta en la Figura 46.



**Figura 45.** Muestras del ensayo de liberación *in vitro* de lactobacilos en fluido vaginal simulado de la formulación F9

De izquierda a derecha: 0 min, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min.



**Figura 46.** Liberación *in vitro* de la mezcla de lactobacilos contenidos en los óvulos al fluido vaginal simulado

F5 (▲), F6 (▲) y F9 (▲).

De las tres formulaciones estudiadas, la F9 fue la que liberó más rápidamente a los lactobacilos, ya que alcanzó un porcentaje de 58% de liberación en tan sólo 2 min de incubación y un 87% a los 3 min. Pasado este tiempo, la liberación se volvió más lenta y sostenida hasta los 8 min que duró el ensayo. A diferencia de esto, tanto la formulación F5 como la F6 liberaron los lactobacilos de manera más paulatina a través del tiempo. A los 3 min, se alcanzaron valores de 51% y 30% de liberación en la F5 y F6, respectivamente. En

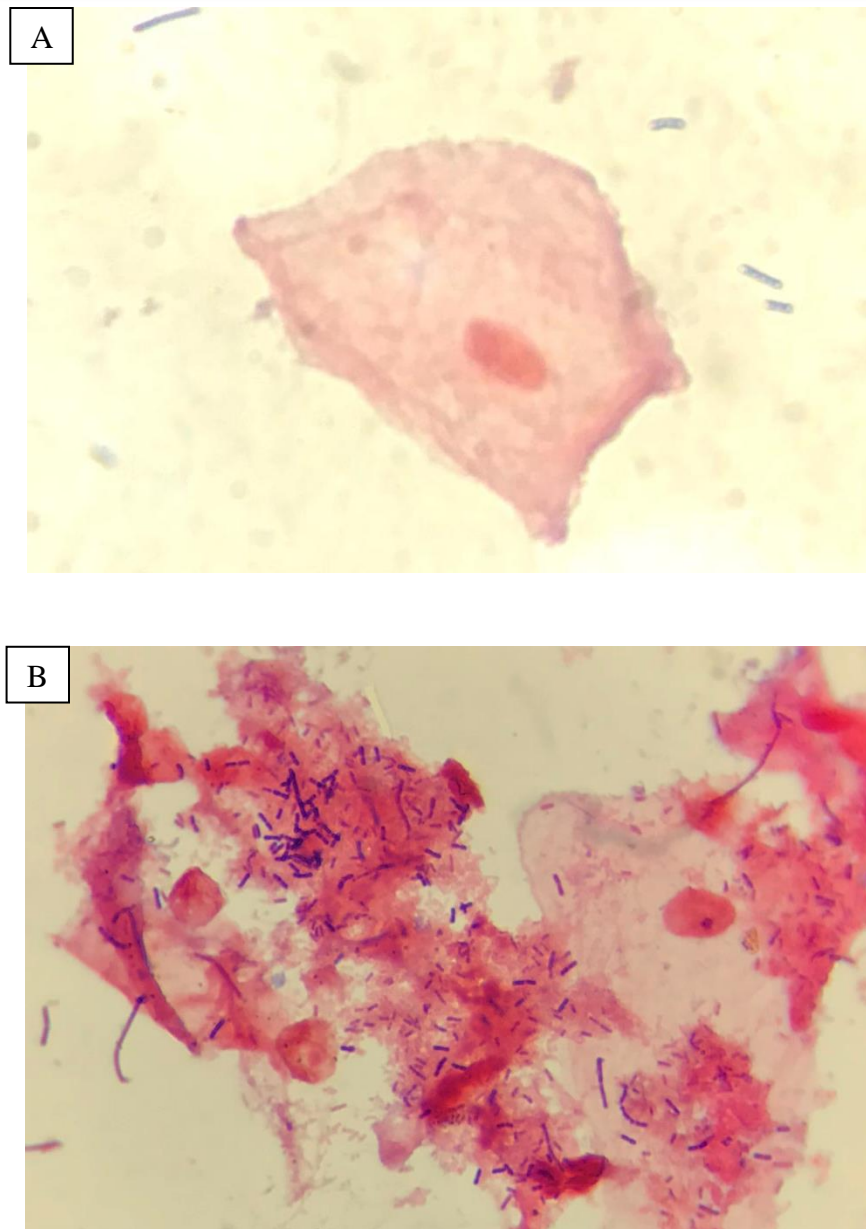


los tres casos, se logró la liberación total de la mezcla de las cepas a los 7 min.

La aplicación de un producto biofarmacéutico como estrategia terapéutica se puede delinear con distintas formas de dosificación. La dosificación elegida puede variar desde una administración periódica del medicamento o bien una única dosis, de acuerdo a si se desea una rápida liberación de los lactobacilos o bien una liberación sostenida en el tiempo, respectivamente. De acuerdo a estos objetivos, en la bibliografía se encuentran distintos tipos de formulados. Algunos de ellos presentan formulaciones de liberación rápida (Sánchez y col., 2018) otros de liberación prolongada utilizando polímeros retardantes (Vitali y col., 2016) y otros una combinación de ambos (Sánchez y col., 2018). En este trabajo de Tesis, se estudiaron óvulos vaginales de rápida hidratación y liberación de su contenido, donde los estudios de absorción de agua y liberación del principio activo cobran importancia para todos los tipos de tratamientos deseados o formulación diseñada. Estos ensayos permitirían predecir posibles comportamientos cuando sean administrados en mujeres sexualmente activas. De esta forma, se podría optar por obtener un tratamiento para la prevención de las infecciones vaginales agudas y recurrentes o bien para el tratamiento de las mismas.

#### **4.10 Inhibición *in situ* de la adherencia de bacterias patógenas a células del epitelio vaginal por los lactobacilos**

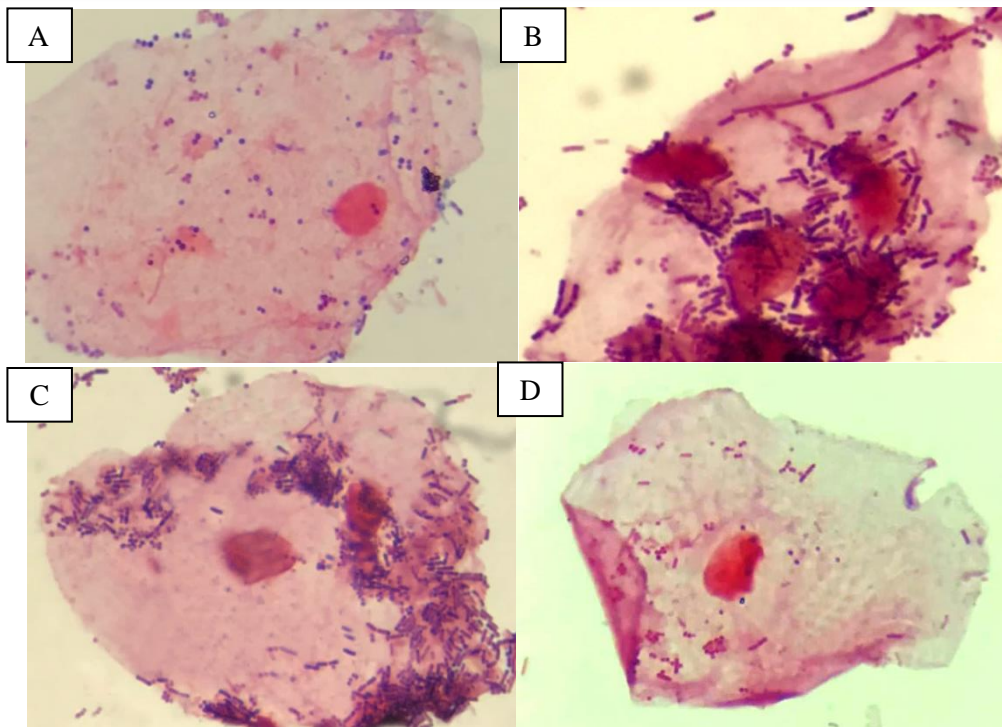
A partir de los ensayos realizados a lo largo de esta Tesis, se seleccionó como formulación final para los subsiguientes estudios a la F9', conteniendo lactobacilos liofilizados con leche y lactosa, y además leche, lactosa y ácido ascórbico como excipientes del producto biofarmacéutico. De este modo, para realizar los estudios *in situ* utilizando células epiteliales vaginales en suspensión se emplearon óvulos de la F9' conteniendo la mezcla L23:L60, de manera de evidenciar si las cepas de lactobacilos mantenían sus propiedades de adherencia (Figura 47) y competencia por los receptores epiteliales con microorganismos patógenos del nicho vaginal.



**Figura 47.** Adherencia de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 aislados de la F9' a células epiteliales vaginales

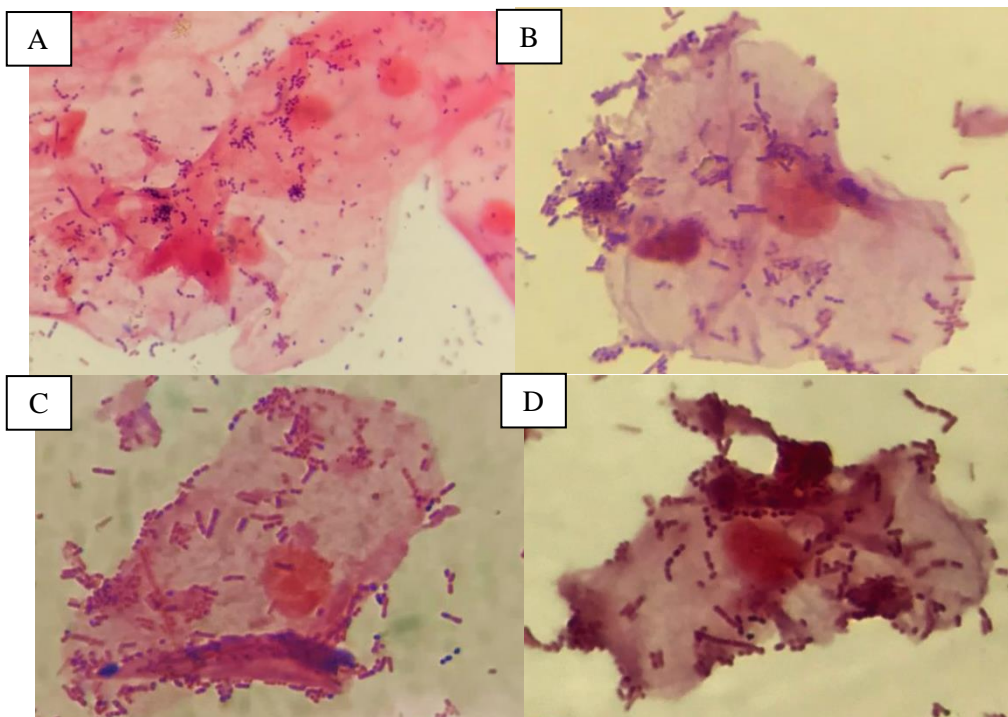
(A) Control, (B) células vaginales + *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60.

En las Figuras 48 y 49 se presentan las fotografías obtenidas de los ensayos de antagonismo de los lactobacilos sobre la adherencia de *S. aureus* y SGB, respectivamente.



**Figura 48.** Inhibición de la adherencia de *S. aureus* a células epiteliales vaginales por la mezcla de lactobacilos aislados de la Formulación 9'

(A) control positivo, (B) exclusión, (C) competencia, (D) desplazamiento.

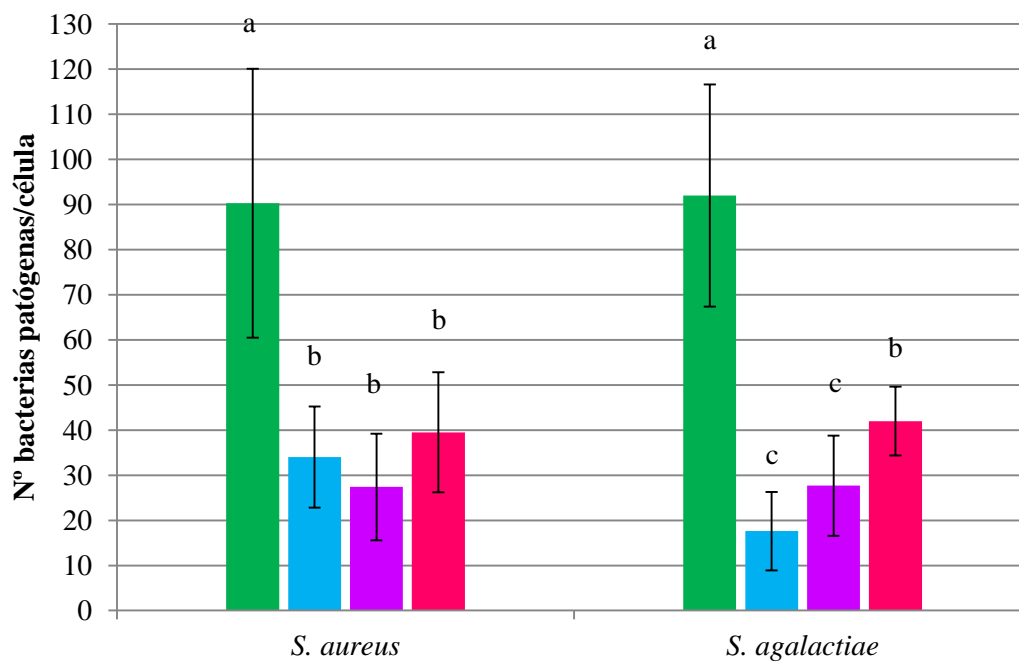


**Figura 49** Inhibición de la adherencia de SGB a células epiteliales vaginales por la mezcla de lactobacilos aislados de la Formulación 9'

(A) control positivo, (B) exclusión, (C) competencia, (D) desplazamiento.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Figura 50 se presentan los resultados del recuento de microorganismos adheridos a las células de los ensayos de exclusión, competencia y desplazamiento de cepas de *S. aureus* y SGB por la mezcla de lactobacilos aislados de la F9'. En los tres tratamientos, se evidenció una importante disminución en el número de células de *S. aureus* y de SGB adheridas a las células vaginales en suspensión con respecto al control. La mezcla de lactobacilos aislados de la F9' demostró ser capaz de ejercer un efecto inhibitorio sobre la adherencia de las bacterias patógenas indicadoras utilizadas en este ensayo. Dicho efecto antagonista fue transformado a porcentaje de inhibición de la adhesión, donde *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 presentaron una marcada capacidad de exclusión, competencia y desplazamiento de *S. aureus*, correspondiendo al 62%, 70% y del 56%, respectivamente. Por otra parte, la inhibición *in situ* de la adherencia de SGB mediante exclusión, competencia y desplazamiento por las cepas probióticas aisladas de la F9' fue del 81%, 70% y 54%, respectivamente (Figura 50).



**Figura 50.** Inhibición *in situ* de la adherencia de *S. aureus* y SGB a células epiteliales vaginales por la mezcla de lactobacilos aislados de la Formulación 9'

(■) control positivo, (■) exclusión, (■) competencia, (■) desplazamiento. Medias con una letra diferente poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Se demostró que estas tres propiedades antagonistas no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el caso de *S. aureus*, aunque el desplazamiento de las

células de SGB fue menos acentuado que la exclusión y competencia. Esto se dedujo ya que el porcentaje de disminución de la adhesión de SGB a las células epiteliales por desplazamiento fue menor que en los ensayos de exclusión y competencia. Sin embargo, esta disminución aún presentaba diferencias estadísticamente significativas con el control positivo, por lo que fue posible demostrar que las tres propiedades relacionadas a la inhibición de la adhesión estudiadas fueron mantenidas por las cepas probióticas ( $p > 0,05$ ).

Se ha propuesto que la colonización por los lactobacilos de las células vaginales del huésped tiene gran relevancia en dos aspectos: tanto para el antagonismo contra los agentes patógenos oportunistas como también para la modulación activa del sistema inmunitario (Surendran y col., 2017).

En trabajos previos realizados por el grupo de trabajo de Bacteriología, fue posible demostrar el antagonismo de las cepas L23 y L60 sobre microorganismos patógenos como *G. vaginalis*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, *Candida* spp., entre muchos otros. Si bien existen numerosos trabajos de investigación evaluando el antagonismo *in situ* de cepas de lactobacilos sobre tales microorganismos patógenos, hay escasa evidencia científica del efecto inhibitorio de la adhesión de bacterias como SGB y *S. aureus*, destacando la importancia de este ensayo (Coman y col., 2015; Parolin y col., 2015, 2018; Santos y col., 2016; Niu y col., 2017; Melgaço y col., 2018). Zárate y Nader-Macias (2006a) analizaron el antagonismo de otras especies de lactobacilos sobre SGB y *S. aureus* y reportaron valores similares a los hallados en esta investigación.

A partir de este estudio fue posible seleccionar efectivamente a la formulación F9' como la más adecuada para el mantenimiento de la viabilidad y todas las propiedades probióticas de las cepas de lactobacilos. Los resultados hallados en este trabajo de Tesis permitieron demostrar que las cepas probióticas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 se mantuvieron viables durante los procesos biotecnológicos de liofilización y almacenamiento por largos períodos de tiempo en los óvulos. Destacándose también que durante ese periodo de tiempo se mantuvieron intactas todas las propiedades biológicas por lo que podrían ser considerados buenos microorganismos probióticos para el nicho vaginal.

*Conclusiones*

---

## CAPITULO 5: CONCLUSIONES

⌘ Las cepas *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 mantuvieron sus propiedades antimicrobianas y benéficas luego del proceso de liofilización.

⌘ La viabilidad de las cepas en los óvulos fue mayor cuando se utilizó leche descremada y lactosa en la liofilización.

⌘ La viabilidad de los lactobacilos en cada formulación farmacéutica dependió de la base y excipientes utilizados.

⌘ Las propiedades probióticas de los lactobacilos no fue afectada por la composición química de las formulaciones farmacéuticas.

⌘ El Tween 80 incorporado a la formulación disminuyó la viabilidad de ambas cepas de lactobacilos durante el almacenamiento de los óvulos.

⌘ La adición de lactosa, leche y ácido ascórbico como excipientes permitió recuperar los lactobacilos viables durante un año y medio.

⌘ La formulación seleccionada mantuvo las propiedades benéficas de las cepas de lactobacilos probióticas.

⌘ La actividad antimicrobiana de los lactobacilos contenidos en los óvulos persistió a través del tiempo.

⌘ Las bacteriocinas L23 y L60 fueron los principales metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana producida por las cepas de lactobacilos en los óvulos vaginales.

⌘ Los metabolitos bioactivos producidos por los lactobacilos en los óvulos inhibieron la producción de biofilm de microorganismos patógenos.

⌘ La mayor absorción de agua que llevó a la disolución de los óvulos en el fluido vaginal simulado fue lograda con la formulación seleccionada.

⌘ Los lactobacilos se liberaron totalmente y más rápidamente de los óvulos en el fluido vaginal simulado con la formulación seleccionada.

⌘ La propiedad de la inhibición de la adherencia que presentaron los lactobacilos probióticos dependió del microorganismo patógeno ensayado.



**CONCLUSIONES**

---

⌘ Los lactobacilos probióticos contenidos en los óvulos mantuvieron la propiedad *in situ* de inhibición de la adhesión en los ensayos de exclusión, competencia y desplazamiento de microorganismos patógenos de las células vaginales a través del tiempo.



Esta Tesis Doctoral permitió la producción de una formulación farmacéutica que contiene *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 probióticos con fuerte potencial biotecnológico y que es capaz de mantener los lactobacilos viables, con sus propiedades antimicrobianas y benéficas estables durante un año y medio. Estos óvulos podrían ser utilizados en la prevención y/o tratamiento de infecciones vaginales. Los hallazgos de este trabajo de Tesis son muy alentadores y con evidencia científica para la producción farmacológica de este bioproducto.

*Perspectivas Futuras*

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

A partir de los hallazgos de este trabajo de Tesis Doctoral las perspectivas futuras serían:

- ⌘ Corroborar los estudios de citotoxicidad *in vitro* con respecto a los *in vivo*, en base a la absorción de los metabolitos activos a través de la mucosa vaginal.
- ⌘ Confirmar la colonización de los lactobacilos presentes en los óvulos a través de ensayos clínicos fase I.

# *Referencias Bibliográficas*

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abdulla AA, Abed TA, Saeed AM. Adhesion, Autoaggregation and Hydrophobicity of Six *Lactobacillus* Strains. *Br Microbiol Res J* 2014;4(4):381-91.
- Abrantes CG, Duarte D, Reis CP. An Overview of Pharmaceutical Excipients: Safe or Not Safe?. *J Pharm Sci* 2016;105(7):2019-26.
- Abruzzo A, Giordani B, Parolin C, Vitali B, Protti M, Mercolini L, Cappelletti M, Fedi S, Bigucci F, Cerchiara T, Luppi B. Novel mixed vesicles containing lactobacilli biosurfactant for vaginal delivery of an anti-*Candida* agent. *Eur J Pharm Sci* 2018;112:95-101.
- Ahn KB, Baik JE, Park OJ, Yun CH, Han SH. *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS One* 2018a;13(2):e0192694. doi: 10.1371/journal.pone.0192694.
- Ahn KB, Baik JE, Yun CH, Han SH. Lipoteichoic Acid Inhibits *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *Front Microbiol* 2018b;9:327.
- Ait Ouali F, Al Kassaa I, Cudennec B, Abdallah M, Bendali F, Sadoun D, Chihib NE, Drider D. Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *Int J Food Microbiol* 2014;191:116-24.
- Alonso B, Cruces R, Pérez A, Sánchez-Carrillo C, Guembe M. Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm. *J Microbiol Methods* 2017;139:135-7.
- Alpay Karaoğlu S, Aydın F, Kiliç S, Kiliç A. Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli. *Turk J Med Sci* 2002;33:7-12.
- Álvarez-Calatayud G, Suárez E, Rodríguez JM, Pérez-Moreno J. La microbiota en la mujer; aplicaciones clínicas de los probióticos. *Nutr Hosp* 2015;32(S1):56-61.
- Amin M, Moradi Choghakabodi P, Alhassan Hamidi M, Najafian M, Farajzadeh Sheikh A. *In vitro* antimicrobial activities of metabolites from vaginal *Lactobacillus* strains against *Clostridium perfringens* isolated from a woman's vagina. *J Chin Med Assoc* 2017;80(1):29-33.
- Ampatzoglou A, Schurr B, Deepika G, Baipong S, Charalampopoulos D. Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Biochem Eng J* 2010;52:65-70.

- 
- Andreu A, Stapleton A, Fennell C, Hillier S, Stamm E. Hemagglutination, adherence and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. J Infect Dis 1995;171:1237-43.
- Arakawa K, Matsunaga K, Takihiro S, Moritoki A, Ryuto S, Kawai Y, Masuda T, Miyamoto T. *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. J Dairy Sci 2014;98(3):1593-1603.
- Archacka M, Białas W, Dembczyński R, Olejnik A, Sip A, Szymanowska D, Celińska E, Jankowski T, Olejnik A, Rogodzińska M. Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. Food Chem 2019;274:733-742.
- Asurmendi P. Acción bioterapéutica de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus* sobre diferentes cepas de *Neisseria gonorrhoeae*. 2010. Tesina de grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.
- Atouf F. Cell-Based Therapies Formulations: Unintended components. AAPS J 2016;18(4):844-8.
- Azara E, Longheu C, Sanna G, Tola S. Biofilm formation and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* isolates collected from ovine mastitis. J Appl Microbiol 2017;123(2):372-379.
- Baba S, Aydın MD. Investigation of the serotype distribution, biofilm production and antibiotic susceptibilities of group B streptococci isolated from urinary samples. Mikrobiyol Bul 2016;50(3):353-60.
- Barberis IL, Pájaro MC, Godino S, Pascual L. Inhibición *in vitro* del crecimiento de *Gardnerella vaginalis* por bacteriocinas producidas por bacterias del género *Lactobacillus*. Revista UNRC. 2003;22(1-2):63-70.
- Beerepoot M, Geerlings S. Non-Antibiotic Prophylaxis for Urinary Tract Infections. Pathogens 2016;5(2).
- Beltrán DA. Microbiota vaginal: composición por edades, factores de mantenimiento y factores alteradores. Cen Diag Med 2015:1-5.
- Bertuccini L, Russo R, Iosi F, Superti F. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* on bacterial vaginal pathogens. Int J Immunopathol Pharmacol 2017;30(2):163-7.

- 
- Borges S, Costa P, Silva J, Teixeira P. Effects of processing and storage on *Pediococcus pentosaceus* SB83 in vaginal formulations: lyophilized powder and tablets. Biomed Res Int. 2013;2013:680767.
- Borges S, Silva J, Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. Arch Gynecol Obstet 2014;289(3):479-89.
- Boris S, Suárez JE, Barbés C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. J Appl Microbiol 1997;83(4):413-20.
- Boris S, Suárez JE, Vázquez F, Barbés C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. Infect Immun 1998;66(5):1985-9.
- Bouridane H, Sifour M, Idoui T, Annick L, Thonard P. Technological and Probiotic Traits of the Lactobacilli Isolated From Vaginal Tract of the Healthy Women for Probiotic Use. Iran J Biotechnol 2016;14(3):192-201.
- Brooks GF, Butel JS, Carroll KC, Morse SA, Mietzner TA (Editores). Lange Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología Médica. 26ª Edición, McGraw-Hill, 2014. ISBN: 9786071511355.
- Camilletti AL, Ruíz FO, Pascual LM, Barberis IL. First Steps towards the Pharmaceutical Development of Ovules Containing *Lactobacillus* Strains: Viability and Antimicrobial Activity as Basic First Parameters in Vaginal Formulations. AAPS PharmSciTech 2018;19(2):886-95.
- Castro A, González M, Tarín JJ, Cano A. Role of probiotics in Obstetrics and Gynecology. Nutrición Hospitalaria. 2015;31(S1):26-30.
- Castro HP, Teixeira PM, Kirby R. Changes in the membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze drying. Biotechnol Lett 1996;18:99-104.
- Cerdó T, García-Santos JA, G Bermúdez M, Campoy C. The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity. Nutrients 2019;11(3).
- Chan RCY, Reid G, Irvin RT, Bruce AW, Costerton JW. Competitive Exclusion of Uropathogens from Human Uroepithelial Cells by *Lactobacillus* Whole Cells and Cell Wall Fragments. Infect Immun 1985;84-9.
- Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and *in vitro* adhesion to bladder cells by urinary tract pathogens. Anaerobe 2014;27:71-6.
- Chen H, Tian M, Chen L, Cui X, Meng J, Shu G. Optimization of composite

- cryoprotectant for freeze-drying *Bifidobacterium bifidum* BB01 by response surface methodology. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019;47(1):1559-69.
- Chervinets Y, Chervinets V, Shenderov B, Belyaeva E, Troshin A, Lebedev S, Danilenko V. Adaptation and Probiotic Potential of Lactobacilli, Isolated from the Oral Cavity and Intestines of Healthy People. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2018;10(1):22-33.
- Chew SY, Cheah YK, Seow HF, Sandai D, Than LT. *In vitro* modulation of probiotic bacteria on the biofilm of *Candida glabrata*. *Anaerobe* 2015b;34:132-8.
- Chew SY, Cheah YK, Seow HF, Sandai D, Than LT. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis-causing *Candida glabrata* isolates. *J Appl Microbiol* 2015a;118(5):1180-90.
- Chung J, Ha ES, Park HR, Kim S. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(3):214-6.
- Ciandrini E, Campana R, Baffone W. Live and heat-killed *Lactobacillus* spp. interfere with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus oralis* during biofilm development on titanium surface. *Arch Oral Biol* 2017;78:48-57.
- Cinque B, La Torre C, Lombardi F, Palumbo P, Van der Rest M, Cifone MG. Production Conditions Affect the *In Vitro* Anti-Tumoral Effects of a High Concentration Multi-Strain Probiotic Preparation. *PLoS One* 2016;11(9):e0163216.
- Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, Cresci A. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501(®), *Lactobacillus paracasei* IMC 502(®) and SYN BIO(®) against pathogens. *J Appl Microbiol* 2014;117(2):518-27.
- Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Caspani M, Mondello F, Cresci A. *In vitro* evaluation on HeLa cells of protective mechanisms of probiotic lactobacilli against *Candida* clinical isolates. *J Appl Microbiol* 2015;119(5):1383-90.
- Daniele M, Pascual L, Barberis L. Curative effect of the probiotic strain *Lactobacillus fermentum* L23 in a murine model of vaginal infection by *Gardnerella vaginalis*. *Lett Appl Microbiol* 2014;59(1):93-8.



- Daniele M, Ruíz F, Pascual L, Barberis L. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* sensitivity to bacteriocins produced by two lactobacilli strains. *Curr Microbiol* 2011;63(4):360-5.
- Datcu R. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. *Dan Med J* 2014;61(4):B4830.
- Davani Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi SJ, Berenjian A, Ghasemi Y. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* 2019;8(3).
- De Gregorio PR, Silva JA, Marchesi A, Nader-Macías MEF. Anti-*Candida* activity of beneficial vaginal lactobacilli in *in vitro* assays and in a murine experimental model. *FEMS Yeast Res* 2019;19(2).
- de Vrese M, Laue C, Papazova E, Petricevic L, Schrezenmeir J. Impact of oral administration of four *Lactobacillus* strains on Nugent score - systematic review and meta-analysis. *Benef Microbes* 2019;1-14.
- Deng K, Chen T, Wu Q, Xin H, Wei Q, Hu P, Wang X, Wang X, Wei H, Shah NP. *In vitro* and *in vivo* examination of anticolonization of pathogens by *Lactobacillus paracasei* FJ861111.1. *J Dairy Sci* 2015;98(10):6759-66.
- Dhewa T, Pant S, Mishra V. Development of freeze dried synbiotic formulation using a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum*. *J Food Sci Technol* 2014;51(1):83-9.
- do Carmo MS, Noronha FM, Arruda MO, Costa ÊP, Bomfim MR, Monteiro AS, Ferro TA, Fernandes ES, Girón JA, Monteiro-Neto V. *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 Displays *In vitro* Inhibitory Activities against *Candida* spp. *Front Microbiol* 2016;7:1722.
- Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol* 2012;78(1):1-6.
- Dominguez Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, Bokulich NA, Song SJ, Hoashi M1, Rivera-Vinas J, Mendez K, Knight R, Clemente JC. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med* 2016;22(3):250-3.
- Dos Santos Ramos MA, Calixto G, de Toledo LG, Bonifácio BV, Dos Santos LC, de Almeida MT, Chorilli M, Bauab TM. Liquid crystal precursor mucoadhesive system as a strategy to improve the prophylactic action of *Syngonanthus nitens*

- (Bong.) Ruhland against infection by *Candida krusei*. Int J Nanomedicine 2015;10:7455-66.
- Dos Santos Ramos MA, de Toledo LG, Calixto GM, Bonifácio BV, de Freitas Araújo MG, Dos Santos LC, de Almeida MT, Chorilli M, Bauab TM. *Syngonanthus nitens* Bong. (Rhul.)-Loaded Nanostructured System for Vulvovaginal Candidiasis Treatment. Int J Mol Sci 2016;17(8).
- Eguchi K, Fujitani N, Nakagawa H, Miyazaki T. Prevention of respiratory syncytial virus infection with probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus gasseri* SBT2055. Sci Rep. 2019 Mar 18;9(1):4812.
- Ekmekci H, Aslim B, Ozturk S. Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. Microbiol Immunol 2009;53(2):59-65.
- Eslami M, Yousefi B, Kokhaei P, Hemati M, Nejad ZR, Arabkari V, Namdar A. Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. J Cell Physiol 2019. doi: 10.1002/jcp.28473.
- Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud de la Nación. 7ª Edición. ANMAT, Argentina. 2013;Vol I-IV.
- Fernández Ramírez MD, Smid EJ, Abee T, Nierop Groot MN. Characterisation of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage isolates. Int J Food Microbiol. 2015;207:23-9.
- Figueiredo AMS, Ferreira FA, Beltrame CO, Côrtes MF. The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. Crit Rev Microbiol 2017;43(5):602-20.
- Fonseca F, Marin M, Morris GJ. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects. Appl Environ Microbiol 2006;72(10):6474-82.
- Foschi C, Salvo M, Cevenini R, Parolin C, Vitali B, Marangoni A. Vaginal Lactobacilli Reduce *Neisseria gonorrhoeae* Viability through Multiple Strategies: An *in vitro* Study. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:502.
- Fuochi V, Cardile V, Petronio G, Furneri PM. Biological properties and production of bacteriocins-like-inhibitory substances by *Lactobacillus* sp. strains from human vagina. J Appl Microbiol 2019;126(5):1541-50.
- Galiñanes S, Coppolillo E, Cifarelli M, Cora Eliseht M, Pellisa E, Losada M, Gruccio S, Ruda Vega H, Vay C, Famiglietti A, Perazzi B. Vaginal inflammatory status in

- pregnant women with normal and pathogenic microbiota in lower genital tract. *ISRN Obstet Gynecol* 2011;2011:835926.
- García MJ, Ruiz F, Asurmendi P, Pascual L, Barberis L. Bacteriocin Producing Lactobacilli Strains as a Biological Strategy to Control Listerial Growth. *Int J Microbiol Adv Immunol* 2015;03(2),60-64.
- Gomaa, EZ. Cryoprotection of probiotic bacteria with poly- $\gamma$ -glutamic acid produced by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J Genet Eng Biotechnol* 2016;14(2):269-79.
- González Andrade F (ed). Medicamentos biológicos, presente y futuro de la terapéutica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central del Ecuador: Quito, 2017. 316p. ISBN: 978-9942-28-449-5.
- Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Lett Appl Microbiol* 2010;50(4):419-24.
- Hazirolan G, Gündoğdu A, Nigiz S, Altun B, Gür D. Presence of OXA-48 Gene in a Clinical Isolate of *Lactobacillus rhamnosus*. *Foodborne Pathog Dis* 2019. doi: 10.1089/fpd.2019.2651.
- Irwin JJ, Pottel J, Zou L, Wen H, Zuk S, Zhang X, Sterling T, Shoichet BK, Lionberger R, Giacomini KM. A Molecular Basis for Innovation in Drug Excipients. *Clin Pharmacol Ther* 2017;101(3):320-323.
- Jäger R, Purpura M, Farmer S, Cash HA, Keller D. Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 Improves Protein Absorption and Utilization. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2018;10(4):611-15.
- Jalilsood T, Baradaran A, Song AA, Foo HL, Mustafa S, Saad WZ, Yusoff K, Rahim RA. Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming *Lactobacillus* isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins. *Microb Cell Fact* 2015;14:96.
- Jiang H, Chen M, Li T, Liu H, Gong Y, Li M. Molecular Characterization of *Streptococcus agalactiae* Causing Community- and Hospital-Acquired Infections in Shanghai, China. *Front Microbiol*. 2016;7:1308.
- Jiménez Pacheco A, Jiménez Pacheco A. El uso de probióticos como alternativa en la prevención de las infecciones urinarias recurrentes en mujeres. *Rev Méd Chile*. 2013;141(6):809-10.

- Jiménez Pranteda ML, Poncelet D, Náder Macías ME, Arcos A, Aguilera M, Monteoliva Sánchez M, Ramos Cormenzana A. Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. *J Biosci Bioeng* 2012;113(2):179-84.
- Juárez Tomás MS, Bru E, Wiese B, de Ruiz Holgado AA, Nader Macías ME. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *J Appl Microbiol* 2002;93(4):714-24.
- Juárez Tomás MS, De Gregorio PR, Leccese Terraf MC, Nader-Macías ME. Encapsulation and subsequent freeze-drying of *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 for its potential inclusion in vaginal probiotic formulations. *Eur J Pharm Sci* 2015;79:87-95.
- Juárez Tomás MS, Ocaña VS, Nader-Macías ME. Viability of vaginal probiotic lactobacilli during refrigerated and frozen storage. *Anaerobe*. 2004;10(1):1-5.
- Kaewnopparat S, Dangmanee N, Kaewnopparat N, Srichana T, Chulasiri M, Settharaksa S. *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe* 2013;22:6-13.
- Kaewnopparat S, Kaewnopparat N. Formulation and Evaluation of Vaginal Suppositories Containing *Lactobacillus*. *Int J Med Health Biom Bioeng Pharm Engin*. 2009;3(7):117-20.
- Kaewsrichan J, Chandarajoti K, Kaewnopparat S, Kaewnopparat N. Evaluation of Lactobacilli Containing Suppository Formulation for Probiotic Use. *MUJPS* 2007;34(1-4):1-8.
- Kale VV, Trivedi RV, Wate SP, Bhusari KP. Development and evaluation of a suppository formulation containing *Lactobacillus* and its application in vaginal diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1056:359-65.
- Kang MS, Lim HS, Oh JS, Lim YJ, Wuertz-Kozak K, Harro JM, Shirtliff ME, Achermann Y. Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. *Pathog Dis* 2017;75(2).
- Keller MK, Hasslöf P, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: an *in vitro* study. *Acta Odontol Scand* 2011;69(5):263-8.
- Koch S, Eugster-Meier E, Oberson G, Meile L, Lacroix C. Effects of strains and growth conditions on autolytic activity and survival to freezing and lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* isolated from cheese. *Int Dairy J* 2008;18:187-96.

- 
- Lasserrot Cuadrado AR. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Lactobacillus* con potencial probiótico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología. Granada, España. 2015.
- Law BA, Kolstad J. Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1983;49(3):225-45.
- Leccese Terraf MC, Juárez Tomás MS, Rault L, Le Loir Y, Even S, Nader-Macías ME. *In vitro* effect of vaginal lactobacilli on the growth and adhesion abilities of uropathogenic *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 2017;199(5):767-774.
- Leccese Terraf MC, Juárez Tomás MS, Rault L, Le Loir Y, Even S, Nader-Macías ME. Biofilms of vaginal *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 and *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1332: kinetics of formation and matrix characterization. *Arch Microbiol* 2016;198(7):689-700.
- Leccese Terraf MC, Mendoza LM, Juárez Tomás MS, Silva C, Nader Macías ME. Phenotypic surface properties (aggregation, adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli. *J Appl Microbiol* 2014;117(6):1761-72.
- Li Y, Hou S, Peng W, Lin Q, Chen F, Yang L, Li F, Huang X. Oral Administration of *Lactobacillus delbrueckii* during the Suckling Phase Improves Antioxidant Activities and Immune Responses after the Weaning Event in a Piglet Model. *Oxid Med Cell Longev* 2019;2019:6919803.
- Lin WH, Hwang CF, Chen LW, Tsen HY. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol* 2006;23(1):74-81.
- Lin X, Chen X, Tu Y, Wang S, Chen H. Effect of Probiotic Lactobacilli on the Growth of *Streptococcus mutans* and Multispecies Biofilms Isolated from Children with Active Caries. *Med Sci Monit* 2017;23:4175-81.
- Lopes EG, Moreira DA, Gullón P, Gullón B, Cardelle-Cobas A, Tavaría FK. Topical application of probiotics in skin: adhesion, antimicrobial and antibiofilm *in vitro* assays. *J Appl Microbiol* 2017;122(2):450-61.
- Lopes LQS, de Oliveira PSB, de Souza Filho WP, de Almeida Vaucher R, Giongo JL, Sagrillo MR, Santos RCV. Glycerol monolaurate nanocapsules for biomedical applications: *in vitro* toxicological studies. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2019. doi: 10.1007/s00210-019-01663-w.

- 
- López MJE, Ochoa ZA, Santoyo PG, Anaya LJL, Medina ME, Martínez TM, Loeza LPD. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2008;39(3):49-57.
- Lukjancenko O, Ussery DW, Wassenaar TM. Comparative genomics of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related probiotic genera. *Microb Ecol* 2012;63(3):651-73.
- Luppi B, Bigucci F, Abruzzo A, Corace G, Cerchiara T, Zecchi V. Freeze-dried chitosan/pectin nasal inserts for antipsychotic drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2010;75(3):381-7.
- Ma L, Su J, Su Y, Sun W, Zeng Z. Probiotics administered intravaginally as a complementary therapy combined with antibiotics for the treatment of bacterial vaginosis: a systematic review protocol. *BMJ Open* 2017;7(10):e019301.
- Madhivanan P, Raphael E, Rumphs A, Krupp K, Ravi K, Srinivas V, Arun A, Reingold AL, Klausner JD, Riley LW. Characterization of culturable vaginal *Lactobacillus* species among women with and without bacterial vaginosis from the United States and India: a cross-sectional study. *J Med Microbiol* 2014;63:931-5.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (Editores). *Brock Biología de los Microorganismos*. 10ª edición. Pearson-Prentice Hall, 2004;159-160,399,402,721.
- Maggi L, Mastromarino P, Macchia S, Brigidi P, Pirovano F, Matteuzzi D et al. Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:389-95.
- Malik S, Petrova MI, Claes IJ, Verhoeven TL, Busschaert P, Vaneechoutte M, Lievens B, Lambrechts I, Siezen RJ, Balzarini J, Vanderleyden J, Lebeer S. The highly autoaggregative and adhesive phenotype of the vaginal *Lactobacillus plantarum* strain CMPG5300 is sortase dependent. *Appl and Environ Microbiol* 2013;79(15):4576-85.
- Martín R, Sánchez B, Suárez JE, Urdaci MC. Characterization of the adherence properties of human Lactobacilli strains to be used as vaginal probiotics. *FEMS Microbiol Lett* 2012;328(2):166-73.
- Martín R, Soberón N, Vázquez F, Suárez JE. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008;26(3):160-167.

- 
- Mastromarino P, Di Pietro M, Schiavoni G, Nardis C, Gentile M, Sessa R. Effects of vaginal lactobacilli in *Chlamydia trachomatis* infection. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(5-6):654-61.
- Mastromarino P, Macchia S, Meggiorini L, Trinchieri V, Mosca L, Perluigi M, Midulla C. Effectiveness of *Lactobacillus*-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(1):67-74.
- Mathaes R, Mahler HC. Next Generation Biopharmaceuticals: Product Development. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2018;165:253-76.
- Matu MN, Orinda GO, Njagi EN, Cohen CR, Bukusi EA. *In vitro* inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women. *Anaerobe*. 2010;16(3):210-5.
- Mäyra Mäkinen A, Bigret M. Industrial use and production of lactic acid bacteria. Editores: Salminen S, von Wright A. *Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects*. New York. Marcel Dekker Inc. 1998;73-102.
- Melgaço ACC, Blohem Pessoa WF, Freire HP, Evangelista de Almeida M, Santos Barbosa M, Passos Rezende R, Timenetsky J, Miranda Marques L, Romano CC. Potential of Maintaining a Healthy Vaginal Environment by Two *Lactobacillus* Strains Isolated from Cocoa Fermentation. *Biomed Res Int* 2018;2018:7571954.
- Melo TA, Dos Santos TF, de Almeida ME, Junior LA, Andrade EF, Rezende RP, Marques LM, Romano CC. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiol* 2016;16(1):250.
- Mendling W. Vaginal Microbiota. *Adv Exp Med Biol* 2016;902:83–93.
- Merghni A, Dallel I, Noumi E, Kadmi Y, Hentati H, Tobji S, Ben Amor A, Mastouri M. Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. *Microb Pathog* 2017;104:84-89.
- Mezzasalma V, Manfrini E, Ferri E, Boccarusso M, Di Gennaro P, Schiano I, Michelotti A, Labra M. Orally administered multispecies probiotic formulations to prevent uro-genital infections: a randomized placebo-controlled pilot study. *Arch Gynecol Obstet* 2017;295(1):163-72.
- Ministerio de Salud de La Nación. Vigilancia Epidemiológica de Infecciones de Transmisión Sexual. Dirección de SIDA y ETS, Dirección de Epidemiología. Argentina, 2014.



- [http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000585cnt-2014-12\\_Guia-ITS.pdf](http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000585cnt-2014-12_Guia-ITS.pdf).
- Mogna L, Del Piano M, Deidda F, Nicola S, Soattini L, Debiaggi R, Sforza F, Strozzi G, Mogna G. Assessment of the *in vitro* inhibitory activity of specific probiotic bacteria against different *Escherichia coli* strains. *J Clin Gastroenterol* 2012;46(S):S29-32.
- Mur Pérez AM, Mateo Segura Z, Ramírez Domínguez N, Vela Condón P. Uso de probióticos en las vaginosis bacterianas. *Semergen* 2017;43(5):394-98.
- Murina F, Graziottin A, Vicariotto F, De Seta F. Can *Lactobacillus fermentum* LF10 and *Lactobacillus acidophilus* LA02 in a slow-release vaginal product be useful for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis?: A clinical study. *J Clin Gastroenterol* 2014;48(S1):S102-5.
- Nader Macías ME, Ocaña VS, Juárez Tomás MS, Silva de Ruiz C. Bacterias Lácticas Probióticas en el tracto urogenital. *Fundamentos biológicos, procesos y biotecnología de Bacterias Lácticas*. Editorial Reverte. 2007;17-20.
- Niu XX, Li T, Zhang X, Wang SX, Liu ZH. *Lactobacillus crispatus* Modulates Vaginal Epithelial Cell Innate Response to *Candida albicans*. *Chin Med J (Engl)* 2017;130(3):273-9.
- Ocaña VS, Nader Macías ME. Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregating ability. *Br J Biomed Sci* 2002;59(4):183-190.
- OMS/WHO. World Health Organization. Estrategia mundial del sector de la salud contra las infecciones de transmisión sexual 2016-2021. 2016.
- Orrego Arnolt L, Pesenti M, Petricic M, Petrocelli S, Pisani M. Caracterización del diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria en la población de mujeres de Rosario, Santa Fe, Argentina. XXVII reunión del grupo GAPURMED (Grupo Argentino Para el Uso Racional de los Medicamentos) 2018;11.
- Ortiz L, Ruiz F, Pascual L, Barberis L. Effect of two probiotic strains of *Lactobacillus* on *in vitro* adherence of *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, and *Staphylococcus aureus* to vaginal epithelial cells. *Curr Microbiol* 2014;68(6):679-84.
- Otero MC, Espeche MC, Nader-Macías ME. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus*



- 
- delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Process Biochem* 2007;42:1406-11.
- Owen DH, Katz DF. A vaginal fluid simulant. *Contraception* 1999;59(2):91-5.
- Pan M, Kumaree KK, Shah NP. Physiological Changes of Surface Membrane in *Lactobacillus* with Prebiotics. *J Food Sci* 2017;82(3):744-50.
- Paolino M, Arrossi S. Women's knowledge about cervical cancer, Pap smear and human papillomavirus and its relation to screening in Argentina. *Women Health* 2011;51(1):72-87.
- Parker RE, Laut C, Gaddy JA, Zadoks RN, Davies HD, Manning SD. Association between genotypic diversity and biofilm production in group B *Streptococcus*. *BMC Microbiol* 2016;16:86.
- Parolin C, Frisco G, Foschi C, Giordani B, Salvo M, Vitali B, Marangoni A, Calonghi N. *Lactobacillus crispatus* BC5 Interferes With *Chlamydia trachomatis* Infectivity Through Integrin Modulation in Cervical Cells. *Front Microbiol* 2018;9:2630.
- Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Ñahui Palomino RA, Calonghi N, Cevenini R, Vitali B. Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-*Candida* Activity. *PLoS One* 2015;10(6):e0131220.
- Pascual L, Daniele MB, Giordano W, Pájaro MC, Barberis IL. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr Microbiol* 2008a;56(4):397-402.
- Pascual L, Daniele MB, Pájaro C, Barberis L. *Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9resistance. *Contraception* 2006;73(1):78-81.
- Pascual L, Daniele MB, Ruíz F, Giordano W, Pájaro C, Barberis L. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *J Gen Appl Microbiol* 2008b;54(3):141-8.
- Pascual L, Ruíz F, Giordano W, Barberis IL. Vaginal colonization and activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus fermentum* L23 in a murine model of vaginal tract infection. *J Med Microbiol* 2010;59(Pt 3):360-4.
- Pascual L. Bacteriocinogenia en el género *Lactobacillus*: características benéficas de lactobacilos de vagina humana. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. 2004.

- 
- Peiren J, Buyse J, De Vos P, Lang E, Clermont D, Hamon S, Bégaud E, Bizet C, Pascual J, Ruvira MA, Macián MC, Arahal DR. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99(8):3559-71.
- Pendharkar S, Magopane T, Larsson PG, de Bruyn G, Gray GE, Hammarström L, Marcotte H. Identification and characterisation of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Infect Dis* 2013;26:13-43.
- Peng Soh JL, Liew CV, Sia Heng PW. Impact Of Excipient Variability On Drug Product Processing And Performance. *Curr Pharm Des* 2015;21(40):5890-9.
- Pereira ALF, Maciel TC, Rodrigues S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research Int* 2011;1276-83.
- Pérez Ibarreche M, Castellano P, Vignolo G. Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. *Meat Sci* 2014;96(1):295-303.
- Pérez Leonard H. *Lactobacillus* Probióticos: Sustancias Naturales Bioactivas para la Prevención de Infecciones Urogenitales. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.* 2007;10(1):6-13.
- Pérez Montarelo D, Viedma E, Murcia M, Muñoz-Gallego I, Larrosa N, Brañas P, Fernández-Hidalgo N, Gavaldà J, Almirante B, Chaves F. Pathogenic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Endovascular Infection Isolates from Different Clonal Complexes. *Front Microbiol* 2017;8:917.
- Pérez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*. 2014;13(S1):S3.
- Pessoa WFB, Melgaço ACC, de Almeida ME, Ramos LP, Rezende RP, Romano CC. *In Vitro* Activity of Lactobacilli with Probiotic Potential Isolated from Cocoa Fermentation against *Gardnerella vaginalis*. *Biomed Res Int* 2017;3264194.
- Peters VBM, van de Steeg E, van Bilsen J, Meijerink M. Mechanisms and immunomodulatory properties of pre- and probiotics. *Benef Microbes* 2019;4:1-12.
- Pino A, Bartolo E, Caggia C, Cianci A, Randazzo CL. Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates. *Sci Rep* 2019;9(1):3355.
- Piyadeatsoontorn S, Taharnklaew R, Upathanpreecha T, Sornplang P. Encapsulating Viability of Multi-strain Lactobacilli as Potential Probiotic in Pigs. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2019;11(2):438-46.

- 
- Prabhurajeshwar C, Chandrakanth RK. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An *in vitro* validation for the production of inhibitory substances. *Biomed J* 2017;40(5):270-83.
- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (Editores). *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. 7ª Edición. Wolters Kluwer, 2017.
- Ramos AN, Sesto Cabral ME, Arena ME, Arrighi CF, Arroyo Aguilar AA, Valdéz JC. Compounds from *Lactobacillus plantarum* culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds. *Pharm Biol* 2015;53(3):350-8.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(Suppl 1):4680-7.
- Reid G, Bruce AW, Taylor M. Influence of three-day antimicrobial therapy and *Lactobacillus* vaginal suppositories on recurrence of urinary tract infections. *Clin Ther* 1992;14(1):11-6.
- Reid G, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect* 2002;4:319-24.
- Reid G, Mac Groarty J, Chow A, Bruce A, Eisen A, Costerton W. Coaggregation of urogenital bacteria *in vitro* and *in vivo*. *Curr Microbiol* 1990;20:47-52.
- Rodrigues F, Maia MJ, das Neves J, Sarmiento B, Amaral MH, Oliveira MB. Vaginal suppositories containing *Lactobacillus acidophilus*: development and characterization. *Drug Dev Ind Pharm* 2015;41(9):1518-25.
- Rodríguez González M. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis Doctoral. Departament de Genètica i Microbiologia. Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona, España. 2009;3-5.
- Romano N, Schebor C, Mobili P, Gómez-Zavaglia A. Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Res Int* 2016;90:251-58.

- 
- Ruíz F, Gerbaldo G, Asurmendi P, García M, Pascual L, Barberis I. Efecto protector de *Lactobacillus fermentum* L23 en vagina de ratones BALB/c frente a *Streptococcus agalactiae*. Rev Argent Microbiol 2010;42(1):29-30.
- Ruíz FO, Gerbaldo G, Asurmendi P, Pascual LM, Giordano W, Barberis IL. Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. Curr Microbiol 2009;59(5):497-501.
- Ruíz FO, Gerbaldo G, García MJ, Giordano W, Pascual L, Barberis IL. Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactobacilli strains with inhibitory activity for *Streptococcus agalactiae*. Curr Microbiol 2012;64(4):349-56.
- Ruíz FO, Pascual L, Giordano W, Barberis L. Bacteriocins and other bioactive substances of probiotic lactobacilli as biological weapons against *Neisseria gonorrhoeae*. Pathog Dis 2015;73(3).
- Rybalchenko OV, Bondarenko VM, Orlova OG, Markov AG, Amasheh S. Inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum* on microbial growth and biofilm formation. Arch Microbiol 2015;197(8):1027-32.
- Saadatzadeh A, Fazeli MR, Jamalifar H, Dinarvand R. Probiotic Properties of Lyophilized Cell Free Extract of *Lactobacillus casei*. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2013;8(3):131-7.
- Salas Jara MJ, Ilabaca A, Vega M, García A. Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics. Microorganisms 2016;4(3).
- Salveti E, Torriani S, Felis GE. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. Probiotics Antimicrob Proteins 2012;4(4):217-26.
- Samaniego Fernández LM, Sosa del Castillo M. *Lactobacillus* spp: importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Reseña. Centro de estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Cuba. Editorial Universitaria. 2000:3-4.
- Sánchez MT, Ruiz MA, Castán H, Morales ME. A novel double-layer mucoadhesive tablet containing probiotic strain for vaginal administration: Design, development and technological evaluation. Eur J Pharm Sci 2018;112:63-70.
- Santos CM, Pires MC, Leão TL, Hernández ZP, Rodríguez ML, Martins AK, Miranda LS, Martins FS, Nicoli JR. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. Microbiology 2016;162(7):1195-207.

- 
- Santos CMA, Pires MCV, Leão TL, Silva AKS, Miranda LS, Martins FS, Silva AM, Nicoli JR. Anti-inflammatory effect of two *Lactobacillus* strains during infection with *Gardnerella vaginalis* and *Candida albicans* in a HeLa cell culture model. *Microbiology* 2018;164(3):349-58.
- Sanz R, Clares B, Mallandrich M, Suñer-Carbó J, Montes MJ, Calpena AC. Development of a mucoadhesive delivery system for control release of doxepin with application in vaginal pain relief associated with gynecological surgery. *Int J Pharm* 2018;535(1-2):393-401.
- Satpute SK, Kulkarni GR, Banpurkar AG, Banat IM, Mone NS, Patil RH, Cameotra SS. Biosurfactant/s from *Lactobacilli* species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *J Basic Microbiol* 2016;56(11):1140-1158.
- Sessa R, Di Pietro M, Filardo S, Bressan A, Mastromarino P, Biasucci AV, Rosa L, Cutone A, Berlutti F, Paesano R, Valenti P. *Lactobacilli*-lactoferrin interplay in *Chlamydia trachomatis* infection. *Pathog Dis* 2017;75(5).
- Shao Y, Gao S, Guo H, Zhang H. Influence of culture conditions and preconditioning on survival of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* ND02 during lyophilization. *J Dairy Sci* 2014;97(3):1270-80.
- Sharma D, Saharan BS, Chauhan N, Bansal A, Procha S. Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:493548.
- Shokri D, Khorasgani MR, Mohkam M, Fatemi SM, Ghasemi Y, Taheri-Kafrani A. The Inhibition Effect of *Lactobacilli* Against Growth and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2018;10(1):34-42.
- Siroli L, Patrignani F, Serrazanetti DI, Parolin C, Ñahui Palomino RA, Vitali B, Lanciotti R. Determination of Antibacterial and Technological Properties of Vaginal *Lactobacilli* for Their Potential Application in Dairy Products. *Front Microbiol* 2017;8:166.
- Slížová M, Nemcová R, Mad'ar M, Hadryová J, Gancarčíková S, Popper M, Pisl J. Analysis of biofilm formation by intestinal *Lactobacilli*. *Can J Microbiol* 2015;61(6):437-46.
- Söderling EM, Marttinen AM, Haukioja AL. Probiotic *Lactobacilli* interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation *in vitro*. *Curr Microbiol* 2011;62(2):618-22.

- 
- Speranza B, Liso A, Corbo MR. Use of design of experiments to optimize the production of microbial probiotic biofilms. *PeerJ* 2018;6:e4826.
- Stefanello RF, Nabeshima EH, Iamanaka BT, Ludwig A, Fries LLM, Bernardi AO, Copetti MV. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Res Int* 2019;115:90-4.
- Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Pokhilenko VD, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(9):3111-6.
- Surendran Nair M, Amalaradjou MA, Venkitanarayanan K. Antivirulence Properties of Probiotics in Combating Microbial Pathogenesis. *Adv Appl Microbiol* 2017;98:1-29.
- Terraf MC, Juárez Tomás MS, Nader-Macías ME, Silva C. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *J Appl Microbiol* 2012;113(6):1517-29.
- Todorov SD, de Paula OAL, Camargo AC, Lopes DA, Nero LA. Combined effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and vancomycin, propolis or EDTA for controlling biofilm development by *Listeria monocytogenes*. *Rev Argent Microbiol* 2018;50(1):48-55.
- Trinchieri V, Laghi L, Vitali B, Parolin C, Giusti I, Capobianco D, Mastromarino P, De Simone C. Efficacy and Safety of a Multistrain Probiotic Formulation Depends from Manufacturing. *Front Immunol* 2017;8:1474.
- Tsuda H, Matsumoto T, Ishimi Y. Biotin, niacin, and pantothenic acid assay using lyophilized *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *J Nutr Sci Vitaminol* 2011;57(6):437-40.
- Uehara S, Monden K, Nomoto K, Seno Y, Kariyama R, Kumon H. A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28(S1):S30-4.

- 
- van de Wijkert, JH, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H, Jespers V. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? PLoS One 2014;9(8):e105998.
- Ventolini G, Mitchell E, Salazar M. Biofilm formation by vaginal *Lactobacillus in vivo*. Med Hypotheses 2015;84(5):417-20.
- Vera Cusme MA. Obtención de cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico a partir del tracto reproductor femenino bovino. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Felix López”, Calceta, Ecuador. 2013.
- Vera Pingitore E, Bru E, Nader-Macías ME. Effect of lyophilization and storage temperature on the activity of salivaricin CRL 1328, a potential bioactive ingredient of a urogenital probiotic product. J Gen Appl Microbiol 2012;58:71-81.
- Vera Pingitore E, Juárez Tomás MS, Wiese B, Nader-Macías ME. Design of novel urogenital pharmabiotic formulations containing lactobacilli, salivaricin CRL 1328 and non-microbial compounds with different functionalities. Drug Dev Ind Pharm 2015;41(6):942-52.
- Verdenelli MC, Cecchini C, Coman MM, Silvi S, Orpianesi C, Coata G, Cresci A, Di Renzo GC. Impact of Probiotic SYN BIO(®) Administered by Vaginal Suppositories in Promoting Vaginal Health of Apparently Healthy Women. Curr Microbiol 2016;73(4):483-90.
- Verdenelli MC, Coman MM, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. Evaluation of antipathogenic activity and adherence properties of human *Lactobacillus* strains for vaginal formulations. J Appl Microbiol 2014;116(5):1297-307.
- Vicariotto F, Del Piano M, Mogna L, Mogna G. Effectiveness of the association of 2 probiotic strains formulated in a slow release vaginal product, in women affected by vulvovaginal candidiasis: a pilot study. J Clin Gastroenterol 2012;46 (Suppl:S)73-80.
- Vicariotto F, Mogna L, Del Piano M. Effectiveness of the two microorganisms *Lactobacillus fermentum* LF15 and *Lactobacillus plantarum* LP01, formulated in slow-release vaginal tablets, in women affected by bacterial vaginosis: a pilot study. J Clin Gastroenterol 2014;48(S1)106-12.
- Vitali B, Abruzzo A, Parolin C, Palomino RA, Dalena F, Bigucci F, Cerchiara T, Luppi B. Association of *Lactobacillus crispatus* with fructo-oligosaccharides and ascorbic



- acid in hydroxypropyl methylcellulose vaginal insert. *Carbohydr Polym* 2016;136:1161-9.
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Heinz Schleifer K, Whitman WB. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume three. The Firmicutes. New York, United States: Springer. 2009.
- Wang Y, Ametaj BN, Ambrose DJ, Gänzle MG. Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. *BMC Microbiol* 2013;13:19.
- Wessman P, Håkansson S, Leifer K, Rubino S. Formulations for freeze-drying of bacteria and their influence on cell survival. *J Vis Exp* 2013;(78).
- Yeo S, Shin HS, Lee HW, Hong D, Park H, Holzappel W, Kim EB, Huh CS. Determination of Optimized Growth Medium and Cryoprotective Additives to Enhance the Growth and Survival of *Lactobacillus salivarius*. *J Microbiol Biotechnol* 2018;28(5):718-31.
- Younes JA, van der Mei HC, van den Heuvel E, Busscher HJ, Reid G. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. *PLoS One*. 2012;7(5):e36917.
- Zakaria Gomaa E. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *J Gen Appl Microbiol* 2013;59(6):425-36.
- Zárate G, Nader-Macias ME. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett Appl Microbiol* 2006a;43(2):174-80.
- Zárate G, Nader-Macias ME. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. *Process Biochem* 2006b;41:1779-85.
- Zárate G, Santos V, Nader-Macias ME. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2009;2009:48358.
- Zárate G, Tomás MS, Nader-Macias ME. Effect of some pharmaceutical excipients on the survival of probiotic vaginal lactobacilli. *Can J Microbiol* 2005;51(6):483-9.
- Zendo T. Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013;77(5):893-9.



*Anexo*

**ANEXO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO****1 Resistencia de los lactobacilos al proceso de liofilización****1.1 *L. fermentum* L23****1.1.1 Experimento 1****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,82	1	1,82	268,56	0,0001
Columna2	1,82	1	1,82	268,56	0,0001
Error	0,03	4	0,01		
Total	1,85	5			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18660**

Error: 0,0068 gl: 4

Columna2	Medias	n	E.E.
DL	9,68	3	0,05 A
AL	10,78	3	0,05 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**1.1.2 Experimento 2****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,11	1	4,11	3720,68	<0,0001
Columna2	4,11	1	4,11	3720,68	<0,0001
Error	4,4E-03	4	1,1E-03		
Total	4,12	5			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07538**

Error: 0,0011 gl: 4

Columna2	Medias	n	E.E.
DL	8,37	3	0,02 A
AL	10,03	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**1.1.3 Experimento 3****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,37	1	2,37	547,26	<0,0001
Columna2	2,37	1	2,37	547,26	<0,0001
Error	0,02	4	4,3E-03		
Total	2,38	5			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14910**

Error: 0,0043 gl: 4

Columna2	Medias	n	E.E.
DL	8,53	3	0,04 A
AL	9,79	3	0,04 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 1.1.4 Experimento 4

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,76	1	0,76	9,14	0,0390
Columnal	0,76	1	0,76	9,14	0,0390
Error	0,33	4	0,08		
Total	1,10	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,65560

Error: 0,0836 gl: 4

Columnal	Medias	n	E.E.	
DL	10,44	3	0,17	A
AL	11,16	3	0,17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 1.1.5 Experimento 5

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,35	1	1,35	14,57	0,0188
Columnal	1,35	1	1,35	14,57	0,0188
Error	0,37	4	0,09		
Total	1,72	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,69059

Error: 0,0928 gl: 4

Columnal	Medias	n	E.E.	
DL	9,41	3	0,18	A
AL	10,36	3	0,18	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 1.2 *L. rhamnosus* L60

### 1.2.1 Experimento 1

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,95	1	0,95	160,18	0,0002
Columna2	0,95	1	0,95	160,18	0,0002
Error	0,02	4	0,01		
Total	0,98	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17483

Error: 0,0059 gl: 4

Columna2	Medias	n	E.E.	
DL	10,26	3	0,04	A
AL	11,06	3	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 1.2.2 Experimento 2

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,57	1	0,57	43,49	0,0027
Columna2	0,57	1	0,57	43,49	0,0027
Error	0,05	4	0,01		
Total	0,62	5			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,25902

Error: 0,0131 gl: 4

Columna2	Medias	n	E.E.	
DL	8,42	3	0,07	A
AL	9,03	3	0,07	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 1.2.3 Experimento 3

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,7E-04	1	5,7E-04	0,08	0,7880
Columna2	5,7E-04	1	5,7E-04	0,08	0,7880
Error	0,03	4	0,01		
Total	0,03	5			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18799

Error: 0,0069 gl: 4

Columna2	Medias	n	E.E.	
DL	10,02	3	0,05	A
AL	10,04	3	0,05	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 1.2.4 Experimento 4

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,91	1	0,91	12,39	0,0245
Columna1	0,91	1	0,91	12,39	0,0245
Error	0,29	4	0,07		
Total	1,20	5			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,61320

Error: 0,0732 gl: 4

Columna1	Medias	n	E.E.	
DL	10,75	3	0,16	A
AL	11,53	3	0,16	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 1.2.5 Experimento 5

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,31	1	0,31	11,56	0,0273
Columna1	0,31	1	0,31	11,56	0,0273
Error	0,11	4	0,03		
Total	0,42	5			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,37047

Error: 0,0267 gl: 4

Columna1	Medias	n	E.E.	
DL	10,87	3	0,09	A

AL	11,32	3	0,09	B
----	-------	---	------	---

## 2 Viabilidad de las cepas de lactobacilos en los óvulos vaginales

### 2.1 *L. fermentum* L23

#### 2.1.1 Formulación 1

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	74,41	2	37,21	1611,67	<0,0001
Tiempo	74,41	2	37,21	1611,67	<0,0001
Error	0,14	6	0,02		
Total	74,55	8			

##### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,38065

Error: 0,0231 gl: 6

Tiempo	Medias	n	E.E.	
60,00	0,00	3	0,09	A
30,00	2,50	3	0,09	B
0,00	6,95	3	0,09	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 2.1.2 Formulación 2

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	130,29	6	21,72	1394,66	<0,0001
Tiempo	130,29	6	21,72	1394,66	<0,0001
Error	0,22	14	0,02		
Total	130,51	20			

##### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,34789

Error: 0,0156 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.			
180,00	0,10	3	0,07	A		
150,00	1,20	3	0,07		B	
120,00	3,46	3	0,07			C
30,00	6,09	3	0,07			D
60,00	6,12	3	0,07			D
0,00	6,36	3	0,07			D
90,00	6,48	3	0,07			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.1.3 Formulación 3

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	138,97	6	23,16	1468,03	<0,0001
Tiempo	138,97	6	23,16	1468,03	<0,0001
Error	0,22	14	0,02		
Total	139,19	20			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,35019

Error: 0,0158 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.			
180,00	0,00	3	0,07	A		
150,00	0,86	3	0,07		B	
120,00	3,12	3	0,07			C
90,00	5,71	3	0,07			D
60,00	5,95	3	0,07			D
30,00	6,54	3	0,07			E
0,00	6,56	3	0,07			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.1.4 Formulación 5

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	181,46	8	22,68	356,35	<0,0001
Tiempo	181,46	8	22,68	356,35	<0,0001
Error	1,15	18	0,06		
Total	182,61	26			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,72178

Error: 0,0637 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.			
240,00	0,00	3	0,15	A		
210,00	0,26	3	0,15	A		
180,00	1,57	3	0,15		B	
120,00	3,13	3	0,15			C
150,00	3,56	3	0,15			C
90,00	5,44	3	0,15			D
60,00	5,45	3	0,15			D
0,00	7,11	3	0,15			E
30,00	7,23	3	0,15			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.1.5 Formulación 6

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	178,31	7	25,47	835,79	<0,0001
Tiempo	178,31	7	25,47	835,79	<0,0001
Error	0,49	16	0,03		
Total	178,80	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,49351

Error: 0,0305 gl: 16

Tiempo	Medias	n	E.E.	
210	0,00	3	0,10	A
180	1,50	3	0,10	B
150	1,51	3	0,10	B
120	4,09	3	0,10	C
90	5,31	3	0,10	D
60	6,18	3	0,10	E
30	6,99	3	0,10	F
0	7,98	3	0,10	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.1.6 Formulación 7

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	138,35	6	23,06	748,68	<0,0001
Tiempo	138,35	6	23,06	748,68	<0,0001
Error	0,43	14	0,03		
Total	138,78	20			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,48927

Error: 0,0308 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.	
180	0,00	3	0,10	A
150	1,22	3	0,10	B
120	2,85	3	0,10	C
90	4,70	3	0,10	D
60	5,65	3	0,10	E
30	6,76	3	0,10	F
0	7,20	3	0,10	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.1.7 Formulación 8

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	87,78	8	10,97	120,12	<0,0001
Tiempo	87,78	8	10,97	120,12	<0,0001
Error	1,64	18	0,09		
Total	89,43	26			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,86469

Error: 0,0914 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.				
240	2,48	3	0,17	A			
210	4,15	3	0,17		B		
180	6,08	3	0,17			C	
150	6,74	3	0,17			C	D
90	6,76	3	0,17			C	D
120	6,88	3	0,17			C	D
60	7,07	3	0,17				D
30	8,21	3	0,17				E
0	8,54	3	0,17				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.1.8 Formulación 8'

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	36,21	7	5,17	377,05	<0,0001
Tiempo	36,21	7	5,17	377,05	<0,0001
Error	0,22	16	0,01		
Total	36,42	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,33108

Error: 0,0137 gl: 16

Tiempo	Medias	n	E.E.				
210,00	3,92	3	0,07	A			
180,00	5,53	3	0,07		B		
120,00	6,10	3	0,07			C	
90,00	6,27	3	0,07			C	
60,00	6,32	3	0,07			C	
150,00	6,37	3	0,07			C	
30,00	7,47	3	0,07				D
0,00	8,40	3	0,07				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



### 2.1.9 Formulación 9

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	57,21	9	6,36	75,07	<0,0001
Tiempo	57,21	9	6,36	75,07	<0,0001
Error	1,69	20	0,08		
Total	58,91	29			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,84134

Error: 0,0847 gl: 20

Tiempo	Medias	n	E.E.	
270,00	3,96	3	0,17	A
180,00	6,20	3	0,17	B
210,00	6,22	3	0,17	B
240,00	6,31	3	0,17	B
60,00	6,59	3	0,17	B
150,00	6,79	3	0,17	B
90,00	6,99	3	0,17	B
120,00	7,00	3	0,17	B
30,00	8,65	3	0,17	C
0,00	9,36	3	0,17	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.1.10 Formulación 9'

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	140,61	16	8,79	265,50	<0,0001
Tiempo	140,61	16	8,79	265,50	<0,0001
Error	1,13	34	0,03		
Total	141,73	50			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,55405

Error: 0,0331 gl: 34

Tiempo	Medias	n	E.E.	
480,00	2,75	3	0,11	A
360,00	3,20	3	0,11	A B
450,00	3,26	3	0,11	A B
390,00	3,38	3	0,11	B
420,00	3,55	3	0,11	B
330,00	5,06	3	0,11	C
300,00	5,42	3	0,11	C D
270,00	5,80	3	0,11	D E
210,00	6,12	3	0,11	E F
240,00	6,13	3	0,11	E F
120,00	6,54	3	0,11	F G
180,00	6,55	3	0,11	F G
90,00	6,68	3	0,11	G H
60,00	6,73	3	0,11	G H
150,00	6,91	3	0,11	G H
30,00	7,12	3	0,11	H
0,00	8,65	3	0,11	I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**2.1.11 Formulación 10****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	17,18	2	8,59	100,93	<0,0001
Tiempo	17,18	2	8,59	100,93	<0,0001
Error	0,51	6	0,09		
Total	17,69	8			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,73095**

Error: 0,0851 gl: 6

Tiempo	Medias	n	E.E.	
60,00	5,58	3	0,17	A
30,00	7,09	3	0,17	B
0,00	8,96	3	0,17	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**2.1.12 Formulación 11****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	72,53	3	24,18	427,95	<0,0001
Tiempo	72,53	3	24,18	427,95	<0,0001
Error	0,45	8	0,06		
Total	72,98	11			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,62146**

Error: 0,0565 gl: 8

Tiempo	Medias	n	E.E.	
90,00	2,48	3	0,14	A
60,00	5,39	3	0,14	B
30,00	7,19	3	0,14	C
0,00	9,16	3	0,14	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**2.1.13 Formulación 11'****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	90,92	5	18,18	581,14	<0,0001
Tiempo	90,92	5	18,18	581,14	<0,0001
Error	0,38	12	0,03		
Total	91,30	17			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,48514**

Error: 0,0313 gl: 12

Tiempo	Medias	n	E.E.	
150,00	2,49	3	0,10	A
120,00	3,59	3	0,10	B
90,00	4,52	3	0,10	C
60,00	5,76	3	0,10	D
30,00	8,02	3	0,10	E
0,00	8,70	3	0,10	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**2.1.14 Formulación 12****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	100,84	5	20,17	803,43	<0,0001
Tiempo	100,84	5	20,17	803,43	<0,0001
Error	0,30	12	0,03		
Total	101,14	17			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,43453**

Error: 0,0251 gl: 12

Tiempo	Medias	n	E.E.			
150,00	2,50	3	0,09	A		
120,00	3,03	3	0,09		B	
90,00	6,16	3	0,09			C
60,00	7,66	3	0,09			D
30,00	7,68	3	0,09			D
0,00	8,64	3	0,09			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**2.1.15 Formulación 13****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	71,16	3	23,72	3253,55	<0,0001
Tiempo	71,16	3	23,72	3253,55	<0,0001
Error	0,06	8	0,01		
Total	71,22	11			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,22326**

Error: 0,0073 gl: 8

Tiempo	Medias	n	E.E.			
90,00	2,04	3	0,05	A		
60,00	6,39	3	0,05		B	
30,00	7,29	3	0,05			C
0,00	8,49	3	0,05			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**2.2 L. rhamnosus L60****2.2.1 Formulación 1****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	79,46	2	39,73	717,92	<0,0001
Tiempo	79,46	2	39,73	717,92	<0,0001
Error	0,33	6	0,06		
Total	79,80	8			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,58936**

Error: 0,0553 gl: 6

Tiempo	Medias	n	E.E.			
60,00	0,00	3	0,14	A		
30,00	3,75	3	0,14		B	
0,00	7,28	3	0,14			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 2.2.2 Formulación 2

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	93,42	6	15,57	1392,38	<0,0001
Tiempo	93,42	6	15,57	1392,38	<0,0001
Error	0,16	14	0,01		
Total	93,58	20			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,29482

Error: 0,0112 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.			
180,00	0,05	3	0,06	A		
150,00	1,50	3	0,06		B	
120,00	2,90	3	0,06			C
30,00	5,25	3	0,06			D
60,00	5,27	3	0,06			D
90,00	5,47	3	0,06			D
0,00	5,77	3	0,06			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 2.2.3 Formulación 3

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	114,26	6	19,04	1416,51	<0,0001
Tiempo	114,26	6	19,04	1416,51	<0,0001
Error	0,19	14	0,01		
Total	114,44	20			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,32326

Error: 0,0134 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.			
180,00	0,00	3	0,07	A		
150,00	1,49	3	0,07		B	
120,00	4,01	3	0,07			C
90,00	5,95	3	0,07			D
0,00	5,97	3	0,07			D
60,00	6,04	3	0,07			D
30,00	6,06	3	0,07			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 2.2.4 Formulación 5

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	177,76	8	22,22	361,28	<0,0001
Tiempo	177,76	8	22,22	361,28	<0,0001
Error	1,11	18	0,06		
Total	178,86	26			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,70949

Error: 0,0615 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.				
240	0,00	3	0,14	A			
210	2,67	3	0,14		B		
180	3,54	3	0,14			C	
150	3,71	3	0,14			C	
120	5,74	3	0,14				D
90	6,04	3	0,14				D
60	7,41	3	0,14				E
30	7,95	3	0,14				E
0	7,99	3	0,14				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 2.2.5 Formulación 6

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	224,68	9	24,96	267,61	<0,0001
Tiempo	224,68	9	24,96	267,61	<0,0001
Error	1,87	20	0,09		
Total	226,55	29			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,88309

Error: 0,0933 gl: 20

Tiempo	Medias	n	E.E.					
270	0,02	3	0,18	A				
240	2,01	3	0,18		B			
210	2,78	3	0,18		B			
180	3,81	3	0,18			C		
150	6,28	3	0,18				D	
90	6,79	3	0,18				D	E
120	6,99	3	0,18				D	E
60	7,58	3	0,18					E
30	8,02	3	0,18					F
0	8,29	3	0,18					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 2.2.6 Formulación 7

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	235,44	8	29,43	576,15	<0,0001
Tiempo	235,44	8	29,43	576,15	<0,0001
Error	0,92	18	0,05		
Total	236,36	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,64659

Error: 0,0511 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.					
240	0,00	3	0,13	A				
210	0,43	3	0,13	A				
180	1,45	3	0,13		B			
150	1,51	3	0,13		B			
120	3,88	3	0,13			C		
90	5,27	3	0,13				D	
60	6,49	3	0,13					E
30	7,57	3	0,13					F
0	8,09	3	0,13					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 2.2.7 Formulación 8

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	81,55	9	9,06	106,16	<0,0001
Tiempo	81,55	9	9,06	106,16	<0,0001
Error	1,71	20	0,09		
Total	83,26	29			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,84472

Error: 0,0854 gl: 20

Tiempo	Medias	n	E.E.					
270,00	2,48	3	0,17	A				
240,00	4,13	3	0,17		B			
210,00	5,56	3	0,17			C		
180,00	6,14	3	0,17			C	D	
150,00	6,47	3	0,17				D	
90,00	6,58	3	0,17				D	
60,00	6,78	3	0,17				D	E
120,00	6,81	3	0,17				D	E
30,00	7,43	3	0,17					E
0,00	8,71	3	0,17					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 2.2.8 Formulación 8'

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31,05	8	3,88	171,73	<0,0001
Tiempo	31,05	8	3,88	171,73	<0,0001
Error	0,41	18	0,02		
Total	31,46	26			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,43011**

Error: 0,0226 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.					
240,00	2,64	3	0,09	A				
210,00	3,92	3	0,09		B			
180,00	4,46	3	0,09			C		
120,00	4,93	3	0,09				D	
90,00	4,98	3	0,09				D	
150,00	5,04	3	0,09				D	
60,00	5,30	3	0,09				D	E
30,00	5,67	3	0,09					E
0,00	6,72	3	0,09					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 2.2.9 Formulación 9

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	81,06	17	4,77	99,00	<0,0001
Tiempo	81,06	17	4,77	99,00	<0,0001
Error	1,73	36	0,05		
Total	82,80	53			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,67203**

Error: 0,0482 gl: 36

Tiempo	Medias	n	E.E.					
510,00	2,48	3	0,13	A				
480,00	3,39	3	0,13		B			
450,00	4,73	3	0,13			C		
420,00	5,07	3	0,13			C		
360,00	5,16	3	0,13			C		
390,00	5,16	3	0,13			C		
300,00	5,86	3	0,13				D	
330,00	5,92	3	0,13				D	
270,00	5,93	3	0,13				D	
240,00	6,04	3	0,13				D	
210,00	6,06	3	0,13				D	
180,00	6,10	3	0,13				D	
120,00	6,46	3	0,13				D	E
150,00	6,47	3	0,13				D	E
90,00	6,52	3	0,13				D	E
30,00	6,84	3	0,13					E
60,00	7,12	3	0,13					E
0,00	7,63	3	0,13					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**2.2.10 Formulación 9'****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	109,41	17	6,44	61,59	<0,0001
Tiempo	109,41	17	6,44	61,59	<0,0001
Error	3,76	36	0,10		
Total	113,17	53			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,98990**

Error: 0,1045 gl: 36

Tiempo	Medias	n	E.E.					
510,00	3,40	3	0,19	A				
480,00	4,47	3	0,19	B				
450,00	4,86	3	0,19	B	C			
420,00	5,10	3	0,19	B	C	D		
390,00	5,76	3	0,19		C	D	E	
360,00	5,96	3	0,19			D	E	
300,00	6,71	3	0,19				E F	
330,00	6,73	3	0,19				E F	
270,00	7,45	3	0,19				F G	
240,00	7,52	3	0,19				F G	
180,00	7,54	3	0,19				F G	
60,00	7,56	3	0,19				F G	
120,00	7,58	3	0,19				F G	
210,00	7,60	3	0,19				F G	
90,00	7,61	3	0,19				F G	
150,00	7,69	3	0,19				F G	
30,00	7,88	3	0,19					G
0,00	9,10	3	0,19					H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**2.2.11 Formulación 10****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	86,93	4	21,73	167,98	<0,0001
Tiempo	86,93	4	21,73	167,98	<0,0001
Error	1,29	10	0,13		
Total	88,22	14			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,96655**

Error: 0,1294 gl: 10

Tiempo	Medias	n	E.E.					
120,00	2,08	3	0,21	A				
90,00	4,04	3	0,21		B			
60,00	5,25	3	0,21			C		
30,00	7,11	3	0,21				D	
0,00	9,04	3	0,21					E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



**2.2.12 Formulación 11****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	91,24	4	22,81	244,33	<0,0001
Tiempo	91,24	4	22,81	244,33	<0,0001
Error	0,93	10	0,09		
Total	92,17	14			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,82105**

Error: 0,0934 gl: 10

Tiempo	Medias	n	E.E.				
120,00	2,31	3	0,18	A			
90,00	4,28	3	0,18		B		
60,00	5,15	3	0,18			C	
30,00	7,95	3	0,18				D
0,00	9,10	3	0,18				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**2.2.13 Formulación 11'****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	76,76	5	15,35	290,65	<0,0001
Tiempo	76,76	5	15,35	290,65	<0,0001
Error	0,63	12	0,05		
Total	77,40	17			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,63032**

Error: 0,0528 gl: 12

Tiempo	Medias	n	E.E.				
150,00	2,48	3	0,13	A			
120,00	3,57	3	0,13		B		
90,00	4,71	3	0,13			C	
60,00	6,52	3	0,13				D
30,00	7,60	3	0,13				E
0,00	8,08	3	0,13				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**2.2.14 Formulación 12****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	94,64	8	11,83	319,89	<0,0001
Tiempo	94,64	8	11,83	319,89	<0,0001
Error	0,67	18	0,04		
Total	95,31	26			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,55017**

Error: 0,0370 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.					
240,00	2,33	3	0,11	A				
210,00	3,62	3	0,11		B			
180,00	3,71	3	0,11		B			
150,00	5,21	3	0,11			C		
120,00	5,63	3	0,11			C	D	
90,00	5,88	3	0,11				D	
60,00	6,73	3	0,11					E
30,00	7,21	3	0,11					E
0,00	8,68	3	0,11					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.2.15 Formulación 13

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	102,33	7	14,62	410,67	<0,0001
Tiempo	102,33	7	14,62	410,67	<0,0001
Error	0,57	16	0,04		
Total	102,90	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,53335

Error: 0,0356 gl: 16

Tiempo	Medias	n	E.E.			
210,00	2,85	3	0,11	A		
180,00	3,70	3	0,11		B	
150,00	4,88	3	0,11			C
90,00	7,36	3	0,11			D
60,00	7,38	3	0,11			D
120,00	7,38	3	0,11			D
30,00	7,74	3	0,11			D
0,00	9,11	3	0,11			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.3 Mezcla *L. fermentum* L23:*L. rhamnosus* L60

#### 2.3.1 Formulación 8'

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	23,53	8	2,94	260,00	<0,0001
Tiempo	23,53	8	2,94	260,00	<0,0001
Error	0,20	18	0,01		
Total	23,73	26			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,30429

Error: 0,0113 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.			
240,00	3,59	3	0,06	A		
210,00	5,02	3	0,06		B	
150,00	5,26	3	0,06		B	C
180,00	5,33	3	0,06		C	D
120,00	5,36	3	0,06		C	D E
90,00	5,61	3	0,06		D	E
60,00	5,66	3	0,06			E
30,00	6,32	3	0,06			F
0,00	7,27	3	0,06			G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.3.2 Formulación 9'

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	141,02	17	8,30	155,35	<0,0001
Tiempo	141,02	17	8,30	155,35	<0,0001
Error	1,92	36	0,05		
Total	142,94	53			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,70761

Error: 0,0534 gl: 36

Tiempo	Medias	n	E.E.							
510,00	2,81	3	0,13	A						
480,00	3,74	3	0,13	B						
450,00	4,91	3	0,13		C					
420,00	5,14	3	0,13		C					
390,00	5,21	3	0,13		C					
360,00	5,36	3	0,13		C					
330,00	6,21	3	0,13			D				
300,00	6,67	3	0,13			D	E			
240,00	7,10	3	0,13				E	F		
150,00	7,17	3	0,13				E	F	G	
180,00	7,25	3	0,13				E	F	G	
270,00	7,30	3	0,13				E	F	G	
210,00	7,46	3	0,13					F	G	
120,00	7,56	3	0,13					F	G	H
90,00	7,65	3	0,13					F	G	H
60,00	7,85	3	0,13						G	H
30,00	8,18	3	0,13							H
0,00	9,38	3	0,13							I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.3.3 Formulación 12

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	56,17	8	7,02	230,77	<0,0001
Tiempo	56,17	8	7,02	230,77	<0,0001
Error	0,55	18	0,03		
Total	56,72	26			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,49903

Error: 0,0304 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.							
240,00	2,23	3	0,10	A						
210,00	2,97	3	0,10		B					
180,00	3,56	3	0,10			C				
150,00	4,00	3	0,10			C				
90,00	5,33	3	0,10				D			
120,00	5,38	3	0,10				D			
60,00	5,79	3	0,10				D	E		
30,00	5,99	3	0,10						E	
0,00	6,74	3	0,10							F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 2.3.4 Formulación 13

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	72,07	7	10,30	499,44	<0,0001
Tiempo	72,07	7	10,30	499,44	<0,0001
Error	0,33	16	0,02		
Total	72,40	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,40587

Error: 0,0206 gl: 16

Tiempo	Medias	n	E.E.	
210,00	2,46	3	0,08	A
180,00	4,65	3	0,08	B
150,00	4,65	3	0,08	B
90,00	6,51	3	0,08	C
120,00	6,53	3	0,08	C
60,00	7,21	3	0,08	D
30,00	7,27	3	0,08	D
0,00	8,08	3	0,08	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 3 Producción de biofilm de las cepas probióticas aisladas de los óvulos

### 3.1 *L. fermentum* L23

#### 3.1.1 Formulación 2

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,07	2	0,03	0,14	0,8719
Días	0,07	2	0,03	0,14	0,8719
Error	1,49	6	0,25		
Total	1,56	8			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,24951

Error: 0,2488 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.	
90,00	7,61	3	0,29	A
180,00	7,68	3	0,29	A
0,00	7,82	3	0,29	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 3.1.2 Formulación 3

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,17	2	0,08	0,73	0,5189
Días	0,17	2	0,08	0,73	0,5189
Error	0,68	6	0,11		
Total	0,85	8			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,84506

Error: 0,1138 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.	
0,0	7,44	3	0,19	A
180,0	7,66	3	0,19	A
90,0	7,77	3	0,19	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3.1.3 Formulación 5

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,5E-04	2	1,8E-04	0,68	0,5408
Días	3,5E-04	2	1,8E-04	0,68	0,5408
Error	1,6E-03	6	2,6E-04		
Total	1,9E-03	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04033

Error: 0,0003 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
0,00	0,15	3	0,01 A
90,00	0,16	3	0,01 A
180,00	0,17	3	0,01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3.1.4 Formulación 6

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,1E-04	2	4,0E-04	1,33	0,3315
Días	8,1E-04	2	4,0E-04	1,33	0,3315
Error	1,8E-03	6	3,0E-04		
Total	2,6E-03	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04360

Error: 0,0003 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
0,00	0,12	3	0,01 A
180,00	0,12	3	0,01 A
90,00	0,14	3	0,01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3.1.5 Formulación 7

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,1E-03	2	5,6E-04	2,19	0,1926
Días	1,1E-03	2	5,6E-04	2,19	0,1926
Error	1,5E-03	6	2,5E-04		
Total	2,6E-03	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03995

Error: 0,0003 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
180,00	0,12	3	0,01 A
90,00	0,14	3	0,01 A
0,00	0,14	3	0,01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3.2 *L. rhamnosus* L60

#### 3.2.1 Formulación 2

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,22	2	0,11	0,77	0,5020
Días	0,22	2	0,11	0,77	0,5020
Error	0,86	6	0,14		
Total	1,09	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,95061

Error: 0,1440 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
90,00	7,65	3	0,22 A
0,00	7,65	3	0,22 A
180,00	7,98	3	0,22 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 3.2.2 Formulación 3

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,19	2	0,09	1,41	0,3143
Días	0,19	2	0,09	1,41	0,3143
Error	0,39	6	0,07		
Total	0,58	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,64216

Error: 0,0657 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
0,0	7,53	3	0,15 A
180,0	7,76	3	0,15 A
90,0	7,87	3	0,15 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 3.2.3 Formulación 5

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,3E-03	2	6,5E-04	3,74	0,0883
Días	1,3E-03	2	6,5E-04	3,74	0,0883
Error	1,0E-03	6	1,7E-04		
Total	2,4E-03	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03310

Error: 0,0002 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
90,00	0,13	3	0,01 A
0,00	0,15	3	0,01 A
180,00	0,15	3	0,01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3.2.4 Formulación 6

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,3E-04	3	1,1E-04	0,44	0,7281
Días	3,3E-04	3	1,1E-04	0,44	0,7281
Error	2,0E-03	8	2,5E-04		
Total	2,3E-03	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04113

Error: 0,0002 gl: 8

Días	Medias	n	E.E.	
180,00	0,13	3	0,01	A
270,00	0,14	3	0,01	A
90,00	0,14	3	0,01	A
0,00	0,15	3	0,01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 3.2.5 Formulación 7

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,4E-03	2	7,2E-04	2,87	0,1335
Días	1,4E-03	2	7,2E-04	2,87	0,1335
Error	1,5E-03	6	2,5E-04		
Total	3,0E-03	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03980

Error: 0,0003 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.	
90,00	0,12	3	0,01	A
0,00	0,13	3	0,01	A
180,00	0,15	3	0,01	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 4 Autoagregación *in vitro* de los lactobacilos probióticos contenidos en los óvulos vaginales

### 4.1 *L. fermentum* L23

#### 4.1.1 Formulación 5

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1078,28	5	215,66	6,03	0,0051
Columnal	1078,28	5	215,66	6,03	0,0051
Error	429,33	12	35,78		
Total	1507,61	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=16,40442

Error: 35,7778 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.			
T0 2 h	42,00	3	3,45	A		
T180 2 h	46,00	3	3,45	A	B	
T0 5 h	53,67	3	3,45	A	B	C
T90 2h	57,00	3	3,45	A	B	C
T180 5 h	58,67	3	3,45		B	C
T90 5h	65,00	3	3,45			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 4.1.2 Formulación 6

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	592,94	5	118,59	13,18	0,0002
Tiempo	592,94	5	118,59	13,18	0,0002
Error	108,00	12	9,00		
Total	700,94	17			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,22764

Error: 9,0000 gl: 12

Tiempo	Medias	n	E.E.			
T90 2h	39,00	3	1,73	A		
T180 2h	42,00	3	1,73	A	B	
T180 5h	49,33	3	1,73		B	C
T0 2h	49,67	3	1,73		B	C
T0 5h	54,00	3	1,73			C
T90 5h	54,33	3	1,73			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 4.1.3 Formulación 7

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	759,17	5	151,83	14,09	0,0001
Tiempo	759,17	5	151,83	14,09	0,0001
Error	129,33	12	10,78		
Total	888,50	17			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,00365

Error: 10,7778 gl: 12

Tiempo	Medias	n	E.E.			
T90 2h	37,00	3	1,90	A		
T180 2h	41,00	3	1,90	A		
T90 5h	41,67	3	1,90	A		
T0 2h	51,33	3	1,90		B	
T180 5h	52,00	3	1,90		B	
T0 5h	54,00	3	1,90		B	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 4.1.4 Formulación 8

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	248,94	5	49,79	3,72	0,0289
Columnal	248,94	5	49,79	3,72	0,0289
Error	160,67	12	13,39		
Total	409,61	17			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=10,03521

Error: 13,3889 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.		
L23 90 días 2 horas	42,67	3	2,11	A	
L23 0 días 2 horas	44,00	3	2,11	A	
L23 0 días 5 horas	45,67	3	2,11	A	
L23 180 días 2 horas	47,00	3	2,11	A	
L23 180 días 5 horas	51,67	3	2,11	A	
L23 90 días 5 horas	52,67	3	2,11	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



### 4.1.5 Formulación 9

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	532,00	7	76,00	4,54	0,0058
Columnal	532,00	7	76,00	4,54	0,0058
Error	268,00	16	16,75		
Total	800,00	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,56932

Error: 16,7500 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.			
L23 0 días 2 horas	40,00	3	2,36	A		
L23 180 días 2 horas	41,33	3	2,36	A	B	
L23 180 días 5 horas	43,33	3	2,36	A	B	C
L23 90 días 2 horas	43,67	3	2,36	A	B	C
L23 0 días 5 horas	45,67	3	2,36	A	B	C
L23 270 días 2 horas	47,67	3	2,36	A	B	C
L23 270 días 5 horas	52,33	3	2,36		B	C
L23 90 días 5 horas	54,00	3	2,36			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 4.1.6 Formulación 11

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	247,33	3	82,44	6,18	0,0177
Columnal	247,33	3	82,44	6,18	0,0177
Error	106,67	8	13,33		
Total	354,00	11			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,54757

Error: 13,3333 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.		
L23 0 días 5 horas	42,33	3	2,11	A	
L23 0 días 2 horas	43,33	3	2,11	A	
L23 90 días 2 horas	48,67	3	2,11	A	B
L23 90 días 5 horas	53,67	3	2,11		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 4.1.7 Formulación 12

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	156,00	3	52,00	2,77	0,1106
Columnal	156,00	3	52,00	2,77	0,1106
Error	150,00	8	18,75		
Total	306,00	11			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,32202

Error: 18,7500 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.	
L23 90 días 2 horas	48,00	3	2,50	A
L23 0 días 2 horas	51,33	3	2,50	A
L23 90 días 5 horas	55,33	3	2,50	A
L23 0 días 5 horas	57,33	3	2,50	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 4.2 *L. rhamnosus* L60

### 4.2.1 Formulación 5

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	191,17	5	38,23	2,04	0,1452
Columnal	191,17	5	38,23	2,04	0,1452
Error	225,33	12	18,78		
Total	416,50	17			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,88437

Error: 18,7778 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.	
T180 2 h	47,67	3	2,50	A
T0 2 h	48,33	3	2,50	A
T90 2h	50,00	3	2,50	A
T90 5h	52,00	3	2,50	A
T180 5 h	54,00	3	2,50	A
T0 5 h	57,00	3	2,50	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 4.2.2 Formulación 6

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	891,33	7	127,33	5,66	0,0020
Tiempo	891,33	7	127,33	5,66	0,0020
Error	360,00	16	22,50		
Total	1251,33	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=13,40885

Error: 22,5000 gl: 16

Tiempo	Medias	n	E.E.	
T0 2h	39,00	3	2,74	A
T270 2h	42,67	3	2,74	A
T180 2h	44,00	3	2,74	A
T90 2h	49,00	3	2,74	A B
T0 5h	49,00	3	2,74	A B
T180 5h	49,33	3	2,74	A B
T270 5h	52,00	3	2,74	A B
T90 5h	60,33	3	2,74	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 4.2.3 Formulación 7

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	372,94	5	74,59	1,73	0,2023
Tiempo	372,94	5	74,59	1,73	0,2023
Error	517,33	12	43,11		
Total	890,28	17			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=18,00731

Error: 43,1111 gl: 12

Tiempo	Medias	n	E.E.	
T0 2h	37,33	3	3,79	A
T180 2h	39,67	3	3,79	A
T90 2h	40,33	3	3,79	A
T180 5h	45,33	3	3,79	A
T0 5h	48,00	3	3,79	A
T90 5h	49,67	3	3,79	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 4.2.4 Formulación 8

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	588,96	7	84,14	4,76	0,0047
Columnal	588,96	7	84,14	4,76	0,0047
Error	282,67	16	17,67		
Total	871,63	23			

##### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,88167

Error: 17,6667 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.		
L60 270 días 2 horas	43,67	3	2,43	A	
L60 180 días 2 horas	46,00	3	2,43	A	B
L60 0 días 2 horas	46,33	3	2,43	A	B
L60 180 días 5 horas	52,00	3	2,43	A	B
L60 270 días 5 horas	54,00	3	2,43	A	B
L60 90 días 2 horas	55,33	3	2,43	A	B
L60 90 días 5 horas	56,67	3	2,43		B
L60 0 días 5 horas	57,00	3	2,43		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 4.2.5 Formulación 9

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	456,30	9	50,70	2,00	0,0942
Columnal	456,30	9	50,70	2,00	0,0942
Error	506,67	20	25,33		
Total	962,97	29			

##### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=14,55257

Error: 25,3333 gl: 20

Columnal	Medias	n	E.E.	
L60 0 días 2 horas	42,00	3	2,91	A
L60 180 días 2 horas	44,00	3	2,91	A
L60 360 días 2 horas	46,00	3	2,91	A
L60 270 días 2 horas	49,00	3	2,91	A
L60 0 días 5 horas	49,33	3	2,91	A
L60 180 días 5 horas	49,33	3	2,91	A
L60 90 días 2 horas	50,00	3	2,91	A
L60 90 días 5 horas	52,00	3	2,91	A
L60 270 días 5 horas	53,33	3	2,91	A
L60 360 días 5 horas	55,33	3	2,91	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 4.2.6 Formulación 11

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	238,25	3	79,42	3,81	0,0578
Columnal	238,25	3	79,42	3,81	0,0578
Error	166,67	8	20,83		
Total	404,92	11			

##### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,93446

Error: 20,8333 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.	
L60 0 días 2 horas	44,00	3	2,64	A
L60 90 días 2 horas	44,00	3	2,64	A
L60 90 días 5 horas	52,00	3	2,64	A
L60 0 días 5 horas	53,67	3	2,64	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 4.2.7 Formulación 12

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	333,61	5	66,72	2,81	0,0664
Columnal	333,61	5	66,72	2,81	0,0664
Error	285,33	12	23,78		
Total	618,94	17			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=13,37334

Error: 23,7778 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.	
L60 90 días 2 horas	46,00	3	2,82	A
L60 0 días 2 horas	51,33	3	2,82	A
L60 0 días 5 horas	54,33	3	2,82	A
L60 180 días 5 horas	56,67	3	2,82	A
L60 180 días 2 horas	57,33	3	2,82	A
L60 90 días 5 horas	58,67	3	2,82	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 4.3 Mezcla *L. fermentum* L23:*L. rhamnosus* L60

### 4.3.1 Formulación 12

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	286,44	5	57,29	2,46	0,0934
Columnal	286,44	5	57,29	2,46	0,0934
Error	279,33	12	23,28		
Total	565,78	17			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=13,23198

Error: 23,2778 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.	
M 0 días 2 horas	42,33	3	2,79	A
M 0 días 5 horas	49,00	3	2,79	A
M 180 días 2 horas	49,33	3	2,79	A
M 90 días 5 horas	52,33	3	2,79	A
M 90 días 2 horas	53,33	3	2,79	A
M 180 días 5 horas	54,33	3	2,79	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 5 Coagregación *in vitro* de lactobacilos probióticos contenidos en óvulos con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

### 5.1 *L. fermentum* L23

#### 5.1.1 Formulación 5

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	107,33	5	21,47	2,97	0,0567
dias/patogeno	107,33	5	21,47	2,97	0,0567
Error	86,67	12	7,22		
Total	194,00	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,37037

Error: 7,2222 gl: 12

dias/patogeno	Medias	n	E.E.
180/Ec1	29,33	3	1,55 A
0/Sa168	33,00	3	1,55 A B
90/Ec1	33,67	3	1,55 A B
0/Ec1	34,00	3	1,55 A B
180/Sa168	34,33	3	1,55 A B
90/Sa168	37,67	3	1,55 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 5.1.2 Formulación 6

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	73,74	5	14,75	1,61	0,2307
dias/patogeno	73,74	5	14,75	1,61	0,2307
Error	109,83	12	9,15		
Total	183,57	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,29718

Error: 9,1528 gl: 12

dias/patogeno	Medias	n	E.E.
0/Ec1	30,00	3	1,75 A
180/Ec1	31,67	3	1,75 A
0/Sa168	33,17	3	1,75 A
180/Sa168	33,33	3	1,75 A
90/Ec1	34,67	3	1,75 A
90/Sa168	36,33	3	1,75 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 5.1.3 Formulación 7

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	99,61	5	19,92	3,59	0,0325
dias/patogeno	99,61	5	19,92	3,59	0,0325
Error	66,67	12	5,56		
Total	166,28	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,46425

Error: 5,5556 gl: 12

dias/patogeno	Medias	n	E.E.
90/Ec1	31,67	3	1,36 A
0/Ec1	32,00	3	1,36 A
90/Sa168	33,67	3	1,36 A
180/Ec1	35,67	3	1,36 A
0/Sa168	36,67	3	1,36 A
180/Sa168	38,00	3	1,36 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 5.1.4 Formulación 8

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	148,67	5	29,73	2,89	0,0611
Columnal	148,67	5	29,73	2,89	0,0611
Error	123,33	12	10,28		
Total	272,00	17			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,79233

Error: 10,2778 gl: 12

Columnal	Medias	n	E.E.	
L23 90 días EC	29,67	3	1,85	A
L23 180 días EC	31,33	3	1,85	A
L23 0 días EC	31,67	3	1,85	A
L23 0 días SA	35,67	3	1,85	A
L23 180 días SA	36,67	3	1,85	A
L23 90 días SA	37,00	3	1,85	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 5.1.5 Formulación 9

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	139,17	7	19,88	1,47	0,2472
Columnal	139,17	7	19,88	1,47	0,2472
Error	216,67	16	13,54		
Total	355,83	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=10,40247

Error: 13,5417 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.	
L23 0 días EC	28,33	3	2,12	A
L23 180 días EC	29,33	3	2,12	A
L23 270 días EC	30,00	3	2,12	A
L23 90 días EC	32,00	3	2,12	A
L23 0 días SA	32,33	3	2,12	A
L23 90 días SA	33,33	3	2,12	A
L23 270 días SA	34,00	3	2,12	A
L23 180 días SA	36,00	3	2,12	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 5.1.6 Formulación 11

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	95,58	3	31,86	1,45	0,2981
Columnal	95,58	3	31,86	1,45	0,2981
Error	175,33	8	21,92		
Total	270,92	11			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=12,24083

Error: 21,9167 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.	
L23 0 días EC	27,67	3	2,70	A
L23 90 días EC	31,67	3	2,70	A
L23 90 días SA	34,00	3	2,70	A
L23 0 días SA	35,00	3	2,70	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 5.1.7 Formulación 12

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	142,25	3	47,42	5,52	0,0238
Columnal	142,25	3	47,42	5,52	0,0238
Error	68,67	8	8,58		
Total	210,92	11			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,66040

Error: 8,5833 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.		
L23 90 días EC	29,00	3	1,69	A	
L23 0 días EC	30,00	3	1,69	A	B
L23 0 días SA	36,00	3	1,69	A	B
L23 90 días SA	36,67	3	1,69		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 5.2 L. rhamnosus L60

#### 5.2.1 Formulación 5

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	176,94	5	35,39	4,75	0,0126
días/patogeno	176,94	5	35,39	4,75	0,0126
Error	89,33	12	7,44		
Total	266,28	17			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,48291

Error: 7,4444 gl: 12

días/patogeno	Medias	n	E.E.		
0/Ec1	23,67	3	1,58	A	
90/Ec1	27,33	3	1,58	A	B
90/Sa168	29,67	3	1,58	A	B
180/Ec1	31,00	3	1,58	A	B
0/Sa168	31,33	3	1,58		B
180/Sa168	33,33	3	1,58		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 5.2.2 Formulación 6

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	205,83	7	29,40	3,55	0,0171
días/patogeno	205,83	7	29,40	3,55	0,0171
Error	132,67	16	8,29		
Total	338,50	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,13994

Error: 8,2917 gl: 16

días/patogeno	Medias	n	E.E.		
90/Sa168	25,67	3	1,66	A	
270/Sa168	28,00	3	1,66	A	B
180/Ec1	30,33	3	1,66	A	B
90/Ec1	31,33	3	1,66	A	B
0/Sa168	33,00	3	1,66	A	B
180/Sa168	33,00	3	1,66	A	B
0/Ec1	33,67	3	1,66	A	B
270/Ec1	35,00	3	1,66		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 5.2.3 Formulación 7

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	247,33	5	49,47	4,28	0,0182
días/patogeno	247,33	5	49,47	4,28	0,0182
Error	138,67	12	11,56		
Total	386,00	17			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,32287

Error: 11,5556 gl: 12

días/patogeno	Medias	n	E.E.		
90/Ec1	23,00	3	1,96	A	
180/Ec1	27,67	3	1,96	A	B
90/Sa168	28,00	3	1,96	A	B
0/Ec1	28,33	3	1,96	A	B
0/Sa168	32,33	3	1,96		B
180/Sa168	34,67	3	1,96		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 5.2.4 Formulación 8

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	126,00	7	18,00	2,01	0,1174
Columnal	126,00	7	18,00	2,01	0,1174
Error	143,33	16	8,96		
Total	269,33	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,46085

Error: 8,9583 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.		
L23 270 días EC	29,33	3	1,73	A	
L23 0 días EC	29,67	3	1,73	A	
L23 90 días EC	32,00	3	1,73	A	
L23 180 días EC	32,67	3	1,73	A	
L23 0 días SA	33,00	3	1,73	A	
L23 180 días SA	35,00	3	1,73	A	
L23 90 días SA	35,33	3	1,73	A	
L23 270 días SA	35,67	3	1,73	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 5.2.5 Formulación 9

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	233,47	9	25,94	2,30	0,0584
Columnal	233,47	9	25,94	2,30	0,0584
Error	226,00	20	11,30		
Total	459,47	29			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,71925

Error: 11,3000 gl: 20

Columnal	Medias	n	E.E.		
L23 180 días EC	25,33	3	1,94	A	
L23 90 días EC	27,00	3	1,94	A	
L23 360 días EC	29,67	3	1,94	A	
L23 180 días SA	30,00	3	1,94	A	
L23 270 días EC	31,33	3	1,94	A	
L23 0 días EC	31,33	3	1,94	A	
L23 90 días SA	32,33	3	1,94	A	
L23 270 días SA	33,67	3	1,94	A	
L23 360 días SA	34,00	3	1,94	A	
L23 0 días SA	34,00	3	1,94	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



## 5.2.6 Formulación 11

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28,92	3	9,64	0,79	0,5316
Columnal	28,92	3	9,64	0,79	0,5316
Error	97,33	8	12,17		
Total	126,25	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,12030

Error: 12,1667 gl: 8

Columnal	Medias n	E.E.
L23 0 días EC	28,33 3	2,01 A
L23 90 días EC	30,00 3	2,01 A
L23 0 días SA	30,00 3	2,01 A
L23 90 días SA	32,67 3	2,01 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 5.2.7 Formulación 12

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	109,33	5	21,87	2,17	0,1255
Columnal	109,33	5	21,87	2,17	0,1255
Error	120,67	12	10,06		
Total	230,00	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,69675

Error: 10,0556 gl: 12

Columnal	Medias n	E.E.
L60 180 días EC	26,67 3	1,83 A
L60 0 días EC	27,67 3	1,83 A
L60 90 días EC	28,33 3	1,83 A
L60 0 días SA	30,00 3	1,83 A
L60 180 días SA	31,33 3	1,83 A
L60 90 días SA	34,00 3	1,83 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 5.3 Mezcla *L. fermentum* L23:*L. rhamnosus* L60

### 5.3.1 Formulación 12

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	155,78	5	31,16	3,44	0,0369
Columnal	155,78	5	31,16	3,44	0,0369
Error	108,67	12	9,06		
Total	264,44	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,25300

Error: 9,0556 gl: 12

Columnal	Medias n	E.E.
L60 180 días EC	25,00 3	1,74 A
L60 0 días EC	27,67 3	1,74 A B
L60 180 días SA	29,00 3	1,74 A B
L60 90 días EC	29,67 3	1,74 A B
L60 90 días SA	31,67 3	1,74 A B
L60 0 días SA	34,33 3	1,74 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 6 Actividad antimicrobiana de los lactobacilos aislados de los óvulos vaginales sobre *E. coli*

### 6.1 Método de estrías cruzadas

#### 6.1.1 *L. fermentum* L23

##### 6.1.1.1 Formulación 1

###### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9,56	2	4,78	1,59	0,2787
Días	9,56	2	4,78	1,59	0,2787
Error	18,00	6	3,00		
Total	27,56	8			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,33920

Error: 3,0000 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
30,00	21,33	3	1,00 A
0,00	23,33	3	1,00 A
60,00	23,67	3	1,00 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

##### 6.1.1.2 Formulación 2

###### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	60,67	6	10,11	3,54	0,0241
Días	60,67	6	10,11	3,54	0,0241
Error	40,00	14	2,86		
Total	100,67	20			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,71258

Error: 2,8571 gl: 14

Días	Medias	n	E.E.
60,00	21,33	3	0,98 A
120,00	22,00	3	0,98 A B
0,00	22,00	3	0,98 A B
150,00	22,67	3	0,98 A B
180,00	24,00	3	0,98 A B
30,00	25,00	3	0,98 A B
90,00	26,33	3	0,98 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**6.1.1.3 Formulación 3****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	181,81	6	30,30	7,31	0,0011
Días	181,81	6	30,30	7,31	0,0011
Error	58,00	14	4,14		
Total	239,81	20			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,67469**

Error: 4,1429 gl: 14

Días	Medias	n	E.E.	
150,00	22,67	3	1,18	A
180,00	23,67	3	1,18	A
90,00	25,33	3	1,18	A B
120,00	26,33	3	1,18	A B
60,00	28,00	3	1,18	A B
0,00	30,67	3	1,18	B
30,00	30,67	3	1,18	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.1.4 Formulación 5****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	78,29	7	11,18	2,77	0,0435
Días	78,29	7	11,18	2,77	0,0435
Error	64,67	16	4,04		
Total	142,96	23			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,68304**

Error: 4,0417 gl: 16

Días	Medias	n	E.E.	
120,00	27,00	3	1,16	A
210,00	27,00	3	1,16	A
30,00	27,67	3	1,16	A
60,00	29,00	3	1,16	A
180,00	29,67	3	1,16	A
0,00	31,00	3	1,16	A
90,00	31,33	3	1,16	A
150,00	31,67	3	1,16	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.1.1.5 Formulación 6

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	91,96	7	13,14	3,62	0,0156
Días	91,96	7	13,14	3,62	0,0156
Error	58,00	16	3,63		
Total	149,96	23			

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,38213

Error: 3,6250 gl: 16

Días	Medias	n	E.E.		
150,00	25,00	3	1,10	A	
120,00	27,00	3	1,10	A	B
0,00	27,00	3	1,10	A	B
210,00	28,33	3	1,10	A	B
90,00	28,67	3	1,10	A	B
60,00	29,67	3	1,10	A	B
180,00	31,00	3	1,10		B
30,00	31,00	3	1,10		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.1.1.6 Formulación 7

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	53,33	6	8,89	2,10	0,1189
Días	53,33	6	8,89	2,10	0,1189
Error	59,33	14	4,24		
Total	112,67	20			

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,73955

Error: 4,2381 gl: 14

Días	Medias	n	E.E.		
30,00	26,00	3	1,19	A	
120,00	28,33	3	1,19	A	
0,00	29,67	3	1,19	A	
180,00	29,67	3	1,19	A	
150,00	30,00	3	1,19	A	
60,00	30,33	3	1,19	A	
90,00	31,33	3	1,19	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.1.1.7 Formulación 8

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,56	2	1,78	1,60	0,2774
Días	3,56	2	1,78	1,60	0,2774
Error	6,67	6	1,11		
Total	10,22	8			

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,64075

Error: 1,1111 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.		
180,00	28,67	3	0,61	A	
90,00	30,00	3	0,61	A	
0,00	30,00	3	0,61	A	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**6.1.1.8 Formulación 8'****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,56	2	0,78	0,58	0,5868
Días	1,56	2	0,78	0,58	0,5868
Error	8,00	6	1,33		
Total	9,56	8			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,89280**

Error: 1,3333 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.	
90,00	29,67	3	0,67	A
0,00	30,33	3	0,67	A
180,00	30,67	3	0,67	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**6.1.1.9 Formulación 9****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31,33	3	10,44	6,27	0,0170
Días	31,33	3	10,44	6,27	0,0170
Error	13,33	8	1,67		
Total	44,67	11			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,37558**

Error: 1,6667 gl: 8

Días	Medias	n	E.E.	
180,00	27,67	3	0,75	A
0,00	28,00	3	0,75	A
270,00	30,00	3	0,75	A B
90,00	31,67	3	0,75	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**6.1.1.10 Formulación 9'****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,89	2	3,44	1,29	0,3416
Días	6,89	2	3,44	1,29	0,3416
Error	16,00	6	2,67		
Total	22,89	8			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,09103**

Error: 2,6667 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.	
0,00	29,33	3	0,94	A
180,00	29,67	3	0,94	A
90,00	31,33	3	0,94	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**6.1.1.11 Formulación 11****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,67	1	2,67	0,62	0,4766
Días	2,67	1	2,67	0,62	0,4766
Error	17,33	4	4,33		
Total	20,00	5			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,71907**

Error: 4,3333 gl: 4

Días	Medias	n	E.E.
0,00	29,33	3	1,20 A
90,00	30,67	3	1,20 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.1.12 Formulación 11'****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,67	1	0,67	0,20	0,6779
Días	0,67	1	0,67	0,20	0,6779
Error	13,33	4	3,33		
Total	14,00	5			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,13890**

Error: 3,3333 gl: 4

Días	Medias	n	E.E.
0,00	29,67	3	1,05 A
90,00	30,33	3	1,05 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.1.13 Formulación 12****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,17	1	0,17	0,04	0,8593
Días	0,17	1	0,17	0,04	0,8593
Error	18,67	4	4,67		
Total	18,83	5			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,89721**

Error: 4,6667 gl: 4

Días	Medias	n	E.E.
90,00	29,67	3	1,25 A
0,00	30,00	3	1,25 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.1.14 Formulación 13****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,17	1	0,17	0,07	0,8025
Días	0,17	1	0,17	0,07	0,8025
Error	9,33	4	2,33		
Total	9,50	5			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,46285**

Error: 2,3333 gl: 4

Días	Medias	n	E.E.
90,00	29,33	3	0,88 A

---

0,00 29,67 3 0,88 A

### 6.1.2 *L. rhamnosus* L60

#### 6.1.2.1 Formulación 1

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	44,67	2	22,33	14,36	0,0052
Días	44,67	2	22,33	14,36	0,0052
Error	9,33	6	1,56		
Total	54,00	8			

##### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,12458

Error: 1,5556 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.	
0,00	19,67	3	0,72	A
30,00	23,33	3	0,72	B
60,00	25,00	3	0,72	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.1.2.2 Formulación 2

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	81,14	6	13,52	3,23	0,0332
Días	81,14	6	13,52	3,23	0,0332
Error	58,67	14	4,19		
Total	139,81	20			

##### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,70721

Error: 4,1905 gl: 14

Días	Medias	n	E.E.	
0,00	20,67	3	1,18	A
150,00	20,67	3	1,18	A
60,00	21,00	3	1,18	A
30,00	23,00	3	1,18	A
120,00	23,00	3	1,18	A
180,00	25,33	3	1,18	A
90,00	25,67	3	1,18	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.1.2.3 Formulación 3

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	60,95	6	10,16	2,88	0,0481
Días	60,95	6	10,16	2,88	0,0481
Error	49,33	14	3,52		
Total	110,29	20			

##### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,23358

Error: 3,5238 gl: 14

Días	Medias	n	E.E.	
90,00	24,00	3	1,08	A
150,00	24,67	3	1,08	A
120,00	25,33	3	1,08	A
180,00	25,67	3	1,08	A
60,00	27,67	3	1,08	A
30,00	27,67	3	1,08	A

0,00            29,00            3    1,08    A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.1.2.4 Formulación 5

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	123,33	8	15,42	3,62	0,0111
Días	123,33	8	15,42	3,62	0,0111
Error	76,67	18	4,26		
Total	200,00	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,90430

Error: 4,2593 gl: 18

Días	Medias	n	E.E.	
210,00	25,00	3	1,19	A
150,00	27,00	3	1,19	A
90,00	27,67	3	1,19	A    B
240,00	28,00	3	1,19	A    B
30,00	28,33	3	1,19	A    B
120,00	29,00	3	1,19	A    B
60,00	29,33	3	1,19	A    B
180,00	30,67	3	1,19	A    B
0,00	33,00	3	1,19	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.1.2.5 Formulación 6

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38,00	9	4,22	1,54	0,1996
Días	38,00	9	4,22	1,54	0,1996
Error	54,67	20	2,73		
Total	92,67	29			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,78013

Error: 2,7333 gl: 20

Días	Medias	n	E.E.	
90,00	27,67	3	0,95	A
120,00	27,67	3	0,95	A
150,00	29,33	3	0,95	A
270,00	29,67	3	0,95	A
180,00	29,67	3	0,95	A
30,00	30,00	3	0,95	A
240,00	30,33	3	0,95	A
0,00	30,33	3	0,95	A
210,00	31,00	3	0,95	A
60,00	31,00	3	0,95	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



**6.1.2.6 Formulación 7****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	91,19	8	11,40	3,85	0,0084
Días	91,19	8	11,40	3,85	0,0084
Error	53,33	18	2,96		
Total	144,52	26			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,92453**

Error: 2,9630 gl: 18

Días	Medias	n	E.E.
210,00	27,00	3	0,99 A
90,00	27,00	3	0,99 A
120,00	27,67	3	0,99 A
0,00	28,00	3	0,99 A
30,00	30,33	3	0,99 A
150,00	30,67	3	0,99 A
180,00	31,00	3	0,99 A
60,00	31,33	3	0,99 A
240,00	31,67	3	0,99 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.2.7 Formulación 8****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22,92	3	7,64	3,40	0,0741
Días	22,92	3	7,64	3,40	0,0741
Error	18,00	8	2,25		
Total	40,92	11			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,92206**

Error: 2,2500 gl: 8

Días	Medias	n	E.E.
270,00	28,67	3	0,87 A
90,00	29,67	3	0,87 A
180,00	31,00	3	0,87 A
0,00	32,33	3	0,87 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.2.8 Formulación 8'****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,22	2	2,11	0,59	0,5817
Días	4,22	2	2,11	0,59	0,5817
Error	21,33	6	3,56		
Total	25,56	8			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,72392**

Error: 3,5556 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
90,00	29,00	3	1,09 A
0,00	29,67	3	1,09 A
180,00	30,67	3	1,09 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**6.1.2.9 Formulación 9****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15,33	4	3,83	0,91	0,4931
Días	15,33	4	3,83	0,91	0,4931
Error	42,00	10	4,20		
Total	57,33	14			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,50703**

Error: 4,2000 gl: 10

Días	Medias	n	E.E.
180,00	29,00	3	1,18 A
90,00	29,33	3	1,18 A
360,00	30,67	3	1,18 A
270,00	31,00	3	1,18 A
0,00	31,67	3	1,18 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.2.10 Formulación 9'****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,22	2	3,11	2,55	0,1583
Días	6,22	2	3,11	2,55	0,1583
Error	7,33	6	1,22		
Total	13,56	8			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,76964**

Error: 1,2222 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
0,00	29,33	3	0,64 A
90,00	30,00	3	0,64 A
180,00	31,33	3	0,64 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.2.11 Formulación 10****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,67	1	2,67	1,23	0,3295
Días	2,67	1	2,67	1,23	0,3295
Error	8,67	4	2,17		
Total	11,33	5			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,33689**

Error: 2,1667 gl: 4

Días	Medias	n	E.E.
90,00	30,00	3	0,85 A
0,00	31,33	3	0,85 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**6.1.2.12 Formulación 11****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,50	1	1,50	0,39	0,5655
Días	1,50	1	1,50	0,39	0,5655
Error	15,33	4	3,83		
Total	16,83	5			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,43847**

Error: 3,8333 gl: 4

Días	Medias	n	E.E.
90,00	30,67	3	1,13 A
0,00	31,67	3	1,13 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.2.13 Formulación 11'****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,17	1	4,17	0,68	0,4573
Días	4,17	1	4,17	0,68	0,4573
Error	24,67	4	6,17		
Total	28,83	5			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,62951**

Error: 6,1667 gl: 4

Días	Medias	n	E.E.
90,00	29,00	3	1,43 A
0,00	30,67	3	1,43 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.2.14 Formulación 12****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,89	2	3,44	1,29	0,3416
Días	6,89	2	3,44	1,29	0,3416
Error	16,00	6	2,67		
Total	22,89	8			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,09103**

Error: 2,6667 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
0,00	29,33	3	0,94 A
90,00	29,67	3	0,94 A
180,00	31,33	3	0,94 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.1.2.15 Formulación 13****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,22	2	3,11	0,72	0,5254
Días	6,22	2	3,11	0,72	0,5254
Error	26,00	6	4,33		
Total	32,22	8			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,21506**

Error: 4,3333 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.
------	--------	---	------

90,00	28,67	3	1,20	A
180,00	29,33	3	1,20	A
0,00	30,67	3	1,20	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.1.3 Mezcla *L. fermentum* L23:*L. rhamnosus* L60

#### 6.1.3.1 Formulación 8'

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10,89	2	5,44	1,26	0,3501
Días	10,89	2	5,44	1,26	0,3501
Error	26,00	6	4,33		
Total	36,89	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,21506

Error: 4,3333 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.	
90,00	30,67	3	1,20	A
180,00	32,33	3	1,20	A
0,00	33,33	3	1,20	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.1.3.2 Formulación 9'

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,56	2	0,78	0,37	0,7065
Días	1,56	2	0,78	0,37	0,7065
Error	12,67	6	2,11		
Total	14,22	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,64002

Error: 2,1111 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.	
0,00	30,00	3	0,84	A
90,00	30,67	3	0,84	A
180,00	31,00	3	0,84	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.1.3.3 Formulación 12

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,89	2	3,44	1,29	0,3416
Días	6,89	2	3,44	1,29	0,3416
Error	16,00	6	2,67		
Total	22,89	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,09103

Error: 2,6667 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.	
180,00	30,67	3	0,94	A
90,00	32,33	3	0,94	A
0,00	32,67	3	0,94	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.1.3.4 Formulación 13

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,22	2	3,11	0,72	0,5254
Días	6,22	2	3,11	0,72	0,5254
Error	26,00	6	4,33		
Total	32,22	8			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,21506

Error: 4,3333 gl: 6

Días	Medias	n	E.E.	
90,00	28,67	3	1,20	A
180,00	29,33	3	1,20	A
0,00	30,67	3	1,20	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.1.4 Promedios de las cepas de lactobacilos por separado con respecto a la mezcla de los mismos

#### 6.1.4.1 Formulación 8'

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	27,63	2	13,81	4,60	0,0203
cepa	27,63	2	13,81	4,60	0,0203
Error	72,00	24	3,00		
Total	99,63	26			

#### Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,68517

Error: 3,0000 gl: 24

cepa	Medias	n	E.E.	
L60	29,78	9	0,58	A
L23	30,22	9	0,58	A
M	32,11	9	0,58	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.1.4.2 Formulación 9'

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22,74	2	11,37	4,60	0,0204
CEPA	22,74	2	11,37	4,60	0,0204
Error	59,33	24	2,47		
Total	82,07	26			

#### Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,52977

Error: 2,4722 gl: 24

CEPA	Medias	n	E.E.	
L23	30,11	9	0,52	A
L60	30,22	9	0,52	A
M	32,11	9	0,52	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**6.1.4.3 Formulación 12****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20,35	2	10,17	3,31	0,0564
CEPA	20,35	2	10,17	3,31	0,0564
Error	64,61	21	3,08		
Total	84,96	23			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,85735**

Error: 3,0767 gl: 21

CEPA	Medias	n	E.E.	
L23	29,83	6	0,72	A
L60	30,11	9	0,58	A
M	31,89	9	0,58	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**6.1.4.4 Formulación 13****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20,56	2	10,28	3,72	0,0413
CEPA	20,56	2	10,28	3,72	0,0413
Error	57,94	21	2,76		
Total	78,50	23			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,75892**

Error: 2,7593 gl: 21

CEPA	Medias	n	E.E.	
L23	29,50	6	0,68	A
L60	29,56	9	0,55	A
M	31,44	9	0,55	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 6.2 Método de difusión en pozos

### 6.2.1 *L. fermentum* L23

#### 6.2.1.1 Formulación 1

##### 6.2.1.1.1 SLC

###### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,52	2	0,76	0,63	0,5637
Tiempo	1,52	2	0,76	0,63	0,5637
Error	7,22	6	1,20		
Total	8,74	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,74816

Error: 1,2033 gl: 6

Tiempo	Medias	n	E.E.
0,00	22,00	3	0,63 A
30,00	22,60	3	0,63 A
60,00	23,00	3	0,63 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

##### 6.2.1.1.2 SLCN

###### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,56	2	0,78	0,64	0,5615
Tiempo	1,56	2	0,78	0,64	0,5615
Error	7,33	6	1,22		
Total	8,89	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,76964

Error: 1,2222 gl: 6

Tiempo	Medias	n	E.E.
0,00	17,67	3	0,64 A
30,00	18,00	3	0,64 A
60,00	18,67	3	0,64 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.2.1.2 Formulación 2

##### 6.2.1.2.1 SLC

###### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	33,74	6	5,62	2,28	0,0955
Tiempo	33,74	6	5,62	2,28	0,0955
Error	34,50	14	2,46		
Total	68,24	20			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,37661

Error: 2,4643 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.
180,00	21,33	3	0,91 A
90,00	22,33	3	0,91 A
0,00	22,83	3	0,91 A
120,00	23,00	3	0,91 A
150,00	23,67	3	0,91 A
30,00	24,67	3	0,91 A
60,00	25,33	3	0,91 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.2.1.2.2 SLCN

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28,64	6	4,77	2,29	0,0944
Tiempo	28,64	6	4,77	2,29	0,0944
Error	29,17	14	2,08		
Total	57,81	20			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,02413

Error: 2,0833 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.
180,00	17,33	3	0,83 A
90,00	18,00	3	0,83 A
150,00	18,33	3	0,83 A
0,00	18,50	3	0,83 A
30,00	18,67	3	0,83 A
120,00	19,00	3	0,83 A
60,00	21,33	3	0,83 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.2.1.3 Formulación 3

#### 6.2.1.3.1 SLC

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	37,33	6	6,22	2,89	0,0477
Tiempo	37,33	6	6,22	2,89	0,0477
Error	30,15	14	2,15		
Total	67,48	20			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,09118

Error: 2,1533 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.
180,00	20,00	3	0,85 A
90,00	21,00	3	0,85 A
120,00	21,00	3	0,85 A
60,00	21,67	3	0,85 A
150,00	23,33	3	0,85 A
0,00	23,33	3	0,85 A
30,00	23,67	3	0,85 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.2.1.3.2 SLCN

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20,79	6	3,46	1,70	0,1931
Tiempo	20,79	6	3,46	1,70	0,1931
Error	28,50	14	2,04		
Total	49,29	20			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,97787

Error: 2,0357 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.
90,00	16,00	3	0,82 A
180,00	16,17	3	0,82 A
0,00	16,33	3	0,82 A
120,00	17,33	3	0,82 A
30,00	17,67	3	0,82 A



60,00	18,33	3	0,82	A
150,00	18,67	3	0,82	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 6.2.1.4 Formulación 5

### 6.2.1.4.1 SLC

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	57,33	7	8,19	1,82	0,1520
Tiempo	57,33	7	8,19	1,82	0,1520
Error	72,00	16	4,50		
Total	129,33	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,99662

Error: 4,5000 gl: 16

Tiempo	Medias	n	E.E.	
150,00	26,00	3	1,22	A
0,00	26,33	3	1,22	A
90,00	27,33	3	1,22	A
180,00	28,33	3	1,22	A
120,00	29,00	3	1,22	A
30,00	29,33	3	1,22	A
60,00	29,67	3	1,22	A
210,00	30,67	3	1,22	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.2.1.4.2 SLCN

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	16,50	7	2,36	0,80	0,6012
Tiempo	16,50	7	2,36	0,80	0,6012
Error	47,33	16	2,96		
Total	63,83	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,86210

Error: 2,9583 gl: 16

Tiempo	Medias	n	E.E.	
0,00	21,67	3	0,99	A
90,00	22,33	3	0,99	A
150,00	22,33	3	0,99	A
180,00	23,00	3	0,99	A
120,00	23,67	3	0,99	A
60,00	23,67	3	0,99	A
210,00	24,00	3	0,99	A
30,00	24,00	3	0,99	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.2.1.5 Formulación 6

#### 6.2.1.5.1 SLC

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	147,29	7	21,04	6,92	0,0007
Tiempo	147,29	7	21,04	6,92	0,0007
Error	48,67	16	3,04		
Total	195,96	23			

##### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,93010

Error: 3,0417 gl: 16

Tiempo	Medias	n	E.E.	
60,00	22,00	3	1,01	A
120,00	27,00	3	1,01	B
30,00	27,33	3	1,01	B
180,00	28,33	3	1,01	B
0,00	28,33	3	1,01	B
150,00	29,00	3	1,01	B
90,00	29,33	3	1,01	B
210,00	31,00	3	1,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.2.1.5.2 SLCN

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	130,63	7	18,66	16,59	<0,0001
Tiempo	130,63	7	18,66	16,59	<0,0001
Error	18,00	16	1,13		
Total	148,63	23			

##### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,99831

Error: 1,1250 gl: 16

Tiempo	Medias	n	E.E.			
60,00	17,67	3	0,61	A		
120,00	19,00	3	0,61	A	B	
150,00	21,67	3	0,61		B	C
180,00	22,33	3	0,61			C
30,00	22,33	3	0,61			C
0,00	22,67	3	0,61			C
90,00	24,00	3	0,61			C
210,00	25,33	3	0,61			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.2.1.6 Formulación 7

#### 6.2.1.6.1 SLC

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	65,90	6	10,98	3,60	0,0225
Tiempo	65,90	6	10,98	3,60	0,0225
Error	42,67	14	3,05		
Total	108,57	20			

##### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,86713

Error: 3,0476 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.		
150,00	27,00	3	1,01	A	
30,00	27,67	3	1,01	A	B
0,00	28,00	3	1,01	A	B
120,00	28,67	3	1,01	A	B
60,00	29,33	3	1,01	A	B
90,00	31,00	3	1,01	A	B
180,00	32,33	3	1,01		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.2.1.6.2 SLCN

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	83,14	6	13,86	5,39	0,0045
Tiempo	83,14	6	13,86	5,39	0,0045
Error	36,00	14	2,57		
Total	119,14	20			

##### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,47074

Error: 2,5714 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.		
0,00	20,33	3	0,93	A	
30,00	20,67	3	0,93	A	
120,00	21,67	3	0,93	A	
150,00	21,67	3	0,93	A	
60,00	22,00	3	0,93	A	B
90,00	24,33	3	0,93	A	B
180,00	26,33	3	0,93		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 6.2.2 *L. rhamnosus* L60

### 6.2.2.1 Formulación 1

#### 6.2.2.1.1 SLC

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,89	2	1,44	0,46	0,6494
Tiempo	2,89	2	1,44	0,46	0,6494
Error	18,67	6	3,11		
Total	21,56	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,41882

Error: 3,1111 gl: 6

Tiempo	Medias	n	E.E.
60,00	22,67	3	1,02 A
30,00	23,00	3	1,02 A
0,00	24,00	3	1,02 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 6.2.2.1.2 SLCN

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,17	2	1,08	0,36	0,7089
Tiempo	2,17	2	1,08	0,36	0,7089
Error	17,83	6	2,97		
Total	20,00	8			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,31906

Error: 2,9722 gl: 6

Tiempo	Medias	n	E.E.
0,00	17,50	3	1,00 A
30,00	18,33	3	1,00 A
60,00	18,67	3	1,00 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.2.2.2 Formulación 2

#### 6.2.2.2.1 SLC

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13,14	6	2,19	0,25	0,9530
Tiempo	13,14	6	2,19	0,25	0,9530
Error	124,67	14	8,90		
Total	137,81	20			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,31962

Error: 8,9048 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.
120,00	21,67	3	1,72 A
180,00	22,67	3	1,72 A
0,00	23,00	3	1,72 A
90,00	23,67	3	1,72 A
60,00	23,67	3	1,72 A
30,00	24,00	3	1,72 A
150,00	24,00	3	1,72 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**6.2.2.2 SLCN****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15,81	6	2,63	0,41	0,8604
Tiempo	15,81	6	2,63	0,41	0,8604
Error	90,00	14	6,43		
Total	105,81	20			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,06887**

Error: 6,4286 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.
90,00	17,33	3	1,46 A
180,00	18,00	3	1,46 A
60,00	18,33	3	1,46 A
30,00	19,00	3	1,46 A
120,00	19,00	3	1,46 A
0,00	19,67	3	1,46 A
150,00	20,00	3	1,46 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.2.2.3 Formulación 3****6.2.2.3.1 SLC****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,57	6	0,10	0,02	>0,9999
Tiempo	0,57	6	0,10	0,02	>0,9999
Error	84,00	14	6,00		
Total	84,57	20			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,82917**

Error: 6,0000 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.
120,00	23,67	3	1,41 A
60,00	23,67	3	1,41 A
0,00	23,67	3	1,41 A
150,00	24,00	3	1,41 A
180,00	24,00	3	1,41 A
90,00	24,00	3	1,41 A
30,00	24,00	3	1,41 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )**6.2.2.3.2 SLCN****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	29,16	6	4,86	1,63	0,2112
Tiempo	29,16	6	4,86	1,63	0,2112
Error	41,75	14	2,98		
Total	70,92	20			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,81475**

Error: 2,9824 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.
90,00	17,33	3	1,00 A
120,00	17,67	3	1,00 A
180,00	17,67	3	1,00 A
30,00	18,00	3	1,00 A
150,00	19,33	3	1,00 A
0,00	19,70	3	1,00 A
60,00	20,67	3	1,00 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 6.2.2.4 Formulación 5

### 6.2.2.4.1 SLC

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	117,33	8	14,67	3,12	0,0215
Tiempo	117,33	8	14,67	3,12	0,0215
Error	84,67	18	4,70		
Total	202,00	26			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,20471

Error: 4,7037 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.		
150,00	25,67	3	1,25	A	
60,00	26,67	3	1,25	A	B
240,00	27,33	3	1,25	A	B
180,00	29,67	3	1,25	A	B
210,00	30,33	3	1,25	A	B
90,00	30,67	3	1,25	A	B
120,00	30,67	3	1,25	A	B
30,00	31,00	3	1,25	A	B
0,00	32,00	3	1,25		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.2.2.4.2 SLCN

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	143,41	8	17,93	5,50	0,0013
Tiempo	143,41	8	17,93	5,50	0,0013
Error	58,67	18	3,26		
Total	202,07	26			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,16489

Error: 3,2593 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.		
150,00	20,00	3	1,04	A	
60,00	21,00	3	1,04	A	
30,00	21,00	3	1,04	A	
240,00	22,00	3	1,04	A	B
0,00	23,00	3	1,04	A	B
180,00	23,67	3	1,04	A	B
210,00	24,67	3	1,04	A	B
120,00	26,67	3	1,04		B
90,00	26,67	3	1,04		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 6.2.2.5 Formulación 6

### 6.2.2.5.1 SLC

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	80,83	9	8,98	2,17	0,0712
Tiempo	80,83	9	8,98	2,17	0,0712
Error	82,67	20	4,13		
Total	163,50	29			

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,87819

Error: 4,1333 gl: 20

Tiempo	Medias	n	E.E.		
60,00	26,33	3	1,17	A	
150,00	28,00	3	1,17	A	B
270,00	28,00	3	1,17	A	B
240,00	29,33	3	1,17	A	B
0,00	29,33	3	1,17	A	B
210,00	29,67	3	1,17	A	B
90,00	30,33	3	1,17	A	B
30,00	30,67	3	1,17	A	B
120,00	31,00	3	1,17	A	B
180,00	32,33	3	1,17		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.2.2.5.2 SLCN

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	186,83	9	20,76	11,12	<0,0001
Tiempo	186,83	9	20,76	11,12	<0,0001
Error	37,33	20	1,87		
Total	224,17	29			

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,95027

Error: 1,8667 gl: 20

Tiempo	Medias	n	E.E.				
60,00	19,00	3	0,79	A			
150,00	19,67	3	0,79	A	B		
270,00	20,67	3	0,79	A	B	C	
0,00	20,67	3	0,79	A	B	C	
240,00	20,67	3	0,79	A	B	C	
30,00	21,33	3	0,79	A	B	C	
210,00	23,33	3	0,79		B	C	D
120,00	23,67	3	0,79			C	D
90,00	26,00	3	0,79				D
180,00	26,67	3	0,79				D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 6.2.2.6 Formulación 7

### 6.2.2.6.1 SLC

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	40,67	8	5,08	1,72	0,1625
Tiempo	40,67	8	5,08	1,72	0,1625
Error	53,33	18	2,96		
Total	94,00	26			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,92453

Error: 2,9630 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.	
60,00	27,00	3	0,99	A
210,00	27,00	3	0,99	A
150,00	28,00	3	0,99	A
0,00	28,33	3	0,99	A
120,00	28,67	3	0,99	A
30,00	29,00	3	0,99	A
180,00	29,00	3	0,99	A
240,00	30,00	3	0,99	A
90,00	31,00	3	0,99	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 6.2.2.6.2 SLCN

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	48,30	8	6,04	2,67	0,0397
Tiempo	48,30	8	6,04	2,67	0,0397
Error	40,67	18	2,26		
Total	88,96	26			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,30016

Error: 2,2593 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.	
0,00	20,33	3	0,87	A
30,00	20,67	3	0,87	A
150,00	21,00	3	0,87	A
210,00	21,33	3	0,87	A
180,00	21,67	3	0,87	A
60,00	21,67	3	0,87	A
240,00	22,67	3	0,87	A
120,00	24,00	3	0,87	A
90,00	24,33	3	0,87	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



## 7 Inhibición de la producción de biofilm de *S. agalactiae* y *S. aureus* por los sobrenadantes libres de células de los lactobacilos aislados de los óvulos

### 7.1 *L. fermentum* L23

#### 7.1.1 Formulación 8

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	141,33	7	20,19	1,31	0,3061
Columnal	141,33	7	20,19	1,31	0,3061
Error	246,00	16	15,38		
Total	387,33	23			

##### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=11,08429

Error: 15,3750 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.
L23 SLC 180 días SGB	92,00	3	2,26 A
L23 SLCN 180 días SGB	95,00	3	2,26 A
L23 SLCN 0 días SA	97,67	3	2,26 A
L23 SLC 0 días SA	97,67	3	2,26 A
L23 SLC 180 días SA	98,33	3	2,26 A
L23 SLC 0 días SGB	99,33	3	2,26 A
L23 SLCN 180 días SA	99,33	3	2,26 A
L23 SLCN 0 días SGB	99,33	3	2,26 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### 7.1.2 Formulación 9

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	63,63	7	9,09	0,80	0,5995
Columnal	63,63	7	9,09	0,80	0,5995
Error	182,00	16	11,38		
Total	245,63	23			

##### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,53402

Error: 11,3750 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.
L23 SLCN 0 días SGB	94,67	3	1,95 A
L23 SLCN 180 días SA	95,00	3	1,95 A
L23 SLC 180 días SGB	95,33	3	1,95 A
L23 SLC 0 días SGB	96,00	3	1,95 A
L23 SLCN 180 días SGB	96,67	3	1,95 A
L23 SLC 180 días SA	97,33	3	1,95 A
L23 SLCN 0 días SA	98,33	3	1,95 A
L23 SLC 0 días SA	99,67	3	1,95 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 7.1.3 Formulación 12

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21,67	3	7,22	0,76	0,5472
Columnal	21,67	3	7,22	0,76	0,5472
Error	76,00	8	9,50		
Total	97,67	11			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,05908

Error: 9,5000 gl: 8

Columnal	Medias	n	E.E.
L23 SLCN 0 días SGB	94,67	3	1,78 A
L23 SLCN 0 días SA	95,00	3	1,78 A
L23 SLC 0 días SA	97,33	3	1,78 A
L23 SLC 0 días SGB	97,67	3	1,78 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 7.2 L. rhamnosus L60

#### 7.2.1 Formulación 8

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	61,96	7	8,85	0,81	0,5890
Columnal	61,96	7	8,85	0,81	0,5890
Error	174,00	16	10,88		
Total	235,96	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,32213

Error: 10,8750 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.
L60 SLCN 180 días SA	95,67	3	1,90 A
L60 SLCN 0 días SA	96,00	3	1,90 A
L60 SLCN 0 días SGB	96,00	3	1,90 A
L60 SLC 180 días SA	97,33	3	1,90 A
L60 SLC 0 días SA	97,33	3	1,90 A
L60 SLCN 180 días SGB	98,67	3	1,90 A
L60 SLC 0 días SGB	98,67	3	1,90 A
L60 SLC 180 días SGB	100,67	3	1,90 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 7.2.2 Formulación 9

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	57,96	7	8,28	0,61	0,7373
Columnal	57,96	7	8,28	0,61	0,7373
Error	216,00	16	13,50		
Total	273,96	23			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=10,38645

Error: 13,5000 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.
L60 SLCN 180 días SGB	97,00	3	2,12 A
L60 SLC 180 días SGB	97,33	3	2,12 A
L60 SLCN 180 días SA	98,00	3	2,12 A
L60 SLCN 0 días SA	98,00	3	2,12 A
L60 SLC 180 días SA	98,33	3	2,12 A
L60 SLC 0 días SGB	99,67	3	2,12 A
L60 SLCN 0 días SGB	100,00	3	2,12 A
L60 SLC 0 días SA	102,00	3	2,12 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 7.2.3 Formulación 12

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	61,96	7	8,85	0,81	0,5890
Columnal	61,96	7	8,85	0,81	0,5890
Error	174,00	16	10,88		
Total	235,96	23			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,32213

Error: 10,8750 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.
L60 SLCN 180 días SA	95,67	3	1,90 A
L60 SLCN 0 días SA	96,00	3	1,90 A
L60 SLCN 0 días SGB	96,00	3	1,90 A
L60 SLC 180 días SA	97,33	3	1,90 A
L60 SLC 0 días SA	97,33	3	1,90 A
L60 SLCN 180 días SGB	98,67	3	1,90 A
L60 SLC 0 días SGB	98,67	3	1,90 A
L60 SLC 180 días SGB	100,67	3	1,90 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 7.3 *L. fermentum* L23:*L. rhamnosus* L60

#### 7.3.1 Formulación 12

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	66,29	7	9,47	1,37	0,2834
Columnal	66,29	7	9,47	1,37	0,2834
Error	110,67	16	6,92		
Total	176,96	23			

##### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,43445

Error: 6,9167 gl: 16

Columnal	Medias	n	E.E.
M SLCN 0 días SA	95,00	3	1,52 A
M SLCN 180 días SGB	95,00	3	1,52 A
M SLC 0 días SGB	98,00	3	1,52 A
M SLC 0 días SA	98,00	3	1,52 A
M SLC 180 días SA	98,33	3	1,52 A
M SLC 180 días SGB	98,33	3	1,52 A
M SLCN 180 días SA	99,33	3	1,52 A
M SLCN 0 días SGB	99,67	3	1,52 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 8 Liberación *in vitro* de la mezcla de lactobacilos contenidos en los óvulos al fluido vaginal simulado

### 8.1 Análisis por formulación

#### 8.1.1 Formulación 5

##### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	25632,31	7	3661,76	530,21	<0,0001
Minutos	25632,31	7	3661,76	530,21	<0,0001
Error	110,50	16	6,91		
Total	25742,81	23			

##### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,42884

Error: 6,9062 gl: 16

Minutos	Medias	n	E.E.
1,00	9,67	3	1,52 A
2,00	10,72	3	1,52 A
3,00	51,30	3	1,52 B
4,00	56,07	3	1,52 B
5,00	69,10	3	1,52 C
6,00	80,93	3	1,52 D
7,00	97,83	3	1,52 E
8,00	99,27	3	1,52 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 8.1.2 Formulación 6

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	33127,31	7	4732,47	1390,20	<0,0001
Minutos	33127,31	7	4732,47	1390,20	<0,0001
Error	54,47	16	3,40		
Total	33181,78	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,21562

Error: 3,4042 gl: 16

Minutos	Medias	n	E.E.					
1,00	7,03	3	1,07	A				
2,00	7,47	3	1,07	A				
3,00	31,23	3	1,07		B			
4,00	73,50	3	1,07			C		
5,00	81,13	3	1,07				D	
6,00	93,03	3	1,07					E
8,00	97,67	3	1,07					E
7,00	99,03	3	1,07					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 8.1.3 Formulación 9

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20062,84	7	2866,12	512,23	<0,0001
Minutos	20062,84	7	2866,12	512,23	<0,0001
Error	89,53	16	5,60		
Total	20152,37	23			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,68677

Error: 5,5954 gl: 16

Minutos	Medias	n	E.E.					
1,00	8,10	3	1,37	A				
2,00	58,67	3	1,37		B			
3,00	86,77	3	1,37			C		
4,00	88,30	3	1,37			C	D	
5,00	91,03	3	1,37			C	D	E
6,00	94,90	3	1,37				D	E
7,00	96,67	3	1,37					E
8,00	99,00	3	1,37					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 8.2 Análisis por tiempo de incubación

### 8.2.1 1 minuto

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	10,53	2	5,26	3,87	0,0832
Formulación	10,53	2	5,26	3,87	0,0832
Error	8,15	6	1,36		
Total	18,68	8			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,32897

Error: 1,3589 gl: 6

Formulación	Medias	n	E.E.	
F6	7,03	3	0,67	A
F9	8,10	3	0,67	A B
F5	9,67	3	0,67	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 8.2.2 2 minutos

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	996,24	2	498,12	126,21	<0,0001
Formulación	996,24	2	498,12	126,21	<0,0001
Error	23,68	6	3,95		
Total	1019,92	8			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,96904

Error: 3,9466 gl: 6

Formulación	Medias	n	E.E.	
F6	7,47	3	1,15	A
F5	10,72	3	1,15	A
F9	31,23	3	1,15	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 8.2.3 3 minutos

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2101,76	2	1050,88	78,31	0,0001
Formulación	2101,76	2	1050,88	78,31	0,0001
Error	80,51	6	13,42		
Total	2182,28	8			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=7,31865

Error: 13,4189 gl: 6

Formulación	Medias	n	E.E.	
F5	51,30	3	2,11	A
F6	58,67	3	2,11	B
F9	86,77	3	2,11	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**8.2.4 4 minutos****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1561,95	2	780,97	73,72	0,0001
Formulación	1561,95	2	780,97	73,72	0,0001
Error	63,57	6	10,59		
Total	1625,52	8			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=6,50297**

Error: 10,5944 gl: 6

Formulación	Medias	n	E.E.	
F5	56,07	3	1,88	A
F6	73,50	3	1,88	B
F9	88,30	3	1,88	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**8.2.5 5 minutos****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	723,88	2	361,94	64,57	0,0001
Formulación	723,88	2	361,94	64,57	0,0001
Error	33,63	6	5,61		
Total	757,52	8			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,73023**

Error: 5,6056 gl: 6

Formulación	Medias	n	E.E.	
F5	69,10	3	1,37	A
F6	81,13	3	1,37	B
F9	91,03	3	1,37	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**8.2.6 6 minutos****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	344,96	2	172,48	35,04	0,0005
Formulación	344,96	2	172,48	35,04	0,0005
Error	29,53	6	4,92		
Total	374,50	8			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,43255**

Error: 4,9222 gl: 6

Formulación	Medias	n	E.E.	
F5	80,93	3	1,28	A
F6	93,03	3	1,28	B
F9	94,90	3	1,28	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**8.2.7 7 minutos****Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,40	2	4,20	2,54	0,1587
Formulación	8,40	2	4,20	2,54	0,1587
Error	9,92	6	1,65		
Total	18,32	8			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,56893**

Error: 1,6533 gl: 6

Formulación	Medias	n	E.E.	
F9	96,67	3	0,74	A
F5	97,83	3	0,74	A
F6	99,03	3	0,74	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 8.2.8 8 minutos

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,91	2	1,95	2,36	0,1749
Formulación	3,91	2	1,95	2,36	0,1749
Error	4,96	6	0,83		
Total	8,87	8			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,81651

Error: 0,8267 gl: 6

Formulación	Medias	n	E.E.	
F6	97,77	3	0,52	A
F9	99,03	3	0,52	A
F5	99,27	3	0,52	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## 9 Inhibición *in situ* de la adherencia de *S. aureus* y *S. agalactiae* a células epiteliales vaginales por la mezcla de lactobacilos

### 9.1 *S. aureus*

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	30142,95	3	10047,65	26,13	<0,0001
Ensayo	30142,95	3	10047,65	26,13	<0,0001
Error	14611,17	38	384,50		
Total	44754,12	41			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=17,37877

Error: 384,5044 gl: 38

Ensayo	Medias	n	E.E.	
Competencia	27,40	10	6,20	A
Exclusión	28,80	10	6,20	A
Desplazamiento	39,50	10	6,20	A
Control	90,33	12	5,66	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



## 9.2 *S. agalactiae* o SGB

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	37098,24	3	12366,08	52,74	<0,0001
Ensayo	37098,24	3	12366,08	52,74	<0,0001
Error	8910,17	38	234,48		
Total	46008,40	41			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=13,57124

Error: 234,4781 gl: 38

Ensayo	Medias	n	E.E.	
Exclusión	17,60	10	4,84	A
Competencia	27,70	10	4,84	A
Desplazamiento	42,00	10	4,84	B
Control	92,17	12	4,42	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )