

**"ARTIGO HIGIÊNICO COMPREENDENDO UMA COMPOSIÇÃO INIBIDORA DE
MICRÓBIO"**

Campo da Invenção

5 A presente invenção se refere a um artigo
higiênico, tal como, um artigo do tipo de toalhas
higiênicas, forros de calças, protetores de incontinência
urinária, fraldas, tampões ou similares, compreendendo pelo
10 menos um produto extracelular de pelo menos uma bactéria
probiótica e/ou pelo menos uma bactéria probiótica e pelo
menos um dentre aditivos selecionados, proporcionando um
efeito sinérgico inibidor na bactéria *Candida albicans*
ou em outros indesejados microorganismos.

15 Antecedentes da Invenção

A área urogenital abriga um complexo ecossistema
microbiano, compreendendo mais de 50 diferentes espécies de
bactérias (Hill e outros, *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 1984;86
(suppl.) 23-29). As espécies dominantes para as mulheres
20 férteis nessa área incluem a bactéria produtora de ácido
lático pertencente ao gênero *Lactobacillus*. Esses
elementos produtores de ácido lático são importantes para
reter uma flora microbiana saudável nessas áreas e atuar
como uma bactéria probiótica com um efeito antagonístico
25 contra as espécies microbianas patogênicas. A bactéria
produtora de ácido lático inibe o crescimento e a
colonização por outros microorganismos, ocupando adequados
nichos de colonização, formando biofilmes e competindo por
nutrientes disponíveis, dessa forma, excluindo a
30 colonização por microorganismos danosos. Também, a produção
de peróxido de hidrogênio, de substâncias inibidoras
específicas, como, por exemplo, as bacteriocinas, e de
ácidos orgânicos (incluindo ácido lático e ácido acético)

que diminuem o pH, inibem o crescimento e a colonização por outros microorganismos.

O ecossistema microbiano de um indivíduo saudável pode ser prejudicado pelo uso de antibióticos durante
5 mudanças hormonais, como, por exemplo, durante a gravidez ou através do uso de anticoncepcionais contendo estrogênio durante a menstruação, após a menopausa, ou em pessoas que sofrem de diabetes, etc. Também, os microorganismos podem se espalhar do ânus para a área urogenital, isso resultando
10 na perturbação da flora microbiana normal, deixando o indivíduo suscetível a infecções microbianas, como, por exemplo, vaginite, infecções produzidas pela *Candida albicans*, infecções do trato urinário e infecções na pele. Os microorganismos comumente associados com esses tipos de
15 infecções pertencem ao gênero *Escherichia*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Gardnerella* e *Candida*. As mulheres se encontram em um risco específico, devido à distância mais curta entre o ânus e o trato urogenital; especialmente, em
20 risco são as mulheres jovens, que ainda não apresentam uma microflora bem desenvolvida na área urogenital e as mulheres mais idosas, que, na maioria dos casos, nem apresentam mais uma flora protetora.

De modo similar à área urogenital, a pele é
25 colonizada por um sistema de organismos, os quais formam sua flora normal. O número e identidade dos organismos variam entre diferentes locais da pele. Isso, juntamente com a barreira estrutural da pele, proporciona ao hospedeiro uma excelente defesa contra micróbios invasores.
30 O número de bactérias na pele varia de algumas centenas por cm^2 nas superfícies áridas do antebraço e das costas, para dezenas de milhares por cm^2 nas áreas úmidas, tais como, as axilas e virilha. Essa flora normal desempenha um importante papel na prevenção de organismos estranhos se

colonizarem na pele, mas, isso precisa ser sempre verificado, a fim de evitar infecções na pele.

O *Staphylococcus aureus* é o causador mais comum de pequenas infecções na pele, como, por exemplo, bolhas ou abscessos, assim como, infecções mais sérias de feridas pós-operatórias. O tratamento envolve drenagem, isto sendo suficiente para as lesões menores, mas, os antibióticos devem ser providos em adição quando a infecção for grave e o paciente tiver febre.

A síndrome do choque tóxico é uma infecção sistêmica provocada pelas linhagens do *S. aureus*, que produz a toxina da síndrome do choque tóxico. A doença ganhou evidência através de sua associação com o uso de tampão pelas mulheres saudáveis, mas isso não está confinado às mulheres, podendo ocorrer como resultado de uma infecção do *S. aureus* em locais não-genitais.

Outras infecções comuns da pele são causadas pelo *Streptococcus pyogenes* (*streptococcus* do grupo A). Os organismos são adquiridos através do contato com outras pessoas com lesões infectadas na pele e podem, primeiro, colonizar e se multiplicar na pele normal, antes da invasão através de fissuras menores do epitélio e do desenvolvimento de lesões.

O tratamento com penicilina ou eritromicina pode ser necessário para combater a infecção.

A *Candida* gosta de locais da pele que são úmidos e quentes e também rapidamente se coloniza na pele danificada. Conseqüentemente, a secura relativa da maioria das áreas da pele evita o crescimento da *Candida*, que, portanto, é encontrada em baixo número na pele saudável. A *Candida* também se coloniza na mucosa oral e vaginal e um crescimento excessivo pode resultar em doença nesses locais. A *Candida albicans* está associada com a dermatite causada pela fralda. Um estudo mostrou que a *Candida*

albicans induziu lesões que são acentuadamente influenciadas pelo pH, pelo que um pH mais baixo da pele proporciona menos lesões na pele (B. Runeman, *Acta Derm. Venereol.*, 2000; 80: 421-424).

5 Uma maneira de reduzir os problemas com o tipo de infecções descrito acima é ter uma satisfatória higiene pessoal. No entanto, o uso excessivo de agentes de limpeza não apenas diminui a quantidade de micróbios danosos, como, também, prejudica a flora microbiana benéfica, tornando
10 novamente a mesma suscetível a espécies patogênicas para se colonizarem e provocar infecções. Alternativamente, a administração de bactérias produtoras de ácido láctico à área urogenital e à pele, a fim de competir com espécies patogênicas e facilitar o restabelecimento e manutenção de
15 uma flora microbiana benéfica nessas áreas, foi encontrada como sendo um fato de sucesso para o tratamento e prevenção de infecções microbianas.

 Foi sugerido que a bactéria produtora de ácido láctico possa ser liberada através dos produtos
20 absorventes, tais como, fraldas, toalhas higiênicas, protetores de incontinência, forros de calças e tampões, conforme descrito, por exemplo, nos documentos de patentes WO 92/13577, WO 97/02846, WO 99/17813, WO 99/45099 e WO 00/35502.

25 Outros modos de liberação da bactéria produtora de ácido láctico foram também sugeridos, como, por exemplo, um tecido que permite a limpeza e a proteção da pele e da área urogenital e a liberação da bactéria probiótica produtora de ácido láctico, por exemplo, no documento de
30 patente WO 04/060416.

 Um principal problema com a provisão de produtos idealizados de serem usados para transferência da bactéria produtora de ácido láctico é que a bactéria deve manter a viabilidade durante o transporte e armazenamento dos

produtos. A bactéria produtora de ácido láctico rapidamente perde a viabilidade sob condições semi-úmidas, sendo, portanto, importante que a bactéria não seja exposta à umidade durante o armazenamento. Um modo de parcialmente
5 superar esse problema nos produtos absorventes providos com a bactéria produtora de ácido láctico tem sido suprir os produtos com a bactéria, secar os ditos produtos para remover a maior parte da sua umidade e proporcionar o produto em pacotes impermeáveis à umidade (documento de
10 patente W0 99/17813).

O documento de patente WO 00/61201 divulga um produto higiênico contendo uma quantidade efetiva de uma bactéria probiótica viável, não-patogênica, tal como, *Bacillus coagulans*, ou um produto extracelular da mesma.

15 O documento de patente EP 1140226 descreve a combinação de uma substância reguladora de pH, na forma de um material superabsorvente, parcialmente neutralizada com a bactéria produtora de ácido láctico.

Diante do apresentado pelo estado da técnica,
20 existe ainda a necessidade de artigos higiênicos com um aperfeiçoado efeito prebiótico e/ou probiótico, cujos artigos higiênicos sejam fáceis de armazenar e transportar.

Resumo da Invenção

25 Diante do apresentado pelo estado da técnica, constitui um objetivo da presente invenção proporcionar um artigo higiênico que compreende uma composição inibidora de micróbios com um aperfeiçoado efeito. Constitui também um objetivo da presente invenção, que o dito artigo higiênico
30 compreendendo uma composição inibidora de micróbios possa ser facilmente transportado e armazenado, sem que a composição inibidora de micróbios perca seu equilíbrio de microflora e funcionamento de promoção de saúde.

Os problemas definidos acima são solucionados pela presente invenção, mediante um artigo higiênico, tal como, um artigo do tipo de toalhas higiênicas, forros de calças, protetores de incontinência urinária, fraldas, 5 tampões ou similares, compreendendo uma composição inibidora de micróbio que compreende um produto extracelular de pelo menos uma bactéria probiótica e/ou pelo menos uma bactéria probiótica e pelo menos um aditivo na forma de um ácido orgânico, tendo um valor de pKa que 10 não excede a 5,5, e/ou um sal do mesmo, proporcionando um efeito sinérgico probiótico e/ou prebiótico.

Em um aspecto da invenção, o dito valor de pKa não excede a 5.

De acordo com a presente invenção, o dito produto 15 extracelular inibidor de micróbio é um sobrenadante obtido mediante filtração ou centrifugação de uma cultura de uma bactéria probiótica.

Em uma modalidade, a dita composição inibidora de micróbio é substancialmente isenta de bactérias 20 probióticas, ditas bactérias probióticas, preferivelmente, não estando presente numa quantidade superior a 100 CFU/mL, mais preferivelmente, não superior a 10 CFU/mL.

Em outra modalidade da invenção, a dita 25 composição inibidora de micróbio compreende pelo menos uma bactéria probiótica e pelo menos um dos ditos aditivos.

Em uma adicional modalidade da invenção, a dita 30 composição inibidora de micróbio compreende pelo menos uma bactéria probiótica, um produto extracelular de pelo menos uma bactéria probiótica e pelo menos um dos ditos aditivos.

Em um aspecto da invenção, a bactéria probiótica 30 é uma bactéria produtora de ácido láctico.

Em um adicional aspecto da invenção, a bactéria produtora de ácido láctico é *Lactobacillus plantarium*, LB 931. Em outro aspecto da invenção, a bactéria produtora de

ácido láctico é *Lactobacillus fermentum*, Ess-1. Em um adicional aspecto da invenção, a bactéria produtora de ácido láctico é uma combinação de *Lactobacillus plantarum*, LB 931 e *Lactobacillus fermentum*, Ess-1.

5 Em um aspecto da invenção, o dito aditivo é escolhido dentre ácido acético, ácido propiônico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprônico, ácido succínico e/ou um sal dos mesmos. Preferivelmente, o dito
10 aditivo é escolhido de ácido acético, ácido propiônico, ácido láctico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido succínico ou ácido ascórbico e/ou um sal dos mesmos. Mais preferivelmente, o dito aditivo é escolhido de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiônico, ácido succínico
15 e/ou um sal dos mesmos.

 Em outro aspecto da invenção, o dito sal é um sal de sódio; preferivelmente, propionato de sódio ou acetato de sódio.

 Uma vez que a composição inibidora de micróbio da
20 invenção, combinando uma bactéria probiótica e/ou um produto extracelular da mesma e um aditivo proporciona um inesperado efeito sinérgico na inibição de microorganismos patogênicos, um artigo higiênico de acordo com a invenção, compreendendo essa composição inibidora de
25 micróbio, possui um intensificado efeito probiótico e/ou prebiótico. Além disso, um artigo higiênico de acordo com a presente invenção é fácil de transportar e armazenar, sem que a composição inibidora de micróbio perca suas propriedades benéficas.

30

Descrição dos Desenhos

 A figura 1 mostra o crescimento de *C. albicans* no produto extracelular de LB 931, com a adição (50 mM) de diferentes ácidos/sais.

A figura 2a mostra o crescimento de *E. coli* no produto extracelular de LB 931, com a adição (50 mM) de diferentes ácidos/sais.

5 A figura 2b mostra o crescimento de *S. saprophyticus* no produto extracelular de LB 931, com a adição (50 mM) de diferentes ácidos/sais.

10 A figura 3a mostra o crescimento de *Candida albicans* quando o produto extracelular de *Lactobacillus fermentum*, Ess-1, foi combinado com o aditivo de ácido ascórbico.

A figura 3b mostra o crescimento de *Candida albicans* quando o produto extracelular de *Lactobacillus fermentum* Ess-1, foi combinado com o aditivo de ácido propiônico.

15 A figura 4a é uma vista plana de um artigo higiênico, de acordo com a presente invenção.

A figura 4b é uma vista em seção transversal de um artigo higiênico, de acordo com a linha II-II mostrada na figura 4a.

20 A figura 5a é uma vista plana de um artigo higiênico, de acordo com a presente invenção.

A figura b 5é uma vista em seção transversal de um artigo higiênico, de acordo com a linha II-II mostrada na figura 5a.

25

Definições

O termo "probióticos/probiótico" no presente contexto se refere a microorganismos vivos que conferem um benefício à saúde quando administrados em adequadas
30 quantidades a um hospedeiro.

A expressão "bactéria produtora de ácido láctico" tem o significado de uma bactéria que produz ácido láctico. Bactérias produtoras de ácido láctico preferidas para o objetivo da presente invenção incluem as bactérias dos

gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*. Preferivelmente, a bactéria selecionada usada pertence às espécies *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* ou
5 *Lactobacillus plantarum*. Mais preferivelmente, a linhagem bacteriana é selecionada de *Lactobacillus plantarum* ou *Lactobacillus fermentum*. Ainda mais preferivelmente, a bactéria produtora de ácido láctico é *Lactobacillus plantarum* 931 (depósito No. (DSMZ): DSM 11918) e
10 *Lactobacillus fermentum*, ESS-1 (depósito No. (DSMZ): DSM 17851).

O termo "prebióticos/prebiótico" no presente contexto se refere a substâncias que promovem uma microflora balanceada quando administradas em adequadas
15 quantidades a um hospedeiro. Exemplos incluem os nutrientes para as bactérias probióticas, as substâncias que promovem a aderência ao hospedeiro para as bactérias probióticas, substâncias reguladoras do pH e produtos extracelulares das bactérias probióticas.

20 O termo "inibidor de micróbio" tem o significado de inibição do crescimento, colonização e/ou sobrevivência de outros microorganismos.

O termo "produto extracelular" tem o significado de produtos secretados nas culturas de bactérias
25 probióticas, cujos produtos extracelulares apresentam um efeito antimicrobiano. O produto extracelular é obtido de culturas de células bacterianas através, por exemplo, de filtração, centrifugação ou de ambos os procedimentos, e o resultante sobrenadante compreendendo o produto
30 extracelular possui atividade antimicrobiana útil em uma composição inibidora de micróbio.

O termo "artigo higiênico" se refere a produtos que são colocados contra a pele do usuário para absorver e conter exudatos do corpo, como, por exemplo, urina, fezes e

fluido menstrual, cujos artigos podem também ser usados para liberar bactérias probióticas para essas áreas. A invenção se refere, principalmente, a artigos higiênicos descartáveis, o que significa artigos que não são idealizados de serem lavados ou, de outro modo, recuperados ou reutilizados como artigos higiênicos, após o uso. Exemplos de artigos higiênicos descartáveis incluem os produtos de higiene feminina, tais como, toalhas higiênicas, forros de calças, calças higiênicas, insertos e tampões femininos; fraldas e fraldas-calça para crianças e adultos que sofrem de incontinência urinária; elementos almofadados para incontinência; insertos de fraldas e similares.

15 Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção é idealizada para solucionar o problema do crescimento, colonização e/ou sobrevivência de microorganismos patogênicos na área urogenital e/ou em um artigo higiênico durante o uso do mesmo.

20 Esse problema, na presente invenção, é solucionado mediante aplicação em um artigo higiênico, de um produto extracelular de pelo menos uma bactéria probiótica e/ou pelo menos uma bactéria probiótica e pelo menos um aditivo, na forma de um ácido orgânico que apresenta um valor de pKa que não excede a 5,5 e/ou um sal do mesmo, formando em conjunto, uma composição inibidora de micróbio.

30 Deve ser observado que, logicamente, uma combinação de duas ou mais linhagens bacterianas probióticas pode ser usada para produzir o produto extracelular da invenção. Logicamente, também é possível se usar uma combinação de pelo menos duas linhagens bacterianas em uma composição inibidora de micróbio, de acordo com a presente invenção.

O estado da técnica divulga artigos higiênicos compreendendo somente bactérias probióticas ou produtos extracelulares das mesmas. Entretanto, o efeito inibidor de micróbio nem sempre é completamente satisfatório, existindo
5 diversos problemas para se superar, quando da produção e armazenamento de artigos higiênicos contendo microorganismos viáveis, conforme anteriormente discutido.

Na presente invenção, foi descoberto que mediante adição de um aditivo - na forma de um ácido orgânico tendo
10 um valor de pKa não superior a 5,5, preferivelmente, não superior a 5, e/ou um sal do mesmo - a uma bactéria probiótica ou produtos extracelulares da mesma, ocorre um surpreendente grande aumento na inibição da *Candida albicans* e de diversos outros microorganismos, como, por
15 exemplo, *E.coli* e *S. Saprofyticus*.

A presente invenção, em algumas modalidades, também objetiva reduzir os problemas relativos à retenção do efeito inibidor de micróbio do artigo higiênico durante o armazenamento. Uma vez que todo o efeito em algumas
20 modalidades e pelo menos partes do efeito em outras modalidades é originário de uma composição que, substancialmente, não compreende organismos vivos, o problema da manutenção dos organismos em forma viável e, assim, em atividade funcional, é eliminado ou reduzido.

25 As figuras 4 e 5 mostram uma modalidade exemplificativa de uma toalha higiênica (1), a qual compreende uma folha superior permeável a líquido (2), uma folha de forro (3) e uma estrutura absorvente (4), incluída entre as ditas folhas. A folha superior permeável a
30 líquido (2) pode ser composta de um material não-tecido, por exemplo, um material ligado por fiação, um material soprado em estado fundido, um material cardado, um material hidro-emaranhado, um material formado por firas suspensas em água, etc. Adequados materiais não-tecidos podem ser

compostos de fibras naturais, tais como, fibras de polpa de madeira ou fibras de algodão, fibras sintéticas, tais como, fibras de poliéster, fibras de polietileno, polipropileno, viscose, etc., ou uma mistura de fibras naturais e
5 sintéticas. O material de folha superior pode ainda ser composto de fibras de cânhamo, que podem ser ligadas entre si conforme um padrão de ligação, como, por exemplo, divulgado no documento de patente EP-A-1 035 818. Outros exemplos de materiais para a folha superior incluem as
10 espumas porosas, filmes de plástico perfurado, etc. Os materiais adequados como materiais para folha superior devem ser macios e não-irritantes para a pele, além de serem facilmente penetrados pelos fluidos do corpo, tais como, a urina ou o fluido menstrual.

15 A folha superior (3) pode consistir de um filme de plástico fino, por exemplo, um filme de polietileno ou polipropileno, um material não-tecido revestido com um material impermeável a líquido ou, um material não-tecido hidrofóbico resistente à penetração de líquido. Laminados
20 de filmes de plástico e materiais não-tecidos podem também ser usados. O material da folha de forro é preferivelmente respirável, de modo a permitir o escape de vapor da estrutura absorvente, ao mesmo tempo em que evita a passagem de líquidos através do mesmo.

25 A folha superior (2) e a folha de forro (3) apresentam uma extensão um pouco maior no plano do que a estrutura absorvente (4), se estendendo lateralmente para fora das bordas para formar porções salientes (5). As camadas (2) e (3) são ligadas ente si dentro das porções
30 salientes (5), por exemplo, por meio de colagem ou soldagem térmica ou ultra-sônica. A folha superior e/ou a folha de forro podem ainda ser fixadas à estrutura absorvente por meio de qualquer método conhecido na técnica, como, por exemplo, mediante adesivos ou por meio soldagem térmica ou

ultra-sônica. A estrutura absorvente pode, também, não ser fixada à folha superior e/ou à folha de forro.

Meios de fixação na forma de uma região adesiva (6) são providos sobre o lado da folha de forro que se defronta ao usuário durante o uso. O adesivo pode ser fixado de forma liberável à roupa de baixo do usuário. U
5 papel de liberação (7) protege a região adesiva (6) antes do uso. A região adesiva (6) pode apresentar qualquer adequada configuração, tal como, de tiras alongadas ou transversais, de pontos, áreas totalmente revestidas, etc.
10

Em outras modalidades (não ilustrado) de artigos higiênicos de acordo com a invenção, outros tipo de fixadores, como fixadores de atrito, etiquetas tipo fita ou fixadores mecânicos, como, por exemplo, fixadores de gancho e alça, etc., podem ser usados para fixar os artigos à
15 roupa de baixo ou em volta da cintura do usuário. Alguns artigos higiênicos se apresentam no formato das calças e, portanto, não precisam de meios de fixação especiais. Em outros casos, o artigo higiênico é vestido em calças elásticas especiais, sem a necessidade de fixadores
20 adicionais.

A estrutura absorvente (4) pode ser de qualquer tipo convencional. Exemplos de materiais absorventes que normalmente se apresentam incluem polpa de penugem
25 celulósica, camadas de tecido, polímeros altamente absorventes (os chamados materiais superabsorventes), materiais de espuma absorvente, materiais não-tecidos absorventes ou similares. É comum se combinar polpa de penugem celulósica com materiais superabsorventes em uma
30 estrutura absorvente. É também comum se dispor de estruturas absorventes compreendendo camadas de diferentes materiais com diferentes propriedades com relação à capacidade de aquisição de líquidos, capacidade de distribuição de líquidos e capacidade de armazenamento. Tal

matéria é bem conhecida pelos especialistas versados na técnica e, portanto, não deverá descrita com maiores detalhes. Os corpos absorventes finos, que são comuns nos atuais artigos higiênicos, normalmente, compreendem uma
5 estrutura mista comprimida ou laminada de polpa de penugem celulósica e material superabsorvente. O tamanho e a capacidade absorvente da estrutura absorvente podem ser variados, para se adequarem a diferentes usos, tais como, toalhas higiênicas, forros de calças, elementos almofadados
10 e fraldas de incontinência para adultos, fraldas de bebês, fraldas-calça, etc. Em alguns casos, os artigos higiênicos se apresentam na forma de um elemento de inserção feminino ou uma inserção de incontinência sem nenhuma função absorvente, sendo a função principal desse artigo, portar e
15 possivelmente liberar, por exemplo, uma substância promotora de saúde. Exemplos de elementos de inserção incluem uma camada não-tecida, um filme plástico perfurado ou uma camada de espuma ou laminados da mesma, todos, preferivelmente, com meios de fixação a uma vestimenta. O
20 dito elemento de inserção pode, opcionalmente, compreender uma folha de forro (3).

Um objetivo da presente invenção é proporcionar artigos higiênicos, tais como, toalhas higiênicas, fraldas-calça, fraldas, protetores de incontinência, etc.,
25 adequados para absorção de fluidos do corpo e, simultaneamente, aptos a liberar uma composição inibidora de micróbio (8) que deve ser transferida para a pele ou, alternativamente, adequados para inibir o crescimento de microorganismos indesejáveis no próprio artigo em si
30 durante o seu uso.

Deve ser entendido que o artigo higiênico descrito acima e mostrado nos desenhos representa apenas exemplos não-limitativos e que a presente invenção não está

limitada ao mesmo, podendo ser usada em quaisquer dos tipos de artigos higiênicos dentre os definidos acima.

As bactérias probióticas que são adequadas para uso na presente invenção produzem, na maioria dos casos, ácido e, em todos os casos, são não-patogênicas. Existem diversas bactérias adequadas identificadas abaixo, embora a invenção não seja limitada a espécies e linhagens bacterianas atualmente conhecidas, na medida em que a função e objetivos acima das bactérias probióticas são atendidos.

Uma importante característica da bactéria probiótica produtora de ácido láctico é a sua capacidade de produzir ácido láctico e, em alguns casos, também outros ácidos, em que os ditos ácidos aumentam a acidez da mucosa da pele, o que ajuda na prevenção do crescimento, colonização e sobrevivência de indesejados fungos e bactérias. Assim, através do mecanismo de produção de ácido, essas bactérias probióticas inibem o crescimento da competição e das bactérias e fungos perigosos. Outras importantes características das ditas bactérias incluem a sua capacidade de produzir peróxido de hidrogênio e outras substâncias inibidoras de micróbios e, também, sua capacidade de aderência às superfícies celulares, dessa forma, evitando a adesão de outras bactérias e fungos perigosos nessas superfícies.

As bactérias probióticas típicas de utilidade numa composição inibidora de micróbio da presente invenção são todos os elementos das espécies *Lactobacillus*, *Lactococcus* ou *Pediococcus*, que são eficientes produtores de ácidos, incluindo, também, os elementos não-patogênicos da espécie *Bacillus*, todos os elementos das espécies *Bifidobacterium* e *Pseudomonas limbergii*, conquanto que outras determinadas espécies sejam especialmente preferidas, conforme descrito abaixo.

Os elementos preferidos da espécie *Lactobacillus* incluem *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cereale*, *Lactobacillus delbrukei*, *Lactobacillus fermentum*,
5 *Lactobacillus gaserii*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus paracasei* sp. *paracasei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*,
10 e outros.

Particularmente preferidas são as novas bactérias *Lactobacillus fermentum*, Ess-1 e *Lactobacillus plantarum*, LB 931. A LB 931 foi descoberta como sendo valiosa para a prevenção e/ou tratamento de infecções urogenitais, na
15 medida em que inibe o crescimento de um grande número de microorganismos patogênicos, por exemplo, conforme mencionado no documento de patente EP 1060240. A *Lactobacillus fermentum*, Ess-1 (depósito No. (DSMZ): DSM 17851) foi depositada de acordo com o Tratado de Budapeste,
20 no Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124, Braunschweig) (depositante, Essum AB, Box 3160, SE 90304 Umeå, Suécia, depositado em 6 de Janeiro de 2006).

Deve ser observado que, embora nos exemplos
25 abaixo, onde apenas duas linhagens de *Lactobacilli* foram utilizadas, essas linhagens de bactérias devem apenas ser vistas como um modelo para a bactéria probiótica de utilidade na prática da presente invenção. Portanto, os exemplos abaixo não devem ser vistos como limitativos da
30 presente invenção. É idealizado que quaisquer bactérias probióticas possam ser usadas na composição.

Em uma modalidade da presente invenção, quando a composição inibidora de micróbio compreende um produto extracelular e pelo menos um dos ditos aditivos, a dita

composição é substancialmente isenta de bactérias probióticas. É verificado que é extremamente difícil se fabricar uma composição que seja totalmente isenta de bactérias probióticas, portanto, as bactérias probióticas, preferivelmente, não estão presentes na composição inibidora de micróbio numa quantidade superior a 100 CFU/mL, mais preferivelmente, não superior a 10 CFU/mL. Essa composição tem a vantagem de apresentar exigências de armazenamento menos rigorosas, uma vez que o produto extracelular é mais durável do que o microorganismo.

O produto extracelular da presente invenção é obtido de uma cultura bacteriana. As bactérias adequadas para a presente invenção secretam produtos tendo atividade antimicrobiana, o que é útil para os objetivos da presente invenção. A fim de se obter os produtos extracelulares, as culturas celulares são colhidas, conforme descrito abaixo, e o sobrenadante é obtido mediante procedimentos de centrifugação ou filtração ou mediante ambos os procedimentos. O sobrenadante assim obtido apresenta uma atividade inibidora de micróbio devido aos produtos extracelulares nele contidos. Um exemplo de como o produto extracelular pode ser preparado se encontra descrito no Exemplo 3.

O produto extracelular pode se apresentar na forma de sobrenadante, quando obtido diretamente de uma cultura bacteriana, mas, também, é possível concentrar e/ou purificar posteriormente o sobrenadante. Por purificação, significa dizer que algumas das substâncias inibidoras de micróbio são isoladas, por exemplo, mediante cromatografia, cristalização ou destilação e usadas separadamente ou em combinação com outras substâncias isoladas.

O aditivo que é adicionado às bactérias probióticas e/ou ao produto extracelular na presente invenção está na forma de um ácido orgânico ou um sal do

mesmo. Ao escolher o dito aditivo, logicamente, isso deve ser feito considerando a segurança do produto. Os ácidos orgânicos ou os correspondentes sais devem ser de tal natureza, que quando da aplicação dos mesmos em um artigo
5 higiênico, eles não devem causar nenhuma irritação na pele do usuário do artigo higiênico, portanto, o pKa do ácido orgânico, quando medido em água sob temperatura de 25°C, não deve, preferivelmente, ser inferior a 2. Se os valores de pKa, ao contrário, forem demasiadamente altos, os ácidos
10 orgânicos ou seus sais estarão, principalmente, na forma de ácidos. Isso significa que o aditivo não será suficientemente dissociado no íon hidrogênio e na sua forma aniônica desprotonada, que, se acredita, ser um pré-requisito, a fim de se obter o dito efeito sinérgico
15 inibidor de micróbio com a bactéria probiótica e/ou o produto extracelular da mesma. Portanto, o valor de pKa para o adequado ácido orgânico da presente invenção deve ser inferior a 5,5, preferivelmente, inferior a 5. Se o ácido orgânico adequado para a presente invenção tiver mais
20 de um valor de pKa, pelo menos um desses valores deverá ser inferior a 5,5, preferivelmente, inferior a 5.

Quando o produto extracelular se apresenta na forma de um sobrenadante, a solubilidade desses ácidos orgânicos ou dos sais correspondentes deve ser
25 suficientemente alta, de modo que o dito aditivo possa ser dissolvido no sobrenadante. Alternativamente, quando o aditivo se apresenta numa forma seca sobre o artigo higiênico, a solubilidade do aditivo deve ser de tal natureza que o aditivo rapidamente entre na forma de
30 solução, quando em contato com os fluidos do corpo, durante o uso do dito artigo higiênico.

Numa modalidade preferida da presente invenção, o aditivo é escolhido dentre ácido acético, ácido propiônico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido

cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprônico, ácido succínico e/ou um sal dos mesmos. Preferivelmente, o dito aditivo é escolhido de ácido acético, ácido propiônico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, 5 ácido cítrico ou ácido succínico, e/ou um sal dos mesmos. Mais preferivelmente, o dito aditivo é escolhido de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiônico, ácido succínico e/ou um sal dos mesmos.

10 Numa modalidade da invenção, o sal é um sal de sódio. Sais especialmente preferidos incluem propionato de sódio ou acetato de sódio.

Quando um artigo higiênico da presente invenção compreende bactérias probióticas, estas são, tipicamente, providas em quantidades de cerca de 10^6 - 10^{11} CFU de 15 bactérias probióticas viáveis por artigo. Tipicamente, as bactérias se apresentam na forma de células ou esporos que são providos numa suspensão que é aplicada ao artigo higiênico que depois é seco. Preferivelmente, o artigo higiênico irá compreender cerca de 10^8 - 10^{10} CFU por artigo 20 higiênico, embora essas quantidades possam variar, dependendo da aplicação específica, formulação do produto e uso pretendido.

Se o artigo higiênico compreender o produto extracelular ao invés das bactérias probióticas, o artigo 25 higiênico, tipicamente, irá compreender cerca de 0,5-100 mL, preferivelmente, cerca de 1-10 mL do produto extracelular.

Em combinação com o produto extracelular, o dito aditivo, tipicamente, é adicionado com uma concentração de 30 5-100 mM. Quando combinado somente com as bactérias probióticas, o dito aditivo é tipicamente adicionado ao artigo higiênico em quantidades de 0,15 mg - 2,6 g, preferivelmente, 0,3 mg - 0,3 g, embora essas quantidades

possam variar, dependendo da aplicação específica, da formulação do produto e do uso pretendido.

A composição inibidora de micróbio pode ser diretamente aplicada ao tecido higiênico de acordo com a
5 invenção ou pode ser provida em um veículo farmacêuticamente aceitável, o qual pode intensificar a transferência da composição inibidora de micróbio, cujos exemplos de tais veículos incluem agentes viscosos, como, por exemplo, petrolato, óleo ou uma cera.

10 Numa modalidade preferida, a composição inibidora de micróbio se apresenta na forma de uma suspensão, dita suspensão podendo ser aplicada diretamente ao artigo higiênico mediante impregnação, pulverização, impressão ou outros métodos, após o que o tecido higiênico pode ser
15 seco, por exemplo, mediante aplicação de calor.

Em outra modalidade preferida, a composição inibidora de micróbio se apresenta na forma de um pó. O pó pode ser misturado com o dito veículo farmacêuticamente aceitável ou ser diretamente aplicado ao tecido higiênico
20 como um pó, neste caso, preferivelmente, sobre a estrutura absorvente ou entre a estrutura absorvente e a folha superior, conforme ilustrado na figura 5. No caso em que o pó é misturado com um veículo farmacêuticamente aceitável, essa mistura pode ser aplicada ao artigo higiênico por meio
25 de impregnação, pulverização, impressão ou método similar, após o que o artigo higiênico pode ser seco. Um artigo de liberação, do tipo de uma bolsa separada, possivelmente impermeável à umidade, fixada à folha superior do artigo higiênico, constitui também uma vantajosa maneira de
30 liberar a dita composição inibidora de micróbio.

O pó, de acordo com o exposto acima, pode ser obtido mediante evaporação da suspensão mencionada acima, por meio de secagem através de aplicação de calor, secagem por convecção, secagem por pulverização, secagem por

congelamento, ou métodos similares. Pode ser necessário ainda se moldar a composição inibidora de micróbio, a fim de se obter um pó fino. As bactérias probióticas, preferivelmente, são secas por congelamento.

5 A composição inibidora de micróbio pode ser colocada sobre qualquer local do artigo higiênico, na medida em que a mesma entra em contato com o usuário do artigo higiênico quando de sua utilização. A composição inibidora de micróbio (8) é preferivelmente localizada na
10 folha superior do artigo higiênico, conforme mostrado na figura 4.

 Numa modalidade alternativa preferida, mostrada na figura 5, a composição inibidora de micróbio (8) está localizada entre a folha superior (2) e a estrutura
15 absorvente (4).

 Quando o tecido higiênico compreende bactérias probióticas vivas, as bactérias devem ser protegidas da umidade. O artigo higiênico, portanto, pode ser hermeticamente incluído em uma embalagem impermeável à
20 umidade. O documento de patente WO 00/76878 fornece um exemplo de tal embalagem impermeável à umidade. Outro exemplo de como as bactérias podem ser protegidas da umidade é mediante uso de um sistema de liberação, conforme exemplificado, por exemplo, no documento de patente WO
25 02/28446.

 Outra possibilidade é liberar a dita composição inibidora de micróbio separadamente, numa forma que seja conveniente de se aplicar diretamente a um artigo absorvente pelo usuário, por exemplo, em sua forma líquida,
30 na forma de um pó, dispersa em uma loção ou em um óleo. O meio para aplicar a dita composição inibidora de micróbio pode ser um spray, um dispositivo de rolamento, um tubo, um frasco, uma ampola, uma tira ou um bastão.

Em um adicional aspecto da invenção, a composição inibidora de micróbio é usada em combinação com o artigo higiênico de acordo com a invenção.

Outro aspecto da invenção consiste em preparar um
5 artigo higiênico, compreendendo a aplicação da dita composição inibidora de micróbio ao dito artigo higiênico.

Seção Experimental

10 Teste 1

O objetivo desse teste foi determinar se os aditivos selecionados afetaram o crescimento da *Candida albicans* e se uma aperfeiçoada inibição do crescimento pode ser alcançada quando esses aditivos são adicionados aos
15 produtos extracelulares da *Lactobacillus plantarum*, LB 931. Os aditivos usados nesse teste foram ácido ascórbico, ácido cítrico, fenilalanina, ácido acético, ácido propiônico e propionato de sódio.

Método

20 Linhagem de Germes

Uma amostra clínica isolada de *Candida albicans* (designada *C. albicans* 702) foi usada como linhagem de teste. A amostra foi isolada da vagina de uma mulher sofrendo de candidíase vaginal.

25 Controle

Como controle, foi usado caldo de cultura puro de dMRSSs (caldo de MRS sem adição de acetato de sódio). Um volume especificado foi transferido para os poços de uma placa de microtitulação e foi deixado secar ao ar
30 (temperatura de 45°C em um período mínimo de 20 horas).

Produto Extracelular (ECP)

Culturas de LB 931 cultivadas em caldo de dMRSSs foram centrifugadas para granular as células, que foram filtradas em condição estéril, usando um filtro de 0,22 µm

(filtro Millipore, Bedford, USA), a fim de obter o sobrenadante de LB 931 compreendendo o produto extracelular de LB 931. Um volume especificado de sobrenadante filtrado estéril foi transferido para os poços de uma placa de microtitulação e foi deixado secar ao ar (temperatura de 45°C em um período mínimo de 20 horas) e, após isso, novamente suspenso em água destilada esterilizada, para atingir uma concentração três vezes maior, sendo transferidos 200 µL para as placas de microtitulação de 96 poços.

Produto Extracelular com Aditivo

Os aditivos foram adicionados numa concentração final de 50 mM em tubos contendo o sobrenadante filtrado estéril de LB 931. Um volume especificado de sobrenadante filtrado estéril foi transferido para os poços de uma placa de microtitulação e foi deixado secar ao ar (temperatura de 45°C em um período mínimo de 20 horas) e, após isso, novamente suspenso em água destilada esterilizada, para atingir uma concentração três vezes maior (isto é, o volume de água destilada esterilizada é cerca de 1/3 do volume especificado, antes da secagem), sendo transferidos 200 µL para as placas de microtitulação de 96 poços.

Caldo de Cultura com Aditivo

Os aditivos foram adicionados com uma concentração final de 50 mM no caldo de cultura de dMRSs. O pH foi ajustado para o mesmo valor de pH do produto extracelular com aditivo, para o respectivo aditivo. Um volume especificado foi transferido para os poços de uma placa de microtitulação e foi deixado secar ao ar (temperatura de 45°C em um período mínimo de 20 horas) e, após isso, novamente suspenso em água destilada esterilizada, para atingir uma concentração três vezes maior, sendo transferidos 200 µL para as placas de microtitulação de 96 poços.

Em seguida, a *Candida* foi adicionada para uma concentração final de aproximadamente 10^4 células por poço e a placa de microtitulação foi incubada à temperatura de 37°C durante 24 horas. O pH para os diferentes aditivos variou entre $3,4 \pm 0,2$. O pH do caldo com aditivo e produto extracelular com aditivo foi sempre o mesmo.

O teste foi blindado, de modo que não poderiam ocorrer opiniões previamente concebidas mascarando os resultados. A inibição da *Candida* foi avaliada e classificada por duas pessoas usando um gabarito, numa escala de cinco (5) para zero (0), baseada em observações visuais de turbidez, com um valor médio calculado sendo apresentado. Os poços contendo forte crescimento da *Candida* no caldo puro de dMRSS foram classificados como cinco (5), enquanto os poços sem nenhum crescimento visual foram classificados como zero (0).

Resultados

Conforme pode ser visto na figura 1, poucos aditivos provaram afetar o crescimento da *Candida*, embora o pH estivesse bastante baixo. O produto extracelular de LB 931 foi efetivo na inibição da *Candida*. Esse efeito foi surpreendentemente intensificado pela adição dos aditivos aos produtos extracelulares da LB 931. Para todos os aditivos em combinação com o produto extracelular de LB 931 foi alcançado um efeito inibidor de crescimento bastante satisfatório. O melhor efeito foi alcançado quando foi adicionado ácido propiônico ao produto extracelular de LB 931 (absolutamente, nenhum crescimento).

30 Teste 2

O objetivo desse teste foi determinar se os aditivos selecionados afetaram o crescimento das bactérias e se uma aperfeiçoada inibição do crescimento pode ser alcançada quando esses aditivos são adicionados aos

produtos extracelulares da *Lactobacillus plantarum*, LB 931. Os aditivos usados nesse teste foram acetato de sódio, ácido succínico, propionato de sódio e ácido acético.

Método

5 Linhagens Bacterianas

Amostras clínicas isoladas de *E. coli* (designada *E. coli* 1) e de *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus* 1) foram usadas como linhagens de teste. As amostras foram isoladas do trato genital em mulheres com
10 infecções do trato urinário.

Controle

Como controle, foi usado caldo de cultura puro de dM17s (caldo de M17 modificado pela adição de MnSO_4 (concentração final de 0,04 g/L), MgSO_4 (concentração final
15 de 0,2 g/L) e glicose (concentração final de 20 g/L). 200 μL foram adicionados a placas de microtitulação de 96 poços.

Produto Extracelular (ECP)

Culturas de LB 931 cultivadas em caldo de cultura
20 de dM17s foram centrifugadas para granular as células, que foram filtradas em condição estéril, usando um filtro de 0,22 μm (filtro Millipore, Bedford, USA), a fim de obter o sobrenadante de LB 931 compreendendo o produto extracelular de LB 931. 200 μL foram transferidos para as placas de
25 microtitulação de 96 poços.

Produto Extracelular com Aditivo

Os aditivos foram adicionados numa concentração final de 50 mM em tubos contendo a suspensão filtrada esterilizada de LB 931. 200 μL foram transferidos para as
30 placas de microtitulação de 96 poços.

Caldo de Cultura com Aditivo

Os aditivos foram adicionados com uma concentração final de 50 mM no caldo de cultura de dM17s.

200 µL foram transferidos para as placas de microtitulação de 96 poços.

10 µl de uma cultura noturna de, respectivamente, *E.coli* e *S. saprophyticus*, ambas diluídas 100 vezes, foram
5 adicionados aos poços na placa de microtitulação, a qual foi incubada à temperatura de 37°C durante a noite. O pH foi ajustado para 6,9 em todos os experimentos.

O teste foi blindado, de modo que não poderiam ocorrer opiniões previamente concebidas mascarando os
10 resultados. A inibição, respectivamente, da *E. coli* e *S. saprophyticus* foi avaliada e classificada por duas pessoas usando um gabarito, numa escala de cinco (5) para zero (0), baseada em observações visuais de turbidez, com um valor médio calculado sendo apresentado. Os poços contendo forte
15 crescimento, respectivamente, da *E. coli* e *S. saprophyticus* no caldo puro de dM17s foram classificados como cinco (5), enquanto os poços sem nenhum crescimento visual foram classificados como zero (0).

Resultados

20 Conforme pode ser visto na figura 2a, nenhum dos aditivos testados isoladamente provaram afetar o crescimento da *E. coli*. O produto extracelular de LB 931 foi efetivo na inibição da *E. coli*. Esse efeito foi surpreendentemente intensificado pela adição dos aditivos
25 aos produtos extracelulares da LB 931. Para todos os aditivos em combinação com o produto extracelular de LB 931, foi alcançado um efeito inibidor de crescimento bastante satisfatório.

Conforme pode ser visto na figura 2b, nenhum dos
30 aditivos testados isoladamente provaram afetar o crescimento da *Staphylococcus saprophyticus*. O produto extracelular de LB 931 foi efetivo na inibição da *Staphylococcus saprophyticus*. Esse efeito foi surpreendentemente intensificado pela adição dos aditivos

aos produtos extracelulares da LB 931. Para todos os aditivos em combinação com o produto extracelular de LB 931, foi alcançado um efeito inibidor de crescimento bastante satisfatório.

5

Teste 3

O objetivo desse teste foi avaliar a inibição melhorada de *Candida albicans*, quando o produto extracelular de *Lactobacillus fermentum*, Ess-1, foi
10 combinado com os aditivos de ácido ascórbico e ácido propiônico.

Método

A Ess-1 foi cultivada em fase estacionária em caldo de dMRSS (caldo de MRS sem adição de acetato de
15 sódio). A cultura bacteriana foi centrifugada para granular as células, que foram filtradas em condição estéril, usando um filtro de 0,22 µm (filtro Millipore, Bedford, USA), após o que foi obtido o sobrenadante compreendendo o produto extracelular. Ácido propiônico e ácido ascórbico foram
20 adicionados numa concentração final de 50 mM em tubos contendo o produto extracelular. O pH do filtrado foi ajustado para o valor de pKa do respectivo ácido (4,2 para o ácido ascórbico e 4,87 para o ácido propiônico) e 200 µL foram transferidos para poços de uma placa de
25 microtitulação de 96 poços. A *C. albicans* foi adicionada para uma concentração final de aproximadamente 5×10^4 CFU mL⁻¹ a cada poço. As placas foram incubadas durante 20 horas à temperatura de 37°C e o crescimento foi avaliado e classificado por duas pessoas usando um gabarito, numa
30 escala de cinco para zero, baseada nas observações visuais de turbidez, com um valor médio calculado sendo apresentado. Os poços contendo forte crescimento da *Candida* no caldo de cultura puro de dMRSS foram classificados como

cinco, enquanto os poços sem nenhum crescimento visual foram classificados como zero.

Resultados

Um inesperado aumento de inibição foi obtido quando o sobrenadante de Ess-1 foi combinado com o ácido ascórbico ou o ácido propiônico, conforme pode ser visto nas figuras 3A e 3B, respectivamente.

Teste 4

O objetivo desse teste foi avaliar a aperfeiçoada inibição da *Candida albicans*, a partir da adição de acetato de sódio em combinação com células em crescimento de *Lactobacillus plantarum*, LB 931.

Método

Duas placas foram feitas com ágar M17 e duas com ágar MRS. O meio de MRS (desenvolvido por De Man, Rogosa e Sharpe), é um meio de cultura comumente usado para a *Lactobacillus*. O ágar MRS, da Merck, contém 5 g de acetato de sódio por litro de ágar. O ágar M17 (um Oxóide) é um substrato comercial similar para a *Lactobacillus*, porém, sem a adição do acetato de sódio. Os meios de ágar foram preparados conforme descrito nas embalagens.

A *Lactobacillus plantarum*, LB 931, foi cultivada no caldo de MRS, sob temperatura de 37°C, com CO₂ a 5%, durante 24 horas. A *Candida albicans*, 702, foi cultivada no caldo de cultura de M17, sob temperatura de 37°C, durante 24 horas.

Alguns furos (diâmetro de 10 mm) foram punccionados nas placas e preenchidos com tampões de 250 µL de misturas de ágar, contendo aproximadamente uma quantidade de 10⁷ LB 931 no ágar de MRS. As placas foram deixadas por 30 minutos e depois incubadas por 24 horas à temperatura de 37°C com CO₂ a 5%. A cultura durante a noite da *C. albicans* em um caldo de M17 foi diluída 10 vezes e

foi espalhada sobre a superfície de cada placa. As placas foram depois incubadas durante 24 horas à temperatura de 37°C. Como controles, os furos (diâmetro de 10 mm) foram preenchidos somente com ágar de MRS.

- 5 As placas foram avaliadas com relação à inibição do crescimento da *Candida albicans*. As zonas em volta dos tampões sem nenhum crescimento da *Candida* foram medidas (diâmetro em mm).

Resultados

- 10 Os tamanhos das zonas podem se vistos na Tabela 1, abaixo.

Ágar na Placa de Petri	Tampão somente com Ágar (Ø mm)	Tampão com LB 931 (Ø mm)
Ágar de MRS	0	18,8
Ágar de M17	0	0
Ágar de MRS	0	18,1
Ágar de M17	0	0

- 15 A LB 931 cresceu satisfatoriamente em todos os tampões em que a LB 931 havia sido inoculada. Não ocorreram zonas sem o crescimento da *Candida* sobre as placas com ágar de M17. Sobre as placas de ágar de MRS ocorreram zonas evidentes em torno dos tampões da LB 931, mas não ocorreram zonas em torno dos tampões somente com ágar.

- 20 A LB 931 foi aplicada em quantidades razoavelmente baixas sobre as placas, o que pode explicar como, substancialmente, nenhuma inibição da *Candida* foi observada sobre as placas de Agar de M17. Isso, entretanto, indica a eficiente inibição da *Candida* devido ao efeito sinérgico da LB 931 e do aditivo, no presente caso, 25 acetato de sódio compreendido no meio MRS.

Exemplos

Os exemplos seguintes correlacionados à presente invenção são apenas ilustrativos e não devem, logicamente, serem considerados como exemplos específicos limitativos da
5 invenção.

Exemplo 1: Isolamento e Tipificação da Ess-1

O objetivo inicial desse estudo é isolar e tipificar uma linhagem de *Lactobacillus* que inibe o
10 crescimento de *Candida albicans* e *Candida glabrata* em grande proporção, comparado a outras linhagens de *Lactobacillus*.

Método

Linhagens de Germes

15 Amostras clínicas isoladas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* foram usadas como linhagens de teste. Essas amostras foram isoladas de vaginas de mulheres com candidíase vaginal e de mulheres saudáveis.

Seleção I

20 Cerca de 140 linhagens de *Lactobacillus*, originárias da pele humana, garganta, dentes, fezes de bebês, vegetais e sementes foram cultivadas em caldo de cultura de MRS e estampadas sobre placas de ágar de MRS. As placas de ágar foram incubadas sob condições anaeróbicas à
25 temperatura de 37°C. Além disso, ágar de SAB (Sabouraud) (LAB M, Bury, UK) foi derramado sobre o ágar de MRS e deixado congelar. A cultura de *C. albicans* foi semeada sobre o ágar e as placas foram incubadas aerobicamente à temperatura de 37°C. Uma avaliação visual da inibição foi
30 feita. As linhagens que inibiram a *C. albicans*, igualmente ou em maior proporção que a linhagem de referência *Lactobacillus plantarum*, LB 931, foram selecionadas para posterior seleção (seleção II).

Seleção II

Suspensões de lactobacilos cultivadas em caldo de dMRSS (caldo de MRS sem a adição de acetato de sódio) foram centrifugadas e filtradas em condição estéril. O filtrado é
5 daqui em diante chamado de Filtrado isento de Células de *Lactobacillus*, LCF. Um volume especificado foi transferido para os poços de uma placa de microtitulação e foi deixado secar ao ar; depois, foi novamente suspenso em água destilada esterilizada, para alcançar uma concentração três
10 vezes maior e transferido para placas de microtitulação de 96 poços. A *Candida* foi adicionada a todos os frascos (três isolados de *C. albicans* e *C. glabrata*, respectivamente, foram usados). A inibição foi avaliada mediante observação visual da turbidez e classificada por duas pessoas usando
15 um gabarito numa escala de cinco para zero. Os poços contendo forte crescimento da *Candida sp.* em caldo puro de dMRSS foram classificados como (5) cinco, enquanto os poços sem nenhum crescimento visual foram classificados como (0) zero.

20 Tipificação da API e Tipificação Genética

A identificação do nível de espécies foi feita usando o sistema API 50 CHL (bioMerieux, França), seguindo as instruções do fabricante. Os dados dos testes de fermentação foram analisados usando o software Lab Plus da
25 API. A tipificação genética foi feita por DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH) mediante análise de sequência parcial do rRNA 16S.

Resultados

30 Todas as linhagens foram avaliadas de acordo com a capacidade de inibição de crescimento contra a *C. albicans* na seleção I. Vinte e três (23) linhagens de *Lactobacillus* com resultados comparáveis ou que foram superiores aos da LB 931 foram selecionados para a seleção

II. Além dessas 23 linhagens de *Lactobacillus*, três foram linhagens de referência e a maioria das linhagens foi isolada do trato oral.

A Ess-1 provou ter uma capacidade global de inibir o crescimento da *Candida*. Nenhuma das linhagens de *Lactobacillus* testadas foi similar à atividade da Ess-1, com relação ao efeito sobre a *C. albicans* e *C. glabrata*. O padrão de fermentação de carboidratos e a tipificação genética para a Ess-1 mostraram que a mesma pertence à espécie *Lactobacillus fermentum*.

Caracterização da Ess-1

O rDNA 16S da linhagem Ess-1 (DSM 17851) foi analisado pelo DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, GmbH) mediante seqüenciamento direto de cerca de 450 nucleotídeos de rDNA 16S amplificados por PCR. A extração genômica do DNA, a amplificação mediada por PCR do rDNA 16S e a purificação do produto do PCR foram realizadas conforme anteriormente descrito (Rainey, F. A. e outros, *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 1996(46): 1088- 1092). Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados usando o Kit CEQTMDTCS-Quickstart (Beckamnn Coulter), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos reacionais da seqüência foram submetidos à eletroforese usando o Sistema de Análise Genético CEQTM8000.

Os dados da seqüência resultante foram colocados dentro do editor de alinhamento ae2 (Maidak, B. L. e outros, *Nucl. Acids Res.*, 1999(27):171-173), alinhados manualmente e comparados com as seqüências representativas do gene de rRNA 16S do organismo pertencente à espécie *Firmicutes* (Maidak, B. L. e outros). Para comparação, as seqüências do gene de rRNA 16S foram obtidas da base de dados EMBL ou RDP (Maidak, B. L. e outros).

Como resultado dessa análise, a seguinte Tabela 2 relaciona os organismos cujas seqüências do gene de rRNA 16S mostram os valores de similaridade mais altos, comparados com seqüência de rDNA 16S da Ess-1.

5

Tabela 2

Linhagem	% de similaridade da seqüência do gene de rRNA 16S com a Ess-1
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	99,3
<i>Lactobacillus fermentum</i> KRM	99,0
<i>Lactobacillus malefermentans</i> DSM 5705	85,5
<i>Lactobacillus rossie</i> ATCC BAA-822	88,9
<i>Lactobacillus suebicus</i> DSM 5997	86,9
<i>Lactobacillus vaccino</i> DSM 20634	87,2

A seqüência parcial do gene de rDNA 16S da linhagem Ess-1 mostra a similaridade mais alta com a *Lactobacillus fermentum*. Conseqüentemente, a linhagem de Ess-1 pode representar uma linhagem de *Lactobacillus fermentum*, mas, também, pode representar uma nova espécie do gênero de *Lactobacillus*.

15 Exemplo 2 - Produção de *Lactobacillus* Probiótica

Em escala laboratorial, um vaso esterilizado contendo, por exemplo, caldo de MRS é inoculado com um inoculado puro da desejada linhagem de *Lactobacillus*. O caldo de cultura com bactérias é incubado durante a noite sob temperatura de 37°C e, preferivelmente, com uma atmosfera de CO₂ a 5%. As células podem depois ser lavadas usando centrifugação e solução salina estéril. Açúcar protetor, amido ou proteínas podem ser adicionados e a massa celular é seca por congelamento e moída.

Em escala de produção, o processamento do lote semeado é fermentado em diferentes etapas até entrar em escala de produção. A produção é controlada e otimizada para a linhagem específica a ser produzida. Após a fermentação, a cultura é lavada e/ou apenas concentrada usando microfiltração de fluxo cruzado ou centrifugação. Substâncias protetoras de acordo com o exposto acima são adicionadas e as células podem ser secas por congelamento e moídas ou secas por pulverização.

10

Exemplo 3 - Produção de Produto Extracelular a partir, por exemplo, de *Lactobacillus*

Em escala laboratorial, a cultura noturna da linhagem probiótica é produzida como no Exemplo 2. Após filtração ou centrifugação, o sobrenadante é coletado. O sobrenadante pode ser concentrado mediante evaporação ou ser completamente seco, por exemplo, através de secagem por convecção em ar seco, secagem por congelamento ou secagem por pulverização.

20

Em escala de produção, a cultura bacteriana é fermentada em conformidade com o Exemplo 2. O produto extracelular é obtido na forma de um filtrado usando microfiltração de fluxo cruzado ou um sobrenadante usando centrifugação. Também, nesse caso, a cultura pode ser ainda concentrada mediante evaporação ou ser completamente seca mediante, por exemplo, secagem por pulverização.

25

Exemplo 4 - Formulações

- Forro de Calça com Agente anti-*Candida*

30

O produto é baseado em um forro de calça comercializado padrão, como, por exemplo, os extra-forros Libresse® (comercializados pela SCA Hygiene Products, AB), aos quais o produto extracelular de Ess-1 em combinação com um aditivo é adicionado, de acordo com o seguinte: 10 mL do

produto extracelular de Ess-1 são evaporados para 1 mL, aos
quais 3,7 mg de ácido propiônico são adicionadas. O produto
extracelular com ácido propiônico é disposto sobre a
superfície do forro de calça, a qual é depois seca antes da
5 embalagem.

- Almofada Leve de Incontinência com Reduzido Crescimento
Bacteriano e Controle de Odor

O produto é baseado em um elemento comercializado
padrão, tipo almofada leve de incontinência, tal como,
10 Tena® Lady Normal (comercializado pela SCA Hygiene
Products, AB), ao qual os produtos extracelulares de LB 931
são adicionados, de acordo com o seguinte: 100 mL do
produto extracelular de LB 931 são misturados com 1 g de
ácido cítrico. A mistura é evaporada e seca, após o que, o
15 pó é homogeneamente misturado no núcleo absorvente do
elemento tipo almofada.

- Forro Leve para Aperfeiçoada Higiene Genital

O produto é baseado em um forro de calça
comercializado padrão, como, por exemplo, os forros leves
20 Libresse® (comercializados pela SCA Hygiene Products, AB),
aos quais os produtos extracelulares de Ess-1 e LB 931 são
adicionados, de acordo com o seguinte: 5 mL do produto
extracelular de Ess-1 e 5 mL do produto extracelular de LB
931 são misturados e evaporados para 1 mL, aos quais 4,1 mg
25 de acetato de sódio são adicionadas. A mistura é evaporada
e seca e o pó é misturado com 0,1 g de cera de silicone e,
finalmente, disposta no centro da folha superior do forro.

Deve ser observado que mesmo que todos os três
exemplos das formulações compreendam somente a
30 *Lactobacillus plantarum*, LB 931, e/ou *Lactobacillus*
fermentum, Ess-1, como bactérias probióticas, todas as
bactérias probióticas adequadas para a presente invenção,
conforme anteriormente descrito, podem também ser usadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Artigo higiênico (1), tal como, uma toalha higiênica, um forro de calça, um protetor de incontinência, uma fralda, um elemento almofadado de incontinência, um elemento de inserção feminino, um tampão, ou elementos similares, **caracterizado** pelo fato de compreender uma folha superior (2), dito artigo higiênico (1) compreendendo ainda uma composição inibidora de micróbio (8), dita composição inibidora de micróbio contendo um produto extracelular de pelo menos uma bactéria probiótica e/ou pelo menos uma bactéria probiótica e pelo menos um aditivo na forma de um ácido orgânico, o qual apresenta um valor de pKa que não excede a 5,5, e/ou um sal do mesmo.

2. Artigo higiênico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o dito valor de pKa não excede a 5.

3. Artigo higiênico, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o dito produto extracelular se apresenta na forma de um sobrenadante, obtido mediante centrifugação ou filtração de uma cultura de uma bactéria probiótica.

4. Artigo higiênico, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a dita composição inibidora de micróbio (8) compreende pelo menos uma bactéria probiótica e pelo menos um dos ditos aditivos.

5. Artigo higiênico, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a dita composição inibidora de micróbio (8) compreende pelo menos uma bactéria probiótica, um produto extracelular de pelo menos uma bactéria probiótica e pelo menos um dos ditos aditivos.

6. Artigo higiênico, de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a dita composição inibidora de micróbio (8) é substancialmente isenta de bactérias probióticas, preferivelmente, a dita
5 bactéria probiótica não estando presente numa quantidade superior a 100 CFU/mL, mais preferivelmente, não superior a 10 CFU/mL.

7. Artigo higiênico, de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que a
10 dita bactéria probiótica é uma bactéria produtora de ácido láctico.

8. Artigo higiênico, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que a bactéria produtora de ácido láctico é *Lactobacillus plantarum*, LB
15 931 ou *Lactobacillus fermentum*, Ess-1 ou uma combinação das mesmas.

9. Artigo higiênico, de acordo com quaisquer das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o dito aditivo é escolhido de ácido acético, ácido
20 propiônico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprônico, ácido succínico e/ou um sal dos mesmos, preferivelmente, o dito aditivo é escolhido de ácido acético, ácido propiônico, ácido láctico, ácido ascórbico,
25 fenilalanina, ácido cítrico ou ácido succínico e/ou um sal dos mesmos, mais preferivelmente, o dito aditivo é escolhido de ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiônico, ácido succínico e/ou um sal dos mesmos.

10. Artigo higiênico, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o dito sal
30 é um sal de sódio, preferivelmente, propionato de sódio ou acetato de sódio.

11. Artigo higiênico compreendendo uma composição inibidora de micróbio (8), de acordo com quaisquer das

reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que a dita composição inibidora de micróbio (8) está localizada na folha superior (2).

5 12. Kit, compreendendo a dita composição inibidora de micróbio (8), conforme definido nas reivindicações 1-10 e o dito artigo higiênico (1), **caracterizado** pelo fato de que a dita composição inibidora de micróbio (8) é provida separadamente do dito artigo higiênico (1).

10 13. Kit, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a dita composição inibidora de micróbio (8) é provida de uma ampola, um frasco, um tubo, um dispositivo de rolamento, tal como, um bastão ou um spray.

15 14. Uso da composição inibidora de micróbio (8), de acordo com quaisquer das reivindicações 1-10, **caracterizado** pelo fato de que o dito uso é feito em combinação com o dito artigo higiênico (1).

20 15. Método de preparação de um artigo higiênico (1), de acordo com quaisquer das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de compreender a aplicação da dita composição inibidora de micróbio (8) ao dito artigo higiênico (1).

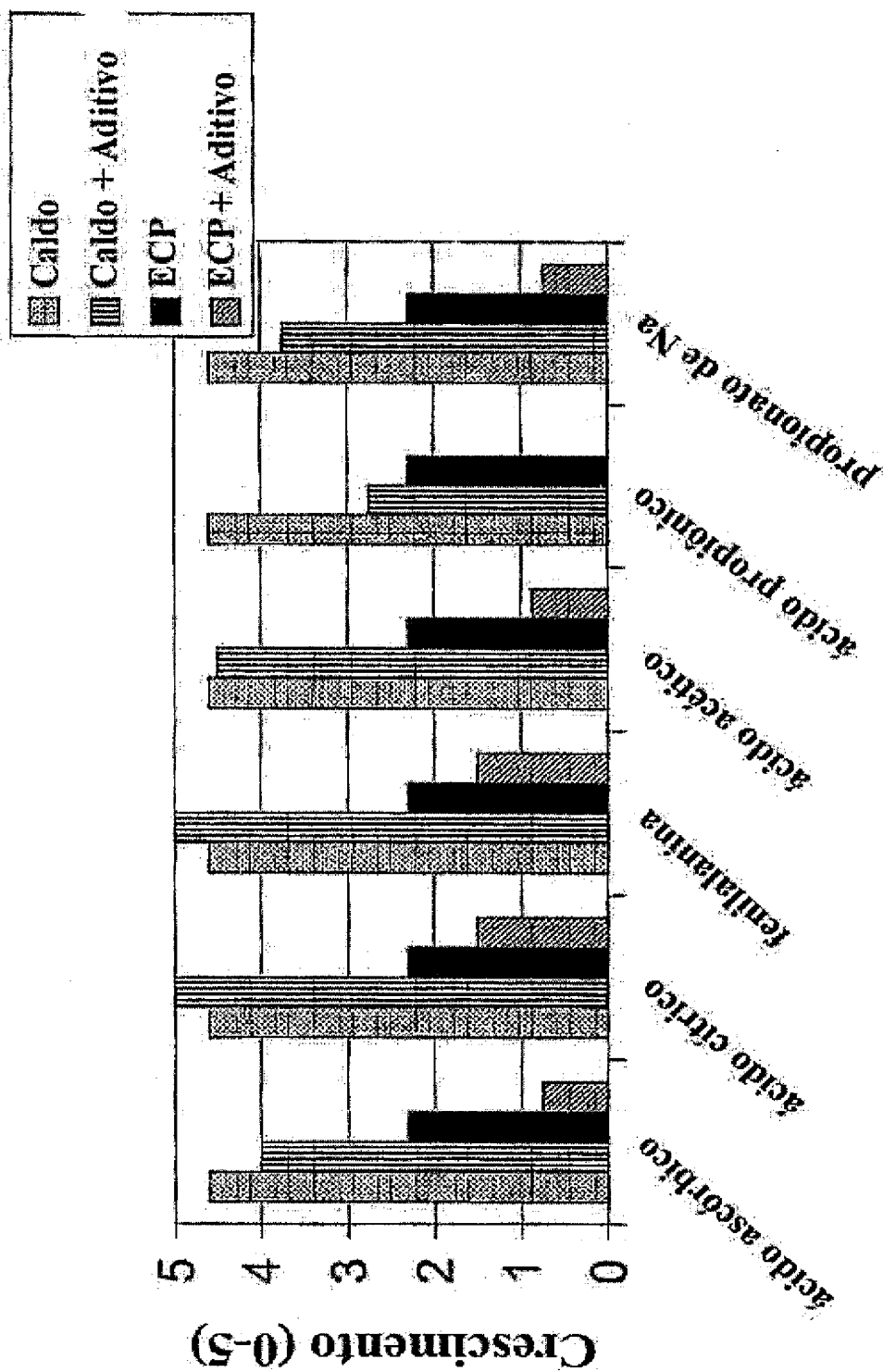


Fig.1

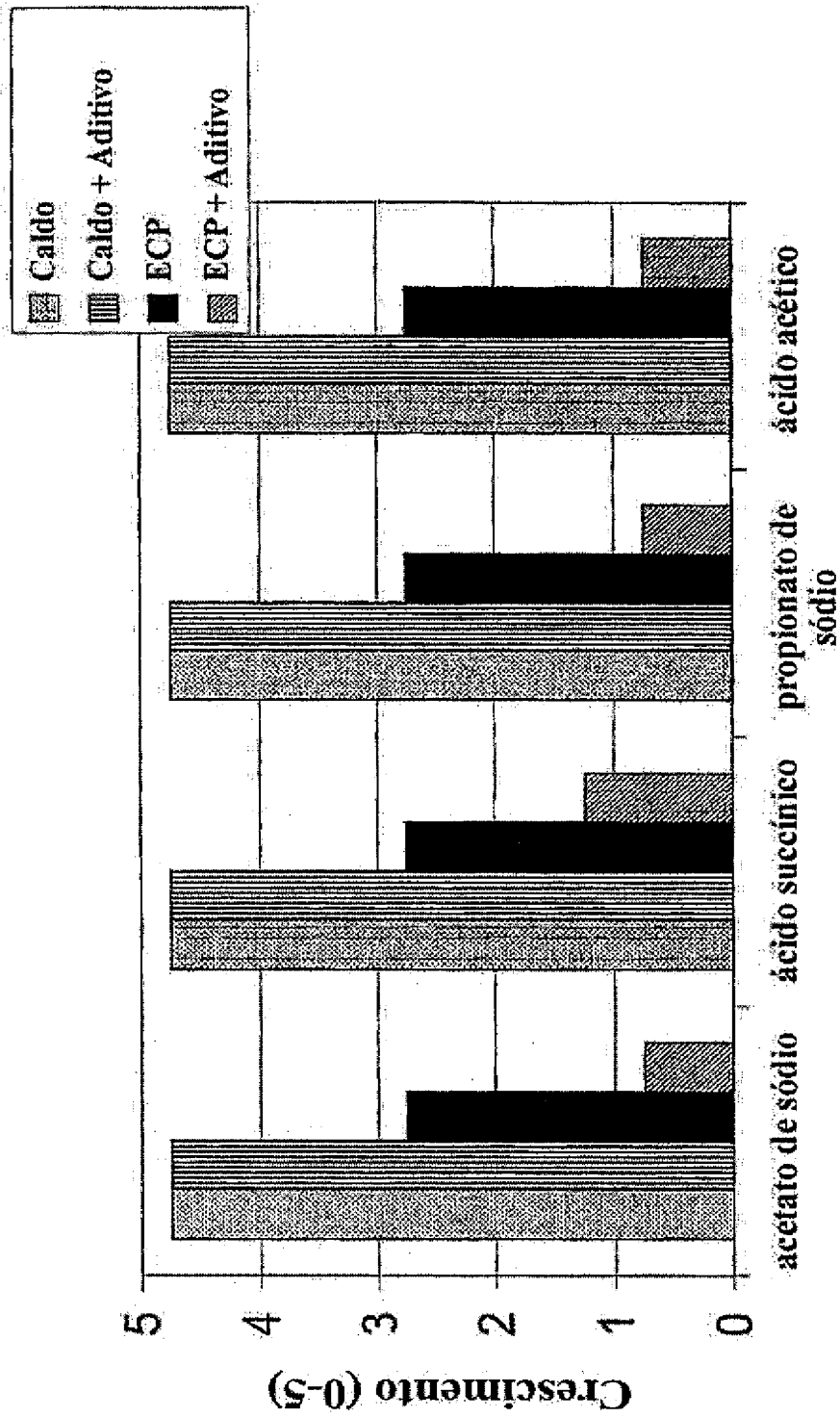


Fig.2A

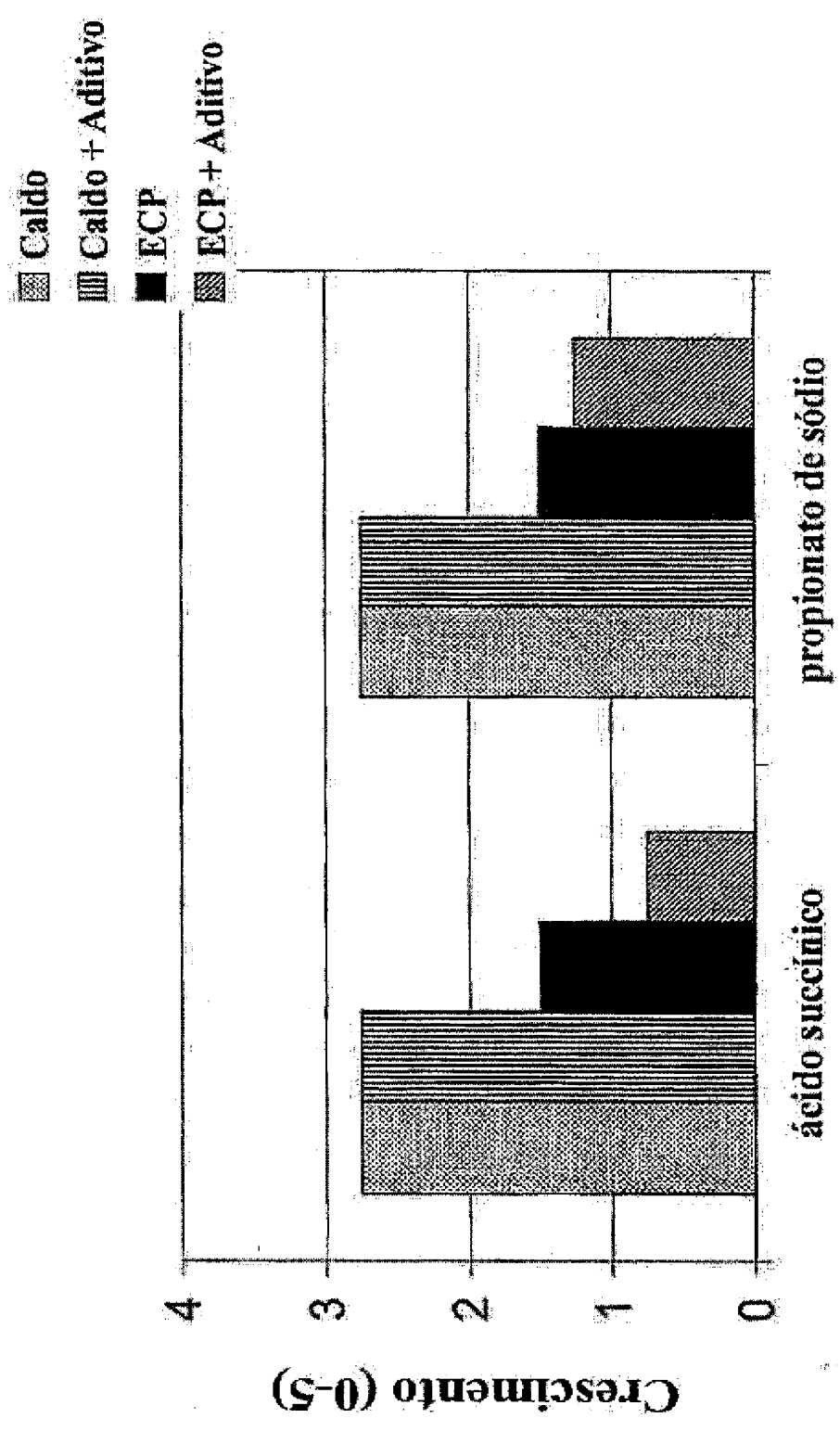


Fig. 2B

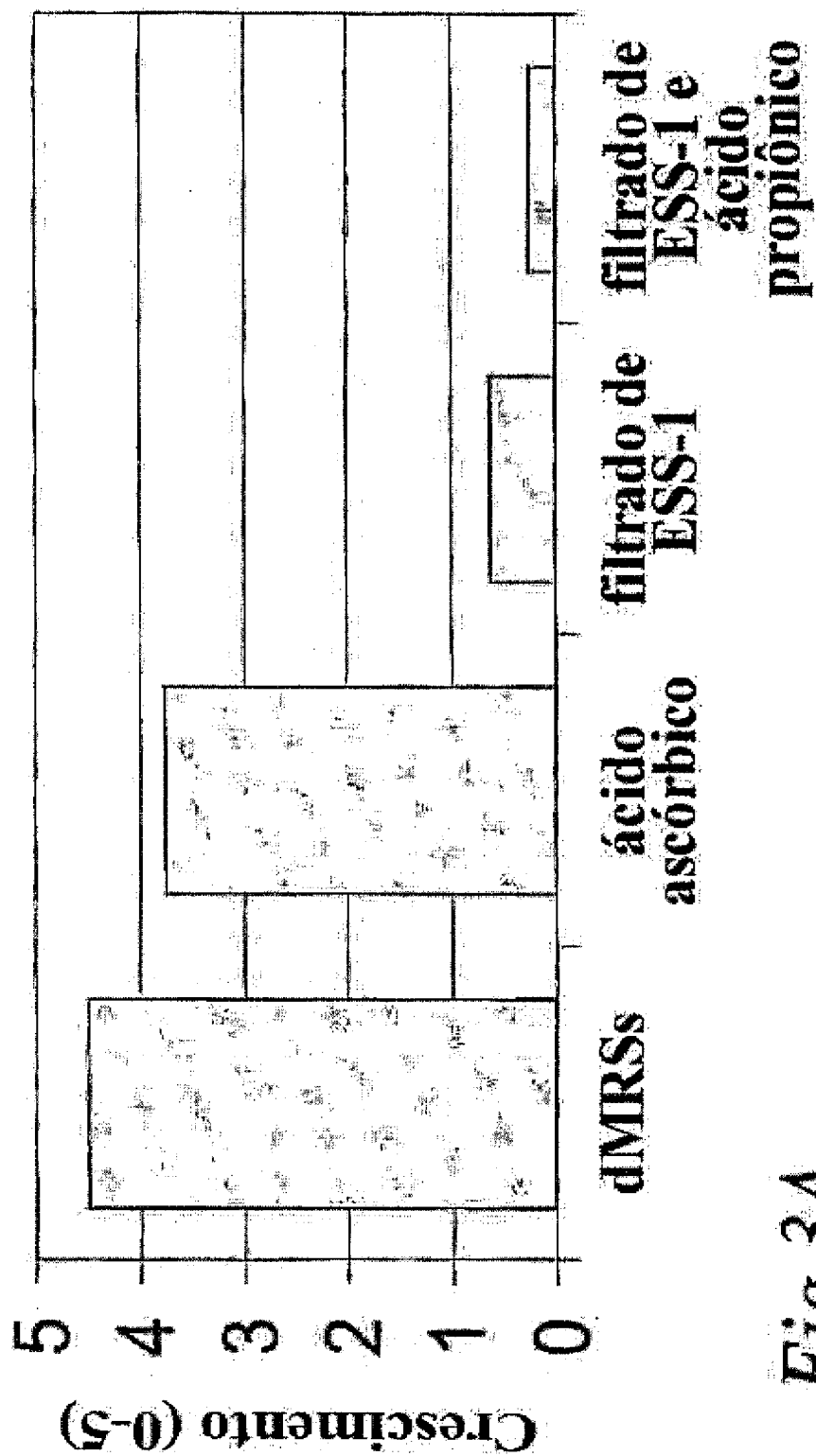


Fig. 3A

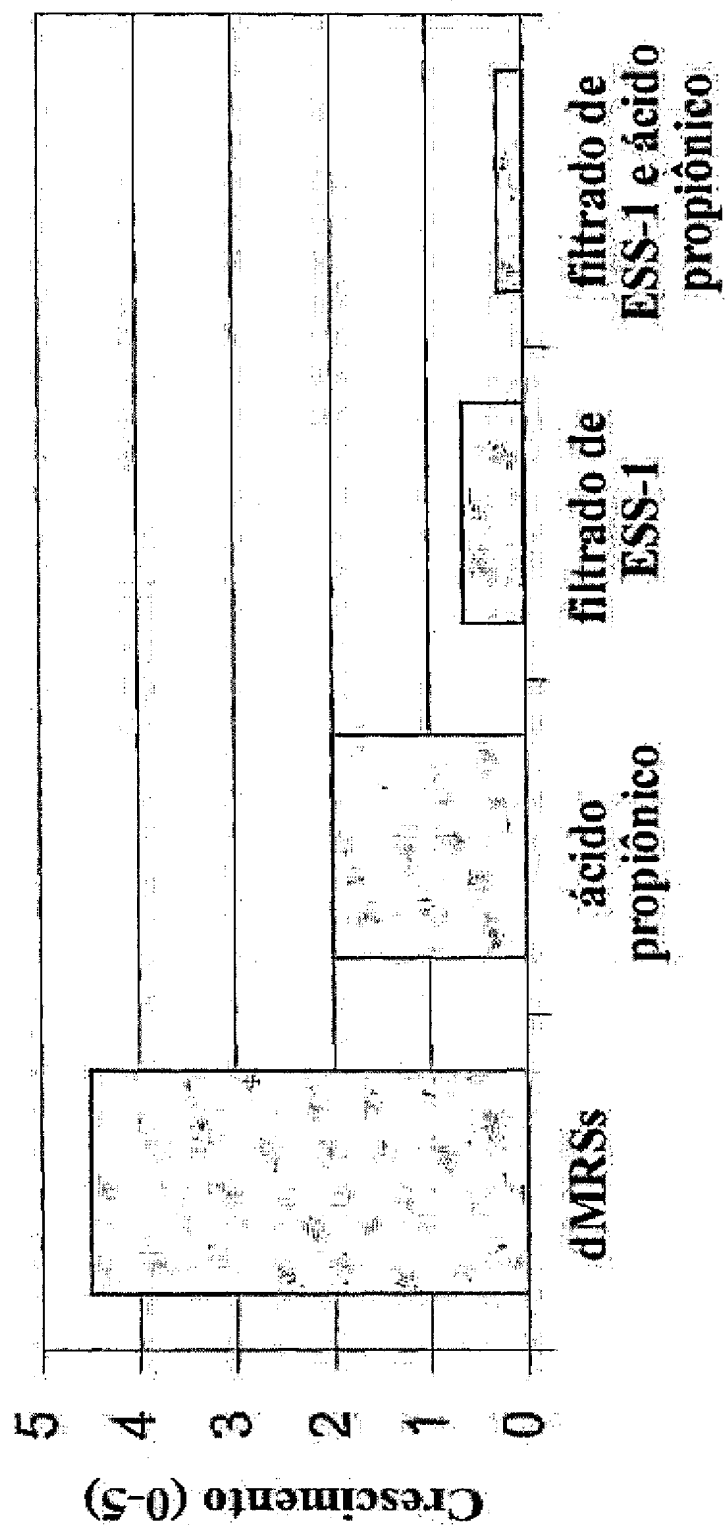


Fig. 3B

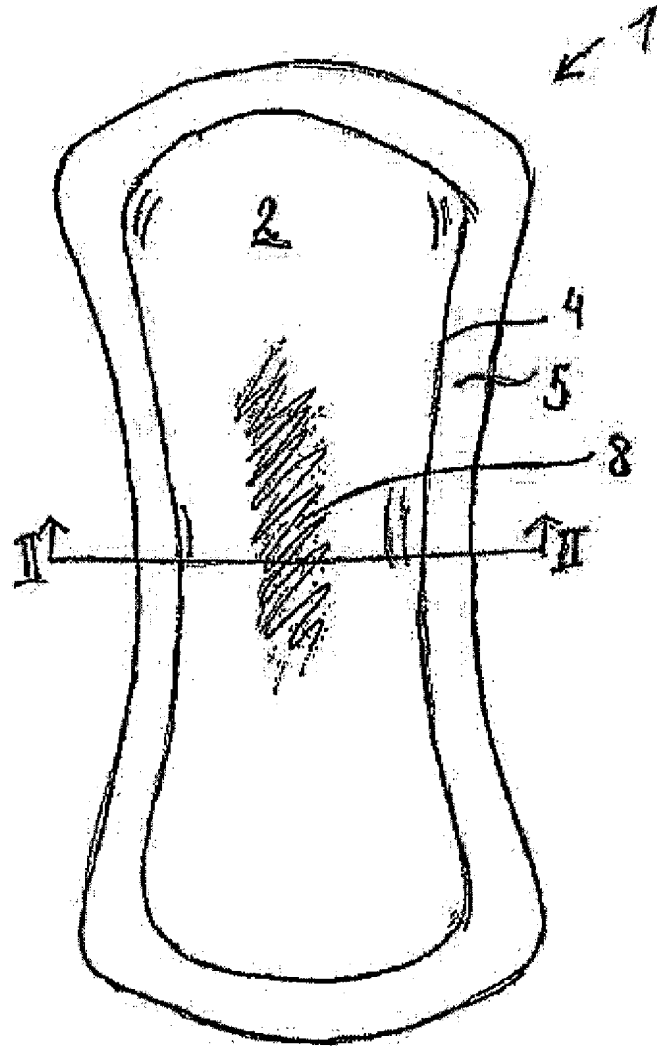


Fig. 4A

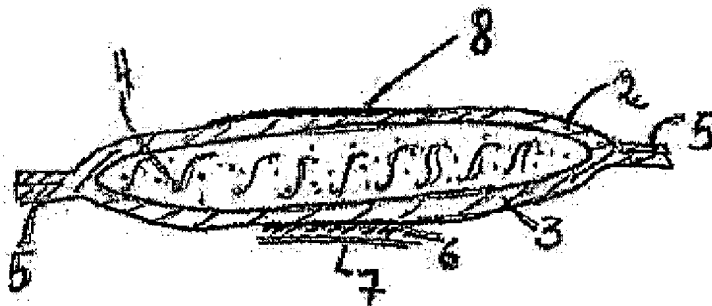


Fig. 4B

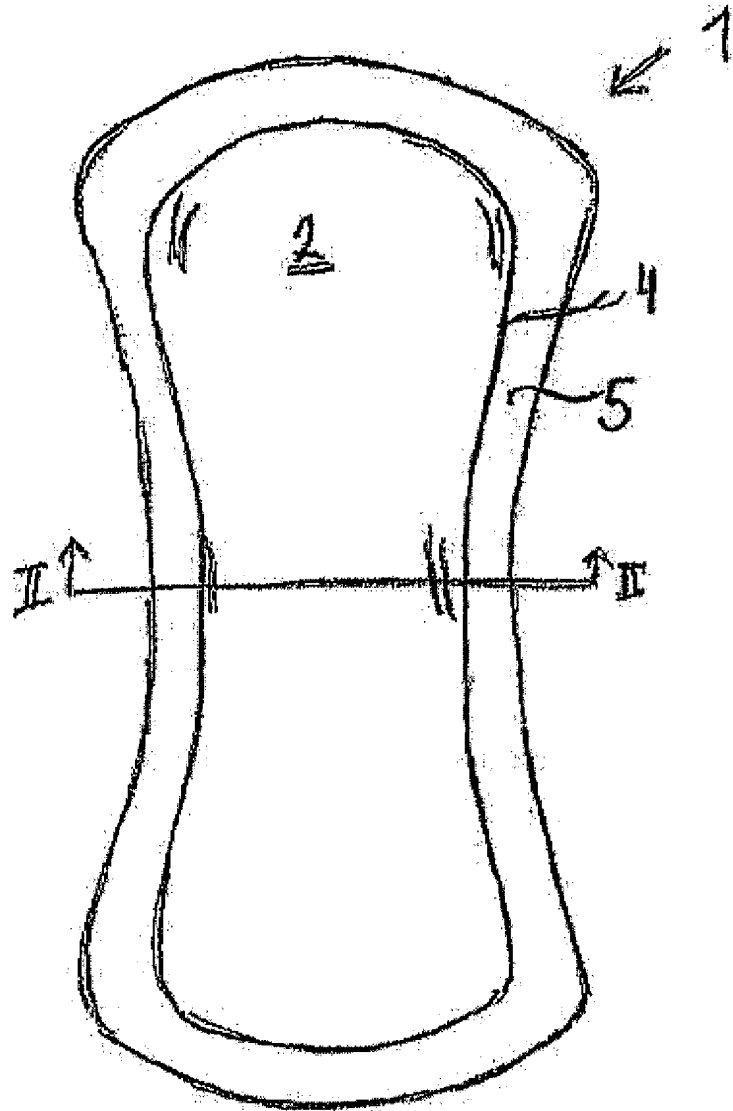


Fig. 5A

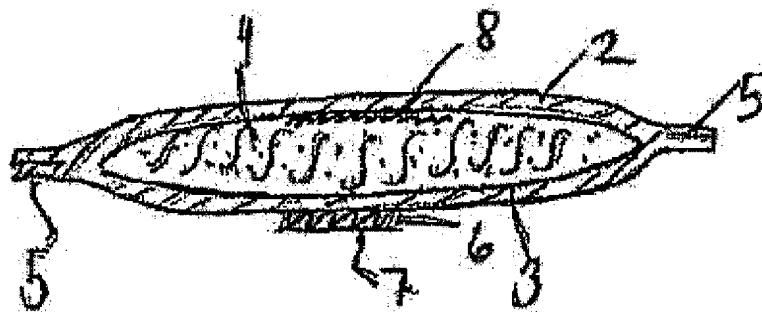
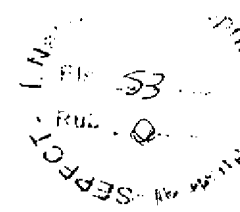


Fig. 5B

**RESUMO****"ARTIGO HIGIÊNICO COMPREENDENDO UMA COMPOSIÇÃO INIBIDORA DE
MICRÓBIO"**

5

A presente invenção se refere a um artigo higiênico (1), tal como, uma toalha higiênica, um forro de calça, um protetor de incontinência, uma fralda, um elemento almofadado de incontinência, um elemento de inserção feminino, um tampão, ou elementos similares, compreendendo uma folha superior (2), dito artigo higiênico (1) compreendendo ainda uma composição inibidora de micróbio (8), dita composição inibidora de micróbio contendo um produto extracelular de pelo menos uma bactéria probiótica e/ou pelo menos uma bactéria probiótica e pelo menos um aditivo na forma de um ácido orgânico, em que pelo menos um de seus valores de pKa não excede a 5,5, e/ou um sal do mesmo.

15