



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL –  
BIONORTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIONORTE

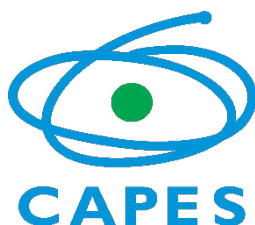
HERMÍNIO BENÍTEZ RABELLO MENDES

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MICRORGANISMOS COM POTENCIAL  
PROBIÓTICO E ATIVIDADE CONTRA ENTEROPATÓGENOS  
BACTERIANOS**

SÃO LUÍS  
2017

Uma parte do presente trabalho foi desenvolvido no “Instituto de Nutrição e Tecnologia dos Alimentos” José Mataix, Centro de Investigação Biomédica da Universidade de Granada, Espanha, com a supervisão do Prof. Dr. Angel Gil Hernandez, Pesquisador responsável pelo Grupo de Investigação de Excelência da Junta de Andalucía “CTS-461 Bioquímica Nutricional: Implicações Terapêuticas e teve colaboração do Dr. Julio R. Plaza Garcia, e fez parte do Programa Doutorado Sanduiche da CAPES-PDSE do Ministério da Educação do Brasil

*Una parte del presente trabajo fue desarrollado en el “Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos” José Mataix, Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, España, con la supervisión do Prof. Dr. Angel Gil Hernández, Investigador Responsable del Grupo de Investigación de Excelencia de la Junta de Andalucía "CTS-461 Bioquímica Nutricional: Implicaciones Terapéuticas y tuvo colaboración del Dr. Julio R. Plaza Diaz, haciendo parte de la estancia Doctoral del programa CAPES - PDSE “Doutorado Sanduiche” del ministerio de educación de Brasil*



**HERMÍNIO BENÍTEZ RABELLO MENDES**

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MICRORGANISMOS COM POTENCIAL  
PROBIÓTICO E ATIVIDADE CONTRA ENTEROPATÓGENOS  
BACTERIANOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – BIONORTE, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valério Monteiro Neto

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Rosa Quaresma Bomfim

SÃO LUÍS  
2017

HERMÍNIO BENÍTEZ RABELLO MENDES

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MICRORGANISMOS COM POTENCIAL  
PROBIÓTICO E ATIVIDADE CONTRA ENTEROPATÓGENOS  
BACTERIANOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – BIONORTE, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr. Valério Monteiro Neto (Orientador)**

---

**Dra. Regina Maria Nardi Drummond**

---

**Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra**

---

**Dr. Afonso Gomes Abreu Junior**

---

**Dra. Cristina de Andrade Monteiro**

*A Deus, onipresente em minha vida...  
A minha família, por ter instigado em mim o desejo pela Ciência.  
Mãe, seus cuidados e dedicação transformaram meus caminhos e aqui estou,  
sinta-se orgulhosa.  
Papai, sua honradez e disciplina me fizeram perceber  
que o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.*

## AGRADECIMENTOS

De todos lugares que frequentei, de todos os países em que estive, sempre te carreguei comigo Deus, portanto, a ti agradeço a honra de ter chegado onde estou... obrigado!

A minha noiva Mariana Arruda (Marys), companheira e cúmplice de longas jornadas acadêmicas, iniciada na graduação até os dias atuais, me incentivando e suportando as lamúrias de um doutorando crítico e sincero demais.

A meu orientador, Prof. Monteiro-Neto, pelos ensinamentos e orientações, que me fizeram, assim como ele, ser apaixonado pela Microbiologia. Obrigado Prof.!

A minha co-orientadora, Profa. Maria Rosa, esta pessoa de coração gigantesco e elevada estima que carregarei pelo resto da minha vida. Soube, em muitos momentos, funcionar como um “algodão entre cristais”, mediando conflitos e com muita destreza solucionando-os, a Universidade CEUMA e a comunidade científica do Maranhão não esquecerão seu legado.

A Universidade CEUMA, por toda a disponibilidade e espaço concedido, tanto como docente quanto pesquisador.

A minhas companheiras no Laboratório de Biologia Parasitaria, Bruna e em especial Monique do Carmo, amiga e colega de trabalho - pela ajuda indispensável na execução de experimentos e análises estatísticas, muito obrigado!

A meu orientador no Doc-sanduche, prof. Angel Gil Hernandez, que me acolheu e possibilitou a transformação do meu conhecimento sobre os “mundo dos probióticos” em terras andaluzas, *muchas gracias Doctor Gil!!* e também a todos os colegas do INYTA, em especial: Julio Plaza, Candido Robles, Maria Jose, Mari Cruz, Oscar Rangel, Carolina Glez, Miguel Gonzáles, Fran e Estefania Sánchez, sin ustedes mi amigos, la vivencia en españa seria muy difícil, gracias a todos!

A meus amigos e companheiras no exterior, Breno Salgado (Liverpool University), Thays Borges (Lopez Neira-UGR), Laryssa Oliveira (Universidad de Granada) e em especial, Apoana Camara (Hospital San Cecílio-UGR), por todos os momentos inesquecíveis vivenciados, pela paciência, água-benta e dedicação nos momentos em que mais precisei... Obrigado!

A meu amigo de longa data, Wandyson Oliveira, pelas idas e vinda ao aeroporto rsrs... pelas cervejas e risadas. Valeu Gordo!

Aos meus colegas de trabalho na Universidade CEUMA, Profa. Lilaléia, Marcia, Ana Claudia, Erica e Profs. Marcos, Jr e em especial Marcio, pelas piadas e *bullying* com o Jr...rsrs – nossa amizade perdurará a “anos-luz”!

A minha família, em especial meus irmãos Charles e Tassia, por acreditar e depositar em mim a confiança necessária para alcançar meus objetivos.

*“Todo homem possui um filósofo dentro de si, para fazê-lo viver é necessária a presença do amor heroico, dessa força infinita que provém do uno, e que permite ao homem suportar dores, transformar o mundo, concretizar seus ideais.”*

**Giordano Bruno**

## RESUMO

O uso de alimentos contendo bactérias probióticas foi recentemente considerado uma possibilidade de prevenção contra a instalação ou atenuação de diversos processos infecciosos. Espécies pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* predominam na microbiota gastrintestinal humana e são amplamente utilizadas em alimentos funcionais. Em geral, a seleção de novas cepas probióticas para uso em humanos, tem como fonte a microbiota intestinal humana e o leite materno. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi isolar e identificar novas estirpes com potencial probiótico a partir de fezes de lactentes amamentados exclusivamente com leite materno, além de avaliar seu potencial probiótico. Foram utilizadas amostras de material fecal de bebês alimentados exclusivamente com leite materno. O isolamento foi realizado utilizando-se ágar MRSC e ágar Beerens para bactérias ácido-lácticas (BAL) e *Bifidobacterium* spp. respectivamente. O potencial probiótico foi avaliado pelos testes de tolerância ao pH gástrico e sais biliares. Além disso, foi verificado sua capacidade de aderir à mucina e as células intestinais humanas (HT-29), bem como a capacidade de inibir adesão de distintas linhagens diarreiogênicas de *E. coli* além de sensibilidade a antimicrobianos. A identificação dos isolados promissores foi realizada através da região 16S rDNA. Cinco isolados apresentaram resistência ácido-biliar, com destaque para o isolado CLM0109 que apresentou 90.2% e 64.6% de resistência a pH 3.0 e pH 2.0 respectivamente. Estes isolados tiveram a capacidade de aderir à mucina e células HT-29, o isolado FEB0308 apresentou o maior nível de aderência a células HT-29. O ensaio de inibição da adesão demonstrou que todos os isolados foram capazes de inibir adesão de *E. coli* diarreiogênicas (DECs). Além disso, a análise de sensibilidade a antimicrobianos demonstrou que 3 isolados apresentaram resistência a um ou dois antibióticos (canamicina e estreptomicina). A análise molecular identificou os isolados como *Lactobacillus casei*. Concluímos que os cinco isolados apresentam potencial probiótico especialmente para uso na prevenção e tratamento de infecções causadas por DEC e demonstra que as amostras fecais de lactentes alimentados exclusivamente com leite materno, podem funcionar como fonte de bactérias com potencial probiótico.

**Palavras-chave:** leite humano, fezes de lactentes, *Lactobacillus casei*, diarreia e probióticos



## ABSTRACT

The use of food for probiotic bacteria has recently been considered a possibility of prevention against the installation or attenuation of several infectious processes. Species belonging to the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* predominate in the gastrointestinal microbiota and are widely used in functional foods. In general, a selection of new probiotic strains for use in humans has as its source a human intestinal flora and breast milk. Thus, the objective of this study was to isolate and identify new species with potential probiotic from samples of breast milk and feces of infants exclusively breastfed, in addition to evaluating their probiotic potential. Samples of breast milk from two different lactation periods (colostrum and transitional milk) and samples of fecal material from infants were used. Isolation was used using MRSC and for Beerens for Lactic-Acid Bacteria and *Bifidobacterium* spp. respectively. Probiotic potential was assessed by physical pH and bile salt tolerance tests. Verified its ability to adhere to mucin and human intestinal cells (HT-29) and inhibit adhesion of different diarrheogenic strains of *E. coli*. The identification of the promising isolates was performed through the 16S rDNA region. Five isolates had acid-bile resistance, with CLM0109 insulation having 90.2% and 64.6% resistance, pH 3.0 and pH 2.0, respectively. These isolates have an ability to adhere to mucin and HT-29 cells, the isolate FEB0308 showed the highest level of adherence to HT-29 cells. The adhesion assay demonstrated that all isolates were absorbed by adhesion of diarrheogenic *E. coli* (DECs). Antimicrobial susceptibility analysis showed that 3 isolates showed resistance to one or two antibiotics (kanamycin and streptomycin). The molecular analysis allowed identifying the isolates as belonging to the species *Lactobacillus casei*. The results show that the five isolates present probiotic potential especially for use in the prevention and treatment of infections caused by DEC and demonstrate that milk and stool samples from infants can act as a source of potential probiotic bacteria.

**Keywords:** Human milk, infants stool, *Lactobacillus casei*, Childhood diarrhea, probiotics

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 MICRORGANISMOS E O HOMEM .....	16
2.1.1 A Microbiota Intestinal .....	17
2.1.2 Bactérias Ácido-Láticas e Bifidobacterias .....	19
2.1.3 Funções da Microbiota Intestinal .....	20
2.2 PROBIÓTICOS E SAÚDE .....	22
2.2.1 Evolução da Definição dos Probióticos .....	23
2.2.2 Atividade dos Probióticos na Saúde Humana .....	24
2.2.3 Aplicações Clínicas dos Probióticos .....	24
2.2.3.1 Manejo da intolerância à lactose .....	25
2.2.3.2 Prevenção e tratamento de alergias .....	26
2.2.3.3 Prevenção e tratamento de diarreias .....	26
2.2.4 Aspectos de Segurança dos Probióticos .....	28
2.2.5 Mecanismos de Ação dos Probióticos .....	28
2.2.6 Critérios para Avaliação dos Probióticos nos Alimentos .....	30
2.2.7 Probióticos Comercialmente Disponíveis .....	31
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>
<b>4. LISTA DE PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 ARTIGO 1 .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 ARTIGO 2 .....</b>	<b>54</b>
<b>4.3 DOCUMENTO DE PATENTE .....</b>	<b>78</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>83</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição e concentração microbiana por sítio anatômico ao longo do trato gastrointestinal ..... **17**
- Figura 2.** Mudança na composição da microbiota intestinal com transcorrer do ciclo vital humano..... **19**
- Figura 3.** Diagrama esquemático de mecanismos de ação de cepas probióticas ..... **29**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BAL:** Bactérias do Ácido Lático
- DAA:** Diarreia Associada a Antibióticos
- EFSA:** *European Food Safety Authority*
- EHEC:** *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EPEC:** *Escherichia coli* enteropatogênica
- EAEC:** *Escherichia coli* enteroagregativa
- ETEC:** *Escherichia coli* enterotoxigênica
- FAO:** *Food and Agriculture Organization*
- Gram (-):** Gram negativa
- Gram (+):** Gram positiva
- GRAS:** *Generally Regarded As Safe*
- ICD:** Infecção por *Clostridium difficile*
- ILSI:** *International Life Sciences Institute*
- LM:** Leite Materno
- MF:** Material Fecal
- MRSC:** Meio de Cultivo de Man Rogosa Sharpe com 0,25% L-cisteína
- OD:** *Optical Density*
- p/v:** Peso/volume
- PBS:** *Phosphate-buffered saline*
- PCR:** *Polimerase Chain Reaction*
- rpm:** Revoluções por minuto
- TGI:** Trato Gastrointestinal
- UFC/g:** Unidades Formadoras de Colônias por gramo
- UFC:** Unidades Formadoras de Colônias
- WHO:** *World Health Organization*

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as enfermidades diarreicas representam a maior causa de morte em crianças menores de 5 anos de idade, provocando 526 mil mortes anuais e apresentando aproximadamente 2,5 milhões de casos ao ano (WHO/UNICEF, 2015). As elevadas taxas de mortalidade são preocupantes devido a sequelas que podem se manifestar a longo prazo no desenvolvimento linear e nas funções físicas e cognitivas das crianças (SCHARF et al., 2014).

A diarreia pode ser causada por uma variedade de microrganismos desde bactérias e vírus até parasitas. Entre os principais agentes que são reconhecidos como causadores, incluem: Adenovírus, Astrovírus, Calicivírus, Enterovírus, Norovírus (vírus Norwalk-like), Sapovírus, Rotavírus, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Blastocystis hominis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Isospora*, *Strongyloides stercoralis*, entre outros (HODGES; GILL, 2010; CHARLES et al., 2014).

No caso de infecções parasitárias (como a amebíase e a giardíase) e de algumas infecções bacterianas (infecções sistêmicas, como a shigelose e a cólera), a terapia antimicrobiana adequada pode reduzir o curso clínico da doença e a duração da excreção fecal do agente infeccioso (GUERRANT et al., 2001). No entanto, quando se realiza o tratamento empírico com antibióticos de amplo espectro, ou quando ocorre falha no tratamento como resultado da resistência à droga utilizada, pode-se permitir a propagação da resistência a outras bactérias (ROBERTS; MULLANY, 2013; SOLOMON; OLIVER, 2014).

Não obstante, o tratamento empírico pode também resultar no uso desnecessário de antibióticos, tendo em vista a elevada prevalência de infecções virais (BARTELT; GUERRANT, 2014; KRONMAN et al., 2014). Não obstante, mesmo no caso de algumas infecções intestinais bacterianas, o resultado clínico tende a piorar com o uso de antibióticos, por exemplo: pacientes infectados por EHEC apresentam maior probabilidade de desenvolver síndrome hemolítica urêmica, quando tratados com antibióticos (CROXEN; FINLAY, 2010; GOLDWATER; BETTELHEIM, 2012) ou quando o paciente apresenta gastroenterites por *Salmonellas* não tíficas, a terapia com antimicrobianos pode aumentar o risco das bactérias presentes permanecerem por mais

tempo dentro do organismo e por sua vez ocasionar recrudescência ou reinfecção (OKORO et al., 2012). Outra complicação associada com o uso de antibióticos é o desenvolvimento de candidíase (VAZQUEZ-GONZALEZ et al., 2013) e diarreia associada a *Clostridium difficile* (GORBACH, 2014).

A microbiota intestinal apresenta-se como um complexo ecossistema formado por microrganismos que possuem uma grande influência sobre a saúde humana, contribuindo para a maturação do intestino, resistência do hospedeiro a patógenos e manutenção da integridade física da mucosa intestinal (HUANG et al., 2013). Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que a microbiota intestinal normal é uma barreira muito eficaz frente a microrganismos oportunistas e patogênicos (TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 2011; VAISHNAVA et al., 2011). A compreensão sobre as funções da microbiota intestinal e o uso de microrganismos para promover saúde tem crescido de maneira significativa nos últimos anos, sendo que o uso destes microrganismos oferece um enfoque inovador sobre o modelo de intervenção terapêutica e de controle de enfermidades específicas (RAOULT, 2008).

Microrganismos benéficos para os seres humanos são designados probióticos. Atualmente, segundo a Organização para a Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAO) e a OMS os probióticos “são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício a saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Os probióticos podem ser utilizados para tratar uma variedade de enfermidades gastrointestinais, incluindo doença inflamatória intestinal (DII), síndrome do intestino irritado (SII) e diarreia associada com o uso de antibióticos (DAA) (OREL; KAMHI TROP, 2014; REZAIE; PIMENTEL, 2014; YOON et al., 2014).

As bactérias probióticas, tanto autóctones como as introduzidas ao organismo mediante alimentação, podem controlar a instauração e/ou desenvolvimento de diversos microrganismos patogênicos, entre estes se destacam: *Salmonella thyphimurium*, *Shigella* spp. *Clostridium difficile*, *Campilobacter jejuni* e *Escherichia coli*, além de proporciona proteção importante contra patógenos urogenitais como *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* e *Chlamydia trachomatis* (MENARD, 2011).

Desta maneira, as cepas probióticas tem sido alvo de muitos estudos devido ao aumento da variabilidade de espécies com potencial probiótico que foram descobertas e testadas. Esta mudança, fez com que o público alvo, antes formado por idosos, crianças e adultos com saúde debilitada, abrangesse também indivíduos saudáveis e até animais domésticos e de produção (KORTERINK et al., 2014).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar novas estirpes probióticas isoladas a partir de amostras de leite materno e fezes de bebês alimentados exclusivamente com leite materno, procedentes do Hospital Materno Infantil-Universidade Federal do Maranhão.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MICRORGANISMOS E O HOMEM

O corpo humano é habitado por um vasto número de bactérias, vírus e eucariotos unicelulares. Antes, alguns autores acreditavam que a proporção de bactérias em relação a células humanas era de 10:1, no entanto, estudos mais recentes demonstram que o número de bactérias é equivalente ao número de células humano (1:1) (SENDER et al., 2016). Além disso, outras áreas do corpo também apresentam concentrações variadas de bactérias como pele, cavidade oral, trato intestinal e urogenital (QUIGLEY, 2013).

A maior parte da microbiota intestinal é composta por anaeróbios obrigatórios, anaeróbios facultativos e aeróbios. Embora existam mais de 50 filos descritos, a microbiota intestinal é predominantemente formada por 4 filos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Os anaeróbios obrigatórios são encontrados em maior proporção do que as bactérias aeróbias e a maioria (60-90%) são representantes de duas famílias principais: 23% *Bacteroidetes* e 64% *Firmicutes* (SEKIROV et al., 2010).

A proporção dos gêneros de microrganismos que integram a microbiota gastrointestinal varia consideravelmente ao longo do aparelho digestório. Dessa forma, por exemplo, no intestino delgado a quantidade de microrganismos oscila na ordem de  $10^4$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias) /mL a  $10^{6-7}$  UFC/mL (Figura 1). Os fatores que limitam o crescimento destes microrganismos no trato gastrintestinal são fundamentalmente o trânsito intestinal e a secreção de ácidos biliares e enzimas pancreáticas (CONLON; BIRD, 2015).

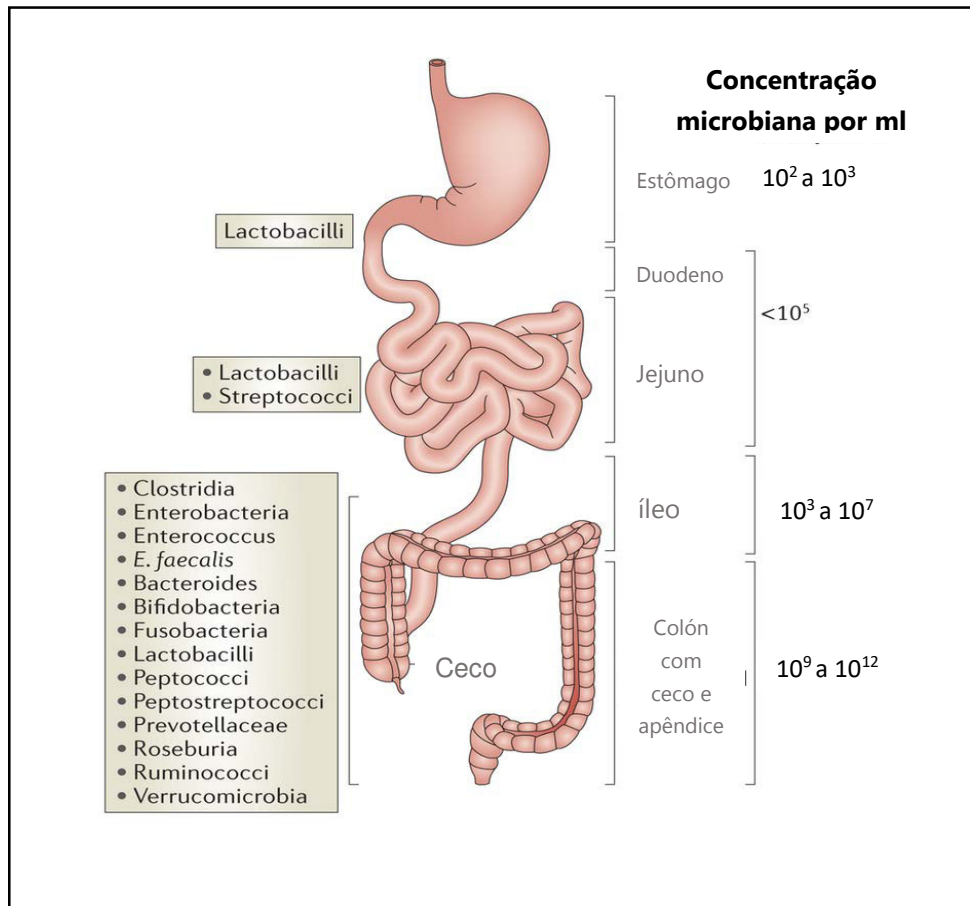
A microbiota normal humana é adquirida num momento posterior ao nascimento (BEZIRTZOGLU, 1997). Em uma primeira fase, cepas aeróbias e anaeróbias facultativas, colonizam o tubo digestivo, dentre elas *Lactobacillus* e *Escherichia coli*, como consequência, um microssistema é formado, onde também é destacada a grande proliferação de bactérias anaeróbias pertencentes aos gêneros: *Clostridium*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (SEKIROV et al., 2010). Transcorridos os primeiros anos de vida, a microbiota do trato TGI encontra-se estabelecida (RODRIGUEZ et al., 2015).

Estudos de colonização intestinal identificaram três funções primárias da microbiota intestinal: (A) *nutrição e metabolismo*, como um resultado da atividade bioquímica da microbiota, incluindo a recuperação de energia sob a forma de ácidos graxos de cadeia curta, produção de vitaminas e efeitos benéficos sobre a absorção de cálcio e ferro no cólon; (B) *proteção*, impedindo a invasão de agentes infecciosos ou o



crescimento excessivo de espécies residentes com potencial patogênico, e (C) *trófica* sobre a proliferação e diferenciação do epitélio intestinal, e sobre o desenvolvimento e a modulação do sistema imunológico local (GUARNER; MALAGELADA, 2003; TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 2011).

**Figura 1.** Distribuição e concentração microbiana por sítio anatômico ao longo do TGI humano



Fonte: Adaptado de Alan M. Mowat e W. Agace, 2014

### 2.1.1 A Microbiota Intestinal

A composição inicial da microbiota do TGI começa a ser estabelecida concomitante ao nascimento e depende fundamentalmente de dois fatores: tipo de parto e status nutricional da mãe (PENDERS et al., 2006).

Durante o desenvolvimento gestacional, o ser humano encontra-se protegido por um ambiente fisiologicamente apropriado e estéril. No entanto, no momento do nascimento é invadido por uma variedade de espécies microbianas provenientes da

mucosa materna, consequência da sua passagem através do canal vaginal e contato com a pele, bem como o meio ambiente circundante (NURIEL-OHAYON et al., 2016).

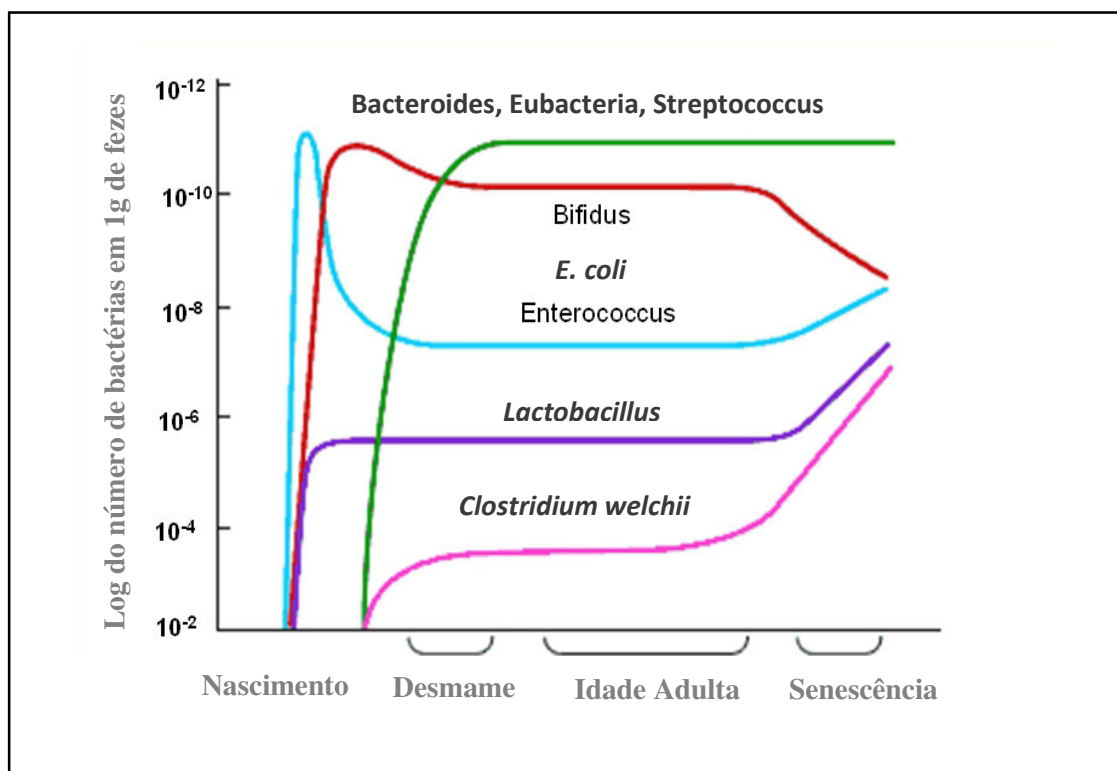
A partir deste momento é estabelecido no TGI uma residência bacteriana, que se modifica com a idade, impondo um padrão de distribuição. Regulada por fatores ambientais, interações fisiológicas hospedeiro-microrganismo e componentes alimentares (NEU, 2012).

A alimentação é um fator crucial para a evolução da microbiota, como tem sido demonstrado em estudos que compararam crianças sob aleitamento materno e aquelas alimentadas com fórmula (BARTICK; REINHOLD, 2010; REPA et al., 2015). Em bebês alimentados exclusivamente com leite materno, a população de bifidobactérias é dominante, enquanto a presença de coliformes e clostrídios é pequena. Em contrapartida, os bebês alimentados com fórmulas apresentam uma microbiota mais complexa, com a presença de bacteroides, bifidobactérias, clostrídios, estreptococos e coliformes em proporções semelhantes (HARMSEN et al., 2000).

Após o desmame, coincidindo com a introdução de suplementos alimentares, inicia-se o desenvolvimento de uma microbiota mais diversificada. Após dois anos, a microbiota da criança evolui para o que será a microbiota adulta. O número de *Bacteroides* spp. e cocos Gram-positivos aeróbios se estabiliza e chega a superar em número as bifidobactérias que, após a idade adulta, diminuem ao passo que o número de *Lactobacillus* aumenta (RODRIGUEZ et al., 2015) (Figura 2).

Embora a maioria dos autores argumentem que o feto no útero é estéril e a colonização do recém-nascido é produzida principalmente pela microbiota do canal de vaginal, estudos recentes indicam que o leite materno apresenta um papel fundamental como fonte de microrganismos (MARTIN et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2013). Outros autores, especulam sobre a possibilidade da passagem de bactérias através do epitélio intestinal da mãe para outras regiões, tais como as glândulas mamárias, meio pelo qual o intestino do lactente é atingido (FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013; RODRIGUEZ, 2014).

**Figura 2.** Mudanças na composição da microbiota intestinal com o transcorrer do ciclo vital humano



Fonte: Adaptado de Tomotari Mitsouka, 1996

### 2.1.2 Bactérias Ácido-láticas e Bifidobacterias

As bactérias ácido-láticas (BAL) são definidas como microrganismos Gram (+), catalase (-), não esporuladas, com morfologia cocobacilar e produtores de ácido lático como produto final da sua fermentação. Seu modo peculiar de fermentação de açúcares sob determinadas condições é uma importante ferramenta para sua diferenciação. Desta forma, as BAL podem agrupar-se em: aquelas que realizam Glicólise – via Embden Meyerhof - onde exclusivamente o produto final da fermentação é o ácido lático (metabolismo homofermentativo) e aquelas que além do ácido lático produzem etanol, acetato e  $CO_2$  pela via do ácido-6-fosfogluconico (metabolismo heterofermentativo) (SALMINEN et al., 2004). Geralmente, estas bactérias possuem complexas necessidades de fatores de crescimento, como: vitamina B, aminoácidos, peptídeos, bases púricas e pirimídicas sendo esta uma das razões de estarem presentes de forma tão numerosa em um meio tão rico quanto o leite.

As BAL estão presentes em dois nichos ecológicos principais. Ambos ambientes apresentam uma grande quantidade nutrientes: a mucosa do TGI do homem e de animais homeotérmicos, além de ambientes lácteos. Algumas apresentam relevante interesse na biopreservação de alimentos, por sua capacidade de restringir o crescimento de microrganismos indesejáveis, por competição e/ou pela produção de agentes antimicrobianos, entre os quais estão as bacteriocinas (PEREZ, et al., 2014), ácidos orgânicos (CHAILLOU et al., 2005) e hipotiocianato (JONES et al., 2001).

As bifidobacterias são microrganismos Gram-positivos pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, compartilham numerosas características fenotípicas e funcionais com as BAL “típicas”, por tradição e efeitos práticos foram reunidas no mesmo grupo, apesar de não estarem relacionadas filogeneticamente. Além disso, as bifidobacterias possuem uma concentração maior de guanina e citosina em seu DNA comparado às BAL tradicionais (HOLZAPFEL et al., 2001).

Estes microrganismos foram isoladas pela primeira vez no final do século XIX por Henry Tissier (Tissier, 1900). As principais espécies desse gênero que apresentam interesse industrial para produção de leites fermentados com apelo probiótico são: *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* e *B. termophilum*. Normalmente são encontradas no trato gastrintestinal, na vagina e na boca dos seres humanos e animais. Algumas espécies são, todavia, oriundas do ambiente ou de alimentos, normalmente de origem animal (MAYRHOFER et al., 2011). As bifidobactérias são anaeróbias obrigatórias e colonizam o intestino grosso, principalmente o cólon dos seres humanos nos seus primeiros dias de vida, se proliferam intensamente até atingirem uma população estável na idade adulta e, a partir de então, começam a decrescer gradativamente até o final da vida (FUJIMURA et al., 2010).

### **2.1.3 Funções da Microbiota**

A elevada atividade metabólica e endócrina do TGI, além do seu papel nutricional, resulta num importante impacto sobre a saúde e o bem estar do indivíduo. As bactérias presentes no cólon já são consideradas como os maiores determinantes da saúde e doença (HUMAN MICROBIOME PROJECT, 2012).

Nos últimos anos, muitos estudos foram iniciados buscando compreender melhor a complexidade deste sistema. O Programa Europeu de Metagenômica do Trato Intestinal Humano (MetaHIT) e o Projeto do Microbioma humano dos EUA (HMP), são exemplos de programas que possuem a intenção, através do sequenciamento em larga escala, de

caracterizar a diversidade de espécies microbianas encontradas nos diferentes sítios anatômicos do corpo humano (QIN et al., 2010; ARUMUGAM et al., 2011; HUMAN MICROBIOME PROJECT, 2012).

#### *2.1.3.1 Funções de Nutrição e Metabolismo*

A microbiota entérica metaboliza os substratos ou resíduos dietéticos não digeríveis, muco endógeno e os detritos celulares. A diversidade de genes na comunidade microbiana (microbioma) proporciona uma grande variedade de enzimas e vias bioquímicas distintas no hospedeiro (HOOPER et al., 2002). A fermentação de carboidratos não digeríveis pelo hospedeiro ocorre principalmente no ceco e cólon direito e representa uma fonte de energia importante para o crescimento de bactérias produzindo ácidos graxos de cadeia curta que o hospedeiro pode absorver. Isto resulta na reabsorção de energia na dieta e promove a absorção de íons (Ca, Mg, Fe) no ceco (MACFARLANE; MACFARLAND, 2014). Os tipos de funções metabólicas incluem a produção de vitaminas (K, vitamina B12, biotina, ácido fólico e pantotênico) e síntese de aminoácidos a partir do amoníaco ou da ureia. Já o metabolismo anaeróbio de peptídeos e proteínas ocorre em segmentos mais distais do cólon, e é uma fonte de ácidos graxos de cadeia curta, contudo, ao mesmo tempo, gera uma série de substâncias potencialmente tóxicas (POWER et al., 2014).

#### *2.1.3.2 Função de Proteção*

A função defensiva inclui efeito "barreira", em que as bactérias que ocupam um espaço ou nicho impedem a implantação de bactérias estranhas ao ecossistema. Além disso, a própria microbiota impede o crescimento excessivo de bactérias oportunistas que estão presentes no intestino, mas com crescimento restrito (KAMADA et al., 2013). O equilíbrio entre as espécies bacterianas residentes permite a estabilidade global da população microbiana. O efeito de barreira se deve à capacidade de certas bactérias de liberar substâncias antimicrobianas (bacteriocinas) que inibem a proliferação de outras bactérias, e também a competição entre essas bactérias por recursos do sistema, tanto nutrientes ou sítios ecológicos (NG et al., 2009).

### 2.1.3.3 Função Trófica

Possivelmente, o papel mais importante da microbiota intestinal sobre a fisiologia colônica é o seu efeito trófico no epitélio intestinal (WONG et al., 2006). A diferenciação das células epiteliais é afetada em grande parte pela interação com microrganismos residentes e seus produtos metabólicos, principalmente ácidos graxos com cadeias curtas (butirato, acetato e propionato) que estimulam a proliferação e diferenciação de células epiteliais no intestino humano. Além disso, o acetato é utilizado pelo músculo esquelético e cardíaco para a obtenção de energia e pelos adipócitos para lipogênese (HOOPER et al., 2001).

## 2.2 PROBIÓTICOS E A SAÚDE

Atualmente, diversos trabalhos tem demonstrado haver uma estreita relação entre a dieta e o estado de saúde (CLAESSON et al., 2012; GURA, 2014; KELDER et al., 2014). Segundo estes autores, doenças metabólicas como obesidade e diabetes estão intrinsecamente correlacionadas com o papel da microbiota intestinal e a alimentação.

Há muitos séculos, microrganismos probióticos têm sido utilizados de forma empírica na produção de alimentos como produtos lácteos e fermentados (MALAGO et al., 2011). Estes alimentos apresentam características ditas organolépticas, com base na presença de determinados microrganismos. Nos últimos anos o interesse sobre esses microrganismos elevou-se devido sua utilização na promoção de melhorias na saúde e prevenção de enfermidades (BARRETT et al., 2012; PETSCHOW et al., 2013; SHERIDAN et al., 2014).

Sem dúvida a relação mais conhecida de probióticos com derivados lácteos fermentados corresponde a associação entre *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, tradicionalmente utilizado na produção de iogurte. Não obstante, a lista de linhagens tem aumentado com outros microrganismos que podem estar presentes na microbiota intestinal, com por exemplo, outras espécies de *Lactobacillus*, *Streptococcus* espécies de *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, cepas de *Escherichia coli* e inclusive espécies do gênero *Enterococcus* (FIJAN, 2014).

Tais agentes devem possuir patogenicidade nula ou mínima, assim com capacidade de desempenhar funções favoráveis sobre a saúde, funcionando como coadjuvantes no tratamento de diarreias agudas, principalmente a provocada pelo uso de antibióticos (REZAIE; PIMENTEL, 2014).

### 2.2.1 Evolução da Definição dos Probióticos

O conceito de microrganismos probióticos vem do Grego "pro-bios" (para a vida), e foi introduzido por Ilya Metchnikoff em 1907 . Contudo, o termo "probiótico" foi proposto em várias fontes, por Ferdinand Vergin em 1954 para "substâncias ativas que são essenciais para um desenvolvimento saudável da vida", por Werner Kollath em 1953 e respectivamente usado por Lilly e Stillwell, em 1965.

Várias espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* já foram investigadas intensamente, assim como estirpes de *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* e *Streptococcus* que foram considerados como microrganismos com propriedades probióticas (FUNG et al., 2011).

Atualmente, os probióticos são definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2006). No entanto, esta definição não é aceita pela Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA) e pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA). No momento, tais órgãos informam que a alegação de saúde integrada na definição do termo probiótico não é mensurável, pois os mercados comerciais têm ultrapassado a capacidade da ciência para comprovar tal evidência (RIJKERS et al., 2011). Contudo, as alegações de saúde, como tratamento e cura de doenças usando probióticos, são mensuráveis e podem ser comprovadas utilizando abordagens, como ensaios randomizados, ensaios duplo-cegos ou controlados com placebo (FIJAN, 2014).

No Brasil, a ANVISA estabelece que os probióticos são os microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. Tal agência ainda estabelece critérios como: número de células viáveis, concentrações mínimas exigidas até o momento do consumo, dentre outros (BRASIL, 2002).

Embora os benefícios do consumo de alimentos fermentados sejam conhecidos pela humanidade há séculos; muito antes dos microrganismos serem descobertos; o conceito de administração de microrganismos, a fim de promover um benefício a saúde humana iniciou-se a um século, quando Ilya Metchnikoff teorizou que a saúde pode ser melhorada, assim como o processo de envelhecimento retardado, manipulando-se o microbioma intestinal com bactérias "benéficas" encontradas no iogurte (METCHNIKOFF, 1907).

Desde então, até os dias atuais, têm crescido o interesse por esses alimentos que apresentam microrganismos benéficos para a saúde e de forma maior, pelos produtos lácteos fermentados (CEAPA et al., 2013; VEIGA et al., 2014; MANZO et al., 2015).

## **2.2.2 Atividade dos Probióticos na Saúde Humana**

Nos dias atuais, consumidores estão mais cientes da relação entre estilo de vida, dieta e boa saúde, o que explica o surgimento de uma forte procura por produtos que são capazes de melhorar a saúde, além de fornecer nutrição básica (KLIEM; GIVENS, 2011; ROZENBERG et al., 2016). A lista de benefícios conferidos a saúde dada pelos alimentos funcionais aumenta vertiginosamente e os probióticos demonstram ser uma das categorias que mais cresce (BISANZ et al., 2014; MOHAMADSHAHI et al., 2014).

O uso de probióticos como suplementos na alimentação tem sido efetivo no controle de infecções do TGI e em condições inflamatórias (VERNA; LUCAK, 2010; OREL; KAMHI TROP, 2014; HORVATH et al., 2016). Essas evidências indicam que estirpes específicas e selecionadas a partir da microbiota intestinal saudável, exibem poderosa capacidade antipatogênica e anti-inflamatória e conseqüentemente estão envolvidas na modulação da microbiota intestinal (ISOLAURI et al., 2004).

Certos produtos lácteos, que contêm linhagens iniciadoras como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, são capazes de facilitar a degradação da lactose em indivíduos que apresentem intolerância, pois contém uma enzima chamada  $\beta$ -galactosidase que atua durante a fermentação dos produtos e também no intestino (EL KAFSI et al., 2014; SAVAIANO, 2014).

## **2.2.3 Aplicações Clínicas dos Probióticos**

Atualmente, existem vários estudos investigando os reais benefícios de alimentos fermentados e probióticos a saúde humana (BISANZ et al., 2014; IVEY et al., 2015; PEREZ, C., 2015). No entanto, na maioria desses estudos os pesquisadores não utilizam informações suficientes ou utilizam microrganismos que não foram identificados definitivamente. Assim, enquanto o número de efeitos descritos pelo uso de probióticos for baixo, pouco impacto científico terão os probióticos, tornando restrita suas aplicações clínicas.

Dentre os principais benefícios conferidos aos probióticos que estão relatados na literatura, convém destacar:



- Melhora do sistema imunológico;
- *Manejo da intolerância à lactose*;
- Prevenção do câncer de cólon;
- Redução das concentrações de colesterol e triglicérides plasmáticos;
- Redução da pressão arterial;
- Redução de quadros inflamatórios;
- *Prevenção e tratamento de alergias*;
- Efeitos benéficos sobre o metabolismo mineral, particularmente a densidade óssea e estabilidade;
- Redução da infecção por *Helicobacter pylori*;
- Supressão de microrganismos patogênicos (efeito antimicrobiano);
- *Prevenção e tratamento de diarreias*;
- Prevenção de infecções urogenitais

#### 2.2.3.1 Manejo da intolerância à lactose

Intolerância a lactose, também conhecida como má absorção da lactose ou como denominado recentemente, “lactase não persistente”, é um dos tipos mais comuns de má absorção de carboidratos. Está associada com a incapacidade de digestão da lactose e seus constituintes, glicose e galactose, devido à baixa atividade enzimática da lactase, que muitos autores denominam de hipolactasia (MATTAR et al., 2012; PERETS et al., 2014).

Após o nascimento, a atividade de lactase é alta e declina durante o crescimento. Como consequência, a lactose não absorvida, durante a fase adulta, é metabolizada por bactérias do colón que produzem gás (hidrogênio e metano) e ácidos graxos de cadeia curta. Os principais sintomas aparecem cerca de 30 minutos a 2 horas após o consumo de produtos alimentares contendo lactose, e podem variar desde inchaço e cólicas até diarreia (WILT et al., 2010).

As pessoas com intolerância a lactose, toleram melhor lactose presente no iogurte do que à lactose presente no leite, devido à presença de bactérias produtoras de lactase no iogurte, especialmente *Lactobacillus acidophilus*, o que contribui para a digestão e absorção de lactose (SUCHY et al., 2010; REPA et al., 2015).

A presença de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* diminuem a intolerância à lactose devido a capacidade que tem em produzir a enzima lactase (MONTES et al., 1995; VASILJEVIC; JELEN, 2001; RUL et al., 2011).

Adicionalmente, em outro estudo, verificou-se que o consumo de leite contendo *Bifidobacterium longum* resultou em uma menor produção de hidrogênio e sintomas de flatulência, quando comparado com o consumo de leite pasteurizado como controle (ANDRADE; BORGES, 2009).

Atualmente, estudos com *B. longum* envolvendo imunomodulação, demonstram que a administração oral pode promover proteção contra infecções ocasionada por agentes virais como o vírus influenza (KAWAHARA et al., 2015). Com base nas informações citadas acima, pesquisadores especulam que a administração de probióticos pode ajudar na digestão de produtos lácteos contendo lactose.

#### 2.2.3.2 *Prevenção de tratamento de alergias*

As doenças alérgicas representam um problema de saúde pública, atingindo mais de 20% da população mundial (PAWANKAR, 2014). Em crianças, sua prevalência depende muito do status alérgico dos pais, sendo 10% naqueles sem pais ou irmãos alérgicos e 20 a 30% naqueles com parentes de primeiro grau atópicos (ARSHAD, 2005). Vale ressaltar também, a prevalência de alergias a alimentos apresentada por lactentes e crianças que oscila entre 3 a 10% (LACK, 2008)

A prevalência de enfermidades alérgicas como eczema atópico, alergias respiratórias e alimentares tem aumentado nos últimos anos (DHAMI; SHEIKH, 2015). Estas condições estão associadas a presença de citocinas sintetizadas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> que estimulam a secreção de IgE (POULSEN; HUMMELSHOJ, 2007).

Probióticos ao atuarem como imunomoduladores de respostas alérgicas, através da fagocitose e/ou produção de citocinas pro-inflamatórias, apresentam-se como uma nova abordagem terapêutica na prevenção e tratamento destas doenças (YAN; POLK, 2011). Isto é confirmado através de estudos que relatam a influência da microbiota intestinal na sensibilização e origem de alergias. Tal hipótese, segundo alguns autores, pode explicar o aumento da incidência de doenças alérgicas recentemente (TROMPETTE et al., 2014).

#### 2.2.3.3 *Prevenção e tratamento de diarreias*

Na diarreia, os efeitos dos probióticos ainda não estão totalmente elucidados, no entanto, existem pesquisas que relatam efeitos benéficos de probióticos sobre alguns tipos de diarreia (DIETRICH et al., 2014). O rotavírus, vírus da família *Reoviridae*, é considerado o principal agente causador de diarreia infantil e responsável por elevadas

taxas de mortalidade (WHO/UNICEF, 2015). Bons resultados foram obtidos no tratamento de diarreia com o uso de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* GG (PANT et al., 2011; NIXON et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Existem relatos também, da ação de *Lactobacillus acidophilus* LB1, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus reuterii*, descritos por possuírem efeitos benéficos sobre diarreias (SALAZAR et al., 2009; GUTIERREZ-CASTRELLON et al., 2014; PRESTI et al., 2015).

Outros microrganismos associados a quadros graves de diarreia são os enteropatógenos bacterianos, dos quais os mais comuns são *Escherichia coli* (linhagens diarreio gênicas), onde a *E. coli* enteropatógênica clássica (EPEC) e enterohemorrágica (EHEC), representam os agentes bacterianos mais frequentemente associados à diarreia infantil, além de *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, (WALKER et al., 2013). A avaliação da ação de probióticos sobre patógenos como EPEC e EHEC, mostra-se efetiva através de mecanismos como, exclusão competitiva e produção de substâncias inibitórias (JANDU et al., 2009; FORSSTEN et al., 2014; KLETA et al., 2014).

Vale ressaltar que a antibioticoterapia, principal linha de intervenção contra enteropatógenos, pode provocar desde surtos leves a quadros graves de diarreia (HICKSON, 2011). Durante a terapia antimicrobiana a microbiota normal pode ser suprimida e como resultado disto, ser ocupada com cepas patogênicas. As mudanças da microbiota também podem levar a origem de cepas resistentes como de *Clostridium difficile* que é um dos principais agentes causadores de DAA (VARUGHESE et al., 2013). Este microrganismo é também responsável por uma infecção chamada ICD (infecção por *Clostridium difficile*) que é uma infecção gastrointestinal caracterizada por manifestações clínicas que podem variar desde diarreias leves à colite pseudomembranosa, com surgimento de megacólon e possível perfuração intestinal, estando intimamente associado a uso de antibióticos (FREEMAN et al., 2010).

Várias pesquisas têm utilizado *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* no combate a DAA (HICKSON, 2011; ALLEN et al., 2013; MICKLEFIELD, 2014). Esses microrganismos podem ser usados em pacientes idosos, internados por longos períodos ou em imunocomprometidos. As cepas de *S. boulardii* são eficientes em reduzir a concentração de *C. difficile* na ICD (SHAN et al., 2013; MCFARLAND, 2014).

#### 2.2.4 Aspectos de Segurança dos Probióticos

Certas cepas com características probióticas específicas podem ser utilizadas como bactérias comerciais, apresentando-se com seguras para uso em algumas aplicações (STEINBERG et al., 2014; GU et al., 2015).

A segurança dos produtos probióticos é avaliada através das características fenotípicas e genotípicas e também por análises estatísticas obtidas a partir da utilização destes microrganismos numa determinada população (DORON; SNYDMAN, 2015). Os principais aspectos de segurança associados ao uso de probióticos incluem:

- Utilização de estirpes de origem humana em humanos;
- Isolamento a partir do TGI de humanos saudáveis;
- Apresentar-se não-patogênica;
- Não possuir nenhuma história de relação com doenças infecciosas;
- Não serem capazes de desconjugar sais biliares;
- Não transportar genes de resistência a antibióticos

Conhecimentos a respeito da sobrevivência, propriedades de translocação e colonização são importantes para a avaliação dos possíveis efeitos positivos e negativos dos probióticos (BOYLE et al., 2006). Algumas propriedades enzimáticas como excesso de desconjugação de sais biliares ou degradação de muco tem revelado promover efeitos negativos (JAROCKI et al., 2014).

#### 2.2.5 Mecanismo de ação dos probióticos

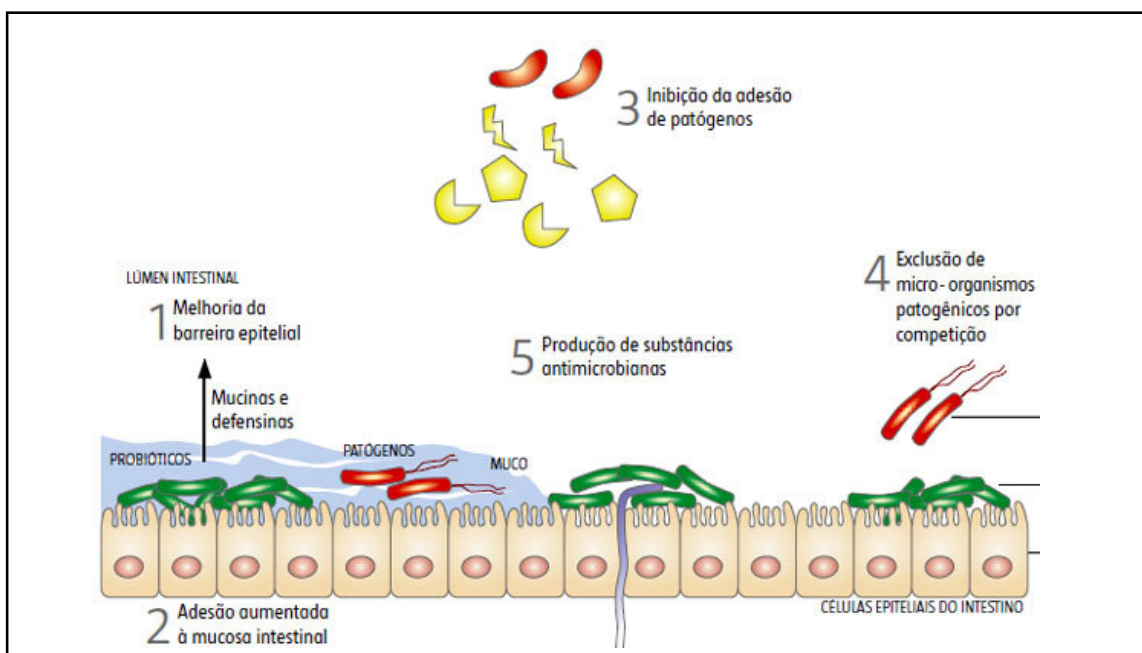
Microrganismos probióticos se apresentam como suporte à saúde do hospedeiro. No entanto, este mecanismo de suporte não está bem explicado. Existe na literatura um número muito grande de pesquisas sobre este tema, porém muitos destes estudos tentam explicar apenas como probióticos podem proteger o hospedeiro de desordens intestinais (PLAZA-DIAZ et al., 2014; RINGEL-KULKA et al., 2014; PYNE et al., 2015).

Dentro os principais mecanismos, convém destacar:

- **Produção de Substancias inibitórias:** Produção de alguns ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas que são inibidores tanto de bactérias Gram-positivas quanto de Gram-negativas (NEAL-MCKINNEY et al., 2012).

- **Bloqueio de Sítios de Adesão:** Probióticos e bactérias patogênicas estão em constante competição. Os probióticos inibem a adesão desses patógenos aderindo às superfícies epiteliais do intestino, bloqueando assim sítios de adesão (OHLAND; MACNAUGHTON, 2010) (Figura 3).
- **Competição por Nutrientes:** Apesar da falta de estudos *in vivo*, os probióticos inibem o crescimento de outros patógenos consumindo os nutrientes que eles necessitam (REIFF; KELLY, 2010).
- **Estímulo da Imunidade:** Estimulante da imunidade específica e não específica pode ser um possível mecanismo dos probióticos para proteger o hospedeiro contra doenças intestinais. Este mecanismo não está bem documentado, porém acredita-se que os componentes específicos da parede celular ou as camadas celulares podem atuar como adjuvantes e aumentar a resposta imune humoral (GIORGETTI et al., 2015).
- **Degradação de Receptores de Toxinas:** Devido a degradação do receptor de toxina sobre a mucosa intestinal, demonstrou-se que *S. boulardii* protege o hospedeiro contra doença intestinal causada por *C. difficile* (POTHOULAKIS, 2009).

**Figura 3.** Diagrama esquemático do mecanismo de ação de probióticos sobre microrganismos patogênicos, ilustrando mecanismos de ação por bloqueio de sítios de adesão em células epiteliais do trato intestinal.



Fonte: icbufmg

Alguns outros mecanismos demonstrados são a supressão da produção de toxinas, redução do pH do intestino, a atenuação da virulência. Todos mecanismos de ação dos probióticos ainda não foram plenamente estabelecidos (HOLZAPFEL et al., 1998; CHEN, C. C.; WALKER, 2005). Vale ressaltar que os probióticos não se multiplicam com rapidez, razão pela qual não permanecem como colonizadores perenes do tubo digestivo (MARCO et al., 2006).

### 2.2.6 Critério para avaliação dos probióticos nos alimentos

Durante a primavera de 2006, a FAO e WHO definiram conjuntamente novos critérios para avaliação dos probióticos.

O informe compreende os seguintes pontos:

- **Identificação da cepa:** Mediante técnicas que incluem métodos moleculares aceitos internacionalmente para estabelecer fenótipo, genótipo, gênero e espécie de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura.
- **Caracterização biológica:** Deve ser demonstrado os efeitos benéficos através de provas *in vitro*, determinando características como adesão a epitélio gastrointestinal, produção de bacteriocinas, ácido lático e peróxido de hidrogênio e a habilidade de inibir a aderência de patógenos. Também deve ser incluído ensaios *in vivo* com modelos animais para estabelecer os potenciais mecanismos de ação.
- **Segurança:** É necessário estabelecer e conhecer os padrões de resistência a antimicrobianos, atividade metabólica, produção de toxinas, atividade hemolítica, infectividade em modelos animais e os possíveis efeitos adversos nos consumidores. Garantindo assim, que se tratam de microrganismos GRAS (*Generally Recognized as Safe*).
- **Eficácia:** Comprovar através de estudos clínicos os efeitos esperados dos probióticos em humanos. Portanto, ao associar um efeito a uma cepa concreta é necessário comprovar isto através de estudos tecnológicos, clínicos e epidemiológicos.

- **Especificações:** Definir na etiqueta um documento explicativo, com as características do produto, gênero e espécie da cepa, caracterização do microrganismo, condições de armazenamento e efeitos benéficos específicos.

### 2.2.7 Probióticos Comercialmente Disponíveis

Vários produtos com características probióticas se apresentam comercialmente disponíveis para consumo em todo mundo. Tais produtos variam desde produtos lácteos como: iogurtes, bebidas e suplementos em capsula a insumos para animas em geral (VEIGA et al., 2010; HUTCHINS et al., 2013; SANDERS et al., 2013). Em alguns produtos são administrados microrganismos isolados, em outros são utilizadas mesclas bacterianas. Entre elas podemos citar a mescla de cepas de *Lactobacillus* e *Streptococcus* que são utilizadas como fermentadoras de produtos lácteos com o objetivo de promover e melhorar a saúde humana (HERVE-JIMENEZ et al., 2009).

No Brasil, a ANVISA, órgão responsável pelo controle sanitário de produtos e serviço, já aprovou 10 microrganismos com função probiótica: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rammosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterim bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* todos em concentrações mínimas de  $10^8$  a  $10^9$  UFC de microrganismos probióticos por porção do produto (ANVISA, 2008).

No entanto, estudos demonstram que em muitos produtos são encontradas discrepâncias entre os conteúdos declarados e os realmente presentes (DRAGO et al., 2010; CHEN, T. et al., 2014). Estes problemas surgem em muitos casos em virtude da ausência de uma fiscalização regulatória precisa, pois tais produtos não são considerados produtos farmacêuticos (GOVENDER et al., 2014).

Nos EUA, a FDA detém autoridade reguladora sobre produtos probióticos, fiscalizando responsabilidades sobre os fabricantes, incluindo a rotulagem e a segurança destes produtos seja em alimentos, suplementos ou na forma de drogas. Contudo, alguns procedimentos não abordam a verificação das declarações de eficácia ou qualidade composicional (identidade, pureza e força) (SANDERS, 2008).

No Brasil, o registro para substâncias bioativas, probióticos isolados, alimentos com alegação de propriedade funcional/saúde, alimentos novos e outros ingredientes produzidos nacionalmente ou importados, passou a ser obrigatório. O processo é

encaminhado para a CTCAF (Comissão de Assessoramento Tecno-científico em Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais), que realiza a análise (ANVISA, 2008)

Portanto, a seleção de novas estirpes com potencial probiótico a partir de amostras de origem humana representaria um grande avanço no tratamento de diarreias e prevenção de outras doenças no Brasil e no mundo. Adicionalmente, uma das grandes preocupações da OMS é a implementação de novas terapias que não atuem como pressão seletiva, ao propiciar a seleção de patógenos cada vez mais resistentes aos antibióticos. Sendo assim, diante da necessidade de novas alternativas ao tratamento de doenças, a busca por novos microrganismos com potencial probiótico pode representar avanços e introduzir importantes benefícios para saúde pública.



### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, S. J.; WAREHAM, K.; WANG, D., *et al.* Lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in older inpatients (PLACIDE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. **Lancet**, v. 382, n. 9900, p. 1249-1257, 2013.

ANDRADE, S.; BORGES, N. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* on plasma lipids of women with normal or moderately elevated cholesterol. **J Dairy Res**, v. 76, n. 4, p. 469-474, 2009.

ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, 2008.

ARSHAD, S. H. Primary prevention of asthma and allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 116, n. 1, p. 3-14; quiz 15, 2005.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E., *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174-180, 2011.

BARRETT, H. L.; CALLAWAY, L. K.; NITERT, M. D. Probiotics: a potential role in the prevention of gestational diabetes? **Acta Diabetol**, v. 49 Suppl 1, n., p. S1-13, 2012.

BARTELT, L. A.; GUERRANT, R. L. Antibiotics help control rotavirus infections and enhance antirotaviral immunity: are you serious? **J Infect Dis**, v. 210, n. 2, p. 167-170, 2014.

BARTICK, M.; REINHOLD, A. The burden of suboptimal breastfeeding in the United States: a pediatric cost analysis. **Pediatrics**, v. 125, n. 5, p. e1048-1056, 2010.

BEZIRTOGLOU, E. The intestinal microflora during the first weeks of life. **Anaerobe**, v. 3, n. 2-3, p. 173-177, 1997.

BISANZ, J. E.; ENOS, M. K.; MWANGA, J. R., *et al.* Randomized open-label pilot study of the influence of probiotics and the gut microbiome on toxic metal levels in tanzanian pregnant women and school children. **MBio**, v. 5, n. 5, p., 2014.

BOYLE, R. J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; TANG, M. L. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 6, p. 1256-1264; quiz 1446-1257, 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 09 jan. 2002.

CEAPA, C.; WOPEREIS, H.; REZAIKI, L., *et al.* Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 27, n. 1, p. 139-155, 2013.

CHAILLOU, S.; CHAMPOMIER-VERGES, M. C.; CORNET, M., *et al.* The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 12, p. 1527-1533, 2005.

CHARLES, M.; DELVA, G. G.; BOUTIN, J., *et al.* Importance of cholera and other etiologies of acute diarrhea in post-earthquake Port-au-Prince, Haiti. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 3, p. 511-517, 2014.

CHEN, C. C.; WALKER, W. A. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states. **Adv Pediatr**, v. 52, n., p. 77-113, 2005.

CHEN, T.; WU, Q.; LI, S., *et al.* Microbiological quality and characteristics of probiotic products in China. **J Sci Food Agric**, v. 94, n. 1, p. 131-138, 2014.

CLAESSON, M. J.; JEFFERY, I. B.; CONDE, S., *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. **Nature**, v. 488, n. 7410, p. 178-184, 2012.

CONLON, M. A.; BIRD, A. R. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 17-44, 2015.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

DHAMI, S.; SHEIKH, A. Estimating the prevalence of aero-allergy and/or food allergy in infants, children and young people with moderate-to-severe atopic eczema/dermatitis in primary care: multi-centre, cross-sectional study. **J R Soc Med**, v. 108, n. 6, p. 229-236, 2015.

DIETRICH, C. G.; KOTTMANN, T.; ALAVI, M. Commercially available probiotic drinks containing *Lactobacillus casei* DN-114001 reduce antibiotic-associated diarrhea. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 42, p. 15837-15844, 2014.

DORON, S.; SNYDMAN, D. R. Risk and safety of probiotics. **Clin Infect Dis**, v. 60 Suppl 2, n., p. S129-134, 2015.

DRAGO, L.; RODIGHIERO, V.; CELESTE, T., *et al.* Microbiological evaluation of commercial probiotic products available in the USA in 2009. **J Chemother**, v. 22, n. 6, p. 373-377, 2010.

EL KAFSI, H.; BINESSE, J.; LOUX, V., *et al.* *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* and ssp. *bulgaricus*: a chronicle of evolution in action. **BMC Genomics**, v. 15, n., p. 407, 2014.

FAO/WHO. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario: World Health Organisation. 2002.

FAO/WHO. **Probiotics in food : health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization, 2006. viii, 50 p. p. (FAO food and nutrition paper.)

FERNANDEZ, L.; LANGA, S.; MARTIN, V., *et al.* The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. **Pharmacol Res**, v. 69, n. 1, p. 1-10, 2013.

FIJAN, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 5, p. 4745-4767, 2014.

FORSSTEN, S.; EVANS, M.; WILSON, D., *et al.* Influence of a probiotic mixture on antibiotic induced microbiota disturbances. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 33, p. 11878-11885, 2014.

FREEMAN, J.; BAUER, M. P.; BAINES, S. D., *et al.* The changing epidemiology of Clostridium difficile infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 3, p. 529-549, 2010.

FUJIMURA, K. E.; SLUSHER, N. A.; CABANA, M. D., *et al.* Role of the gut microbiota in defining human health. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 4, p. 435-454, 2010.

FUNG, W. Y.; YUEN, K. H.; LIONG, M. T. Agrowaste-based nanofibers as a probiotic encapsulant: fabrication and characterization. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 15, p. 8140-8147, 2011.

FUNKHOUSER, L. J.; BORDENSTEIN, S. R. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. **PLoS Biol**, v. 11, n. 8, p. e1001631, 2013.

GIORGETTI, G.; BRANDIMARTE, G.; FABIOCCHI, F., *et al.* Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. **J Immunol Res**, v. 2015, n., p. 501361, 2015.

GOLDWATER, P. N.; BETTELHEIM, K. A. Treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). **BMC Med**, v. 10, n., p. 12, 2012.

GORBACH, S. L. John G. Bartlett: Contributions to the discovery of Clostridium difficile antibiotic-associated diarrhea. **Clin Infect Dis**, v. 59 Suppl 2, n., p. S66-70, 2014.

GOVENDER, M.; CHOONARA, Y. E.; KUMAR, P., *et al.* A review of the advancements in probiotic delivery: Conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 1, p. 29-43, 2014.

GU, S. B.; ZHAO, L. N.; WU, Y., *et al.* Potential probiotic attributes of a new strain of Bacillus coagulans CGMCC 9951 isolated from healthy piglet feces. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 31, n. 6, p. 851-863, 2015.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512-519, 2003.

GUERRANT, R. L.; VAN GILDER, T.; STEINER, T. S., *et al.* Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 3, p. 331-351, 2001.

GURA, T. Nature's first functional food. **Science**, v. 345, n. 6198, p. 747-749, 2014.

GUTIERREZ-CASTRELLON, P.; LOPEZ-VELAZQUEZ, G.; DIAZ-GARCIA, L., *et al.* Diarrhea in preschool children and *Lactobacillus reuteri*: a randomized controlled trial. **Pediatrics**, v. 133, n. 4, p. e904-909, 2014.

HARMSSEN, H. J.; WILDEBOER-VELOO, A. C.; RAANGS, G. C., *et al.* Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 30, n. 1, p. 61-67, 2000.

HERVE-JIMENEZ, L.; GUILLOUARD, I.; GUEDON, E., *et al.* Postgenomic analysis of streptococcus thermophilus cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 7, p. 2062-2073, 2009.

HICKSON, M. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection. **Therap Adv Gastroenterol**, v. 4, n. 3, p. 185-197, 2011.

HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. **Gut Microbes**, v. 1, n. 1, p. 4-21, 2010.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J., *et al.* Overview of gut flora and probiotics. **Int J Food Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 85-101, 1998.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R., *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Am J Clin Nutr**, v. 73, n. 2 Suppl, p. 365S-373S, 2001.

HOOPER, L. V.; WONG, M. H.; THELIN, A., *et al.* Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, n. 5505, p. 881-884, 2001.

HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J. I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. **Annu Rev Nutr**, v. 22, n., p. 283-307, 2002.

HORVATH, A.; LEBER, B.; SCHMERBOECK, B., *et al.* Randomised clinical trial: the effects of a multispecies probiotic vs. placebo on innate immune function, bacterial translocation and gut permeability in patients with cirrhosis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 44, n. 9, p. 926-935, 2016.

HUANG, X. Z.; ZHU, L. B.; LI, Z. R., *et al.* Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier development. **World J Clin Pediatr**, v. 2, n. 4, p. 46-53, 2013.

HUTCHINS, R. G.; BAILEY, C. S.; JACOB, M. E., *et al.* The effect of an oral probiotic containing lactobacillus, bifidobacterium, and bacillus species on the vaginal microbiota of spayed female dogs. **J Vet Intern Med**, v. 27, n. 6, p. 1368-1371, 2013.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

IVEY, K. L.; HODGSON, J. M.; KERR, D. A., *et al.* The effect of yoghurt and its probiotics on blood pressure and serum lipid profile; a randomised controlled trial. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 25, n. 1, p. 46-51, 2015.

JANDU, N.; ZENG, Z. J.; JOHNSON-HENRY, K. C., *et al.* Probiotics prevent enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7-mediated inhibition of interferon-gamma-induced tyrosine phosphorylation of STAT-1. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 2, p. 531-540, 2009.

JAROCKI, P.; PODLESNY, M.; GLIBOWSKI, P., *et al.* A new insight into the physiological role of bile salt hydrolase among intestinal bacteria from the genus Bifidobacterium. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114379, 2014.

JONES, B. D.; INGLE, J. D.; JR. Evaluation of immobilized redox indicators as reversible, in situ redox sensors for determining Fe(III)-reducing conditions in environmental samples. **Talanta**, v. 55, n. 4, p. 699-714, 2001.

KAMADA, N.; CHEN, G. Y.; INOHARA, N., *et al.* Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. **Nat Immunol**, v. 14, n. 7, p. 685-690, 2013.

KAWAHARA, T.; TAKAHASHI, T.; OISHI, K., *et al.* Consecutive oral administration of Bifidobacterium longum MM-2 improves the defense system against influenza virus infection by enhancing natural killer cell activity in a murine model. **Microbiol Immunol**, v. 59, n. 1, p. 1-12, 2015.

KELDER, T.; STROEVE, J. H.; BIJLSMA, S., *et al.* Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health. **Nutr Diabetes**, v. 4, n., p. e122, 2014.

KLETA, S.; NORDHOFF, M.; TEDIN, K., *et al.* Role of F1C fimbriae, flagella, and secreted bacterial components in the inhibitory effect of probiotic Escherichia coli Nissle 1917 on atypical enteropathogenic E. coli infection. **Infect Immun**, v. 82, n. 5, p. 1801-1812, 2014.

KLIEM, K. E.; GIVENS, D. I. Dairy products in the food chain: their impact on health. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 2, n., p. 21-36, 2011.

KOLLATH, W. [The increase of the diseases of civilization and their prevention]. **Munch Med Wochenschr**, v. 95, n. 47, p. 1260-1262, 1953.

KORTERINK, J. J.; OCKELOEN, L.; BENNINGA, M. A., *et al.* Probiotics for childhood functional gastrointestinal disorders: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatr**, v. 103, n. 4, p. 365-372, 2014.

KRONMAN, M. P.; ZHOU, C.; MANGIONE-SMITH, R. Bacterial prevalence and antimicrobial prescribing trends for acute respiratory tract infections. **Pediatrics**, v. 134, n. 4, p. e956-965, 2014.

KUO, C. H.; KUO, H. F.; HUANG, C. H., *et al.* Early life exposure to antibiotics and the risk of childhood allergic diseases: an update from the perspective of the hygiene hypothesis. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 46, n. 5, p. 320-329, 2013.

LACK, G. Epidemiologic risks for food allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, n. 6, p. 1331-1336, 2008.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. **J Clin Gastroenterol**, v. 45 Suppl, n., p. S120-127, 2011.

MALAGO, J. J.; KONINKX, J. F. J. G.; MARINŠEK-LOGAR, R. **Probiotic bacteria and enteric infections cytoprotection by probiotic bacteria**: secondary title. Dordrecht ; New York: Springer., 2011, 1 online resource (xi, 476 p.) p.

MANZO, N.; PIZZOLONGO, F.; MONTEFUSCO, I., *et al.* The effects of probiotics and prebiotics on the fatty acid profile and conjugated linoleic acid content of fermented cow milk. **Int J Food Sci Nutr**, v., n., p. 1-6, 2015.

MARCO, M. L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Curr Opin Biotechnol**, v. 17, n. 2, p. 204-210, 2006.

MARTIN, R.; JIMENEZ, E.; HEILIG, H., *et al.* Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 4, p. 965-969, 2009.

MATTAR, R.; DE CAMPOS MAZO, D. F.; CARRILHO, F. J. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. **Clin Exp Gastroenterol**, v. 5, n., p. 113-121, 2012.

MAYRHOFER, S.; MAIR, C.; KNEIFEL, W., *et al.* Susceptibility of bifidobacteria of animal origin to selected antimicrobial agents. **Chemother Res Pract**, v. 2011, n., p. 989520, 2011.

MCFARLAND, L. V. Use of probiotics to correct dysbiosis of normal microbiota following disease or disruptive events: a systematic review. **BMJ Open**, v. 4, n. 8, p. e005047, 2014.

MENARD, J. P. Antibacterial treatment of bacterial vaginosis: current and emerging therapies. **Int J Womens Health**, v. 3, n., p. 295-305, 2011.

METCHNIKOFF, E.; MITCHELL, P. C. **The prolongation of life; optimistic studies**. London,

New York,: W. Heinemann;

G.P. Putnam's Sons, 1907. xx, 343 p. p.

METCHNIKOFF, E. **Essais optimistes**. Paris: A. Maloine, 1907. iii, 438 p. p.

MICKLEFIELD, G. [Saccharomyces boulardii in the treatment and prevention of antibiotic-associated diarrhea]. **MMW Fortschr Med**, v. 156 Suppl 1, n., p. 18-22, 2014.

MOHAMADSHAHI, M.; VEISSI, M.; HAIDARI, F., *et al.* Effects of probiotic yogurt consumption on lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized controlled clinical trial. **J Res Med Sci**, v. 19, n. 6, p. 531-536, 2014.

MONTES, R. G.; BAYLESS, T. M.; SAAVEDRA, J. M., *et al.* Effect of milks inoculated with Lactobacillus acidophilus or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. **J Dairy Sci**, v. 78, n. 8, p. 1657-1664, 1995.

NEAL-MCKINNEY, J. M.; LU, X.; DUONG, T., *et al.* Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e43928, 2012.

NEU, J. **Gastroenterology and nutrition : neonatology questions and controversies.** Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2012. xiv, 361 p. p.

NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A., *et al.* Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflamm Bowel Dis**, v. 15, n. 2, p. 300-310, 2009.

NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A., *et al.* Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflamm Bowel Dis**, v. 15, n. 2, p. 300-310, 2009.

NIXON, A. F.; CUNNINGHAM, S. J.; COHEN, H. W., *et al.* The effect of Lactobacillus GG on acute diarrheal illness in the pediatric emergency department. **Pediatr Emerg Care**, v. 28, n. 10, p. 1048-1051, 2012.

NURIEL-OHAYON, M.; NEUMAN, H.; KOREN, O. Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. **Front Microbiol**, v. 7, n., p. 1031, 2016.

OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 298, n. 6, p. G807-819, 2010.

OKORO, C. K.; KINGSLEY, R. A.; QUAIL, M. A., *et al.* High-resolution single nucleotide polymorphism analysis distinguishes recrudescence and reinfection in recurrent invasive nontyphoidal Salmonella typhimurium disease. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 7, p. 955-963, 2012.

OREL, R.; KAMHI TROP, T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 33, p. 11505-11524, 2014.

PANT, N.; MARCOTTE, H.; HERMANS, P., *et al.* Lactobacilli producing bispecific llama-derived anti-rotavirus proteins in vivo for rotavirus-induced diarrhea. **Future Microbiol**, v. 6, n. 5, p. 583-593, 2011.

PAWANKAR, R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. **World Allergy Organ J**, v. 7, n. 1, p. 12, 2014.

- PENDERS, J.; THIJS, C.; VINK, C., *et al.* Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118, n. 2, p. 511-521, 2006.
- PERETS, T. T.; SHPORN, E.; AIZIC, S., *et al.* A diagnostic approach to patients with suspected lactose malabsorption. **Dig Dis Sci**, v. 59, n. 5, p. 1012-1016, 2014.
- PEREZ, C. [Probiotics for the treating acute diarrhea and preventing antibiotic-associated diarrhea in children]. **Nutr Hosp**, v. 31 Suppl 1, n., p. 64-67, 2015.
- PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microb Cell Fact**, v. 13 Suppl 1, n., p. S3, 2014.
- PETSCHOW, B.; DORE, J.; HIBBERD, P., *et al.* Probiotics, prebiotics, and the host microbiome: the science of translation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1306, n., p. 1-17, 2013.
- PLAZA-DIAZ, J.; GOMEZ-LLORENTE, C.; FONTANA, L., *et al.* Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 42, p. 15632-15649, 2014.
- POTHOULAKIS, C. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 30, n. 8, p. 826-833, 2009.
- POULSEN, L. K.; HUMMELSHOJ, L. Triggers of IgE class switching and allergy development. **Ann Med**, v. 39, n. 6, p. 440-456, 2007.
- POWER, S. E.; O'TOOLE, P. W.; STANTON, C., *et al.* Intestinal microbiota, diet and health. **Br J Nutr**, v. 111, n. 3, p. 387-402, 2014.
- PRESTI, I.; D'ORAZIO, G.; LABRA, M., *et al.* Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. **Appl Microbiol Biotechnol**, v., n., p., 2015.
- PYNE, D. B.; WEST, N. P.; COX, A. J., *et al.* Probiotics supplementation for athletes - clinical and physiological effects. **Eur J Sport Sci**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2015.
- QIN, J.; LI, R.; RAES, J., *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.
- QUIGLEY, E. M. Gut bacteria in health and disease. **Gastroenterol Hepatol (N Y)**, v. 9, n. 9, p. 560-569, 2013.
- RAOULT, D. Human microbiome: take-home lesson on growth promoters? **Nature**, v. 454, n. 7205, p. 690-691, 2008.
- REIFF, C.; KELLY, D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. **Int J Med Microbiol**, v. 300, n. 1, p. 25-33, 2010.



REPA, A.; THANHAEUSER, M.; ENDRESS, D., *et al.* Probiotics (Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum) prevent NEC in VLBW infants fed breast milk but not formula. **Pediatr Res**, v. 77, n. 2, p. 381-388, 2015.

REZAIE, A.; PIMENTEL, M. Probiotics for antibiotic-associated diarrhea: PLACIDE swings the pendulum. **Gastroenterology**, v. 146, n. 7, p. 1822-1823, 2014.

RIJKERS, G. T.; DE VOS, W. M.; BRUMMER, R. J., *et al.* Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. **Br J Nutr**, v. 106, n. 9, p. 1291-1296, 2011.

RINGEL-KULKA, T.; GOLDSMITH, J. R.; CARROLL, I. M., *et al.* Lactobacillus acidophilus NCFM affects colonic mucosal opioid receptor expression in patients with functional abdominal pain - a randomised clinical study. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 40, n. 2, p. 200-207, 2014.

ROBERTS, A. P.; MULLANY, P. **Bacterial integrative mobile genetic elements**. Austin, Tex.: Landes Bioscience, 2013. p. p. (Molecular biology intelligence unit)

RODRIGUEZ, J. M. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? **Adv Nutr**, v. 5, n. 6, p. 779-784, 2014.

RODRIGUEZ, J. M.; MURPHY, K.; STANTON, C., *et al.* The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microb Ecol Health Dis**, v. 26, n., p. 26050, 2015.

ROZENBERG, S.; BODY, J. J.; BRUYERE, O., *et al.* Effects of Dairy Products Consumption on Health: Benefits and Beliefs--A Commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. **Calcif Tissue Int**, v. 98, n. 1, p. 1-17, 2016.

RUL, F.; BEN-YAHIA, L.; CHEGDANI, F., *et al.* Impact of the metabolic activity of Streptococcus thermophilus on the colon epithelium of gnotobiotic rats. **J Biol Chem**, v. 286, n. 12, p. 10288-10296, 2011.

SALAZAR, N.; PRIETO, A.; LEAL, J. A., *et al.* Production of exopolysaccharides by Lactobacillus and Bifidobacterium strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. **J Dairy Sci**, v. 92, n. 9, p. 4158-4168, 2009.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria : microbiological and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 2004. 633 p. (Food science and technology)

SANDERS, M. E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. **Clin Infect Dis**, v. 46 Suppl 2, n., p. S58-61; discussion S144-151, 2008.

SANDERS, M. E.; GUARNER, F.; GUERRANT, R., *et al.* An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. **Gut**, v. 62, n. 5, p. 787-796, 2013.

SAVAIANO, D. A. Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. **Am J Clin Nutr**, v. 99, n. 5 Suppl, p. 1251S-1255S, 2014.

SCHARF, R. J.; DEBOER, M. D.; GUERRANT, R. L. Recent advances in understanding the long-term sequelae of childhood infectious diarrhea. **Curr Infect Dis Rep**, v. 16, n. 6, p. 408, 2014.

SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C., *et al.* Gut microbiota in health and disease. **Physiol Rev**, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS Biol**, v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016.

SHAN, L. S.; HOU, P.; WANG, Z. J., *et al.* Prevention and treatment of diarrhoea with *Saccharomyces boulardii* in children with acute lower respiratory tract infections. **Benef Microbes**, v. 4, n. 4, p. 329-334, 2013.

SHERIDAN, P. O.; BINDELS, L. B.; SAULNIER, D. M., *et al.* Can prebiotics and probiotics improve therapeutic outcomes for undernourished individuals? **Gut Microbes**, v. 5, n. 1, p. 74-82, 2014.

SOLOMON, S. L.; OLIVER, K. B. Antibiotic resistance threats in the United States: stepping back from the brink. **Am Fam Physician**, v. 89, n. 12, p. 938-941, 2014.

STEINBERG, R. S.; SILVA, L. C.; SOUZA, T. C., *et al.* Safety and protective effectiveness of two strains of *Lactobacillus* with probiotic features in an experimental model of salmonellosis. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 9, p. 8755-8776, 2014.

SUCHY, F. J.; BRANNON, P. M.; CARPENTER, T. O., *et al.* NIH consensus development conference statement: Lactose intolerance and health. **NIH Consens State Sci Statements**, v. 27, n. 2, p. 1-27, 2010.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; STEPANKOVA, R.; KOZAKOVA, H., *et al.* The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. **Cell Mol Immunol**, v. 8, n. 2, p. 110-120, 2011.

TROMPETTE, A.; GOLLWITZER, E. S.; YADAVA, K., *et al.* Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. **Nat Med**, v. 20, n. 2, p. 159-166, 2014.

VAISHNAVA, S.; YAMAMOTO, M.; SEVERSON, K. M., *et al.* The antibacterial lectin RegIII $\gamma$  promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. **Science**, v. 334, n. 6053, p. 255-258, 2011.

VARUGHESE, C. A.; VAKIL, N. H.; PHILLIPS, K. M. Antibiotic-associated diarrhea: a refresher on causes and possible prevention with probiotics--continuing education article. **J Pharm Pract**, v. 26, n. 5, p. 476-482, 2013.

VASILJEVIC, T.; JELEN, P. Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 2, n., p. 75–85, 2001.

VAZQUEZ-GONZALEZ, D.; PERUSQUIA-ORTIZ, A. M.; HUNDEIKER, M., *et al.* Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 11, n. 5, p. 381-393; quiz 394, 2013.

VEIGA, P.; GALLINI, C. A.; BEAL, C., *et al.* Bifidobacterium animalis subsp. lactis fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 42, p. 18132-18137, 2010.

VEIGA, P.; PONS, N.; AGRAWAL, A., *et al.* Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. **Sci Rep**, v. 4, n., p. 6328, 2014.

VERGIN, F. [Antibiotics and probiotics]. **Hippokrates**, v. 25, n. 4, p. 116-119, 1954.

VERNA, E. C.; LUCAK, S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? **Therap Adv Gastroenterol**, v. 3, n. 5, p. 307-319, 2010.

WALKER, C. L.; RUDAN, I.; LIU, L., *et al.* Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **Lancet**, v. 381, n. 9875, p. 1405-1416, 2013.

WHO/UNICEF. **Diarrhoea treatment: Children with diarrhoea for whom advice or treatment was sought from a health facility or provider**. New York. 2015.

WILT, T. J.; SHAUKAT, A.; SHAMLIYAN, T., *et al.* Lactose intolerance and health. **Evid Rep Technol Assess (Full Rep)**, v., n. 192, p. 1-410, 2010.

WONG, J. M.; DE SOUZA, R.; KENDALL, C. W., *et al.* Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, n. 3, p. 235-243, 2006.

YAN, F.; POLK, D. B. Probiotics and immune health. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 27, n. 6, p. 496-501, 2011.

YOON, J. S.; SOHN, W.; LEE, O. Y., *et al.* Effect of multispecies probiotics on irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 29, n. 1, p. 52-59, 2014.

ZHANG, Z.; XIANG, Y.; LI, N., *et al.* Protective effects of Lactobacillus rhamnosus GG against human rotavirus-induced diarrhoea in a neonatal mouse model. **Pathog Dis**, v. 67, n. 3, p. 184-191, 2013.

#### **4. LISTA DE PUBLICAÇÕES**

- Technology prospecting of infant stool as a source of novel probiotic products, Submetido à **Innovation, Technology and Management Journal – GEINTEC** em 2016.

- Probiotic potential of *Lactobacillus casei* strains isolated from the stools of breast-fed infants, Submetido a **International Journal of Food Microbiology** em 2017.

- Cápsula probiótica gastrorresistente a base de *Lactobacillus casei* isolado de fezes de recém nascidos alimentados exclusivamente com leite materno, **Patente de Invenção – BR 10 2017 008185 0** – sob análise no INPI

## **ARTIGO 1**

- **Technology prospecting of infant stool as a source of novel probiotic products**
- Submetido à Innovation, Technology and Management Journal -GEINTEC

**TECHNOLOGY PROSPECTING OF INFANT STOOL AS A SOURCE OF NOVEL  
PROBIOTIC PRODUCTS**

**PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE FEZES DE LACTENTES COMO FONTE DE  
NOVOS PRODUTOS PROBIÓTICOS**

Hermínio Benítez Rabello Mendes<sup>1,2</sup>, Julio Plaza-Díaz<sup>4</sup>, Maria Rosa Quaresma Bomfim<sup>2</sup>, Angel Gil Hernandez<sup>4</sup>, and Valério Monteiro-Neto<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal-Rede BIONORTE, Universidade Federal do Maranhão-UFMA, São Luís-MA, Brasil

[herminio.mendes@ceuma.br](mailto:herminio.mendes@ceuma.br)

<sup>2</sup> Universidade CEUMA, São Luís-MA, Brasil

[marqbomfim@gmail.com](mailto:marqbomfim@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal do Maranhão-UFMA, São Luís-MA, Brasil

[vmonteironeto@ceuma.br](mailto:vmonteironeto@ceuma.br)

<sup>4</sup> Universidad de Granada, Granada, Andalucía, España

[jplaza@ugr.es](mailto:jplaza@ugr.es); [a.gil@ugr.es](mailto:a.gil@ugr.es)

**Abstract**

*Probiotics are live microorganisms that provide health benefits to the host when they are ingested in adequate amounts. The strains most frequently used as probiotics include lactic acid bacteria and bifidobacteria. These microorganisms have significant potential as therapeutic options for a variety of diseases, but the mechanisms responsible for these effects have not yet been fully elucidated. In general, new probiotic strains for human use are sourced from human intestinal flora and breast milk. This study sought to survey the existing research regarding the potential for and development of technologies regarding infant stool-associated probiotics. The study was performed using information from the European Patent Bank, the Bank of the World Intellectual Property Organization and the database of the National Institute of Industrial Property of Brazil. The most abundant international classification prospected was Subsection C12, particularly class A61N. The Republic of Korea has the most patents filed. The results indicate a promising area with significant growth in the number of patents.*

**Keywords:** infant stools; probiotics products; technology prospecting; patents

## INTRODUCTION

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization (WHO), probiotics are live microorganisms that confer a health benefit to the host when they are administered in adequate amounts (FAO/WHO, 2006). Specially, bacteria belonging to *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, which are the predominant and subdominant groups of the gastrointestinal microbiota, respectively, are the most widely used probiotic bacteria and are included in many functional foods and dietary supplements (GOURBEYRE et al., 2011). Generally, the selection of new probiotic strains for human use is sourced from human intestinal flora and breast milk (MARTIN et al., 2009). With a long history of the safe use of probiotics in fermented dairy products and growing recognition of their beneficial effects on human health, the food industry has become increasingly interested in these types of microorganisms (SHERIDAN et al., 2014). Often, the criteria for the selection of probiotics include tolerance to gastrointestinal conditions (gastric acid and bile), the ability to adhere to the gastrointestinal mucosa and competitive exclusion of pathogens (SANDERS, 2013). The mechanisms underlying the beneficial effects of probiotics are largely unknown but are likely to be multifactorial. Several mechanisms related to the antagonistic effects of probiotics on various microorganisms include the following: secretion of antimicrobial substances, competitive adherence to the mucosa and epithelium, strengthening of the gut epithelial barrier, and modulation of the immune system (NEAL-MCKINNEY et al., 2012; GIORGETTI et al., 2015).

Probiotic bacteria, both native and those introduced by feeding the host organism, can control the initiation and/or development of many pathogenic microorganisms, including *Salmonella typhimurium*, *Shigella* spp., *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. Probiotics also provide important protection against urogenital pathogens such as *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, and *Chlamydia trachomatis* (MENARD, 2011).

Thus, these probiotic strains have been the subject of numerous studies because of an increase in the variability of microbial species that have been discovered and tested with potential probiotic capabilities. This change has meant that the previous target audience, consisting of elderly people, children and adults with poor health, has since expanded to also cover healthy individuals and even animals (KORTERINK et al., 2014)

Therefore, the accelerated development of scientific knowledge regarding the role of probiotics conveyed by dairy products and certain non-dairy products on the health of the host will almost certainly result in an expansion of the range of probiotic product options available to consumers (ROWLAND et al., 2010).



Furthermore, consumers are now more aware of probiotics and are increasingly opting for products that support a balanced lifestyle, provide health benefits and are attractive from a sensory standpoint. Consequently, the market for these products is increasingly competitive.

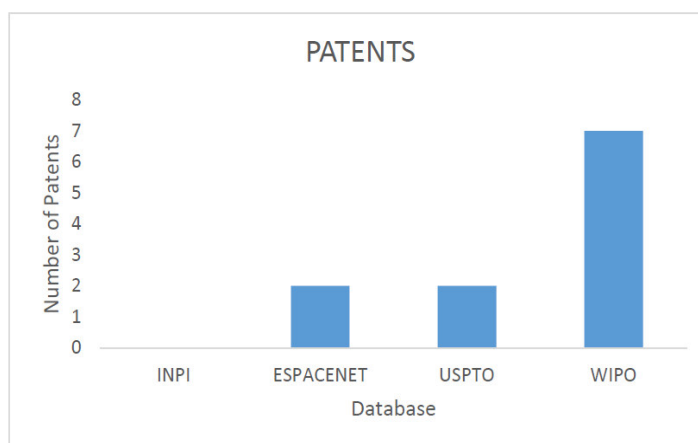
## METHODS

We used the following terms in conjunction with probiotics in the database search: infant stools, breast-fed-infant stools, feces of infants, and baby's stool. The databases used for patent research were: INPI - National Institute of Industrial Property; Espacenet - European Patent Office (EPO); USPTO - United States Patents and Trademarks Office; and WIPO - Intellectual Property Digital Library. The databases used for research papers, theses and dissertations were CAPES Periodicals; PubMed; and SCIELO. Initially, the search in the patent databases used the search term "probiotic and infant stool", which resulted in a much lower number of results in the EPO and WIPO databases compared with the USPTO database.

## RESULTS AND DISCUSSION

The searches of the patent databases (INPI, EPO, USPTO and WIPO) identified a total of 7 relevant patents in the WIPO database, 2 patents in the EPO database and 2 patents in the USPTO database, as shown in the data presented in Figure 1. No patents were found in the INPI database.

Figure 1. Patents filed by database



Source: Author's own figure

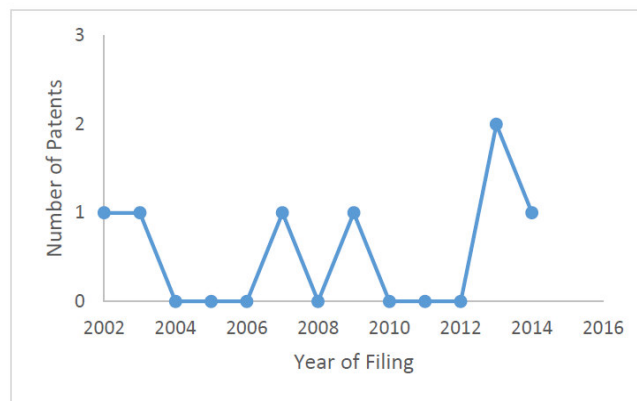
Recently, the INPI has concentrated on using the system of industrial property for more than its function of protecting intellectual property. The restructuring work, undertaken since 2004, has



intended to allow use of the system as a tool of empowerment and competitiveness, which are essential to improving countries' economic and technological development (BARROSO et al., 2009)

The documents identified by our searches provided us with the number of relevant patents deposited each year. Using the WIPO, which is the most specific patent database (because the necessary information to register a patent in the WIPO includes a set of legal references related to the patent's theme of development), we noted that the deposition of patents fluctuated in the past decade but remained constant in recent years, although the last year of record is 2014.

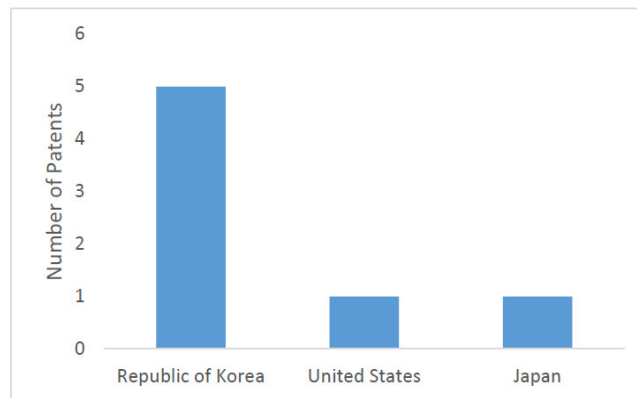
Figure 2. Number of patent filed per year, 2016



Source: Author's own figure

The analysis of the country of origin of each depositor can be observed in Figure 3. The Republic of Korea is the largest patent holder, with 5 deposited patents. The United States and Japan each have only one registered patent.

Figure 3. Patents filed by country of origin, 2016



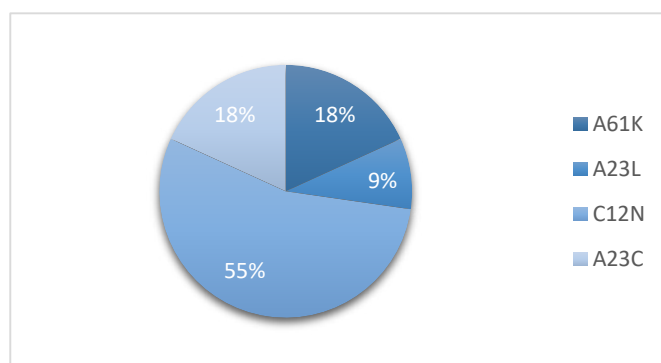
Source: Author's own figure

Brazil does not have any patents in the area of probiotics associated with infant stools. However, a new policy to encourage patents has been proposed by the government (PINHEIRO,

2005). Furthermore, patent information is essential for policy makers to decide whether a new technology will be introduced or will replace existing technology to optimize technical and financial human resources through the sale or licensing of technology, to avoid duplicated efforts and wasted resources (OLIVEIRA, 2005).

Among the documents identified in the survey, 55% are related to the field of microorganisms or enzymes and their compositions (C12N); 18% are in the area of food, food products and non-alcoholic beverages and preparations for medical purposes (A61K and A23C, respectively); and 9% are in the area of dairy products (A61K) (Figure 4).

Figure 4. Patents filed by application area, 2016.



Source: Author's own figure

The search on patent databases and scientific production identified 17,166 documents in PubMed (US National Library of Medicine), 596 scientific papers in the Scielo (Scientific Electronic Library Online) and 15,672 scientific papers in the CAPES database, as shown in Table 1.

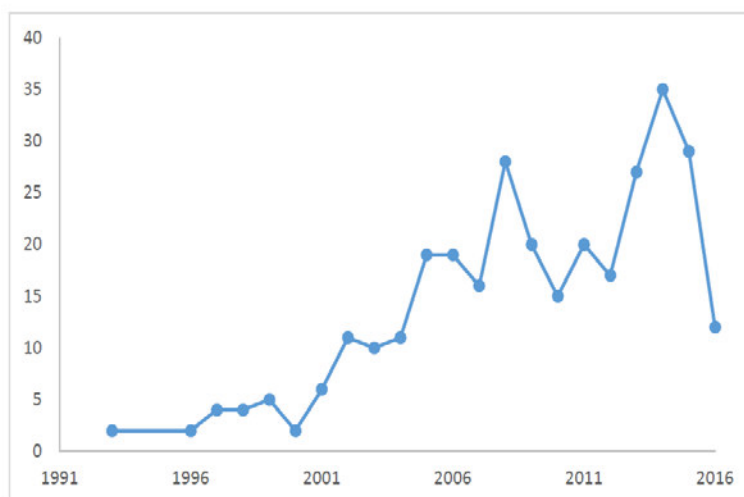
Table 1. Number of research papers, theses and dissertations from keyword searches in different databases

Keyword	CAPES	PubMed	SCIELO
Probiotic*	15,478	16,682	573
Probiotic* and (breast-fed-infant stools OR infant feces OR baby's stool)	130	324	21
Food* and probiotic* and (breast-fed-infant stools OR infant feces OR baby's stool)	37	147	1
Probiotic* and Product* and (breast-fed-infant stools OR infant feces OR baby's stool)	27	13	1
<b>Total</b>	<b>15,672</b>	<b>17,166</b>	<b>596</b>

With the search keywords and associations using Boolean operators outlined in Table 1, the largest volume of documents was found with the PubMed search. This is because PubMed is the search engine for the MEDLINE database of references and abstracts, and MEDLINE is the largest medical and natural sciences database in the world.

According to the analysis of the articles extracted from MEDLINE by year, the annual production of work related to probiotics and associated with the word "infant stool" was scarce until the end of the 1990s and fluctuated greatly in the 2000s, with the highest number of publications in 2014. The number of scientific papers found was much higher than the number of patents in the WIPO database (Figure 5).

Figure 5. Annual number of articles deposited into the PubMed database (1992-2016).



Source: Author's own figure

## CONCLUSIONS

The Republic of Korea has largest number of patent applications in this area, followed by the United States and Japan. Brazil shows a promising future because the number of scientific projects specifically in the area of probiotics has grown tremendously in the past several years. The public expects future innovations to produce more diverse probiotic products aimed at contributing to the improvement of consumer health.



## REFERENCES

- BARROSO, W.; QUONIAM, L.; PACHECO, E. Patents as technological information in Latin America. **World Patent Information**, vol. 31, n 3, p 207-215, 2009.
- CAPES, 2016. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Disponível em: Acesso em 2016 ><http://www-periodicos-capes-gov-br.ez14.periodicos.capes.gov.br/><
- EPO, 2016. European Patent Office. Disponível em: ><https://www.epo.org/index.html>< Acesso em: jun.2016
- FAO/WHO. Probiotics in Food: **Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation**. FAO Food and Nutrition Paper 85. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, Rome. 2006
- GIORGETTI, G.; BRANDIMARTE, G.; FABIOCCHI, F., *et al.* Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. **J Immunol Res**, v. 2015, n., p. 501361, 2015.
- GOURBEYRE P, DENERY S, BODINIER M: Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. **J Leukoc Biol** 2011; 89: 685–695
- INPI, 2016. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Disponível em: ><http://www.inpi.gov.br/>< Acesso em jun.2016.
- KORTERINK, J. J.; OCKELOEN, L.; BENNINGA, M. A., *et al.* Probiotics for childhood functional gastrointestinal disorders: a systematic review and meta-analysis. **Acta Paediatr**, v. 103, n. 4, p. 365-372, 2014.
- LIONG MT: **Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects**. Microbiology Monographs. Heidelberg, Springer, 2011
- MENARD, J. P. Antibacterial treatment of bacterial vaginosis: current and emerging therapies. **Int J Womens Health**, v. 3, n., p. 295-305, 2011.
- MARTIN, R.; JIMENEZ, E.; HEILIG, H., *et al.* Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 4, p. 965-969, 2009
- NEAL-MCKINNEY, J. M.; LU, X.; DUONG, T., *et al.* Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e43928, 2012.
- OLIVEIRA, L. G; PINTO, C. A.; RIBEIRO, N. M. *et al.* Informação de patentes: ferramenta indispensável para a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico. **Quim. Nova**, v. 28, supl., p. S36-S40, 2005.
- PINHEIRO, L. V. R. Inteligência competitiva como disciplina da Ciência da Informação e sua trajetória e evolução no Brasil. In: STAREC, C.; GOMES, E. B. P.; CHAVES, J. B. L. **Gestão estratégica da informação e inteligência competitiva**. São Paulo: Saraiva, 2005. p. 17-32

ROWLAND, I; CAPURSO L; COLLINS, K; *et al.* Current level of consensus on probiotic science. **Gut Microbes**. v. 1, n. 6, p. 436-439, 2010

SANDERS, M. E.; GUARNER, F.; GUERRANT, R., *et al.* An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. **Gut**, v. 62, n. 5, p. 787-796, 2013.

SCIELO, 2016. Scientific Electronic Library Online. Disponível em: Acesso em jun. 2016

SHERIDAN, P. O.; BINDELS, L. B.; SAULNIER, D. M., *et al.* Can prebiotics and probiotics improve therapeutic outcomes for undernourished individuals? **Gut Microbes**, v. 5, n. 1, p. 74-82, 2014.

USPTO, 2016. United States Patent and Trademark Office. Disponível em:, Acesso em jun. 2016

WIPO, 2016. World Intellectual Property Organization. Disponível em:. Acesso em jun. 2016.

## ARTIGO 2

- **Probiotic potential of *Lactobacillus casei* strains isolated from the stools of breast-fed infants**
- Submetido à International Journal of Food Microbiology

## **Probiotic potential of *Lactobacillus casei* strains isolated from the stools of breast-fed infants**

Hermínio Benitez. R. Mendes <sup>a</sup>, Julio Plaza-Díaz <sup>b</sup>, Bruna de Oliveira Melo <sup>a</sup>, Monique S. do Carmo <sup>a</sup>, Maria Rosa Q. Bomfim <sup>a</sup>, Angel Gil <sup>b</sup>, Elizabeth S. Fernandes <sup>a</sup>, Valério Monteiro-Neto <sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade CEUMA, São Luís-MA, Brazil, 65075-1200

<sup>b</sup> Universidad de Granada, Granada, Andalusia, Spain

<sup>c</sup> Universidade Federal de Maranhão-UFMA, São Luís-MA, Brazil

\*Corresponding author: Valério Monteiro-Neto

Programa de Pós-graduação

Universidade CEUMA

Rua dos Castanheiros 1

Renascença II

São Luís, MA, 65075-120 Brazil

E-mail: valerio.monteiro@ceuma.br

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; CFU, colony-forming units; DEC, diarrheagenic *Escherichia coli*; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EAEC, enteroaggregative *E. coli*; EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*; EIEC, enteroinvasive *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; MRS medium, de Man-Rogosa-Sharpe medium; PBS, phosphate-buffered saline

## **Abstract**

Probiotics are suggested to aid the therapy or prevention of infectious diseases. The intestinal microbiota and breast milk are important sources of novel probiotic strains, with *Lactobacillus* as the most widely used functional food bacterium. In the current study, we aimed to identify new bacterial strains with probiotic potential isolated from stool samples of exclusively breast-fed infants. Five bacterial isolates were acid- and bile salt-resistant, and all of them were able to adhere to mucin. The isolates were also able to bind to the human intestinal HT-29 cells *in vitro*, and to inhibit the adherence of distinct diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) strains to these cells. Analysis of the *16S rRNA* gene sequences revealed that these isolates are *Lactobacillus casei*. We suggest that these five novel *L. casei* strains isolated from the stools of breast-fed infants possess probiotic potential, and may be useful in preventing or treating intestinal infections caused by DEC strains.

**Keywords:** Probiotic, Human milk, *Escherichia coli*, Childhood diarrhoea



## 1. Introduction

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO/WHO, 2002), probiotics are defined as “living microorganisms that when administered in adequate quantities confer a benefit to the health of the host”. These microorganisms have been used in clinical practice as tablets or sachets, and also as food components, especially within risk groups and children (Chen et al., 2012; Irvine et al., 2010). Some species of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are described as probiotics and are, in their majority, considered normal inhabitants of the human intestine and modulators of the host’s immune system (Gareau et al., 2010; Turrone et al., 2014; Walter, 2008).

As probiotics, microorganisms must (1) be able to survive the enzymatic process of digestion, stomach acidity, and exposure to bile (2) colonize the intestine; (3) exhibit antimicrobial activity against potential pathogenic microorganisms; (4) be genetically stable; and (5) remain viable during the processing and storage of their carrier product (Adams, 2010; Morelli and Capurso, 2012). Recent studies have focused on the isolation and characterization of novel potential probiotic strains from different sources, including human milk and stool of newborn babies (Baruzzi et al., 2011; Vitali et al., 2012; Zavala et al., 2016). Clinical studies have demonstrated that probiotic bacteria, particularly *Lactobacillus casei*, protect the host against intestinal infections (Salazar-Lindo et al., 2004; Walter, 2008).

Diarrheal diseases continue to be one of the leading causes of child mortality in the world, with more than 5000 deaths in 2013 (Liu et al., 2015). Diarrheogenic *Escherichia coli* (DEC) are considered important etiologic agents of intestinal infection worldwide, especially in children (Acosta et al. 2016, Al-Gallas et al. 2007, Bueris et al. 2007, Dias et al. 2016, Ifeanyi et al. 2015, Iijima et al. 2017). At least five main DEC

pathotypes are identified: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), and enteroaggregative *E. coli* (EAEC); they possess distinct pathogenic traits (Croxen and Finlay, 2010; Dias et al., 2016). The initial stage of infection by all DEC strains comprises their interaction with the host cells (Avelino et al., 2010; Dias et al., 2016; Monteiro-Neto et al., 2003; Rendón et al., 2007; Xicohtencatl-Cortes et al., 2007), followed by the expression of a variety of virulence factors that, in turn, trigger diarrhea (Croxen and Finlay, 2010; Dias et al., 2016; Nataro and Kaper, 1998).

In the current study, we characterized novel *L. casei* strains with probiotic potential, which were isolated from stools of healthy and exclusively breast-fed infants. We also investigated the ability of these isolates to inhibit the adherence of DEC strains to human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Biological samples*

Stool samples were collected from 15 healthy and exclusively breast-fed infants under 1 month of age. The participants were recruited at the Maternity Hospital of the Universidade Federal do Maranhão (Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil), after obtaining a written informed consent from their parents. The study was reviewed and approved by the Human Research Ethics Committee of the Universidade Ceuma (Ceuma University, São Luís, Brazil) and was performed in compliance with the Declaration of Helsinki.

## 2.2. Bacterial isolation

Bacteria were isolated from stool samples, as previously described (Thompson-Chagoyan et al., 2010). Briefly, the stools were diluted in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and streaked onto de Man-Rogosa-Sharpe agar plates (MRS agar, Oxoid). The plates were incubated at 37 °C for 48–72 h under anaerobic conditions. Fifty colonies were randomly selected from each plate, inoculated into MRS broth (Oxoid) supplemented with 0.05% (w/v) cysteine (Sigma-Aldrich), and incubated anaerobically at 37 °C for 24–48 h. The bacterial cells were stored in MRS broth supplemented with 20% (v/v) glycerol at -80 °C until further analysis.

## 2.3. Characterization of bacterial acid and bile resistance

The resistance to acidic pH and bile salts was evaluated as described previously (Muñoz-Quezada et al., 2013), with minor modifications. Briefly, 20 µL of bacterial cultures grown overnight in MRS broth were inoculated into 180 µL of MRS broth adjusted to acidic (2.0–3.0) or neutral pH (7.0; a control). To assess bacterial resistance to bile salts, 20 µL of bacterial cultures were added to 180 µL of MRS broth supplemented with oxgall (0.3-1.0 g/dL, Difco). Both assays were performed in 96-well plates; the plates were incubated at 37 °C for 3 h under anaerobic conditions. After the incubation, the number of viable bacteria was determined and expressed as percentage relative to the control.

The ability to adhere to mucin (section 2.5) and HT-29 cells (section 2.6) was only evaluated in strains that were able to survive the acidic pH and bile acid insults.

*Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 was obtained from National Institute of Quality Control in Health (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde –

FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) and used as a reference strain (do Carmo et al., 2016), to assess the activity of the isolates in the assays.

#### 2.4. Molecular identification of the isolates

Gram-positive and catalase-negative bacillus isolates that tolerated low pH and exhibited bile salt resistance were identified by sequencing of the V3–V4 hypervariable region of the *16S rRNA* gene; 1 ng of cDNA was used and the following primers: 341F (5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') (Hansen et al., 1998) and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2012), 0.2  $\mu$ M per reaction. Sequencing was performed at Neoprosperta Microbiome Technologies (Santa Catarina, Brazil), using the MiSeq platform (Illumina, Inc., San Diego, CA).

#### 2.5. Mucin binding assay

The ability of bacterial isolates to adhere to mucin was evaluated as previously described (do Carmo et al., 2016). Initially, porcine gastric mucin type III (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) was suspended in PBS (pH 7.4; Sigma) at a final concentration of 10 mg/mL; 500  $\mu$ L of mucin solution were added to a 24-well plate. Overnight bacterial cultures (*Lactobacillus* isolates and *L. fermentum* ATCC 23271, as a positive control), in the early stationary phase of the growth, were added (ca.  $10^8$  colony-forming units (CFU)/mL). After a 3-h incubation, 10-fold serial dilutions were prepared and spread onto MRS agar plates to determine the number of bacterial cells that adhered to mucin. The data are presented as CFU/mL. Mucin-containing wells without bacteria were used as negative controls.

## 2.6. Bacterial adhesion to HT-29 cells

HT-29 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing glutamax (Gibco), and supplemented with 1× antibiotic-antimycotic solution (Gibco) and 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco), at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. *Lactobacillus* strains were cultured in MRS broth under the conditions described in section 2.1. After 24 h, the bacterial cultures were centrifuged at 9000 × g, washed three times with PBS (pH 7.4, Sigma), and the pellets were resuspended in DMEM. The assay was then performed as previously described (Walsham et al., 2016), with minor modifications. Briefly, HT-29 cells ( $6 \times 10^5$ /well) were seeded into 24-well plates with or without glass coverslips. Then, 50 µL of *Lactobacillus* suspensions ( $5 \times 10^7$  CFU) were added to each well, and the plates were incubated at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> for 3 h. Following the incubation, each well was rinsed three times with PBS to remove non-adherent bacteria. Immediately after this step, the cells were incubated with 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma) for 5 min, and 10-fold serial dilutions were spread onto agar plates to determine the number of bacterial cells that adhered to the HT-29 cells. The data are presented as CFU/mL. To visualize bacterial adherence to the HT-29 cells, each glass coverslip was fixed in methanol (P.A., Amresco, Sydney, Australia) and stained with 0.2% May-Grunwald and 0.6% Giemsa stains (Amresco). The coverslips were then mounted onto glass slides and visualized by light microscopy under oil-immersion objective (100×, Leica ICC50 HD microscope, Leica). Vehicle-treated HT-29 cells were used as negative controls.

## 2.7. Inhibition of DEC adherence to HT-29 cells

The ability of lactobacilli to inhibit the adhesion of DEC strains (EPEC, EHEC, ETEC, and EAEC) to HT-29 cells was assessed. *Lactobacillus* strains were washed three

times with PBS (pH 7.4) and inoculated (ca.  $4.5 \times 10^7$  CFU/mL) into 24-well plates containing confluent monolayers of HT-29 cells. After incubation at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> for 1 h, the tested pathogens (ca.  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) were added to the cultures (Tallon et al., 2007). The plates were incubated at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>. After 1 h, the monolayers were washed three times with PBS, and the cells were lysed using 0.1% (v/v) Triton X-100 in water; 10-fold serial dilutions were spread onto MacConkey agar plates (Difco) to determine the number of *E. coli* cells that adhered to the HT-29 cells (Walsham et al., 2016). The data are presented as CFU/mL.

### 2.8. Antibiotic susceptibility testing

The antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus* isolates were determined by the disc diffusion method (CLSI, 2012). Commercial discs containing different antibiotics [ampicillin (10 µg), vancomycin (30 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), streptomycin (25 µg), erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), tetracycline (30 µg), and chloramphenicol (30 µg)] were placed on MRS agar plates inoculated with *Lactobacillus* ( $10^8$  CFU/mL). The plates were incubated anaerobically at 37 °C for 24 h. Lactobacilli antibiotic susceptibility was evaluated based on the diameter (in mm) of the growth inhibition zone around the discs

### 2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (v. 6.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). All results are expressed as the mean ± SD. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Dunnett's test (when the variances were assumed to be unequal) or Bonferroni test (when the variances were assumed to be equal) were used for multiple comparisons of the means. Statistical

significance was established at  $p < 0.05$ . All assays were performed in triplicate in three independent experiments.

### **3. Results**

#### *3.1. Isolation and characterization of acid- and bile-resistant lactobacilli*

In total, 750 colonies were isolated from 15 analyzed stool samples. Five isolates (CLM0109, LTM4001, LTB0308, FEB0308, and FEB0311) were able to grow at low pH (pH below 3.0). CLM0109 was the most resistant isolate, with 64.6% and 90.2% survival at pH 2.0 and 3.0, respectively (Table 1). These five strains were also tested for their ability to withstand different concentrations of bile salts. The growth of FEB0308 and FEB0311 was completely inhibited upon incubation with 0.5 g/dL bile salts. On the other hand, all isolates partially survived (27.7–37.3%) incubation with the lowest concentration of bile salts (0.3 g/dL), None of the isolates survived incubation with 1.0 g/dL bile salts.

#### *3.2. Molecular identification of isolates with probiotic properties*

The five isolates that demonstrated tolerance to low pH and were resistant to bile salts were identified as *L. casei*, sharing over 99% identity with the *16S rRNA* sequences deposited for this bacterium in the GenBank.

#### *3.3. Isolate binding to mucin and adhesion to HT-29 cells*

All lactobacilli exhibited a similar ability to bind mucin (Table 2). Adhesion assays with HT-29 cells revealed that *L. casei* LTB0308 possessed the highest adhesive capacity (Table 2). The adhesive capacity of *L. casei* LTB0308 to HT-29 cells was higher than that of the reference strain *L. fermentum* ATCC 23271 (Table 2).

### 3.4. Inhibition of DEC adherence to HT-29 cells by *L. casei* strains

The abilities of isolated lactobacilli to inhibit the adhesion of different DEC strains to HT-29 cells are depicted in Fig. 1A–D. Overall, all tested *L. casei* isolates significantly reduced the adherence of pathogenic *E. coli* to HT-29 cells. All isolates showed a similar ability to inhibit the adhesion of EAEC to HT-29 cells (ca. 97% reduction; Fig. 1A). FEB0308 and LTM4001 inhibited the adhesion of EHEC to HT-29 cells to the greatest degree, with percentage inhibitions of 92.2% and 99.1%, respectively (Fig. 1B). A less pronounced effect was observed with FEB0311, CLM0109, and LTB0308 (ca. 47.0% inhibition; Fig. 1B). CLM0109, LTM4001, and FEB0308 had the greatest effect on the adhesion of EPEC to HT-29 cells (ca. 96.6% inhibition), followed by FEB0311 and LTB0308 (62.6% and 29.1% inhibition, respectively) (Fig. 1C). LTM4001 inhibited the ETEC adhesion to HT-29 cells to the greatest degree (92.8%; Fig. 1D). The reference strain *L. fermentum* ATCC 23271 diminished the adhesion of all tested pathogens (Fig. 1A–D).

### 3.5. Antibiotic susceptibility of the stool isolates

The results of antibiotic susceptibility testing of *Lactobacillus* isolates are shown in Table 3. Only three isolates were resistant to one or two out of the nine tested antibiotics: LMT4001 was resistant to kanamycin; LTB0308 was resistant to streptomycin; and FEB0308 was resistant to both kanamycin and streptomycin.



#### 4. Discussion

Increased human consumption of probiotic products, in conjunction with their beneficial properties, has increased the prospecting of novel probiotic bacterial species. In the current study, we investigated the probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from stools of breast-fed infants as well as their ability to inhibit the adherence of DEC strains to HT-29 cells and mucin.

One of the main criteria before a strain is considered as a probiotic is its ability to resist acidic pH (Corcoran et al., 2005). This property is critical for probiotic viability, as the microorganism has to survive the acidic environment of the stomach in order to colonize the intestine following ingestion. After a 4-h exposure to all stool isolates were found to be resistant to low pH (2.0 and 3.0), and were classified as moderately tolerant to acidic conditions. Bacteria with promising probiotic activity should withstand pH as low as 3.0 (Fernández et al., 2003), similarly to the majority of strains isolated in the present study. Indeed, a previous study demonstrated that different lactobacilli isolated from breast milk are resistant to low pH; however, their tolerance varies among species (Shokryazdan et al., 2014). Differences in pH resistance may be associated with multiple factors related to the strain itself and/or the particular strain microenvironment (Šeme et al., 2015).

Bile salts produced during digestion, even at low concentrations, inhibit the growth of many microorganisms (Reis et al., 2016). Their concentrations in the intestinal lumen are variable as their mean estimated values correspond to their critical micelle concentration, which ranges from 6 to 10 mmol/L (i.e., 0.23–0.39 g/dL) (Martínez-Augustin and de Medina, 2008). In the current study, most of the analyzed stool isolates were tolerant to the lowest tested concentration of bile salts (0.3 g/dL), consistent with previous data (Gilliland et al., 1984). However, the strain survival rates were modest.

Exposure to bile salts may promote disruption of cellular homeostasis, by dissociating the lipid bilayer and integral cell membrane proteins, resulting in bacterial content leakage and subsequent cell death. Tolerance to bile salts may be strain-dependent; existing evidence suggests that, in general, *Lactobacillus* strains are able to progressively adapt to the presence of bile salts, becoming resistant following exposure to increasing concentrations of bile (Burns et al., 2010). Incorporation and coating of lactobacilli with certain substances, such as alginate-starch beads with stearic acid, may be useful in improving their resistance if the bacterial survival rates are reduced in the presence of low pH, bile salts, and other adverse conditions, as recently demonstrated for *L. casei* NCDC 298 (Mandal et al., 2014).

Binding to the gut mucosal layer and subsequent adhesion to the host intestinal cells is one of the main bacterial properties required for gut colonization; thus, probiotics need to be able to colonize the mucosal layer and the intestinal epithelium to modulate and protect the gastrointestinal tract (Johansson et al., 2008). Our results indicate that the five tested *L. casei* strains were able to adhere to the intestinal cells and also bind to mucin, a major mucus protein of the gastrointestinal tract. Importantly, their binding capacity to mucin was similar to that of the reference strain *L. fermentum* ATCC 23271. Similar findings were previously reported for different *Lactobacillus* species, in which several proteins have been linked with this property, including Mub, a cell surface protein detected in *L. reuteri* 1063 and a variety of Mub homologues and other mucus binding proteins (Roos and Jonsson, 2002; Van Tassell and Miller, 2011).

Binding to epithelial cells constitutes the first stage of a process whereby the enteric pathogens colonize host tissue and establish intestinal infection. Therefore, the ability of a probiotic to interrupt the adherence of an enteropathogen to the intestinal epithelial cells may be of therapeutic benefit to the host (Krachler and Orth, 2013). We

investigated whether the isolated lactobacilli are able to inhibit the adherence of various enteropathogens usually associated with gastrointestinal infections to HT-29 cells. We showed that all tested isolates were able to inhibit the adherence of DEC strains to HT-29 cells; *L. casei* LTM4001 and CLM0109 were most effective. Previous in vitro studies have reported the capacity of *Lactobacillus* spp. to protect human cell lines against infections caused by EPEC and EHEC strains (Sherman et al., 2005; Walsham et al., 2016). *Lactobacillus* spp. are also able to prevent some intestinal pathogenic infections, e.g., salmonellosis and shigellosis (Jandu et al., 2009; Moorthy et al., 2007; Zihler et al., 2011). The existing evidence suggests that this effect may be associated with the ability of *Lactobacillus* spp. to stimulate the secretion of mucin by epithelial cells, leading to a diminished adhesion of enteropathogens to the gut mucosa (Cornick et al., 2015; Mack et al., 2003). Additional mechanisms of action have been also demonstrated, including the effect of lactobacilli on the production of organic acids, hydrogen peroxide, and bacteriocins these may all contribute to protecting the gut against infectious insults (Bermudez-Brito et al., 2012; Servin, 2004; Valerio et al., 2004).

Probiotics may act as carriers of genes of clinical importance and may transfer acquired virulence and/or resistance genes to pathogenic bacteria (Devirgiliis et al., 2013). Some of the isolates evaluated in the current study were only resistant to kanamycin and/or streptomycin (LMT4001, LTB0308, and FEB0308). Many authors have reported both intrinsic and acquired resistance in different *Lactobacillus* species to some antibiotics (Danielsen and Wind 2003, Ouoba et al. 2008, Zhou et al. 2005). Nevertheless, antibiotic resistance observed in our *L. casei* isolates may be intrinsic, since uptake of aminoglycosides is a two-step process that involves an oxygen- or nitrogen-dependent electron transport system, which are not present in anaerobic bacteria and therefore do not import aminoglycosides (Rasmussen et al. 1997).

## **5. Conclusions**

Our study demonstrates for the first time the probiotic potential of five *L. casei* isolates obtained from infant stools. These lactobacilli, especially LTM4001 and CLM0109, were able resist exposure to low pH and were tolerant to bile salts. In addition, they decreased DEC adherence to intestinal HT-29 cells, and they have the ability to bind to mucin and to adhere to HT-29 cells. We suggest that these strains may represent an alternative or complementary therapy for the treatment or prevention of infections caused by DEC strains.

**Conflicts of interest:** none.

## **Acknowledgements**

This study was supported by the Foundation for Research Support and for Scientific and Technological Development of Maranhão (FAPEMA, grant no. 01041/13), and by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant no. 482037). The sponsors did not have any role in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

## References

- Acosta GJ, Vigo NI, Durand D, Riveros M, Arango S, Zambruni M, Ochoa TJ. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Pathotype Distribution in Children from Peruvian Rural Communities. *Am J Trop Med Hyg.* Sep 07;95:574-579.
- Adams, C.A., 2010. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr. Res. Rev.* 23, 37–46.
- Al-Gallas N, Bahri O, Bouratbeen A, Ben Haasen A, Ben Aissa R. 2007. Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. *Am J Trop Med Hyg.* Sep;77:571-582.
- Avelino, F., Saldaña, Z., Islam, S., Monteiro-Neto, V., Dall’Agnol, M., Eslava, C.A., Girón, J.A., 2010. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 440–448.
- Baruzzi, F., Poltronieri, P., Quero, G.M., Morea, M., Morelli, L., 2011. An *in vitro* protocol for direct isolation of potential probiotic lactobacilli from raw bovine milk and traditional fermented milks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 331–342.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A., 2012. Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160–174.
- Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, dos Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, Ferrer SR, Barreto ML, Trabulsi LR. 2007. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Nov;102:839-844.
- Burns, P., Sánchez, B., Vinderola, G., Ruas-Madiedo, P., Ruiz, L., Margolles, A., Reinheimer, J., de los Reyes-Gavilán, C.G., 2010. Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile. *Int. J. Food. Microbiol.* 142, 132–141.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G., Knight, R., 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6, 1621–1624.
- Chen, Y.C., Chien, Y.W., Chang, P.J., Hsieh, W.S., Chen, P.C., 2012. Probiotic supplement use among young children in Taiwan: a prospective cohort study. *PLoS One* 7, e43885.
- CLSI (xx), 2012. Protocols for excellence: Antimicrobial susceptibility testing. CL Systems, West Newton, MA, United States. <http://xx> (Accessed on Day Month Year).
- Corcoran, B.M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3060–3067.
- Cornick, S., Tawiah, A., Chadee, K., 2015. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers* 3, e982426.
- Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38.

Danielsen M, Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol.* Jan 26;82:1-11.

Devirgiliis, C., Zinno, P., Perozzi, G., 2013. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Front. Microbiol.* 4, 301.

Dias RC, Dos Santos BC, Dos Santos LF, Vieira MA, Yamatogi RS, Mondelli AL, Sadatsune T, Sforcin JM, Gomes TA, Hernandez RT. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. *APMIS.* Apr;124:299-308.

do Carmo, M.S., Noronha, F.M., Arruda, M.O., Costa, E.P., Bomfim, M.R., Monteiro, A.S., Ferro, T.A., Fernandes, E.S., Girón, J.A., Monteiro-Neto, V., 2016. *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 Displays *In vitro* Inhibitory Activities against *Candida* spp. *Front. Microbiol.* 7, 1722.

FAO/WHO, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, in: Report, W.G. (Ed.), Food and Health Agricultural Organisation of the United Nations. World Health Organisation, London, Ontario, Canada.

Fernández, M.F., Boris, S., Barbés, C., 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 94, 449–455.

Gareau, M.G., Sherman, P.M., Walker, W.A., 2010. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 503–514.

Gilliland, S.E., Staley, T.E., Bush, L.J., 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy. Sci.* 67, 3045–3051.

Hansen, M.C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S., 1998. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 141–149.

Ifeanyi CI, Ikeneche NF, Basse BE, Al-Gallas N, Ben Aissa R, Boudabous A. 2015. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from children with diarrhea in the Federal Capital Territory Abuja, Nigeria. *J Infect Dev Ctries.* Feb 19;9:165-174.

Iijima Y, Oundo JO, Hibino T, Saidi SM, Hinenoya A, Osawa K, Shirakawa T, Osawa R, Yamasaki S. 2017. High Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* among Children with Diarrhea in Kenya. *Jpn J Infect Dis.* Jan 24;70:80-83.

Irvine, S.L., Hummelen, R., Hekmat, S., Looman, C.W., Habbema, J.D., Reid, G., 2010. Probiotic yogurt consumption is associated with an increase of CD4 count among people living with HIV/AIDS. *J. Clin. Gastroenterol.* 44, e201–205.

Jandu, N., Zeng, Z.J., Johnson-Henry, K.C., Sherman, P.M., 2009. Probiotics prevent enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-mediated inhibition of interferon-gamma-induced tyrosine phosphorylation of STAT-1. *Microbiology* 155, 531–540.

Johansson, M.E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C., 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15064–15069.

- Krachler, A.M., Orth, K., 2013. Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy. *Virulence* 4, 284–294.
- Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Perin, J., Rudan, I., Lawn, J.E., Cousens, S., Mathers, C., Black, R.E., 2015. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet* 385, 430–440.
- Mack, D.R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S., Hollingsworth, M.A., 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut* 52, 827–833.
- Mandal, S., Hati, S., Puniya, A.K., Khamrui, K., Singh, K., 2014. Enhancement of survival of alginate-encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1994–2001.
- Martínez-Augustin, O., de Medina, F.S., 2008. Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. *World J. Gastroenterol.* 14, 5630–5640.
- Monteiro-Neto, V., Bando, S.Y., Moreira-Filho, C.A., Girón, J.A., 2003. Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. *Cell. Microbiol.* 5, 533–547.
- Moorthy, G., Murali, M.R., Devaraj, S.N., 2007. Protective role of lactobacilli in *Shigella dysenteriae* 1-induced diarrhea in rats. *Nutrition* 23, 424–433.
- Morelli, L., Capurso, L., 2012. FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *J. Clin. Gastroenterol.* 46 Suppl, S1–2.
- Muñoz-Quezada, S., Chenoll, E., Vieites, J.M., Genovés, S., Maldonado, J., Bermúdez-Brito, M., Gomez-Llorente, C., Matencio, E., Bernal, M.J., Romero, F., Suárez, A., Ramón, D., Gil, A., 2013. Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *Br. J. Nutr.* 109 Suppl 2, S51–62.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142–201.
- Ouoba LI, Lei V, Jensen LB. 2008. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int J Food Microbiol.* Jan 31;121:217-224.
- Rasmussen B, Bush K, Tally F. 1997. Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clinical infectious diseases.* Jan;24:S110-S120.
- Reis, N.A., Saraiva, M.A., Duarte, E.A., de Carvalho, E.A., Vieira, B.B., Evangelista-Barreto, N.S., 2016. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. *J. Appl. Microbiol.* 121, 811–820.
- Rendón, M.A., Saldaña, Z., Erdem, A.L., Monteiro-Neto, V., Vázquez, A., Kaper, J.B., Puente, J.L., Girón, J.A., 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10637–10642.

- Roos, S., Jonsson, H., 2002. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* 148, 433–442.
- Salazar-Lindo, E., Miranda-Langschwager, P., Campos-Sanchez, M., Chea-Woo, E., Sack, R.B., 2004. *Lactobacillus casei* strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial [ISRCTN67363048]. *BMC Pediatr.* 4, 18.
- Šeme, H., Gjuračić, K., Kos, B., Fujs, S., Štampelj, M., Petković, H., Šušković, J., Bogovič Matijasić, B., Kosec, G., 2015. Acid resistance and response to pH-induced stress in two *Lactobacillus plantarum* strains with probiotic potential. *Benef. Microbes* 6, 369–379.
- Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 405–440.
- Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S., Goulet, J., Tompkins, T.A., 2005. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect. Immun.* 73, 5183–5188.
- Shokryazdan, P., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B., Faseleh Jahromi, M., Ho, Y.W., 2014. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Res. Int.* 2014, 927268.
- Tallon, R., Arias, S., Bressollier, P., Urdaci, M., 2007. Strain-and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *J. Appl. Microbiol.* 102, 442–451.
- Thompson-Chagoyan, O.C., Vieites, J.M., Maldonado, J., Edwards, C., Gil, A., 2010. Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy—a Spanish prospective case-control 6-month follow-up study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 21, e394–400.
- Turrone, F., Duranti, S., Bottacini, F., Guglielmetti, S., Van Sinderen, D., Ventura, M., 2014. *Bifidobacterium bifidum* as an example of a specialized human gut commensal. *Front. Microbiol.* 5, 437.
- Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M., Visconti, A., 2004. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 289–295.
- Van Tassell, M.L., Miller, M.J., 2011. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients* 3, 613–636.
- Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C.G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., Gobbetti, M., Di Cagno, R., 2012. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiol.* 31, 116–125.
- Walsham, A.D., MacKenzie, D.A., Cook, V., Wemyss-Holden, S., Hews, C.L., Juge, N., Schüller, S., 2016. *Lactobacillus reuteri* Inhibition of Enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence to Human Intestinal Epithelium. *Front. Microbiol.* 7, 244.
- Walter, J., 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4985–4996.



Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M.A., Jordan, D.M., Francetic, O., Kaper, J.B., Puente, J.L., Girón, J.A., 2007. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Invest.* 117, 3519–3529.

Zavala, L., Golowczyc, M.A., van Hoorde, K., Medrano, M., Huys, G., Vandamme, P., Abraham, A.G., 2016. Selected *Lactobacillus* strains isolated from sugary and milk kefir reduce *Salmonella* infection of epithelial cells *in vitro*. *Benef. Microbes.* 7, 585–595.

Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, Gill HS. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int J Food Microbiol.* Feb 01;98:211-217.

Zihler, A., Gagnon, M., Chassard, C., Lacroix, C., 2011. Protective effect of probiotics on *Salmonella* infectivity assessed with combined *in vitro* gut fermentation-cellular models. *BMC Microbiol.* 11, 264.

**Table 1**Resistance of the isolated *Lactobacillus* sp. strains to pH and bile salts

Strain	Survival (%)				
	pH		Bile salts (g/dl)		
	2.0	3.0	0.3	0.5	1.0
<i>L. casei</i> CLM0109	64.6	90.2	37.3	11.2	0
<i>L. casei</i> FEB0308	56.5	70.4	27.7	0	0
<i>L. casei</i> FEB0311	34.4	68.6	32.2	0	0
<i>L. casei</i> LTB0308	30.8	60.0	31.5	17.5	0
<i>L. casei</i> LTM4001	9.4	30.2	35.1	7.9	0
<i>L. fermentum</i> ATCC 23271	10.2	88.8	53.8	76.1	0

The numbers indicate the percentage (%) survival under either different pH conditions or in the presence of different bile salt concentrations.

**Table 2**

The ability of *L. casei* isolates and reference strain *L. fermentum* ATCC 23271 to bind to mucin and adhere to HT-29 cells

<b>Strain</b>	<b>Binding to mucin (CFU × 10<sup>8</sup>/mL)</b>	<b>Adhesion to HT-29 (CFU × 10<sup>5</sup>/mL)</b>
<i>L. casei</i> FEB0311	1.14 ± 0.29	0.01 ± 0.01
<i>L. casei</i> LTM4001	1.41 ± 0.35	0.94 ± 0.05
<i>L. casei</i> CLM0109	1.18 ± 0.37	0.28 ± 0.05
<i>L. casei</i> LTB0308	1.20 ± 0.30	3.46 ± 0.45
<i>L. casei</i> FEB0308	1.27 ± 0.25	0.53 ± 0.11
<i>L. fermentum</i> ATCC 23271	1.55 ± 1.13	1.67 ± 0.55

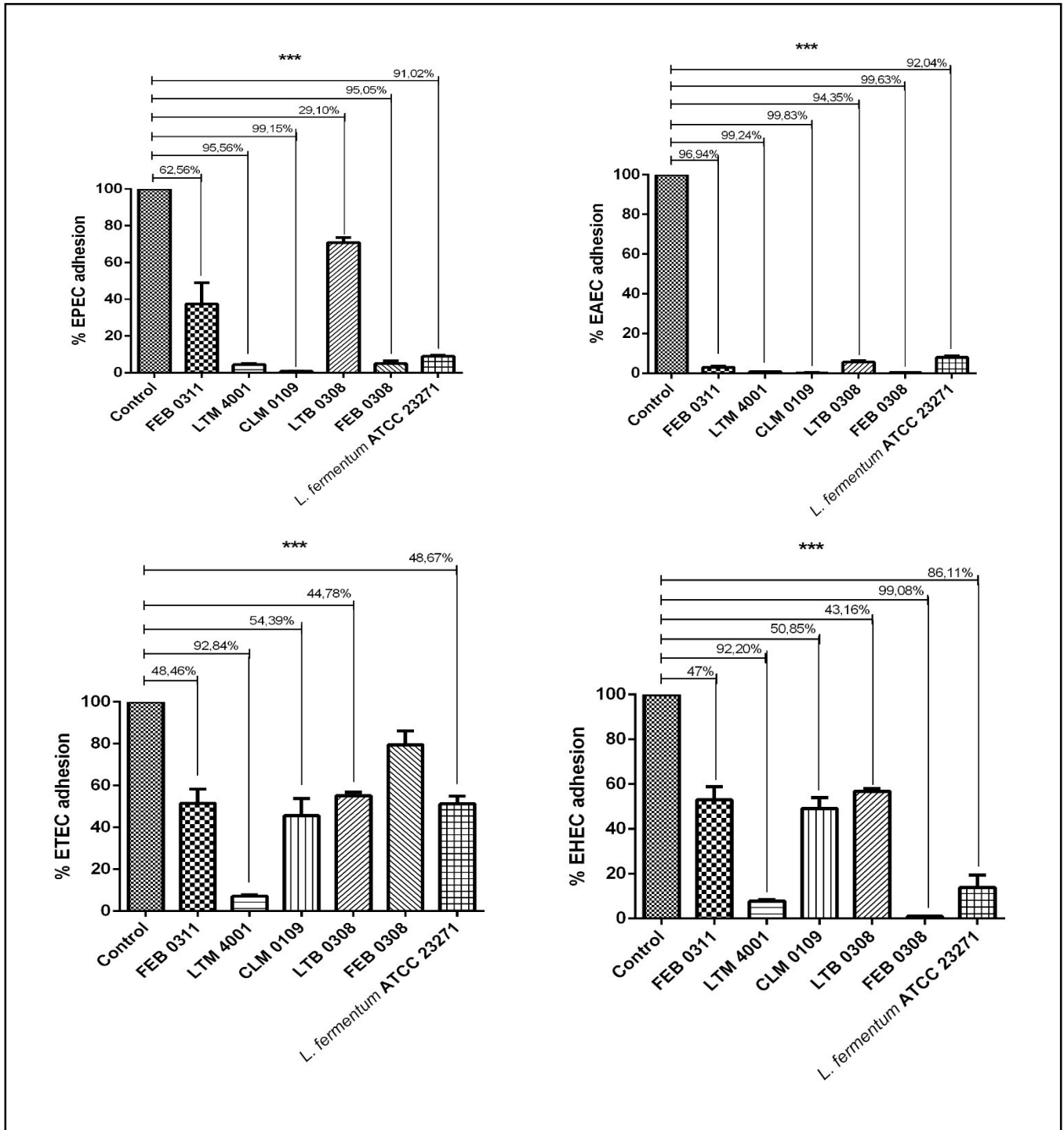
**Table 3**Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antibiotics

Antibiotic ( $\mu\text{g}/\text{disc}$ )	Bacterial isolate				
	<i>L. casei</i> FEB0311	<i>L. casei</i> LTM4001	<i>L. casei</i> CLM0109	<i>L. casei</i> LTB0308	<i>L. casei</i> FEB 0308
Ampicillin (10)	30 $\pm$ 0.7 (S)	28 $\pm$ 1.3 (S)	29 $\pm$ 0.2 (S)	26 $\pm$ 0.4 (S)	30 $\pm$ 0.0 (S)
Vancomycin (30)	30 $\pm$ 0.0 (S)	38 $\pm$ 0.1(S)	28 $\pm$ 0.4 (S)	26 $\pm$ 1.4 (S)	25 $\pm$ 0.0 (S)
Gentamicin (10)	16 $\pm$ 0.9 (S)	15 $\pm$ 0.4 (S)	20 $\pm$ 1.5 (S)	18 $\pm$ 0.0 (S)	15 $\pm$ 0.1 (S)
Kanamycin (30)	22 $\pm$ 0.7 (S)	13 $\pm$ 0.1 ( <b>R</b> )	20 $\pm$ 0.3 (S)	15 $\pm$ 0.7 (MS)	10 $\pm$ 0.7 ( <b>R</b> )
Streptomycin (25)	18 $\pm$ 0.3 (S)	12 $\pm$ 0.8 (MS)	19 $\pm$ 1.0 (S)	10 $\pm$ 0.5 ( <b>R</b> )	10 $\pm$ 0.1 ( <b>R</b> )
Erythromycin (15)	35 $\pm$ 0.0 (S)	30 $\pm$ 1.3 (S)	30 $\pm$ 0.2 (S)	29 $\pm$ 1.2 (S)	40 $\pm$ 0.4 (S)
Clindamycin (2)	20 $\pm$ 0.0 (S)	20 $\pm$ 1.5 (S)	20 $\pm$ 0.0 (S)	14 $\pm$ 0.8 (S)	25 $\pm$ 1.7 (S)
Tetracycline (30)	40 $\pm$ 0.2 (S)	37 $\pm$ 0.6 (S)	33 $\pm$ 0.1 (S)	28 $\pm$ 1.9 (S)	39 $\pm$ 2.4 (S)
Chloramphenicol (30)	33 $\pm$ 0.7 (S)	31 $\pm$ 4.0 (S)	30 $\pm$ 0.4 (S)	29 $\pm$ 0.5 (S)	35 $\pm$ 1.3 (S)

The isolates were obtained from stool samples of breast-fed newborns. Growth inhibition zone diameters (mean  $\pm$  SD, mm) were registered for all isolates in the presence of nine different antibiotics. The strains were classified as: (a) R, resistant; (b) MS, moderately susceptible; or (c) S, susceptible.

## Figure legend

**Fig. 1.** The effect of different *L. casei* isolates on DEC adherence to HT-29 cells. Cell adherence was quantified based on the CFU numbers per well, following the incubation of HT-29 cells with different lactobacillus isolates and DEC strains. The results are expressed as percentage (%) of adhesion relative to control (bacteria incubated with vehicle only). Data are shown as the mean  $\pm$  SEM, from three independent experiments performed in duplicate; \* $p < 0.05$  in comparison with control samples.



## **Documento de Patente**

- Cápsula probiótica gastrorresistente a base de *Lactobacillus casei* isolado de fezes de recém nascidos alimentados exclusivamente com leite materno, **Patente de Invenção – BR 10 2017 008185 0** – sob análise no INPI.



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de  
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 008185 0

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 2

**Nome ou Razão Social:** herminio benitez rabello mendes

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Física

**CPF/CNPJ:** 00669106330

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação

**Endereço:** Rua 01 Quadra 03 Casa 05 Planalto Pingão

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65060290

**País:** Brasil

**Telefone:** 9832212852

**Fax:**

**Email:** hb.mendes@yahoo.com.br

Depositante 2 de 2

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE CEUMA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 23689763000197

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua Josue Montelo, N° 1 - Renascença II

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65075-120

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 981 218493

**Fax:** (98) 402 07525

**Email:** herminio.mendes@ceuma.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/04/2017 às 10:27. Petição 870170025987



## Dados do Pedido

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** CÁPSULA PROBIÓTICA GASTRORRESISTENTE A BASE DE LACTOBACILLUS CASEI ISOLADO DE FEZES DE RECÉM NASCIDOS ALIMENTADOS EXCLUSIVAMENTE COM LEITE MATERNO

**Resumo:** A presente invenção refere-se a provisão de uma cápsula probiótica gastroresistente a base de nova cepa bacteriana liofilizadas, tal como, organismos procarioto, em particular, probiótico, preferencialmente, Lactobacillus casei. A cápsula apresenta como vantagens-chave: liberação do conteúdo a nível intestinal, reduzindo perdas prévias; capacidade de sobrevivência a pH ácido estomacal e sais biliares e ainda propriedades mucoadesivas e antagonistas contra enteropatógenos, principalmente espécies diarreioogênicas de E. coli. A capacidade em inibir patógenos intestinais (EPEC, EIEC, EHEC, Salmonela e Shigella) pode auxiliar no tratamento de inúmeras doenças causadas por estas bactérias. Tal microrganismo pode esta opcionalmente, associadas a outros ativos, métodos de preparação, alimentos e/ou composições alimentares, preferencialmente, produtos probióticos. Adicionalmente, o presente pedido de patente destina-se ao uso desta capsula a base do referido microrganismo como complemento nutricional e/ou farmacêutico, tal como produto industrializado acrescidos de bactérias probióticas, indicados para a prevenção e/ou tratamento de distúrbios gastrointestinais, bem como melhoria das funções fisiológicas, dentre outras aplicações.

**Figura a publicar:** 01

## Dados do Inventor (72)

---

Inventor 1 de 1

**Nome:** HERMINIO BENITEZ RABELLO MENDES

**CPF:** 00669106330

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação

**Endereço:** r 01 q 03 n° 05

**Cidade:** São luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65060-290

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 981 218493

**Fax:** (98) 322 12852

**Email:** hb.mendes@yahoo.com.br

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/04/2017 às 10:27, Petição 870170025987

## Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Reivindicação	REIVINDICAÇÃO2.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	ComprovanteBB - 2017-04-12-161429.pdf
Resumo	RESUMO.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU.pdf
Desenho	DESCRIÇÃO DOS DESENHOS.pdf
Relatório Descritivo	RELATORIO DESCRITIVO.pdf

## Acesso ao Patrimônio Genético

---

- Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de 791.457

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 30/09/2014

### Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso

microrganismos da espécie *Lactobacillus casei* isolados a partir de amostras de fezes de lactentes alimentados exclusivamente com leite materno

### Declaração de veracidade

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/04/2017 às 10:27, Petição 870170025987

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diarreia infecciosa representa um grave problema de saúde pública. Vários microrganismos estão associados com esta doença, dentre estes linhagens de *E. coli* diarreiogênicas. No entanto, a pressão seletiva propiciada pelo uso de antimicrobianos preocupam autoridades sanitárias, pois pode conduzir à seleção de cepas bacterianas resistentes, além de implicações negativas relacionadas com a saúde humana e o meio ambiente. Desta forma, a descoberta e uso de métodos terapêuticos que não atuem induzindo resistência, como uso de probióticos, representam uma boa solução para esta problemática. Diante do exposto, nosso trabalho conclui que:

- O leite materno, assim como material fecal de lactentes alimentados exclusivamente com leite materno, podem funcionar como fonte de novas estirpes com potencial probiótico;
- Com base nos critérios estabelecidos de caracterização probiótica apenas cinco cepas foram selecionadas como possíveis probióticos (LTM4001, CLM0109, FEB0308, LTB0308 e FEB0311)
- A análise taxonômica e genética determinou que as cinco cepas selecionada pertencem a espécie *Lactobacillus casei*;
- Os resultados obtidos a partir da capacidade de adesão a mucina e células HT-29 em conjunto com avaliação da capacidade inibitória das cepas frente a *E. coli* diarreiogênicas *in vitro*, permite considera-las alternativa no tratamento de infecções causada por estes microrganismos;
- Dentre os isolados analisados, as estirpes LTM4001 e CLM0109 apresentaram os melhores resultados após testes de caracterização probiótica;
- As cepas selecionadas podem ser consideradas seguras pois cumprem os pré-requisitos baseados nas *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* quanto a resistência a antibióticos.

Por outro lado, perspectivas futuras associadas a avaliação do potencial probiótico e segurança para utilização em humanos são necessárias.

## ANEXO I

### (MODELO DE TERMO CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO)

#### UNIVERSIDADE CEUMA

#### Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

#### Comitê de Ética em Pesquisa

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título da Pesquisa:** “Identificação de Novos Microrganismos com Potencial Probiótico contra Enteropatógenos Bacterianos”

**Nome do Pesquisador:** Valério Monteiro Neto

1. **Natureza da pesquisa:** *A Sra. está sendo convidada a participar desta pesquisa que tem como finalidade analisar bactérias presentes em leite materno e em fezes de crianças, em condições normais e com isso verificar os seus benefícios para a saúde humana e propor medidas alternativas de controle e prevenção de determinadas doenças, como a diarreia infantil.*
2. **Participantes da pesquisa:** *Serão incluídos mães e crianças em amamentação.*
3. **Envolvimento na pesquisa:** *a sua participação no referido estudo será no sentido de fornecer uma pequena quantidade de leite (até 10 ml) e também de fezes do seu filho(a), bem como informações sócio-demográficos*
4. *A Sra tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para a Sra. ou seu filho. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do pesquisador do projeto e, se necessário, através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.*
5. **Sobre as entrevistas:** *As entrevistas serão realizadas nas residências ou no banco de leite do Hospital Universitário Materno-Infantil.*
6. **Riscos e desconforto:** *A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Somente haverá um pequeno desconforto quanto a retirada de uma amostra leite, mas tudo na maior segurança e com profissionais qualificados. A coleta das fezes ocorrerá diretamente nas fraldas e não oferece riscos e nem desconforto. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa*

*com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.*

7. **Confidencialidade:** *Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.*
8. **Benefícios:** *Ao participar desta pesquisa a Sra. não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre os benefícios dessas bactérias para a nossa saúde, principalmente de crianças.*
9. **Pagamento:** *A Sra não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.*

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

#### **Consentimento Livre e Esclarecido**

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

---

Nome do Participante da Pesquisa  
da pesquisa

---

Assinatura do participante

---

Assinatura do Pesquisador

#### **TELEFONES**

**Pesquisador:** Prof. Dr. Valério Monteiro Neto (98) 9972-2651 e 3214 4252

#### **Comitê de Ética em Pesquisa do Uniceuma:**

Endereço: Rua Josué Montello, nº1, Renascença II, São Luís-MA, CEP 65.075-120.

Telefone: (98) 3214-4189. E-mail: cep@ceuma.br.

## ANEXO III

### (PARECER CONSUBSTANCIADO –CEP)



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO  
MARANHÃO - UNICEUMA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS MICRORGANISMOS COM POTENCIAL PROBIÓTICO  
CONTRA ENTEROPATÓGENOS BACTERIANOS

**Pesquisador:** VALÉRIO MONTEIRO NETO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 35354614.5.0000.5084

**Instituição Proponente:** Centro Universitário do Maranhão - Uniceuma

**Patrocinador Principal:** FUND DE AMPARO A PESQUISA AO DESEN CIENTIFICO E TECNOLÓGICO  
DO MARANHÃO - FAPEMA

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 791.457

**Data da Relatoria:** 30/09/2014

##### Apresentação do Projeto:

O desenho do estudo visará obter novas espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* com potencial probiótico, oriundas de amostras de leite humano e fezes de lactentes e com atividade contra enteropatógenos bacterianos e/ou imunomoduladora. No estudo o delineamento experimento obedecerá o seguinte os seguintes passos: Isolar e identificar bactérias do gênero *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* de amostras de fezes de lactentes e de leite humano em diferentes estágios da lactação (colostro, leite de transição e leite maduro) de mães que tiveram parto prematuro e a termo; Selecionar as espécies com propriedades probióticas in vitro, incluindo: tolerância ao suco gástrico artificial e aos sais biliares; capacidade antagonista contra patógenos intestinais, capacidade de produção de peróxido de hidrogênio; capacidade de adesão em células eucarióticas intestinais in vitro e à mucina; Investigar a capacidade inibitória sobre a adesão de enteropatógenos bacterianos em células eucarióticas in vitro; Verificar a capacidade de indução de citocinas pró e anti-inflamatórias em células de cultura de tecidos; Avaliar a capacidade de produção de peróxido de hidrogênio e nitritos por células apresentadoras de antígenos; Investigar o espriamento de células apresentadoras de antígenos; Estudar a indução de marcadores de ativação e estado funcional de células dendríticas, macrófagos e linfócitos in vitro e ex vivo; Analisar a expressão de receptores TLR em leucócitos de camundongos

**Endereço:** DOS CASTANHEIROS

**Bairro:** JARDIM RENASCENÇA

**CEP:** 65.075-120

**UF:** MA

**Município:** SAO LUIS

**Telefone:** (98)3214-4265

**Fax:** (98)3214-4212

**E-mail:** cep@ceuma.br





Continuação do Parecer: 791.457

estimulados com Probióticos. As amostras de leite serão coletas de lactentes que apresentarem as características necessárias definidas no escopo do trabalho. Serão realizadas coletas em cada estágio de lactação (colostró, leite de transição e leite maduro) de mães que tiveram parto a termo (37 e < 42 semanas) e prematuro com idade gestacional (34 e < 37 semanas), cadastradas no Banco de Leite do Hospital Materno Infantil do Hospital Universitário da UFMA. As amostras de fezes serão obtidas de crianças sem distúrbios gastrointestinais e que não estejam sob uso de antibióticos, cujos pais ou responsáveis aceitem participar do estudo.

**Objetivo da Pesquisa:**

Identificar novas espécies do gênero Lactobacillus e Bifidobacterium com potencial probiótico, oriundas de amostras de leite humano e fezes de lactentes e com atividade contra enteropatógenos bacterianos e/ou imunomoduladora.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Somente haverá um pequeno desconforto quanto a retirada de uma amostra de leite, mas tudo na maior segurança e com profissionais qualificados. A coleta das fezes ocorrerá diretamente nas fraldas e não oferece riscos e nem desconforto. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

**Benefícios:**

Espera-se que este estudo traga informações importantes sobre os benefícios dessas bactérias para a nossa saúde, principalmente de crianças.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta relevância científica e certamente contribuirá para esclarecer aspectos importantes a respeito do tema. A equipe executora apresenta a capacitação necessária para realizar a pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os documentos obrigatórios foram apresentados e encontram-se corretamente preenchidos.

Endereço: DOS CASTANHEIROS  
Bairro: JARDIM RENASCENÇA CEP: 65.075-120  
UF: MA Município: SAO LUIS  
Telefone: (98)3214-4265 Fax: (98)3214-4212 E-mail: cep@ceuma.br



CENTRO UNIVERSITÁRIO DO  
MARANHÃO - UNICEUMA



Continuação do Parecer: 791.457

**Recomendações:**

Nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

SAO LUIS, 15 de Setembro de 2014

---

Assinado por:

Eduardo Durans Figuerêdo  
(Coordenador)

Endereço: DOS CASTANHEIROS

Bairro: JARDIM RENASCENÇA

CEP: 65.075-120

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)3214-4265

Fax: (98)3214-4212

E-mail: cep@ceuma.br