



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1011277-4 B1



(22) Data do Depósito: 27/05/2010

(45) Data de Concessão: 23/03/2021

(54) Título: PRODUTO DE BACTERIOCINA LACTOBACILLUS PENTOSUS, ALIMENTO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO O MESMO E USO DO MESMO

(51) Int.Cl.: A61K 35/74; C12N 1/20.

(30) Prioridade Unionista: 27/05/2009 IT RM2009A000270.

(73) Titular(es): PROBIOTICAL S.P.A..

(72) Inventor(es): GIOVANNI MOGNA; GIAN PAOLO STROZZI; LUCA MOGNA.

(86) Pedido PCT: PCT IB2010001290 de 27/05/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/136891 de 02/12/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/11/2011

(57) Resumo: PRODUTO DE BACTERIOCINA LACTOBACILLUS PENTOSUS, ALIMENTO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO O MESMO E USO DO MESMO A presente invenção refere-se a uma cepa selecionada de *Lactobacillus pentosus* para uso como uma medicação para o tratamento preventivo ou curativo de infecções devido a bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e *E. coli*.

Relatório Descritivo da Patente de invenção para “PRODUTO DE BACTERIOCINA LACTOBACILLUS PENTOSUS, ALIMENTO E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO O MESMO E USO DO MESMO”

Descrição

5 A presente invenção refere-se a uma cepa selecionada de *Lactobacillus pentosus* para uso como medicação para o tratamento preventivo ou curativo de infecções devido a bactérias Gram-negativas, preferivelmente, enterococos, coliformes e *E. coli*.

10 Em particular, a presente invenção refere-se a uma composição que compreende a cepa de *Lactobacillus pentosus* para a preparação de um alimento ou composição farmacêutica para combater, reduzir ou inibir a presença de bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e *E. coli*.

15 Além disso, a presente invenção refere-se ao uso da cepa selecionada de *Lactobacillus pentosus* para a preparação de uma medicação para combater, reduzir ou inibir a presença de bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e *E. coli*; em particular, para o tratamento de infecções devido a bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e *E. coli*.

20 Finalmente, a presente invenção refere-se ao uso da cepa selecionada de *Lactobacillus pentosus*, para a preparação de um aditivo tecnológico a ser adicionado a uma cultura de partida para a preparação de produtos de laticínios.

25 É sabido que *E. coli* é um exemplo de uma bactéria Gram-negativa difundida responsável por um grande número de infecções bacterianas, às vezes também graves, como, por exemplo, cistite bacteriana, gastroenterite e gastroenterocolite. Em geral, as infecções devido a bactérias Gram-negativas são tratadas utilizando drogas como, por exemplo, antibióticos.

Entretanto, com o passar do tempo algumas bactérias Gram-negativas desenvolveram certo grau de resistência às drogas normalmente utilizadas e isso limita, às vezes, seu uso e os resultados obtidos.

30 Adicionalmente, na prática médica comum, infecções bacterianas são tratadas imediatamente por se basear em uma terapia farmacológica que é tão eficaz quanto possível. Essa abordagem é freqüentemente adotada sem ser capaz de esperar por testes microbiológicos que revelam qual bactéria está envolvida e a qual antibiótico é vulnerável.

35 Desse modo se prossegue empiricamente, administrando um antibiótico conhecido assumido como sendo o mais eficaz para a família de bactérias que se considera como a base da infecção.

Entretanto, a abordagem descrita acima envolve a administração de uma quantidade considerável de drogas, por exemplo, antibióticos, sem saber antecipadamente se tal terapia levará à solução do problema e recuperação conseqüente. Além disso, os efeitos colaterais possíveis ligados à administração de antibióticos, que, como sabido, também atuam sobre a flora bacteriana que é positiva e útil para o corpo, não devem ser ignorados.

Portanto, é desejável ter uma terapia para o tratamento preventivo ou curativo de infecções devido a bactérias Gram-negativas que pode ser utilizado como alternativa a ou em combinação com drogas tradicionais para superar as desvantagens derivando de um uso às vezes indiscriminado de antibióticos.

É sabido que microorganismos são capazes de ativar uma série de sistemas defensivos, como, por exemplo, um regulado pela produção de bacteriocinas.

O termo "bacteriocinas" é utilizado para indicar os compostos proteínicos produzidos por bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas e dotado de uma ação de inibição contra cepas bacterianas que são diferentes da cepa produtora, porém estreitamente relacionadas à mesma.

Bacteriocinas são proteínas produzidas por bactérias lácticas e mostram uma atividade antimicrobiana acentuada em virtude do que originaram interesse crescente, acima de tudo nos setores de alimentos/tecnológicos e clínicos.

Até onde se refere à aplicação no setor clínico, bacteriocinas representam uma alternativa válida para antibióticos.

No setor de alimentos, bacteriocinas podem ser utilizadas como biopreservativos para controlar e conter a população bacteriana indesejável responsável por intoxicações e deterioração da matriz de alimento, por exemplo, em produtos laticínios.

Portanto, o uso de bacteriocinas nos setores de alimentos e farmacêuticos poderia ser uma ferramenta tecnologicamente correta e eficaz, a ser utilizada na produção do que são definidos como produtos de "alta qualidade", que conservam por longos períodos de tempo na ausência de quaisquer alterações e em segurança total, desse modo mantendo suas características sensoriais intrínsecas.

Finalmente, uma aplicação válida de bacteriocinas como substâncias antimicrobianas envolveria o uso de culturas bacterianas que produzem bacteriocina como probióticos dietéticos.

Desse modo, permanece uma necessidade para identificar e selecionar cepas de bactérias lácticas que são capazes de combater, através de uma

ação bactericida, e/ou reduzir ou inibir, através de uma ação bacteriostática, a presença de bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e E. coli.

5 Em particular, permanece uma necessidade de identificar e selecionar cepas de bactérias lácticas que são capazes de combater, reduzir ou inibir um espectro amplo de bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e E. coli, desse modo permitindo que os mesmos sejam utilizados de forma válida no setor de alimentos e farmacêutico como uma substituição total ou parcial por antibióticos tradicionais.

10 Adicionalmente, permanece uma necessidade para identificar e selecionar cepas de bactérias lácticas que podem ser utilizadas juntas em uma mistura graças à ausência, em cada cepa selecionada, de uma ação de inibição contra as outras bactérias incluídas na mistura ou já presente na flora bacteriana intestinal nos intestinos.

15 O requerente identificou e selecionou uma cepa de Lactobacillus pentosus que é capaz de fornecer uma resposta apropriada às necessidades acima mencionadas.

20 Por esse motivo, o assunto da presente invenção é uma cepa de Lactobacillus pentosus, depositada com o DSMZ Institute na Alemanha sob DSM no. 21980, para uso como uma medicação para o tratamento preventivo ou curativo de infecções devido a bactérias Gram-negativas, preferivelmente, enterococos, coliformes e E. coli.

25 Um assunto adicional da presente invenção é uma composição que compreende o Lactobacillus pentosus DSM no. 21980 para a preparação de um alimento ou composição farmacêutica para combater, reduzir ou inibir a presença de bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e E. coli.

30 Um assunto adicional da presente invenção é o uso da cepa Lactobacillus pentosus DSM no. 21980 para preparar uma medicação para combater, reduzir ou inibir a presença de bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e E. coli; em particular para o tratamento de infecções devido a bactérias gram-negativas, preferivelmente, enterococos, coliformes e E. coli.

Um assunto adicional da presente invenção é o uso da cepa Lactobacillus pentosus DSM no. 21980 para preparar um aditivo tecnológico a ser adicionado a uma cultura de partida para a preparação de produtos laticínios.

35 Outras modalidades preferidas da presente invenção se tornarão evidentes a partir da descrição detalhada que segue.

A tabela 1 mostra um teste experimental no qual a atividade de inibição de um grupo de cepas bacterianas contra *E. coli* foi testada. Na tabela 1 é mostrado como a seguir: (-) sem halo (sem inibição); (+) halo de 1-2 mm -> (*) inúmeras colônias de *E. coli* dentro do ponto; (++) halo de 3-5 mm -> (**) algumas colônias de *E. coli* dentro do ponto; (+++) halo maior do que 5 mm -> (***) sem colônia de *E. coli* (inibição máxima).

A tabela 2 mostra um teste de inibição.

A tabela 3 mostra um teste de resistência gastro.

A figura 1 mostra o teste de inibição de crescimento de *E. coli* ATCC 8739 pela cepa *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

A figura 2 mostra o teste de inibição de crescimento de *E. coli* ATCC 10536 pela cepa *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

A figura 3 mostra o teste de inibição de crescimento de *E. coli* ATCC 35218 pela cepa *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

A figura 4 mostra o teste de inibição de crescimento de *E. coli* ATCC 25922 pela cepa *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

O requerente identificou e selecionou uma cepa de *Lactobacillus pentosus* de milho ensilado natural utilizando a técnica de isolamento de *lactobacillus*, conhecida por especialistas no campo.

A cepa foi depositada com o DSMZ na Alemanha em 14.11.2008, por Probiotal S.p.A., Novara – Itália, sob o seguinte número de depósito: *Lactobacillus pentosus* DSM no. 21980 (LPS01). A cepa DSM 21980 foi depositada de acordo com o Tratado de Budapeste.

Em uma modalidade preferida, o *Lactobacillus pentosus* DSM no. 21980 (LPS01) é indicado para o tratamento preventivo ou curativo de infecções recorrentes devido a bactérias gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e *E. coli*.

Em outra modalidade preferida, o *Lactobacillus pentosus* DSM no. 21980 (LPS01) é indicado para o tratamento preventivo ou curativo de gastroenterite ou gastroenterocolite, preferivelmente para o tratamento preventivo ou curativo de descargas diarréicas e conseqüente desidratação, náusea, diarreia, cólicas abdominais acompanhadas por febre e fraqueza física.

A cepa selecionada e isolada foi caracterizada e classificada com base no perfil de fermentação de açúcar (API 50 CHL bioMérieux). A espécie foi confirmada por amplificação PCR específica de espécie (Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F., Differentiation of *lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, e *L. paraplantarum*

by recA Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with recA Gene-derived primers. Appl Environ Microbiol. Agosto de 2001; 3450-3454).

5 A cepa foi biotipada utilizando a técnica PFGE (Eletroforese de Gel de campo pulsado) (Tynkken S., Satokari R., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Saxelin M. Comparison of Ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. Appl And Envirom Microb. Set. 1999; 3908-3914).

10 O requerente testou a atividade anti-E. coli do *Lactobacillus pentosus* DSM no. 21980 acima mencionado, que foi colocado em contato direto com os seguintes E. coli: ATCC 35218, ATCC 10536, ATCC 8739, e ATCC 25922.

Entretanto, para obter resultados comparativos, outras cepas de bactérias lácticas probióticas foram também testadas, como mencionado abaixo.

15 1) *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608, presente como o ingrediente microbiano único de dois produtos comercialmente disponíveis diferentes, a saber Reuterin (Noos) e Reuflor (Italchimici).

Os produtos mencionados em 1 foram submetidos a ensaio como a amostra positiva de referência, dada a capacidade conhecida da cepa ATCC 53608, presente nas duas formulações, de produzir uma bacteriocina (chamada reuterin) que é ativa contra bactérias Gram-negativas.

20 Evidentemente, para evitar qualquer tipo de ação direta dos excipientes presentes nas formulações dos dois produtos, o microorganismo ATCC 53608 foi primeiramente isolado e então cultivado em um caldo de cultura e subseqüentemente submetido ao ensaio.

25 2) *L. rhamnosus* DSM No. 21981 (LR06) como outra cepa de interesse.

3) *Lactobacillus fermentum* CNCM I-789 (LF5), ativa contra *Cândida vaginal*, e por esse motive considerado um bom candidate na produção de bacteriocinas com um amplo espectro de ação.

30 4) *Lactobacillus rhamnosus* GG, ATCC 53103, um dos probióticos mais conhecidos e mais estudados no mundo como um colonizador intestinal eficaz.

35 5) *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 e LMG P-21023. As quatro cepas acima mencionadas, LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 e LMG P-21023, têm capacidade de produzir bacteriocinas (chamadas plantaricinas) com uma ação antibacteriana. A comparação entre a cepa da presente invenção e as 4 cepas de *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-

21021, LMG P-21022 e LMG P-21023 serve para demonstrar a quantidade de bacteriocinas produzidas, condições de operação sendo iguais.

6) *Lactobacillus casei* sub. *paracasei* LPC08, DSM 21718, usado como uma amostra de referência negativa.

5 7) *Lactobacillus acidophilus* DSM No. 21717 (LA02), usado como uma amostra de referência negativa.

8) *Lactobacillus lactis* sub. *cremoris* DSM No. 19072 (NS01), usado como um produtor de Nisin, que é conhecido como sendo um bacteriocina com um amplo espectro de ação (por exemplo, eficaz contra *Listeria* e *Clostridia*).

10 9) *Streptococcus thermophilus* DSM No. 18616 (FP4), usado como uma amostra de referência negativa.

As cepas alvo são representadas por *E. coli*: ATCC 35218, ATCC 10536, ATCC 8739, e ATCC 25922, em forma liofilizada, e tendo uma carga de pelo menos 1×10^8 CFU/g.

15 Cada cepa de *E. coli* foi reconstituída com 1 ml de solução fisiológica (NaCl 0,8%) e utilizada em uma proporção de 100 µl por prato Petri contendo 12-25 ml de meio de cultura LaptG agarizado. 1 litro de caldo de cultura LaptG tem: Bacto Pepton 15 g, Bacto Triptona 10 g, Glicose 10 g, extrato de levedura 10 g, Tween 80 1 g, água destilada a 1000 ml, pH 6.5-6.6. para o meio na fase sólida (agarizado), 15 g de Bacto Agar são adicionados.

20 Os dois meios (caldo e Agar) são esterilizados a 121°C/15 minutos (Font De Valdez, G, e colaboradores: Influence of the recovery medium on the viability of injured freeze-dried lactic acid bacteria *Milchwissenschaft* 40 (9) 518-520 (1985).

25 Os pratos Petri foram preparados com meio Laptg agarizado quente e deixados solidificar sob um capuz de fluxo laminar. Subseqüentemente, 100 µl da cepa alvo foi distribuída uniformemente sobre a superfície do meio Laptg utilizando uma espátula estéril. Antes de serem incubados, os pratos Petri desse modo preparados foram secos sob o capuz de fluxo laminar. Os resultados do ensaio de inibição são mostrados na tabela 1.

30 Os Lactobacilos foram cultivados em meio MRS líquido (caldo) e caldo LaptG, ao passo que os Lactococos foram cultivados em um meio M17 líquido (caldo) e caldo LaptG. Os ingredientes e composições dos meios de cultura são conhecidos pelos especialistas no campo.

35 Todas as bactérias foram inoculadas em uma taxa de 1%, iniciando a partir da cultura mãe, e incubadas a 37°C por 16-18 horas em um banho

sob termostato.

Ao término de incubação, o valor de pH final da cultura de caldo foi medido (vide a coluna na tabela 1).

É importante determinar a quantidade de ácido láctico produzido por bactérias individuais visto que é desejável verificar que a acidez não seja o único parâmetro responsável por inibir o crescimento de *E. coli*.

Ao término de incubação, uma alíquota de cada cultura de caldo foi centrifugada a 5000 rpm/5 min. para fornecer um caldo de cultura esgotado e uma pelota de células. O caldo de cultura esgotado foi filtrado utilizando filtros de seringa com tamanho de poro de 0,22 μ m e também submetido a teste. Subseqüentemente, a pelota de célula foi lavada uma vez em água estéril para eliminar os resíduos de meio de cultura. A pelota de célula lavada foi então suspensa novamente em solução fisiológica de modo a obter uma turbidez de 0,5 com base na escala de mcFarland. Esse valor torna possível começar de uma quantidade inicial de células que é igual para todas as bactérias testadas.

Antes do ensaio de inibição, a posição dos pontos respectivos que serão submetidos a teste é marcado no fundo dos pratos Petri preparados com a cepa alvo em um base de Agar LaptG.

10 μ l de cada cultura de caldo bacteriano é marcado sobre a superfície do prato semeada com a cepa alvo.

Os seguintes são também submetidos para análise:

a) As suspensões bacterianas lavadas. Os dados na tabela 1 (vide coluna de células lavadas) mostram que a produção de bacteriocina ocorre durante o metabolismo de replicação das bactérias testadas. Isso demonstra que a cepa DSM 21980, à qual a presente invenção se refere, é capaz de inibir, combater e/ou reduzir o crescimento de *E. coli*. Portanto, a cepa liofilizada DSM 21980, após reconstituição e em uma condição para produzir seu metabolismo basal, será capaz de inibir, combater e/ou reduzir o crescimento de *E. coli*.

b) Os caldos de cultura esgotados derivando das várias bactérias. Os dados na tabela 1 (vide coluna de caldo filtrado) indicam quanta bacteriocina está presente no caldo de cultura. Isso demonstra que a bacteriocina é exógena, ativa e presente em quantidades suficientes para inibir *E. coli*.

c) Os caldos de cultura MRS, M17 e LaptG acidificados pela adição de ácido láctico até atingir um pH próximo ao pH final dos caldos de cultura (3,9 – 4,5). Os dados na tabela 1 (vide 4 linhas inferiores) mostram que a ação de inibição de *E.coli* é amplamente devido à produção de bacteriocinas e não ao pH do meio.

d) Água estéril.

Os pratos desse modo preparados são incubados em um termostato a 37°C/24 horas.

5 Ao término de incubação haverá crescimento uniforme da cepa alvo através do prato inteiro, exceto nas áreas onde bacteriocina está presente. Os dados são mostrados na tabela 1.

Como confirmação dos resultados mostrados na tabela 1, um exemplo prático é dado abaixo em relação ao teste de inibição de crescimento de E.coli pela cepa Lactobacillus pentosus LPS 01, DSM 21980.

10 Nas quatro imagens mostradas abaixo (figuras 1-4) pode ser observado que:

- o prato Petri contendo o meio LaptG agarizado tinha uma porção da cepa alvo E. coli distribuída sobre sua superfície;

15 - os símbolos e linhas pretas delimitam os setores pertinentes aos vários tipos de amostras testadas;

- o "ponto" consiste em 10 ul de cada amostra testada. Deve ser observado que no caso de uma amostra consistindo em culturas de caldo completas o ponto parece mais opaco em comparação com as porções restantes do prato, uma indicação de que multiplicação bacteriana ocorreu;

20 - o halo de inibição, a porção escura presente em cada prato nos setores 1-2-3-4-5, onde a cepa alvo não multiplicou devido à ação de bacteriocina, é diretamente proporcional à quantidade da mesma.

Os vários setores são descritos abaixo:

25 Setor 1: efeito de inibição pela cultura de caldo complete (células mais meio de cultura LaptG) da cepa Lactobacillus pentosus LPS 01, DSM 21980.

Setor 2: efeito de inibição pelo caldo filtrado da cepa Lactobacillus pentosus LPS 01, DSM 21980, após a própria cepa ser deixada crescer.

30 Pode ser inferido da presença do halo escuro que a bacteriocina produzida é exógena porque é secretada pelas células. A bacteriocina produzida permanece ativa no caldo de cultura.

Setor 3: efeito de inibição pela cultura de caldo complete (células mais meio de cultura LaptG) da cepa L. rhamnosus DSM No. 21981 (LR06).

35 Setor 4: efeito de inibição pela cultura de caldo complete (células mais meio de cultura LaptG) da cepa L. reuteri ATCC 53608.

Setor 5: efeito de inibição pelo caldo LaptG filtrado no qual a

cepa *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS 01) cresceu, após o pH ser neutralizado em 6,8 pela adição de 0.1 N soda, para anular a possibilidade de que a ação exercida no alvo foi determinada unicamente pela acidez do meio (caldo de cultura).

Setor 6: efeito de inibição do caldo de cultura LaptG como tal.

5 Nesse caso a formação de um halo não é observada uma vez que o caldo de cultura não possui ingredientes com uma ação de inibição.

As quatro imagens se referem a experimentos realizados sob as mesmas condições operacionais porém utilizando uma cepa de *E. coli* diferente cada vez: *E. coli* ATCC 8739 (Fig.1), ATCC 10536 (Fig. 2), ATCC 35218 (Fig. 3) e
10 ATCC 25922 (Fig. 4).

Com base nos experimentos descritos acima pode ser inferido que a cepa *L. pentosus* DSM No. 21980 (LPS 01) mostrou uma capacidade de inibição excelente contra todas as cepas *E. coli*, ATCC 8739, ATCC 10536, ATCC 35218 e ATCC 25922, em virtude de sua capacidade de produzir uma bacteriocina mais eficaz
15 em grandes quantidades.

Com base nos resultados relatados acima, pode ser inferido que a cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01) tem um espectro de ação amplo, uma vez que é capaz de combater, inibir e reduzir o crescimento de todas as quatro cepas *E. coli* testadas.

20 Além disso, com base nos resultados mostrados na tabela 1 e nas figuras 1-4, pode ser inferido que a cepa *L. pentosus* DSM No. 21980 (LPS 01) é capaz de combater, através de uma ação bactericida, e/ou reduzir ou inibir, através de uma ação bacteriostática, a presença de bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e *E. coli*.

25 Adicionalmente, o requerente testou a cepa *L. pentosus* DSM No. 21980 (LPS 01), à qual a presente invenção se refere, contra outras cepas probióticas tomadas individualmente, a saber, *Lactobacillus rhamnosus* DSM No. 21981 (LR06) e *Lactobacillus plantarum* No. LMG P-21021 (LP01). Esse teste teve o objetivo de verificar se a produção de bacteriocina por *L. pentosus* DSM No. 21980
30 (LPS 01) pode de algum modo inibir as outras bactérias *Lactobacillus rhamnosus* DSM No. 21981 (LR06) e *Lactobacillus plantarum* No. LMG P-21021 (LP01) durante o crescimento das mesmas devido à presença de bacteriocina.

Por conseguinte, um teste foi realizado no qual as cepas *Lactobacillus rhamnosus* DSM No. 21981 (LR06) e *Lactobacillus plantarum* No. LMG
35 P-21021 (LP01) foram cruzadas, exatamente como no ensaio descrito acima, com o patógeno *E. coli*.

Os dados relativos às cepas utilizadas *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01); *Lactobacillus rhamnosus* DSM No. 21981 (LR06) e *Lactobacillus plantarum* No. LMG P-21021 (LP01) são mostrados na tabela 2.

Na tabela 2, o fato de que nenhum halo (sem inibição) está presente é mostrado com (-). Como pode ser visto a partir da tabela 2, nenhuma bactéria mostrou capacidades de inibição contra as outras bactérias probióticas cruzadas.

A cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01) não interfere em outras cepas de bactérias probióticas ou com flora bacteriana benéfica.

Uma modalidade preferida da presente invenção se refere a uma composição compreendendo a cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01) para uso como medicação para o tratamento preventivo ou curativo de infecções devido a bactérias Gram-negativas, preferivelmente por enterococos, coliformes e *E. coli*.

Outra modalidade preferida da presente invenção se refere a uma composição para uso como medicação para o tratamento preventivo ou curativo de infecções recorrentes devido a bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e *E. coli*.

Preferivelmente, a composição é indicada para o tratamento preventivo ou curativo de gastroenterite ou gastroenterocolite. Ainda mais preferivelmente, é indicado para o tratamento preventivo ou curativo de descargas diarréicas e conseqüente desidratação, náusea, diarréia, cólicas abdominais acompanhadas por febre e fraqueza física.

Nas composições acima mencionadas a cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01) pode estar viva ou morta ou alternativamente, os componentes celulares da mesma podem estar presentes.

Em uma modalidade preferida, a cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01), na forma de bactérias vivas ou mortas ou alternativamente, os componentes celulares das mesmas, pode ser utilizada para preparar uma composição dietética que tenha aplicação válida, como um aditivo tecnologia, na indústria de laticínios. A composição dietética é adicionada a uma cultura de partida para a preparação de produtos de laticínios.

Em uma modalidade preferida, as composições acima mencionadas também podem compreender a cepa *Lactobacillus rhamnosus* DSM No. 21981 (LR06) e/ou a cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01) em associação à cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01).

As composições contêm a cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01) como bactérias vivas ou mortas ou os componentes celulares das mesmas em uma quantidade entre 1×10^6 e 1×10^{11} CFU/g, em relação ao peso total da composição, preferivelmente entre 1×10^8 e 1×10^{10} CFU/g.

5 em uma modalidade preferida, as composições acima mencionadas contêm a cepa como bactérias vivas ou mortas ou os componentes celulares das mesmas em uma quantidade entre 1×10^6 e 1×10^{11} CFU/dose, preferivelmente entre 1×10^8 e 1×10^{10} CFU/dose. As doses podem ser, por exemplo, 1 g, 3 g, 5 g e 10 g.

10 as composições também podem conter aditivos e co-formulantes que são aceitáveis a partir de um ponto de vista dietético e farmacêutico.

As composições podem incluir vitaminas, por exemplo, ácido fólico, vitamina B₁₂, riboflavina, fosfato piridoxal, vitamina E e ácido ascórbico; antioxidantes, por exemplo, polifenóis, flavonóides, proantocianidinas e catequinas;
15 aminoácidos, por exemplo, glutamina e metionina; minerais, por exemplo, selênio, cobre, magnésio e zinco; substâncias ativas de origem de planta, preferivelmente na forma de um extrato seco, como oxicoco, Echinacea, extrato de semente de grapefruit, equisetum, uva ursina, alecrim e própolis.

Em uma modalidade preferida, as composições também
20 contêm pelo menos uma substância tendo propriedades prebióticas em uma quantidade entre 1 e 30% em peso, em relação ao peso total da composição, preferivelmente entre 5 e 20% em peso.

As substâncias prebióticas incluem fruto-oligossacarídeos (FOS), xilo-oligossacarídeos (XOS), galacto-oligossacarídeos, inulin, arabino-
25 galactanos e glico-oligossacarídeos.

Em uma modalidade preferida, a cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01) é induzida para produzir bacteriocina em uma escala maciça através da estimulação da bacteriocina anti-*E. coli*. A bacteriocina obtida é extraída da produção maciça descrita acima de modo a obter bacteriocina da presente invenção
30 como tal. A última pode ser utilizada nas composições acima descritas para combater (através da ação bactericida) e/ou reduzir ou inibir (através de ação bacteriostática) a presença de bactérias Gram-negativas, preferivelmente enterococos, coliformes e *E. coli*.

Além disso, testes de resistência gastro foram elaborados para
35 avaliar a capacidade da cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS 01) atingir o intestino em números grandes o bastante para colonizar a parede intestinal. Os

testes foram realizados seguindo os métodos conhecidos na técnica e citados na lista de referências apenas (referências 1-5). Os testes foram elaborados considerando a cepa *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 como uma referência positiva, uma vez que é uma cepa que pertence à família *Plantarum* de origem humana, capaz de colonizar o intestino. Além disso, a cepa *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG) foi testada uma vez que é um *Lactobacillus* probiótico bem caracterizado, bem estudado. Os dados são mostrados na tabela 3.

A tabela 3 mostra a percentagem de sobrevivência de cepas probióticas versus dois tipos diferentes de sucos gástricos e uma secreção pancreática simulada após tempos de contato diferentes (51, 30' e 60') a 37°C.

Os resultados de sobrevivência versus secreção biliar foram obtidos por comparar o número de colônias que crescem em um meio de cultura com ou sem a adição de sais biliares ou bile humana.

Com base nos dados fornecidos na tabela 3, pode ser inferido que a cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01) mostra boa sobrevivência em trânsito gastroduodenal, totalmente comparável com aquela da cepa de referência *Lactobacillus plantarum* DSM No. 9843. Portanto, a cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01) é capaz de passar pela barreira gastrointestinal e colonizar o trato intestinal.

Os dados fornecidos na tabela 1, figura 1-4, tabela 2 e tabela 3 apóiam o uso da cepa *Lactobacillus pentosus* DSM No. 21980 (LPS01) no setor de alimentos ou farmacêutico como uma substituição total ou parcial para antibióticos tradicionais no tratamento preventivo ou curativo de infecções devido a bactérias Gram-negativas.

REFERÊNCIAS

1. suco gástrico humano -Met. Int. 006 (DAS)

Referência: Del Piano M., Morelli L., Strozzi GP., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garelo E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso S.: Probiotics: from research to consumer. Dig Liver Dis. 2006 Dez;38 Suppl 2:S248-55. Review.

2. suco gástrico artificial - Met. Int. 022 (DAS)

Referência: Charteris WP. E outros. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. 1998 Maio;84 (5):759-68.

3. suco pancreático simulado - Met. Int. 023 (DAS)

Referência: Charteris WP. E outros. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper humana gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 1998 Maio;84 (5):759-68

5 Del Piano M., Strozzi GP., Barba M.; Allesina S.; Deidda F. Lorenzini P., Morelli L.; Carmagnola S.; Pagliarulo M.; Balzarini M.; Ballare M.; Orsello M.; Montino F.; Sartori M.; Garelo E.; Capurso L. In Vitro Sensitivity of Probiotics to Human Pancreatic Juice. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 5 de agosto de 2008.

4. bile Humana - Met. Int. 024 (DAS)

10 Referência: Del Plano M., Morelli L., Strozzi GP., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garelo E., Carmagnola S., Pagliarulo M., S. Capurso: Probiotics: from research to consumer. *Dig Liver Dis*. 2006 Dez;38 Suppl 2:S248-55. Review.

5. sais de bile - Met. Int. 024 (DAS)

15 Referência: Charteris WP. E outros. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper humana gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*. Maio de 1998; 84 (5):759-68.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreender uma cepa de *Lactobacillus pentosus* LPS 01, depositada em 14.11.2008 junto ao Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) com número de acesso N.º DSM 21980, um veículo farmacêuticamente aceitável, e alternativamente compreendendo também aditivos e coformulantes aceitáveis do ponto de vista dietético e farmacêutico.

2 Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a referida cepa é alternativamente selecionada dentre o grupo de consiste em *Lactobacillus rhamnosus* N.º DSM 21981 (LR06) e/ou a cepa *Lactobacillus pentosus* N.º DSM 21980 (LPS01) em combinação com a cepa *Lactobacillus pentosus* N.º DSM 21980 (LPS01).

3. Uso de uma composição conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento preventivo ou curativo de infecções de bactérias Gram negativas, preferivelmente de enterococos, bactérias de coliforme, *E. coli*.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de o medicamento ser para o tratamento preventivo ou curativo de gastroenterite ou gastroenterocolite.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 ou 3, **caracterizado** pelo fato de o medicamento ser para o tratamento preventivo ou curativo de descargas de diarreia com desidratação subsequente, náusea, diarreia, cólicas abdominais com febre e fraqueza.

Fig. 1: *E.coli* ATCC 8739

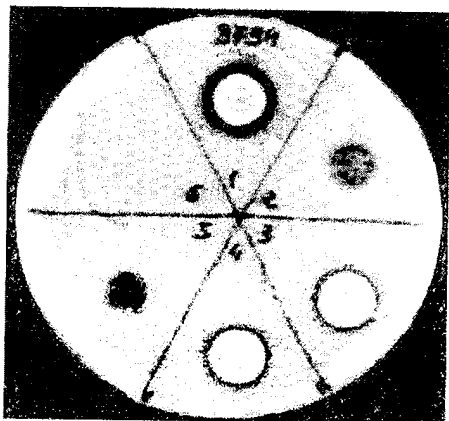


Fig. 2: *E.coli* ATCC 10536

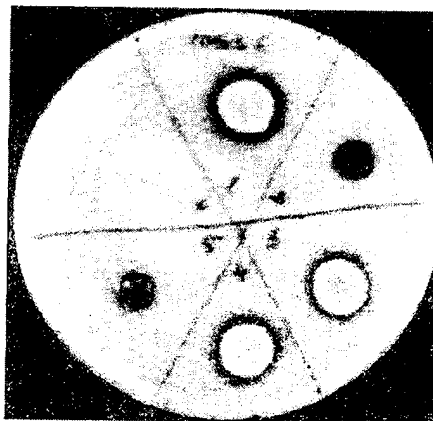


Fig. 3: *E.coli* ATCC 35218

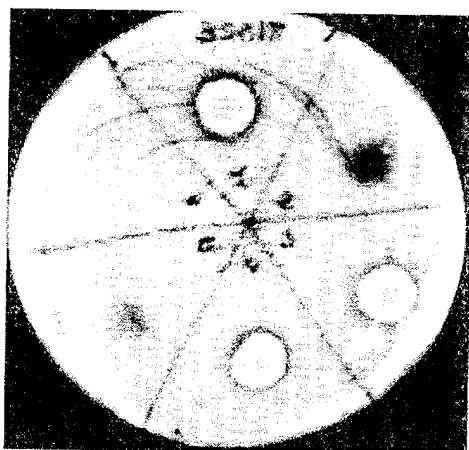


Fig. 4: *E.coli* ATCC 25922

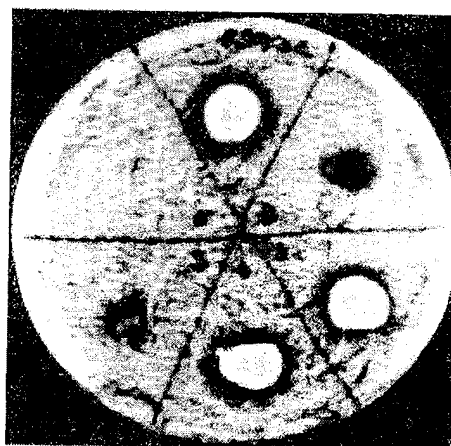


TABELA 1

Cepa testada	Meio de cultura	pH final de cultura de caldo	Amostra inteira 10 µl de cultura de caldo	Células lavadas	Caldo filtrado
L. pentosus LPSO1 DSM 21980	MRS	3.87	+++	+++	**
	LaptG	3.98			**
L. rhamnosus LR06 DSM 21981	MRS	4.04	++	++	*
	LaptG	4.40	+		*
L. reuteri ATCC 55730	MRS	4.15	-/+	+	*
	LaptG	4.33	+		*
L. rhamnosus GG	MRS	4.12	-	-	-
	LaptG	4.50	-		-
L. fermentum LF5	MRS	4.12	++	+	-/*
	LaptG	4.23	++		-/*
L. plantarum LP02	MRS	4.00	+++	++	*
	LaptG	4.02	++		*
L. plantarum ID 094	MRS	3.96	++	++	*
	LaptG	3.89	++		*
L. plantarum LP01	MRS	3.87	++	++	*
	LaptG	3.94	++		*
L. plantarum ID 126	MRS	3.79	++	++	*
	LaptG	3.86	++		*
L. casei sub. paracasei LPC08	MRS	4.48	-	-	-
	LaptG	4.95	-		-
L.	MRS	3.94	-	-	-

acidophilus LA02	LaptG	3.66	-		-
L. lactis sub. cremoris NS01	MRS	4.35	+	+	-
	LaptG	4.05	+		-
S. thermophilus FP4	MRS	4.86	-	-	-
	LaptG	4.23	-		-
Reuterin ATCC 53608			+		
Reuflor™			+		
	Caldo MRS	4.06	-		
	Caldo M17	4.02	-		
	Caldo LaptG	3.90	-		
	H ₂ O	/	-		

TABELA 2

	LR06	LPS01	LP01
LR06	-	-	-
LPS01	-	-	-
LP01	-	-	-

TABELA 3

cepa	Parâmetros avaliados	% de sobrevivência			
	Tempo de contato (minutos)	5'	30'	60'	
<i>Lactobacillus pentosus</i> DSM 21980 (LPS01)	Suco gástrico humano	84	55	36	
	Suco gástrico simulado	90	26	15	
	Secreção pancreática simulada	93	86	72	
	Bile humano (em meio de cultura)				85
	Sais biliares (em meio de cultura)				57
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 9943	Suco gástrico humano	81	61	40	
	Suco gástrico simulado	88	30	20	
	Secreção pancreática simulada	89	83	79	
	Bile humano (em meio de cultura)				97
	Sais biliares (em meio de cultura)				63
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	Suco gástrico humano	88	60	25	
	Suco gástrico simulado	90	30	19	
	Secreção pancreática simulada	88	80	73	
	Bile humano (em meio de cultura)				84
	Sais biliares (em meio de cultura)				55