



* B R P I 0 9 1 4 7 2 6 B 1 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0914726-8 B1

(22) Data do Depósito: 19/05/2009

(45) Data de Concessão: 26/03/2024

(54) Título: COMPOSIÇÕES COSMÉTICA, FARMACÊUTICA E DE ALIMENTO OU RAÇÃO COMPREENDENDO UM MICRORGANISMO E USO DO REFERIDO MICRORGANISMO

(51) Int.Cl.: C12N 1/20; A61K 35/74; C12R 1/23; A61K 8/99.

(30) Prioridade Unionista: 11/06/2008 EP 08010641.2.

(73) Titular(es): BASF SE.

(72) Inventor(es): MEWES BÖTTNER; CHRISTINE LANG; MARKUS VEEN; MICHAEL SCHILLING; ANDREAS REINDL.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009003586 de 19/05/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/149816 de 17/12/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/12/2010

(57) Resumo: MICROORGANISMO, FORMA INATIVA DO MICROORGANISMO, COMPOSIÇÃO, FORMA INATIVADA, SOBRENADANTE DA CULTURA, E, USO DO MICROORGANISMO, DA FORMA INATIVA, DO SOBRENADANTE DA CULTURA, OU DA COMPOSIÇÃO. É descrito um microorganismo, que pertence ao grupo das bactérias do ácido láctico, que é capaz de reduzir, de um modo drástico, a concentração de peptídeos na saliva, deste modo diminuindo o substrato usado pelos microorganismos anaeróbicos da microflora oral, que são o agente causador do mau odor oral. Além disso, é descrito um microorganismo, que pertence ao grupo de bactérias do ácido láctico, que é capaz de estimular o crescimento de Streptococcus salivarius, mas que não estimula o crescimento de Streptococcus mutans e/ ou de Porphyromonas gingivalis. São também descritas composições contendo os microorganismos acima mencionados, o seu uso para prevenir e/ ou tratar o mau odor oral e/ ou a halitose e métodos para a prevenção e/ ou o tratamento do mau odor e/ ou da halitose.

“COMPOSIÇÃO COSMÉTICA COMPREENDENDO UMA FORMA INATIVA DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*, BEM COMO USO DA REFERIDA COMPOSIÇÃO”

5 A presente invenção refere-se a um microorganismo, que pertence ao grupo de bactérias do ácido láctico, que é capaz de reduzir, de um modo drástico, a concentração de peptídeos na saliva, deste modo diminuindo o substrato usado por microorganismos anaeróbicos da microflora oral, que são o agente causador do mau odor oral. Além disso, a presente invenção
10 refere-se a um microorganismo, que pertence ao grupo de bactérias do ácido láctico, que é capaz de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius*, mas que não estimula o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*.

A presente invenção também refere-se a composições
15 contendo os microorganismos acima mencionados, a seu uso para prevenir e/ ou tratar o mau odor oral e/ou a halitose, e a métodos para a prevenção e/ ou o tratamento do mau odor oral e/ ou a halitose.

Um problema comum na higiene oral é o mau hálito crônico (halitose). O método prevalente para tratar a halitose é o de mascarar ou
20 neutralizar o odor ofensivo através do uso de soluções para a colutório ou de gomas de mascar, que contêm, por exemplo, mentol. No entanto, estes métodos apenas são eficazes a curto prazo, mas não a longo prazo. Portanto, existe uma necessidade quanto a métodos de longo termo para prevenir ou para tratar a halitose. Este problema tem sido tratado no estado da técnica
25 através de diferentes métodos, os quais objetivam todos, mais ou menos, à redução do número de bactérias anaeróbicas, que produzem “compostos de enxofre voláteis“ (VSCs), tais que o sulfeto de hidrogênio e metil mercaptana, por exemplo.

Um método descrito para a redução destas bactérias é o de

remover o revestimento da língua com um raspador de língua, de um modo a eliminar os substratos para a proliferação bacteriana a partir da língua. Um outro método consiste em tratar a língua com um sal metálico, tal que o cloreto de zinco, ou um desinfetante, tal que o álcool ou a clorexidina. No entanto, a desvantagem destes métodos é a de que o sal metálico e o

5
desinfetante inibem o crescimento de outros microorganismos orais inócuos ou benéficos.

Uma abordagem que foi descrita para tratar ou prevenir a halitose é a de manter o pH da saliva em um nível fisiologicamente normal. É

10 conhecido que espécies microbianas associadas com as cáries e as infecções da mucosa favorecem um pH ácido; as espécies microbianas associadas com o desenvolvimento da doença periodontal favorecem um pH acima do normal, enquanto que as espécies microbianas associadas com uma boa saúde oral favorecem um pH neutro. As composições contendo bactérias probióticas (por

15 exemplo, *Lactobacillus* e *Streptococcus*), que utilizam este mecanismo, são expostas na US 200707137 e na US 2006018843. A WO 2007/ 077210 expõe um método para o restabelecimento de uma microflora oral associada com uma boa saúde oral, que utiliza probióticos que não produzem ácido ou fracos, selecionados a partir de um grupo de bactérias orais de colonização

20 precoce, que estão normalmente presentes em uma microflora oral saudável (por exemplo, *Streptococcus (oralis)*, *Eubacterium*, *Neisseria*, *Veillonella*) em combinação com substâncias tendo substâncias de tamponamento de pH ou de elevação de pH (por exemplo, bicarbonatos, carbamidas, fosfatos, proteínas e/ou sais). A US 2006045870 expõe bactérias de ácido láctico vivas, que

25 pertencem ao gênero *Weisella*, que inibem o crescimento de bactérias que produzem VSC através da interação com as mesmas e gerando peróxido de hidrogênio sob condições aeróbicas e anaeróbicas. A US 2006171901 expõe um outro método para inibir o crescimento de bactérias anaeróbicas, em particular de bactérias que causam a halitose, que envolvem cepas de

Streptococcus salivarius que produzem BLIS (substâncias inibidoras tipo bacteriocina) e extratos das mesmas.

Uma desvantagem dos métodos que estão disponíveis para a prevenção e o tratamento de halitose é a de que a maioria destes métodos não apenas inibem o crescimento das bactérias que produzem VSC, que são conhecidas como a principal causa de mau odor oral, mas elas inibem igualmente o crescimento de microorganismos orais inócuos.

O objeto da presente invenção é, portanto, o de prover meios e métodos alternativos para a prevenção e/ ou o tratamento do mau odor e/ ou da halitose.

Deste modo, em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a um microorganismo, que pertence ao grupo das bactérias do ácido láctico, caracterizado pelo fato de que ele apresenta a propriedade que se segue (b) quando submetido ao seguinte ensaio (a):

(a) o microorganismo é cultivado durante 24 horas a 37 °C, sob condições anaeróbicas, em um meio sintético, contendo 15 g/l de peptídeos, com uma densidade celular inicial de 1×10^7 células/ ml;

(b) as células são removidas, através de centrifugação, a 4000 x g durante 15 minutos; e

(c) a concentração de peptídeo no sobrenadante resultante é determinada;

Propriedade (b):

O microorganismo conduz a uma redução da concentração de peptídeo no meio de cultura, de um modo tal que a concentração de peptídeo no sobrenadante, após a incubação durante 24 horas, seja reduzida em pelo menos 20%, em comparação com a concentração inicial de 15 g/l, isto é, mo microorganismo é capaz de reduzir a concentração de peptídeo no meio no ensaio (a) em pelo menos 20%.

Em uma modalidade preferida, o microorganismo de acordo

com a invenção apresenta ainda a seguinte propriedade (B), quando submetido ao ensaio que se segue (A):

(a) o microorganismo é cultivado em 100 ml de meio sintético a 37°C durante 24 horas, sob condições anaeróbicas, com uma densidade celular inicial de 1×10^7 células /ml;

(b) subsequentemente, as células são centrifugadas a 4000 x g durante 15 minutos e novamente suspensas em 20 ml de H₂O;

(c) subsequentemente, as células são congeladas a -80°C e liofilizadas sob vácuo durante 16 horas;

(d) 10mg das bactérias liofilizadas são novamente suspensas em H₂O e centrifugadas a 4000 x g durante 10 minutos;

(e) 1 ml de meio sintético contendo 7g/l de peptídeos é adicionado ao grânulo da célula, as células são novamente suspensas no meio e, após 5 minutos de incubação aeróbica a 37 °C, as células são removidas através de centrifugação a 4000 x g durante 15 minutos; e

(f) a concentração de peptídeo no sobrenadante do meio resultante é determinada;

Propriedade (B): a bactéria liofilizada conduz a uma redução da concentração de peptídeo no sobrenadante do meio resultante em pelo menos 20%, em comparação com a concentração do meio no início do período de incubação (7 g/l).

Em uma modalidade preferida, a concentração de peptídeo no ensaio (a) ou (A) é reduzida pelo microorganismo de acordo com a invenção em pelo menos 30%, de um modo mais preferido em pelo menos 40%, e de um modo ainda mais preferido em pelo menos 50%.

Em uma modalidade particularmente preferida, o microorganismo de acordo com a invenção é capaz de reduzir a concentração de o peptídeo no Ensaio (A) em pelo menos 60%, e de um modo ainda mais preferido em pelo menos 70%.

A presente invenção provê, deste modo, um microorganismo, que pode reduzir, de um modo efetivo, a concentração de peptídeo em seu ambiente, de um modo particular também na saliva, tal como ele é descrito nos Exemplos apensos. Como é conhecido, o mau odor oral é causado pelo fato de que a razão entre a flora bucal oral saudável (constituída principalmente pelo *Streptococcus salivarius*) e a flora bucal oral patogênica (constituída principalmente por bactérias gram-negativas anaeróbicas) é alterada para bactérias gram-negativas anaeróbicas, que decompõem as proteínas presentes na saliva em compostos voláteis. Isto conduz à produção de compostos de enxofre voláteis, que causam o mau odor oral.

O microorganismo da presente invenção é capaz de reduzir o mau odor através da redução da quantidade de peptídeos e deste modo diminuindo o substrato dos gram negativos anaeróbicos da flora oral.

O termo “meio sintético” refere-se a um meio definido quimicamente, isto é, a um meio, no qual a composição química é conhecida. O meio sintético pode ser qualquer meio sintético adequado para o cultivo do microorganismo em questão. Em uma modalidade preferida, o meio sintético é um meio sintético tal que exposto na US 6.340.585.

Em uma modalidade preferida, o meio sintético é um meio com a composição que se segue:

Guanina:	0,1 g/l
Citosina:	0,1 g/l
Timidina:	0,1 g/l
2'-Deoxidenosina:	0,1 g/l
25 2'-Deoxiuridina:	0,1 g/l
K ₂ HPO ₄ :	2 g/l
Acetato de Sódio:	5 g/l
Heptaidrato de MgSO ₄ :	0,1 g/l
Hidrogeno citrato de diamônio:	2 g/l

	Diidrato de CaCl ₂ :	0,5 g/l
	Ácido Oleico:	0,1 % (p/v)
	Cianocobalamina:	0,02 mg/l
	Riboflavina:	10 mg/l
5	Ácido Fólico:	0,2 mg/l
	Monoidrato de piridoxal-5-fosfato:	10 mg/l
	Ácido 4-aminobenzóico:	0,2 mg/l
	D(+)-Biotina:	1 mg/l
	Ácido Ascórbico:	500 mg/l
10	Ácido Nicotínico:	10 mg/l
	Pantotenato de Cálcio:	10 mg/l
	Tiamina:	1 mg/l
	Hexaidrato de Nitrato de Cobalto (II):	500 mg/l
	Monoidrato de MnSO ₄ :	20 mg/l
15	Heptaidrato de MgSO ₄ :	500 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ :	0,04 mg/l
	Extrato de PTU (Ohly, Deutsche Hefewerke Germany):	15 g/l
	ou como acima mencionado	
	Monoidrato de D-Glicose:	10 g/l

20 O termo “ contendo 15 g/l de peptídeos“ (“ou contendo 7 g/l de peptídeos”) significa que o meio sintético no início do período de incubação contém 15 g/l de peptídeos (ou 7 g/l de peptídeos, respectivamente). Em princípio, os peptídeos podem ser qualquer tipo de peptídeos. Em uma modalidade preferida, os peptídeos contidos no meio

25 sintético estão sob a forma de um extrato de levedura, de um modo preferido, extrato de PTU. O extrato de PTU pode ser adquirido a partir de Ohly, Deutsche Hefewerke, Germany. Ele é um extrato de levedura de baixa salinidade ultrafiltrado, com um alto conteúdo de peptídeos facilmente disponíveis e apresenta, de um modo preferido, as características que se

seguem:

Análise Média:

	● Matéria seca :	96%
	● Proteína (N x 6, 25) em d. m.:	72,9%
5	● Nitrogênio total em d.m.:	11,7%
	● NaCl:	≤ 1,0%
	● Cinzas:	10%
	● pH (em solução a 2%):	5,7

Vitaminas (típicas):

10	● Hidroclorato de tiamina x HCl (B1):	1,2 mg/100 g
	● Riboflavina (B2):	7,0 mg/100 g
	● Piridoxina x HCl (B6):	5,9 mg/100 g
	● Ácido Nicotínico:	47,8 mg/100 g
	● Biotina:	0,022 mg/100 g
15	● Pantotenato de Ca-D:	17,9 mg/100 g
	● Ácido Fólico:	3,7 mg/100 g

Perfil do Aminoácido (típico): como mostrado na Figura 7:

O termo “uma densidade celular inicial de células/ ml” significa que o meio sintético é inoculado no início do período de cultivo com o microorganismo, de um modo que 1×10^7 células/ ml estejam presentes no meio.

A concentração de peptídeo pode ser determinada através de qualquer método conhecido por aqueles versados na técnica. Métodos bem estabelecidos são, por exemplo, os métodos de acordo com Biuret, Lowry ou Bradford. Além disso, qualquer kit comercialmente disponível ou outra ferramenta para a determinação da concentração de peptídeo pode ser empregado. Um exemplo preferido são as ferramentas ou kits baseados em corante de fluorescência, tais que o kit Quant-it-Protein de Invitrogen. A redução na concentração de peptídeo nos ensaios acima mencionados (a) e/ ou

(A) é preferivelmente testada, tal como descrito nos Exemplos apensos.

Como mostrado nos Exemplos apensos, foi verificado, de um modo surpreendente, que podem ser identificadas bactérias de ácido láctico, que apresentam a capacidade para reduzir, de um modo drástico, em seu ambiente, a concentração de peptídeos. Este efeito não é apenas observado no caso de bactérias vivas, mas também com as formas liofilizadas. Além disso, é conhecido nos Exemplos que os microorganismos de acordo com a invenção apresentam o efeito acima mencionado não apenas nos ensaios acima descritos, mas também na saliva, e que a presença do microorganismo de acordo com a invenção conduz a uma redução notável na produção de H₂S, quando adicionado à saliva.

De um modo particular, em uma modalidade preferida, o microorganismo de acordo com a invenção também apresenta a propriedade que se segue (d) quando submetido ao ensaio que se segue (c):

Ensaio (c):

(a) o microorganismo é cultivado em 100 ml de meio sintético a 37 °C, durante 24 horas, sob condições anaeróbicas, com uma densidade celular inicial de 1×10^7 células/ml;

(b) subsequentemente, as células são centrifugadas a 4000 x g durante 15 minutos e novamente suspensas em 20 ml de H₂O;

(c) subsequentemente, as células são congeladas a -80 °C e liofilizadas sob vácuo durante 16 horas;

(d) mg das bactérias liofilizadas são novamente suspensas em H₂O em uma placa de reservatório profundo e centrifugadas a 4000 x g durante 10 minutos;

(e) 1 ml de meio sintético contendo 3 g/l de peptídeos é adicionado ao grânulo e, após 5 minutos de incubação a 37 °C, as células são removidas por meio de centrifugação a 4000 x g durante 15 minutos;

(f) o sobrenadante é então transferido a uma placa de

reservatório profundo e subsequentemente inoculado com de 10 a 100 µl, de um modo preferido com 50 µl de saliva humana não- estéril e anaerobicamente incubado durante 6 horas a 37 °C, até que a placa de reservatório profundo seja coberta com um papel de filtro estéril e
5 impregnada com acetato de chumbo;

(g) a produção de sulfeto de hidrogênio pelos microorganismos na reação é monitorada pela determinação do escurecimento do papel de filtro;

Propriedade (d): na presença do microorganismo de acordo
10 com a invenção, o escurecimento do papel de filtro impregnado com acetato de chumbo é reduzido em comparação com um controle, no qual o meio não foi previamente incubado com o referido microorganismo. O escurecimento reduzido do papel de filtro é indicativo de uma produção reduzida de H₂S pelas bactérias contidas na saliva humana não- estéril, usada para inocular o
15 meio. O termo “ uma produção reduzida de H₂S” significa uma redução na produção de H₂S de pelo menos 10%, de um modo mais preferido de pelo menos 20%, e de um modo ainda mais preferido de pelo menos 30%, e de um modo particularmente preferido de pelo menos 40% ou até mesmo de pelo menos 50%, em comparação com o controle. A redução pode ser medida, por
20 exemplo, através da análise densiométrica do escurecimento do papel de filtro. De um modo alternativo, a produção de sulfeto de hidrogênio nos estágios (f) e (g) não é medida através do uso de um papel de filtro, mas é medida através da análise do espaço de topo usando cromatografia gasosa.

A presente invenção, em um segundo aspecto, refere-se
25 também a um microorganismo pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico pelo fato de que ele é capaz de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius*, mas sem estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*.

O termo “estimula” em conexão com o crescimento de

microorganismos da espécie *Streptococcus salivarius*, significa que o crescimento destes microorganismos é aumentado quando contactado com um microorganismo de acordo com a invenção. Um crescimento aumentado significa, de um modo preferido, um aumento na proliferação, isto é divisões
5 de célula por unidade de tempo. De um modo alternativo, o termo “estimula” também refere-se a um aumento no tamanho de células individuais. O tamanho da célula bacteriana pode ser determinado através de citometria de fluxo (por exemplo, citômetro de fluxo Becton- Dickinson FACSsort, San Jose, CA), após o manchamento com a mancha SYBR Green I (Molecular
10 Probes, USA). O Tamanho da célula da bactéria é determinado em um modo Side-Angle Light Scatter (SSC). Um crescimento aumentado significa, deste modo, um aumento na produção de biomassa por unidade de tempo.

A estimulação do crescimento do respectivo microorganismo pode, de um modo preferido, ser observado *in vitro*, de um modo ainda mais
15 preferido, em um ensaio, no qual um microorganismo de acordo com a invenção é contactado com *Streptococcus salivarius* e o crescimento do *Streptococcus salivarius* é determinado. O crescimento pode ser determinado através da contagem dos números de células/ colônias após diferentes intervalos de tempo de incubação e pode ser comparado com um controle, que
20 não contém um microorganismo de acordo com a invenção, deste modo permitindo determinar se ocorre um aumento no crescimento.

Um ensaio *in vitro* para a determinação da estimulação do crescimento é descrito nos Exemplos e compreende um assim denominado “
25 Photometric co- incubation- assay”. Em resumo, um tal ensaio compreende os estágios que se seguem:

(a) o microorganismo pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico a ser testado é misturado com *Streptococcus salivarius* em uma razão de contagem celular de 1:100 (bactéria do ácido láctico: *Streptococcus salivarius*) em ½ meio TSY;

(b) a suspensão da cultura é incubada aerobicamente durante 12 horas a 37°C;

(c) como um controle, é usado ½ meio TSY não consumido ou meio MRS leve;

5 (d) a densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) é determinada e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) é determinada durante o crescimento exponencial; e

(e) o microorganismo é classificado como um microorganismo capaz de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarium*, se a densidade
10 óptica máxima ($OD_{600, \max}$) e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) for aumentada em pelo menos 10%, em comparação com o controle.

O termo “1/2 meio TSY” refere-se ao meio TSY, que é diluído em uma razão de 1:1 (vol: vol) com H₂O.

Em uma modalidade preferida, a incubação é executada em
15 uma placa de 96 reservatórios. Em ainda uma outra modalidade, a incubação é executada em um espectômetro de microplaca BioTek PowerWave (Biotek Instruments, GmbH, Germany).

De um modo preferido, a $OD_{600, \max}$ e a V_{\max} são determinadas como se segue:

20 A densidade óptica em uma OD de 600 é medida durante um período de tempo estendido, de um modo preferido de cerca de 8 a 12 horas, após o início da incubação, em intervalos regulares, por exemplo, a cada 2, 5 minutos. Para a determinação da $OD_{600, \max}$, a determinação da OD_{600} é executada, de um modo preferido, durante 10 horas após a incubação.

25 Para a determinação da $OD_{600, \max}$, o valor médio é calculado a partir dos três valores mais altos medidos.

V_{\max} é determinado, de um modo preferido, através da seleção de 15 valores consecutivos, que mostram o gradiente mais agudo. A unidade para indicar a V_{\max} é mOD/ minuto. A determinação da OD_{600} para o cálculo

da V_{\max} é executada, de um modo preferido, durante um período de tempo, que permita cobrir a fase de crescimento exponencial do microorganismo cultivado.

De um modo preferido, o microorganismo de acordo com a presente invenção conduz a um aumento da densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) ou da taxa de crescimento máxima (V_{\max}) do *Streptococcus salivarius* no ensaio acima descrito de pelo menos 15%, de um modo mais preferido de pelo menos 20%, e de um modo ainda mais preferido de pelo menos 30%, e de um modo mais particularmente preferido de pelo menos 40%, 50%, 60%, 70% ou até de 80%, em comparação com o controle.

Em uma modalidade preferida, o microorganismo acima descrito de acordo com a invenção não estimula o crescimento do *Streptococcus salivaris*, mas estimula o crescimento de pelo menos um microorganismo adicional da microflora oral saudável. Exemplos de tais microorganismos são o *Streptococcus oralis* e o *Streptococcus epidermidis*. A estimulação destas bactérias pode ser medida pelo ensaio como acima descrito.

O microorganismo acima descrito de acordo com a invenção é também caracterizado pelo fato de que ele não estimula o crescimento do *Streptococcus mutans* e/ ou do *Porphyromonas gingivalis*. Um microorganismo é considerado como não estimulando o crescimento de um microorganismo da microflora patogênica transitória se ele não conduzir a um crescimento aumentado do *Streptococcus mutans* e / ou do *Porphyromonas gingivalis*, quando em contato com este. A estimulação do crescimento ou a sua ausência pode ser testada *in vitro*. Um ensaio *in vitro* para a determinação da estimulação do crescimento, ou a sua ausência, é descrita nos Exemplos e compreende um assim denominado “ Photometric co-incubation- assay”. Em resumo, um tal ensaio no caso do *Streptococcus mutans* compreende os estágios que se seguem:

(a) o microorganismo pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico a ser testado é cultivado sob condições anaeróbicas em placas de 96 reservatórios com 150 μ l de meio sintético, durante 24 horas, a 37°C, as células sendo transformadas em grânulos através de centrifugação a 4000 x g, durante 15 minutos, e o sobrenadante é recuperado;

(b) o *Streptococcus mutans* é cultivado anaerobicamente em 5 ml de meio TSY, em tubos Falcon de 15 ml fechados, durante a noite, a 37°C;

(c) a cultura celular de *Streptococcus mutans* é misturada, em uma razão volumétrica de 2:1, com o sobrenadante do estágio (a);

(d) a suspensão da cultura é incubada anaerobicamente, durante 12 horas, a 37°C;

(e) como um controle, é usado $\frac{1}{2}$ meio TSY ou meio MRS leve;

(f) a densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) é determinada e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) é determinada durante o crescimento exponencial; e

(g) o microorganismo é classificado como um microorganismo, que não é capaz de estimular o crescimento do *Streptococcus mutans* se a densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) não for aumentada em comparação com o controle.

De um modo alternativo, um tal ensaio pode compreender os estágios que se seguem:

(A) o microorganismo pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico a ser testado é misturado com o *Streptococcus salivaris* em uma razão de contagem celular de 1:100 (*Lactobacillus S. Mutans*) em $\frac{1}{2}$ meio TSY);

(B) a suspensão da cultura é incubada aerobicamente, durante 12 horas, a 37°C;

(C) como um controle, é usado ½ meio TSY não consumido ou meio MRS leve;

(D) a densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) é determinada e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) é determinada durante o crescimento exponencial; e

(E) o microorganismo é classificado como um microorganismo, que não é capaz de estimular o crescimento do *Streptococcus mutans* se a densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) não for aumentada em comparação com o controle.

No caso de *Porphyromonas gingivalis*, o ensaio compreende os estágios que se seguem:

(h) o microorganismo pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático a ser testado é cultivado sob condições anaeróbicas em placas de 96 reservatórios, com 150 µl de meio sintético, durante 24 horas a 37°C, as células foram transformadas em grânulos através de centrifugação a 4000 x g durante 15 minutos e o sobrenadante é recuperado;

(i) *Porphyromonas gingivalis* é cultivado anaerobicamente em 5 ml de meio FAB, em tubos Falcon de 15 ml fechados, durante a noite, a 37°C;

(j) a cultura celular de *Porphyromonas gingivalis* é misturada, em uma razão volumétrica de 2:1, com o sobrenadante do estágio (h);

(k) a suspensão da cultura é incubada anaerobicamente durante 45 horas, a 37°C; (l) como um controle, é usado um meio FAB não-consumido;

(m) a densidade óptica (OD_{600}) é determinada após 10, 15, 21, 39 e 45 horas de incubação (OD_{600}); e

(n) o microorganismo é classificado como um microorganismo, que não é capaz de estimular o crescimento de

Porphyromonas gingivalis se a densidade óptica (OD_{600}) em cada momento da medição não for aumentada em comparação com o controle.

De um modo alternativo, o ensaio compreende os estágios que se seguem:

5 (H) o microorganismo pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico a ser testado é misturado com *Porphyromonas gingivalis* em uma razão de contagem celular de 1:100 (*Lactobacillus P. gingivalis*) em meio FAB;

10 (I) a suspensão da cultura é incubada aerobicamente durante 45 horas, a 37°C;

(J) como um controle, é usado meio FAB não- consumido;

(K) a densidade óptica ($OD_{600, \max}$) é determinada e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) é determinada durante o crescimento exponencial; e

15 (L) o microorganismo é classificado como um microorganismo, que não é capaz de estimular o crescimento do *Porphyromonas gingivalis* se a densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) não for aumentada em comparação com o controle.

20 Em uma modalidade preferida, a incubação nos estágios (d) e (B) é executada em uma placa de 96 reservatórios. Em ainda uma outra modalidade preferida, a incubação é executada em um espectrofotômetro de microplaca Bio Tek PowerWave (Fabricante: Biotek Instruments GmbH, Germany).

25 Em uma modalidade preferida, a incubação nos estágios (k) e (I) [é executada em uma placa de 96 reservatórios. Em ainda uma outra modalidade preferida, a incubação é executada em uma estação de trabalho anaeróbica Whitley DG250 (Meintrup- DWS, Germany).

Com relação as $OD_{600, \max}$ e V_{\max} , o mesmo aplica-se tal como

aqui exposto precedentemente acima.

Um microorganismo é considerado como não estimulando o crescimento de um microorganismo de *Streptococcus mutans* ou de *Porphyromonas gingivalis*, se o crescimento não for aumentado ou ligeiramente aumentado quando em contato com o microorganismo precedente. “Ligeiramente aumentado” significa que o crescimento é aumentado em não mais do que 5%, quando comparado com o controle, de um modo mais preferido em não mais do que 2 %, quando comparado ao controle. O termo “não aumentado” significa que pode ser determinada uma diferença estatisticamente não relevante entre o crescimento do *Streptococcus mutans* ou *Porphyromonas gingivalis* quando contatado com um microorganismo da invenção, quando comparado ao controle, em que não existem microorganismos da invenção presentes. O termo “ não aumentado”, em uma modalidade preferida, também inclui aqueles casos em que um microorganismo conduz efetivamente a um decréscimo do *Streptococcus mutans* ou do *Porphyromonas gingivalis*, isto é, quando ele reprime o crescimento de um tal microorganismo.

Em ainda uma outra modalidade, o microorganismo da presente invenção não influencia, de um modo negativo, o crescimento do *Streptococcus mutans* ou do *Porphyromonas gengivalis*. O termo “não influencia negativamente “ significa que não foi verificada inibição do crescimento do *Streptococcus mutans* ou do *Porphyromonas gingivalis*, quando em contato com um microorganismo da invenção, quando comparado ao controle, em que não existe microorganismo da invenção presente.

Em uma modalidade preferida, o microorganismo de acordo com a invenção não apenas não estimula o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*, mas também não estimula o crescimento de pelo menos um outro microorganismo patogênico da microflora oral. Representativos de bactérias orais patogênicas são as

bactérias gram-negativas, anaeróbicas. Outros exemplos são *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum*, *Prevotella intermedia*, *Solobacterium moorei*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*,
5 *Streptococcus sanguinis*, *Tannerella forsythensis* e *Trepinema denticola*.

A estimulação ou a ausência de estimulação do crescimento destas bactérias pode ser medida pelos ensaios, como acima descrito para *S. Mutans* e *P. Gingivalis*.

Em uma modalidade preferida, os microorganismos acima
10 descritos de acordo com a invenção são caracterizados pelo fato de que eles não apenas mostram o efeito de estimulação do crescimento de *Streptococcus salivarius* como células vivas, mas também como o sobrenadante da cultura. Isto significa que também um sobrenadante da cultura obtida a partir de um microorganismo de acordo com a invenção apresenta o efeito de estimular o
15 crescimento de *Streptococcus salivarius*. De um modo preferido, este efeito ocorre no ensaio que se segue:

(a) o *Streptococcus salivarius* é cultivado anaerobicamente em placas de 6 reservatórios, com 8 ml de meio TSY durante a noite, a 37°C;

(b) o microorganismo pertencente ao grupo de bactérias do
20 ácido láctico a ser testado é cultivado sob condições anaeróbicas em placas de 96 reservatórios, com 150 µl de meio sintético, durante 24 horas a 37°C, as células são transformadas em grânulos através de centrifugação a 4000 x g, durante 15 minutos, e o sobrenadante é recuperado;

(c) a cultura celular de *Streptococcus salivarius* do estágio (a)
25 é misturada em uma razão volumétrica de 2: 1 a 4: 1 com o sobrenadante do estágio (b) em ½ meio TSY;

(d) a suspensão da cultura é incubada aerobicamente, durante 12 horas a 37°C;

(e) como um controle, é usado ½ TSY não consumido ou meio

MRS leve;

(f) a densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) é determinada e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) é aumentada durante o crescimento exponencial; e

5 (g) o microorganismo é classificado como um microorganismo capaz de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius*, se a densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) não for aumentada em pelo menos 10% em comparação com o controle.

10 Em uma modalidade preferida, a incubação é executada em uma placa de 96 reservatórios. Em ainda uma outra modalidade preferida, a incubação é executada em um espectrofotômetro de microplaca Bio Tek PowerWave (Biotek Instruments GmbH, Germany).

Com relação a OD_{600} e V_{\max} , aplica-se o mesmo que foi aqui precedentemente descrito acima.

15 De um modo preferido, o microorganismo de acordo com a presente invenção conduz a um aumento da densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) do *Streptococcus salivarius* do ensaio acima descrito de pelo menos 15%, de um modo mais preferido de pelo menos 20%, de um modo ainda mais preferido de pelo
20 menos 30%, e de um modo particularmente preferido de pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, ou até 80%, em comparação com o controle.

25 Em uma modalidade particularmente preferida, a estimulação do crescimento de *Streptococcus salivarius* apresentada pelo microorganismo de acordo com a invenção, é resistente ao tratamento térmico, isto é, ocorre também quando as células (ou extratos das mesmas) ou o sobrenadante da cultura é submetido a um tratamento térmico. O tratamento térmico é, de um modo preferido, um tratamento térmico em uma temperatura de entre 60°C e 100°C, de um modo mais preferido de entre 70°C e 90°C, e ainda mais preferivelmente entre 75°C e 85°C e de um modo mais preferido em uma

temperatura de cerca de 80°C ou exatamente de 80°C.

De um modo geral, o tratamento deve durar por um período de tempo de pelo menos 1 minuto. Preferivelmente, o tratamento térmico dura por um período de tempo de pelo menos n minutos, em que n é um inteiro na
5 faixa de 2 a 60, com n = 10 ou 15 ou 20 sendo em particular preferido. No entanto, não existe, em princípio, limite superior para o período de incubação. No entanto, ele não é, de um modo preferido, mais longo do que 4, 3, 2 ou 1 hora(s). O tratamento térmico mais preferido é de cerca de 10 minutos, em uma temperatura de 80 °C, em um incubador. O tratamento térmico mais
10 preferido é considerado como abolindo qualquer função de uma proteína e qualquer vitalidade das células, o que distingue, deste modo, o microorganismo acima mencionado pertencente ao grupo de bactérias de ácido lático de um outro microorganismo, que seja ainda capaz de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius*. Deste modo, ele é muito útil para o
15 uso em qualquer alimento, ração, bebida ou composição no contexto da presente invenção, se for desejado que o microorganismo não deva estar vivo.

Após o resfriamento, a capacidade do microorganismo de acordo com a invenção (ou de extratos dos mesmos) ou da cultura de sobrenadante dos mesmos para estimular o crescimento de *Streptococcus*
20 *salivarius* é determinado em um ensaio, tal como aqui acima descrito, ou como descrito nos Exemplos apensos. No contexto com o sobrenadante da cultura de um microorganismo de acordo com a invenção, um ensaio correspondente compreende, de um modo preferido, os estágios que se seguem.

25 (h) o *Streptococcus salivarius* é cultivado anaerobicamente em placas de 6 reservatórios, com 8 ml do meio TST, durante a noite, a 37°C.

(i) o microorganismo pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático a ser testado é cultivado sob condições anaeróbicas em placas de 96 reservatórios, com 150 µl do meio sintético, durante 24 horas a 37°C, as

células são transformadas em grânulos através de centrifugação a 4000 x g durante 15 minutos e o sobrenadante é recuperado.

(j) o sobrenadante é incubado a 80°C durante 10 minutos em um incubador e subsequentemente resfriado à temperatura ambiente;

5 (k) a cultura celular de *Streptococcus salivarius* do estágio (a) é misturada em uma razão volumétrica de 2: 1 com o sobrenadante do estágio (j) em ½ meio TSY;

(l) a suspensão da cultura é incubada aerobicamente durante 12 horas a 37°C;

10 (m) como um controle, é usado ½ TSY ou meio MRS leve;

(n) a densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) é determinada e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) é aumentada durante o crescimento exponencial; e

(g) o microorganismo é classificado como um microorganismo capaz de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius*, se a densidade óptica máxima ($OD_{600, \max}$) e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) não for aumentada em pelo menos 10% em comparação com o controle.

15 Além disso, também a propriedade de não- estimulação do crescimento de *Streptococcus mutans* e/ou de *Porphyromonas gingivalis* do microorganismo de acordo com a invenção é resistente ao tratamento térmico. Com respeito à definição do termo tratamento térmico, aplica-se o mesmo que foi aqui exposto acima.

25 Em ainda uma outra modalidade preferida, a estimulação do crescimento de *Streptococcus salivarius* apresentada pelo microorganismo de acordo com a invenção, é resistente à liofilização, isto é, também ocorre quando as células são submetidas a um tratamento de liofilização. O tratamento de liofilização é, de um modo preferido, um tratamento de liofilização, no qual as células (ou extratos das mesmas) do sobrenadante celular são primeiramente congeladas a - 80°C e são subsequentemente

liofilizadas, sob vácuo, durante 16 horas. Após o tratamento de liofilização, a capacidade do microorganismo de acordo com a invenção para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* pode ser testada através dos ensaios já descritos acima ou como descrito nos Exemplos apensos. No contexto com o sobrenadante da cultura de um microorganismo de acordo com a invenção, um ensaio correspondente compreende, de um modo preferido, os estágios que se seguem:

(p) o *Streptococcus salivarius* é cultivado anaerobicamente em placas de 6 reservatórios, com 8 ml de meio TST, durante a noite a 37°C;

(q) o microorganismo pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico a ser testado é cultivado sob condições anaeróbicas em 50 ml de meio sintético em garrafas de 100 ml fechadas, durante a noite, a 37°C, as células são transformadas em grânulos através de centrifugação a 4000 x g, durante 15 minutos, e o sobrenadante é recuperado;

(r) 20 ml do sobrenadante do estágio (q) são congelados a -80°C e liofilizados, sob vácuo, durante 16 horas;

(s) o sobrenadante liofilizado é novamente suspenso em 20 ml de H₂O;

(t) a cultura celular de *Streptococcus salivarius* do estágio (a) é misturada em uma razão volumétrica de 2:1, com o sobrenadante do estágio (s) em ½ meio TSY em placas de 96 reservatórios;

(u) a suspensão da cultura é incubada aerobicamente, durante 12 horas, a 37°C;

(v) como um controle, é usado ½ TSY ou meio MRS leve;

(w) a densidade óptica máxima (OD_{600, max}) é determinada e/ou a taxa de crescimento máxima (V_{max}) é aumentada durante o crescimento exponencial; e

(x) o microorganismo é classificado como um microorganismo capaz de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius*, se a densidade

óptica máxima ($OD_{600, \max}$) e/ ou a taxa de crescimento máxima (V_{\max}) não for aumentada em pelo menos 10% em comparação com o controle.

De acordo com uma modalidade particularmente preferida, o microorganismo de acordo com a invenção apresenta ambas as propriedades descritas no primeiro e no segundo aspecto da invenção, respectivamente, isto é, ele apresenta as propriedades (b) e/ ou (B), tal como descrito no primeiro aspecto (redução drástica na concentração de peptídeo) e mostra as propriedades tal como descrito no segundo aspecto (estimulação do crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimulação do crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*).

Os microorganismos de acordo com a invenção como aqui descrita acima, devido a suas propriedades, permitem alterar o equilíbrio da microflora oral para *Streptococcus salivarius*, o que conduz a um aperfeiçoamento no que se refere ao desenvolvimento de mau odor.

Como é evidente a partir do acima, todas as características acima mencionadas tornam o microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, um agente adequado para a redução do mau odor e/ ou halitose e para a prevenção e/ ou o tratamento do mau odor oral e/ ou da halitose, em particular do mau odor oral e/ ou halitose, que é causado pelos microorganismos patogênicos da flora microbiana oral, em particular de bactérias gram-negativas, anaeróbicas. Deste modo, o microorganismo de acordo com a invenção apresenta um efeito sobre a redução do mau odor e é deste modo, um agente útil para a prevenção e/ ou tratamento do mau odor oral e/ ou halitose.

O termo “prevenção do mau odor oral” inclui a profilaxia do mau odor oral. Deste modo, um paciente que nunca tenha contraído aqueles microorganismos, que são responsáveis pelo desenvolvimento do mau odor oral, mas que pode estar em risco de contraí-los, isto é, de ser infectado com tais microorganismos, ou um paciente, que apresente ainda os benefícios de

uma microflora oral bem balanceada, a partir dos microorganismos, por exemplo, composições, usos e métodos da presente invenção, não deverá apresentar um mau odor oral. Portanto, os microorganismos, composições, usos e métodos da presente invenção podem, por exemplo, ser aplicados a

5 crianças pequenas, crianças ou a animais jovens, para a profilaxia do mau odor oral, pois a cavidade da criança ou do animal jovem está normalmente livre de microorganismos responsáveis pelo desenvolvimento do mau odor oral. No entanto, os microorganismos e as composições, como usados de acordo com a presente invenção, não estão limitados à administração a

10 crianças pequenas, a crianças ou a animais jovens.

Os termos “tratar o mau odor oral” e “tratar a halitose” incluem a administração dos microorganismos ou composições, como aqui descrito, a um paciente que sofra de mau odor oral e/ ou halitose, com o propósito de diminuir a quantidade de mau odor produzida.

15 De um modo opcional, o microorganismo de acordo com a presente invenção é um microorganismo probiótico que possui, além de seu efeito de redução do mau odor oral, efeitos benéficos para o organismo hospedeiro, ao qual ele é administrado. Um “probiótico”, pela definição geralmente aceita, é um “ suplemento alimentar microbiano vivo, que afeta,

20 de um modo benéfico, o animal hospedeiro através da melhora de seu equilíbrio microbiano intestinal “.

Deste modo, a presente invenção provê o uso de bactérias facilmente administráveis, que são organismos de grau alimentar, que podem, em adição a seu efeito de redução do mau odor oral, ser úteis como

25 probióticos.

De um modo rigoroso, o efeito dos microorganismos de acordo com a invenção de remoção de peptídeos a partir de um meio e, deste modo, também a partir da saliva, deste modo evitando outros microorganismos presentes na microflora oral, que são responsáveis pela

produção de substâncias, que conduzem à geração do mau odor oral, de um modo a produzir as substâncias correspondentes, pode ser observado com formas inativadas dos microorganismos, tais que as formas liofilizadas ou as formas resultantes a partir de um tratamento com luz UV ou com radiação.

5 De forma ainda mais importante, o efeito também ocorre na presença de saliva, o que torna o microorganismo de acordo com a invenção particularmente adequado para o uso sob a forma de aplicações orais ou como um aditivo para alimentos, rações ou bebidas. De um modo notável, as formas termicamente inativadas ou liofilizadas, em particular os análogos, derivados
10 ou (a) fragmento(s) dos referidos microorganismos aqui expostos são ainda capazes de especificamente reduzir, de um modo eficiente, a concentração de peptídeo nos ensaios acima descritos.

De um modo similar, além disso, a propriedade do microorganismo de acordo com a presente invenção, tal como descrito no
15 segundo aspecto da presente invenção, isto é, estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*, ocorre não apenas com os microorganismos em si mesmos, mas também com o sobrenadante da cultura do microorganismo e com as formas inativadas. De um modo particular, a
20 propriedade de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e de não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis* é resistente ao tratamento térmico e é resistente a um tratamento de liofilização.

Estes efeitos surpreendentes são vantajosos para o uso das
25 referidas formas inativadas, sobrenadantes de cultura (análogo)(s) ou fragmento(s) dos referidos microorganismos, assim como mutantes ou derivados dos mesmos, em composições para o uso em animais, de um modo preferido humanos ou mamíferos, de um modo a prevenir e/ ou tratar o mau odor e/ ou a halitose. Em particular as referidas formas inativadas,

sobrenadantes da cultura, análogos ou fragmentos podem ser facilmente adicionados a qualquer composição, por exemplo composição cosmética ou farmacêutica, alimento ou corante alimentar para bebidas e os similares. De um modo adicional, a produção de tais formas inativadas, sobrenadantes de cultura, análogos ou fragmentos é fácil e barata e eles podem ser armazenados durante períodos de tempo prolongados, sem que percam a sua capacidade para reduzir a concentração de peptídeo e/ ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*. Uma vantagem particular do microorganismo de acordo com a invenção é a de que ele retém a sua capacidade para reduzir a concentração de peptídeo e/ ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*, se ele for liofilizado ou secado por pulverização ou secado. Além disso, a propriedade de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e de não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis* é ainda retida após um tratamento térmico. As propriedades acima mencionadas tornam o microorganismo de acordo com a invenção um ingrediente favorável para o uso nas composições aqui descritas.

Em adição, em uma modalidade preferida, o microorganismo de acordo com a presente invenção apresenta as propriedades acima descritas (isto é, redução da concentração de peptídeos e/ ou estimulação do crescimento de *Streptococcus salivarius* e não- estimulação do crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*), também na presença de saliva. A saliva é uma secreção exógena, que é sintetizada pelas glândulas salivares. Ela é um líquido complexo contendo, à parte de cerca de 99% de água, uma multiplicidade de compostos orgânicos e inorgânicos. Os ingredientes fisiológicos da saliva são, entre outros, enzimas, por exemplo, amilases, carboanidrases, lisozima, peroxidases ou proteínas, por exemplo,

mucinas, lactoferrina, proteínas ricas em prolina, cistatinas, histatinas ou estaterinas ou IgA solúvel. Deste modo, embora uma variedade de substâncias potencialmente interferentes estejam presentes na saliva, as propriedades acima mencionadas do microorganismo de acordo com a invenção não são impedidas pela presença da saliva.

As características acima mencionadas do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, o tornam um agente robusto e eficaz para a prevenção e/ ou o tratamento do mau odor oral e /ou da halitose, pois ele é principalmente administrado em várias formas à boca, incluindo a cavidade oral e os dentes onde, entre outros, a saliva, incluindo certas proteases e baixos valores de pH após a ingestão de gêneros alimentícios contendo carboidratos estão presentes. Além disso, a resistência ao calor e/ ou liofilização possui efeitos benéficos na adição do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias de ácido láctico, como um aditivo, a gêneros alimentícios durante a produção do referido gênero alimentício. Ou seja, o gênero alimentício é com frequência esterilizado pelo calor, previamente cozido, pasteurizado e os similares, o que é prejudicial quanto à viabilidade de microorganismos.

Outras modalidades e vantagens da invenção são expostas em parte na descrição nesta, e em parte, pode ser óbvio a partir da descrição, ou pode ser aprendido a partir da prática da invenção.

Antes que a presente invenção seja descrita em detalhes, deve ser entendido que esta invenção não está limitada à metodologia, protocolos, bactérias, vetores e reagentes particulares, etc., aqui descrito, pois estes podem variar. Deve ser também entendido que a terminologia aqui usada destina-se ao propósito de descrever apenas modalidades particulares, e que não se destina a limitar o escopo da presente invenção, que será apenas limitado pelas reivindicações apenas. A não ser que definido de um outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui usados possuem os mesmos

significados que comumente entendidos por aquele de habilidade ordinária na técnica.

De um modo preferido, os termos aqui suados são definidos como descrito em “A multilingual glossary of biotechnological terms : (IUPAC Recommendations)”, Leuenberger, H. G. W., Nagel, B. And Kölbl, F. Eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010, Basel, Switzerland). Em todo este relatório e nas reivindicações que se seguem, a não ser que o contexto o requeira de um outro modo, a palavra “ compreende “, e variações, tais que “compreende” e “compreendendo” serão entendidas como implicando na inclusão de um inteiro mencionado ou estágio ou grupo de inteiros ou estágios, mas não a exclusão de qualquer outro inteiro ou estágio ou grupo de inteiros ou estágio.

Vários documentos são citados em todo o texto deste relatório. Cada um dos documentos aqui citado (incluindo todas as patentes, pedidos de patente, publicações científicas, relatórios de fabricantes, instruções, etc.), seja supra ou infra, são aqui incorporados, a título referencial, em sua totalidade. Nada neste deve ser construído como uma admissão de que a invenção não está intitulada a antedatar uma tal exposição em virtude da invenção anterior.

Deve ser notado, como aqui usado e nas reivindicações apenas, que as formas singulares “um” e “o” incluem os referentes plurais, a não ser que o contexto o indique claramente de um outro modo. Deste modo, por exemplo, a referência a um “reagente” inclui um ou mais de tais diferentes reagentes, e a referência ao “método “ inclui a referência a estágios equivalentes e a métodos conhecidos daqueles de habilidade ordinária na técnica, que poderiam ser modificados ou substituídos pelos métodos aqui descritos.

Quando usado no contexto da presente invenção, o termo “microorganismo pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático” abrange

(a) microorganismo(s) que pertence(m) a bactérias, em particular que pertencem a eubactérias fermentativas gram-positivas, de um modo mais particular que pertencem à família de *lactobacteriaceae*, que incluem as bactérias do ácido láctico. De um modo adicional, o referido termo também

5 abrange os derivados ou mutantes, ou análogos, ou fragmentos, tais que extratos celulares ou as frações de membrana, tal como aqui descrito, do(s) referido(s) microorganismo(s), que retêm as propriedades acima descritas (isto é, reduzindo a concentração de peptídeos e/ou estimulando o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimulando o crescimento de

10 *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*). Os termos “derivado”, “mutantes”, “análogos” e “fragmentos” são descritos em outro local neste. As bactérias de ácido láctico são, a partir de um ponto de vista taxonômico, divididas em subdivisões de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. O microorganismo acima mencionado, que

15 pertence ao grupo de bactérias de ácido láctico, é, de um modo preferido, uma espécie *Lactobacillus*. Membros do grupo de bactérias de ácido láctico normalmente carecem de porfirinas e de citocromos, não efetuam fosforilação de transporte de elétron e, portanto, obtêm energia apenas através de fosforilação do nível de substrato. Isto é, em bactérias do ácido láctico, o ATP

20 é sintetizado através da fermentação de carboidratos. Todas as bactérias de ácido láctico crescem anaerobicamente, no entanto, de um modo diferente de muitos anaeróbicos, a maior parte das bactérias de ácido láctico não são sensíveis ao oxigênio e podem, deste modo, crescer em sua presença, assim como em sua ausência. Deste modo, os microorganismos acima mencionados,

25 que pertencem ao grupo de bactérias de ácido láctico, são, de um modo preferido, bactérias do ácido láctico anaeróbicas aerotolerantes, de um modo preferido pertencendo ao gênero *Lactobacillus*.

As bactérias do ácido láctico acima mencionadas são preferivelmente configuradas em haste ou esféricas, variando a partir de

longas e finas a hastes curvas curtas, sendo, além disso, preferivelmente imóveis e/ ou asporogêneas e produzem o ácido láctico como um produto único e principal do metabolismo fermentativo. O gênero *Lactobacillus*, ao qual o microorganismo acima mencionado pertence, é dividido pelas características que se seguem em três subgrupos principais, pelo que é considerado que a espécie *Lactobacillus* acima mencionada pode pertencer a cada um dos três principais subgrupos:

(a) lactobacilos homofermentativos:

(i) produzem o ácido láctico, de um modo preferido o(s) isômero(s) L, D ou DL do ácido láctico, em uma quantidade de pelo menos 85% a partir de glicose, através da via Embden-Meyerhof;

(ii) crescimento em uma temperatura de 45°C, mas não em uma temperatura de 15°C;

(iii) configurados em hastes longas; e

(iv) tendo ácido glicerol teicóico na parede celular;

(b) lactobacilos homofermentativos:

(i) produzem o ácido láctico, preferivelmente os isômeros L ou DL do ácido láctico através da via de Embden- Meyerhof;

(ii) crescimento em uma temperatura de 15°C, apresentando um crescimento variável em uma temperatura de 45°C;

(iii) configuração em hastes curtas ou corineforme ; e

(iv) tendo ribitol e/ou ácido glicerol teicóico em sua parede celular;

(c) lactobacilos heterofermentativos:

(i) produzem o ácido láctico, preferivelmente o isômero DL do ácido láctico em uma quantidade de pelo menos 50% a partir de glicose através da via de pentose- fosfato;

(ii) produzem dióxido de carbono e etanol;

(iii) apresentam um crescimento variável em uma temperatura

de 15°C ou 45°C;

(iv) sendo configurados em hastes longas ou curtas; e

(v) tendo ácido glicerol teicóico em sua parede celular.

Com base nas características acima mencionadas, os
5 microorganismos acima mencionados podem ser classificados como
pertencendo ao grupo de bactérias do ácido láctico, em particular do gênero de
Lactobacillus. Através do uso de uma sistemática clássica, por exemplo,
através de referência às descrições pertinentes no “Bergey's Manual of
Systematic Bacteriology” (Williams & Wilkins Co., 1984), um
10 microorganismo pode ser determinado como pertencendo ao gênero de
Lactobacillus. De um modo alternativo, os microorganismos podem ser
classificados como pertencendo ao gênero de Lactobacillus através de
métodos conhecidos na técnica, por exemplo, através de sua impressão digital
metabólica, isto é, uma revisão comparável quanto à capacidade de tais (a)
15 microorganismo(s) para metabolizar açúcares ou através de outros métodos
descritos, por exemplo, em Schleifer et al., para metabolizar açúcares ou
através de outros métodos descritos, por exemplo, em Schleifer et al., System
Appl. Microb., 18 (1995), 461- 467 ou Ludwig et al., System Appl. Microb.,
15 (1992), 487-501. Os microorganismos acima mencionados são capazes de
20 metabolizar fontes de açúcar, que são típicas e conhecidas na técnica dos
microorganismos pertencentes ao gênero de Lactobacillus. De um modo
preferido, no entanto, o microorganismo acima mencionado possui uma
impressão digital metabólica selecionada a partir do grupo, que consiste de:

(i) ele metaboliza D-lactose, mas não L- sorbose e/ ou D-
25 sacarose e/ ou D- inulina,

(ii) ele metaboliza inulina,

(iii) ele metaboliza L-sorbose, mas não D-lactose e/ ou D-
sacarose e/ ou inulina, e

(iv) ele metaboliza L- sorbose, D- lactose e inulina.

De um modo preferido, o microorganismo acima mencionado possui uma impressão digital metabólica selecionada a partir do grupo, que consiste de:

- 5 (i) ele metaboliza D-lactose, mas não L-sorbose, D- sacarose e inulina,
- (ii) ele metaboliza L-sorbose, D- lactose e inulina, mas não D-sacarose,
- (iii) ele metaboliza L-sorbose, mas não D-lactose, D-sacarose e inulina, e
- 10 (iv) ele metaboliza L-sorbose, D- lactose, D-sacarose, mas não inulina.

Naturalmente, o microorganismo acima mencionado não está limitado à metabolização dos açúcares mencionados no padrão de impressão digital metabólica antes mencionado, mas podem ser capazes de metabolizar
15 outros açúcares, que são comumente metabolizados por espécies *Lactobacillus*.

A afiliação dos microorganismos acima mencionados do gênero de *Lactobacillus* pode ser também caracterizada pelo uso de outros métodos conhecidos na técnica, por exemplo, usando eletroforese em gel
20 SDS-PAGE de proteína total da espécie a ser determinada e comparando-a a cepas conhecidas e já caracterizadas do gênero *Lactobacillus*. As técnicas para a preparação de um perfil de proteína total como acima descrito, assim como a análise numérica de tais perfis, são bem conhecidos daqueles versados na técnica. No entanto, os resultados apenas são confiáveis, desde que cada
25 estágio do processo esteja suficientemente padronizado. Em face do requerimento de acurácia quando da determinação da ligação de um microorganismo ao gênero de *Lactobacillus*, procedimentos padronizados são regularmente tornados disponíveis ao público por seus autores, tais que aquele de Pot et al., como apresentados durante um “workshop” organizado pela

União Européia, na Universidade de Ghent, na Bélgica, em de 12 a 16 de setembro de 1994 (Fingerprinting techniques for classification and identification of bacteria, SDS- PAGE da proteína celular total). O software usado na técnica de análise do gel de eletroforese SDS- PAGE é de crucial importância, pois o grau de correlação entre as espécies depende dos parâmetros e dos algoritmos usados por este software. Sem que sejamos introduzidos em detalhes teóricos, a comparação quantitativa de faixas medidas por um densitômetro e normalizadas por um computador é preferivelmente produzida com o coeficiente de correlação de Pearson. A matriz de similaridade assim obtida pode ser organizada com o auxílio do algoritmo UPGMA (método de grupo par não pesado usando ligação média), que não apenas torna possível agrupar os perfis mais similares, mas também construir dendogramas (vide Kersters, Numerical methods in the classification and identification of bacteria by electrophoresis, in Computer-assisted Bacterial Systematics, 337 – 368, M. Goodfellow, A. G. O' Donnell Ed., John Wiley and Sons Ltd., 1985).

De um modo alternativo, a afiliação dos referidos microorganismos ao gênero de *Lactobacillus* pode ser caracterizada com relação ao RNA ribossômico em um assim denominado Riboprinter RTM. De um modo mais preferido, a afiliação da espécie acima mencionada ao gênero *Lactobacillus* é demonstrada pela comparação da sequência de nucleotídeo do RNA ribossômico 16S da referida bactéria, ou de seu DNA genômico, que codifica o RNA ribossômico 16S, com aqueles de outros gêneros e espécies de bactérias do ácido lático, conhecidas até o presente. Uma outra alternativa preferida para a determinação da ligação da espécie ao gênero *Lactobacillus* é o uso de iniciadores de PCR específicos para a espécie, que objetivam a região do espaçador rRNA 16S-23S. Uma outra alternativa preferida é o RAPD- PCR (Nigatu et al., em Antonie van Leeuwenhoek (79), 1-6, 2001(em virtude do que um padrão de DNA específico para a cepa é gerado, o qual

permite determinar a afiliação de um microorganismo identificado ao gênero de *Lactobacillus*. Outras técnicas úteis para a determinação da afiliação de um microorganismo ao gênero de *Lactobacillus* são o polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) (Giraffa et al., *Int. J. Food Microbiol.* 82 (2003), 163- 172), impressão digital dos elementos repetitivos (Gevers et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 205 (2001) 31-36) ou a análise do padrão do éster metílico do ácido graxo (FAME) de células bacterianas (Heyrman et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 181 (1991), 55- 62). De um modo alternativo, os lactobacilos podem ser determinados através de tipificação de lectina (Annuk et al., *J. Med. Microbiol.* 50 (2001), 1069- 1074) ou através da análise de suas proteínas da parede celular (Gatti et al., *Lett. Appl. Microbiol.*, 25 (1997), 345-348.

Os microorganismos acima mencionados são, de um modo preferido, bactérias do ácido láctico, que pertencem ao gênero de *Lactobacillus*, de um modo mais preferido a espécie *Lactobacillus* como aqui descrito, em particular a bactéria *Lactobacillus* pertencente a uma espécie selecionada a partir do grupo que consiste de *acidophilus*, *fermentum*, *lactis*, *delbrueckii*, *algidus*, *brevis*, *buchneri*, *casei*, *camelliae*, *colehominis*, *crustorum*, *diolivorans*, *heterohiochii*, *hilgardii*, *kimchii*, *lindneri*, *oris*, *pantheris*, *parabuchner* e *saerimeneri*. De um modo ainda mais preferido, o referido *Lactobacillus* é o *Lactobacillus acidophilus*. No entanto, a espécie *Lactobacillus* não está limitada a estes. Os microorganismos acima mencionados podem, de um modo preferido, ser “isolados” ou “purificados”. O termo “isolado” significa que o material é removido a partir de seu ambiente original, por exemplo, o ambiente natural se ele for de ocorrência natural. Por exemplo, um microorganismo de ocorrência natural, de um modo preferido uma espécie *Lactobacillus*, separada a partir de alguns ou de todos os materiais coexistentes no sistema natural, é isolada. Um tal microorganismo poderia ser parte de uma composição, e deve ser considerado

como sendo ainda isolado pelo fato de que a composição não constitui parte de seu ambiente natural.

O termo “purificado” não requer pureza absoluta; preferivelmente, ele é intencionado como uma definição relativa. Os microorganismos individuais, obtidos a partir de uma biblioteca, foram convencionalmente purificados até a homogeneidade biológica, isto é, eles crescem como colônias únicas quando separados sobre placas de ágar através de métodos conhecidos na técnica. De um modo preferido, as placas de ágar, que são usadas para este propósito, são seletivas para a espécie *Lactobacillus*. Tais placas de ágar seletivas são conhecidas na técnica.

De um modo mais preferido, o microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias de ácido láctico, é selecionado a partir do grupo que consiste de *Lactobacillus acidophilus* tendo os números de acesso DSMZ, DSM 19825, DSM 19826, DSM 19827 ou um mutante ou derivado dos mesmos, em que o referido mutante ou derivado retém a capacidade para reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou (a), como acima descrito. O termo “*Lactobacillus acidophilus* having DSMZ accession number” refere-se a células de um microorganismo pertencente à espécie *Lactobacillus acidophilus* depositada por BASF AG com a Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (“DSMZ”) em 1 de novembro de 2007 e tendo os números de depósito que se seguem DSM 19825, DSM 19826, DSM 19827. O DSMZ está localizado em Inhoffenstr. 7B, 38124, Braunschweig, Germany.

Os depósitos DSMZ antes mencionados foram efetuados de acordo com os termos do Tratado de Budapeste no que se refere ao reconhecimento internacional do depósito de microorganismos para propósitos de procedimento de patente.

“Um mutante ou derivado” do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico,

preferivelmente do *Lactobacillus acidophilus* depositado, possui, de um modo preferido, as mesmas características que as respectivas cepas depositadas, isto é, ele retém a capacidade para reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e ou (A), como acima descrito e/ ou ele retém a capacidade para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não para estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*. Por exemplo, o referido derivado pode ser engenheirado geneticamente. No contexto da presente invenção, o termo “engenheirado geneticamente” é usado em seu sentido mais amplo para métodos conhecidos daqueles versados na técnica para modificar os ácidos nucleicos desejados *in vitro* e *in vivo*, de um modo tal que as modificações genéticas sejam afetadas e que os genes sejam alterados através de tecnologia de DNA recombinante. Deste modo, é preferido que os referidos métodos compreendam a clonagem, a sequenciação e a transformação dos ácidos nucleicos recombinantes. Para este propósito, os vetores apropriados incluem os vetores de expressão para a espécie *Lactobacillus*, tais que, por exemplo, descritos na EP- B1 506 789, EP- B1 316 677, EP-B1 251 0 64, EP- B1 218 230, EP- B1 1 133 046 ou WO 89/ 01970.

Iniciadores, enzimas, outras células hospedeiras para a clonagem de construtos intermediários e os similares podem ser usados e são conhecidos por aquele versado na técnica. De um modo preferido, mutantes geneticamente engenheirados compreendem células do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, de um modo preferido da espécie *Lactobacillus* depositada, abrigando ácidos nucleicos recombinantes, ou compreendidos em seu cromossoma bacteriano ou em (a) plasmídeo(s). Os referidos ácidos nucleicos recombinantes são, de um modo preferido, estranhos ao microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico. Por “estranho” é compreendido que a molécula de ácido nucleico ou polinucleotídeo ou é

heteróloga com relação à célula hospedeira, isto significando derivada de uma célula ou organismo com um fundamento genômico diferente, ou é homóloga em relação à célula hospedeira, mas está localizada em um ambiente genômico diferente daquele que a contraparte de ocorrência natural da referida molécula de ácido nucleico. Isto significa que, se a molécula de ácido nucleico for homóloga com relação à célula hospedeira, ela não estará localizada em sua localização natural no genoma da referida célula hospedeira, em particular sendo circundada por genes diferentes. Neste caso, o polinucleotídeo pode ou estar sob o controle de seu próprio promotor ou sob o controle de um promotor heterólogo. O vetor acima descrito ou a molécula de ácido nucleico, que está presente na célula hospedeira, pode ou ser integrado no genoma da célula hospedeira ou ele pode ser mantido em alguma forma extracromossomialmente. A este respeito, é também entendido que a molécula de ácido nucleico acima descrita pode ser usada para restaurar ou para criar um gene mutante através de recombinação homóloga.

Um mutante do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, de um modo preferido um mutante das cepas *Lactobacillus* depositadas, é, de um modo preferido, artificialmente mutado. De acordo com a presente invenção, o termo “mutado” significa (a) modificação(ões) permanente(s) do material genético, isto é, ácidos nucleicos, causada, por exemplo, naturalmente, ou através de um meio físico ou de compostos/ substâncias/ agentes químicos, tais que EMS ou ENU. As referidas modificações incluem modificações de ponto, tais que transições ou transversões, deleção/ inserção/ adição de uma ou mais bases dentro de um ácido nucleico/ gene; cromossoma, deste modo modificando o ácido nucleico/ gene; cromossoma, o que pode causar, entre outros, expressão/ transcrição/ translação de gene aberrante ou produtos de gene inativos, produtos de gene ativos/ inativos constitutivos, que conduzem, por exemplo, a efeitos negativos dominantes. De um modo preferido, uma

mutação conduz a uma capacidade aumentada de redução da concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), como aqui acima descrito. Deste modo, é também preferido que as células mutantes do microorganismo depositado, que abrigam (a) mutação(ões) em (a) gene(s) desejado(s) ou nas
5 quais (a) mutação(ões) em (s) gene(s) desejado(s) sejam introduzidas por métodos conhecidos daqueles versados na técnica. É também conhecido na técnica antecedente que as células bacterianas mutadas ou geneticamente engunheiradas podem ser selecionadas através de qualquer método/ fenótipo adequado. No contexto da presente invenção, um mutante tendo uma
10 capacidade aumentada de redução da concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), como aqui acima descrito, e/ ou tendo a capacidade de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e de não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis* pode ser testado de acordo com os métodos aqui acima descritos ou nos Exemplos
15 apensos. O termo “mutante”, no entanto, também inclui células do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, de um modo preferido células dos microorganismos depositados, que abrigam mutações espontâneas, de ocorrência natural, em seus genomas, isto é, cromossoma bacteriano. “Mutações espontâneas” são mutações que
20 ocorrem naturalmente, isto é, sem a manipulação genética direta pelo homem, ou através de exposição a um mutágeno. A seleção de mutantes espontâneos podem ser efetuada através da cultura da cepa e seleção das variantes desejadas, através de, por exemplo, a capacidade da bactéria variante para mostrar uma capacidade aumentada de redução da concentração de peptídeo
25 no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), como aqui acima descrito e/ ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e para não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis* (vide, por exemplo, Sambrook, Russell “Molecular Cloning. A laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (2001); Ausubel, “Current Protocols in

Molecular Biology”, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989)). Por exemplo, tais mutações podem ocorrer durante o cultivo, por exemplo, durante o processo de divisão de célula normal acoplado com a replicação de DNA ou durante a passagem e/ ou a preservação do mutante do

5 microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias de ácido lático.

A presente invenção também refere-se a um derivado do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático. O termo “ derivado do microorganismo acima mencionado,

10 pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático “ inclui uma forma inativada, um análogo ou fragmento do microorganismo acima mencionado pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático, em que a referida forma inativada, análogo ou fragmento retém a capacidade de reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), tal como aqui acima descrito e/

15 ou a capacidade de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e de não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*.

De acordo com a presente invenção, o termo “forma inativada” inclui uma célula morta ou inativada de acordo com a invenção, que não é

20 mais capaz de formar uma colônia única sobre uma placa específica para microorganismos que pertencem ao gênero de *Lactobacillus*. A referida célula morta ou inativada pode possuir uma membrana celular intata ou rompida. Métodos para a exterminação ou a inativação de células do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático, são

25 conhecidos na técnica. El- Nezami et al., J. Food Prot. 61 (1998), 466- 468 descreve um método para a inativação da espécie *Lactobacillus* através de irradiação UV. De um modo preferido, as células do microorganismo de acordo com a invenção são termicamente inativadas ou liofilizadas, tal como descrito nos Exemplos apensos. A liofilização das células, tal como descrito

acima, apresenta a vantagem de que elas podem ser facilmente armazenadas e manipuladas, ao mesmo tempo em que retêm a sua capacidade de reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), como aqui acima descrito, e/ ou a capacidade para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e para não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*. Além disso, as células liofilizadas podem ser novamente desenvolvidas quando aplicadas sob condições conhecidas na técnica a um meio líquido ou sólido apropriado. A liofilização é executada através de métodos conhecidos na técnica. De um modo preferido, ela é executada durante, pelo menos, 2 horas, em temperatura ambiente, isto é, qualquer temperatura entre 16°C e 25°C. De um modo particularmente preferido, ela é executada durante 16 horas, sob vácuo. Além disso, as células liofilizadas do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, são estáveis durante pelo menos 4 semanas em uma temperatura de 4°C, de um modo a que ainda sejam capazes de reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), tal como acima descrito, e/ ou estimulando o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimulando o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*.

A inativação térmica pode ser alcançada através da incubação das células do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, durante pelo menos 10 minutos, em uma temperatura de 80°C. A inativação térmica pode ser alcançada através de autoclavagem das referidos células e / ou do sobrenadante em uma temperatura de 121°C durante pelo menos 20 minutos, na presença de vapor saturado, em uma pressão atmosférica de 2 bar. De um modo preferido, a inativação térmica das células ou do sobrenadante da cultura é alcançada, como aqui acima descrito, em conexão com o tratamento térmico.

Em uma alternativa, a inativação térmica das células do

microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, é alcançada através do congelamento das referidas células durante pelo menos 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 1 semana, 12 horas, 6 horas, 2 horas ou 1 hora a - 20°C. É preferido que pelo menos 70%, 75% ou 80%, de um modo mais preferido 85%, 90% ou 95% e de um modo particularmente preferido pelo menos 97%, 98%, 99% e de um modo particularmente preferido, 99,1 %, 99,2 %, 99, 3%, 99, 4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99, 8% ou 99, 9% e de um modo ainda mais particularmente preferido 100% das células do análogo do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico são mortos ou inativados, no entanto eles tendo ainda a capacidade de reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), como acima descrito e/ ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*. Se a forma inativada, análogo ou fragmento do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico está de fato morto ou inativado, pode ser testado através dos métodos conhecidos na técnica, por exemplo, através de um teste quanto à viabilidade.

O termo “ forma inativada” ou “análogo” também abrange lisados, frações, tais que frações de membrana, ou extratos dos microorganismos acima descritos, em que os referidos lisados, frações ou extratos retêm a capacidade para reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), tal como aqui acima descrito e/ ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*. Estas capacidades podem ser testadas como aqui descrito e de um modo particular como descrito nos Exemplos apensos. No caso de um lisado, fração ou extrato do microorganismo de acordo com a invenção, como descrito aqui acima, não apresentar a capacidade para reduzir a concentração de peptídeo no ensaio

M(a) e/ ou no ensaio (A) tal como aqui acima descrito e/ ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*, então a pessoa versada na técnica pode, por exemplo, purificar adicionalmente o referido lisado, fração ou extrato, através de métodos conhecidos na técnica, que são exemplificados aqui abaixo, de um modo a remover as substâncias que inibem a redução. Depois disso, aquele versado na técnica pode novamente testar o referido lisado, fração ou extrato, quanto a se é capaz de reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), tal como aqui acima descrito.

De acordo com a presente invenção, o termo “lisado” compreende uma solução ou suspensão em, um meio de células aquoso do microorganismo de acordo com a invenção. No entanto, o termo não deve ser construído, de modo algum, como limitativo. O lisado celular compreende, por exemplo, macromoléculas, tais que DNA, RNA, proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídeos e os similares e/ ou micromoléculas, tais que aminoácidos, açúcares, ácidos lipídicos, e os similares, ou frações do mesmo. Em adição, o referido lisado compreende resíduos celulares, que podem apresentar uma estrutura lisa ou granular. De um modo preferido, o referido lisado compreende a parede celular ou a membrana celular, ou ambas, ou porções ou fragmentos da parede celular ou da membrana celular, ou ambos. Métodos para a preparação de lisados celulares do microorganismo são conhecidos na técnica, por exemplo, através do emprego de prensa Francesa, moinho de células usando vidro ou contas de ferro ou lise celular enzimática, e os similares. Em adição, a lise de células refere-se a vários métodos conhecidos na técnica para a abertura/ destruição de células. O método para a lise de uma célula não é importante e qualquer método pode alcançar a lise das células do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias de ácido láctico, pode ser empregado. Um apropriado pode ser

selecionado pela pessoa versada na técnica, por exemplo, a abertura/ destruição de células pode ser efetuada enzimaticamente, quimicamente ou fisicamente. Exemplos não limitativos quanto a enzimas e coquetéis de enzimas são proteases, tais que a proteinase K, lipases ou glicosidasas ;
5 exemplos não limitativos quanto a substâncias químicas são ionóforos, detergentes, tais que dodecil sulfato de sódio, ácidos ou bases; e exemplos não limitativos de meios físicos são alta pressão, tais que a pressão Francesa, osmolaridade, temperatura, tal que o frio ou o calor. De um modo adicional, um método que emprega uma combinação apropriada de uma enzima, outra
10 que a enzima proteolítica, um ácido, uma base e os similares, pode ser também utilizado. Por exemplo, as células do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias de ácido láctico, são lisadas através de congelamento e de descongelamento, de um modo mais preferido congelamento em temperaturas abaixo de -70°C e descongelamento em
15 temperaturas de não mais do que 30°C , sendo particularmente preferido o congelamento em temperaturas abaixo de -75°C e o descongelamento sendo preferido em temperaturas de mais do que 35°C e sendo ainda mais preferidas as temperaturas para o congelamento abaixo de -80°C e as temperaturas para o descongelamento de mais do que 37°C . É também preferido que o referido
20 congelamento/ descongelamento seja repetido por pelo menos 1 vez, mais preferivelmente por pelo menos 2 vezes, e de um modo ainda mais preferido por pelo menos 3 vezes, sendo particularmente preferido por pelo menos 4 vezes e de um modo ainda mais preferido por pelo menos 5 vezes.

Deste modo, aqueles versados na técnica podem preparar os
25 lisados desejados por referência às explanações gerais acima, e modificação ou alteração apropriada daqueles métodos, se necessário. De um modo preferido, o meio aquoso usado para os lisados, tal como descrito, é a água, solução salina fisiológica, ou uma solução de tamponamento. Uma vantagem do lisado de célula bacteriana é a de que ele pode ser facilmente produzido a

armazenado a um custo eficientemente, pois menos instalações técnicas são requeridas.

De um modo preferido, o termo “extrato” compreende um componente subcelular do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático, por exemplo, uma macromolécula, tal que
5 uma proteína, DNA, RNA, um peptídeo, um carboidrato, um lipídeo e os similares e/ ou uma micromolécula, tal que um aminoácido, um açúcar, um ácido lipídico e os similares, ou qualquer outro composto orgânico ou molécula, ou uma combinação das referidas macromoléculas e/ ou
10 micromoléculas ou qualquer fração destas, em que o referido extrato retém a capacidade para reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), como aqui acima descrito, e/ ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e para não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*. Estas propriedades podem ser
15 testadas tal como aqui descrito e em particular como descrito nos Exemplos apensos. De um modo preferido, o referido extrato compreende a parede celular ou a membrana celular, ou ambas, ou porções ou fragmentos da parede celular ou da membrana celular, ou ambos. De um modo mais preferido, o termo “ extrato” refere-se a qualquer dos componentes subcelulares acima
20 descritos, em um meio isento de célula.

Em ainda uma outra modalidade preferida, o extrato pode ser obtido pela lise de células de acordo com vários métodos conhecidos na técnica para a abertura/ destruição de células, como aqui acima descrito e/ ou como sobrenadante de um procedimento de centrifugação de uma cultura do
25 microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático, em qualquer líquido, meio ou agente de tamponamento conhecidos daqueles versados na técnica ou de um lisado de uma tal cultura ou de qualquer outra suspensão celular adequada. De um modo mais preferido, o extrato pode ser um lisado purificado ou um sobrenadante de

cultura celular ou qualquer fração ou subporção dos mesmos, em que o referido lisado purificado ou sobrenadante da cultura celular ou qualquer fração ou subporção dos mesmos retém a capacidade para reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), tal como aqui
5 acima descrito e/ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*. Estas propriedades podem ser testadas como aqui descrito e em particular como descrito nos Exemplos apensos. Métodos adequados para o fracionamento e a purificação de um lisado, sobrenadante
10 de cultura ou um extrato são conhecidos daqueles versados na técnica e compreendem, por exemplo, cromatografia por afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de fase reversa, e cromatografia com outro material cromatográfico em métodos de batelada ou coluna, outros métodos de fracionamento, por exemplo, métodos
15 de filtração, por exemplo, ultrafiltração, diálise, diálise e concentração com exclusão de tamanho em centrifugação, centrifugação em gradientes de densidade ou matrizes de estágio, precipitação, por exemplo, precipitações por afinidade, salinização dentro ou salinização fora (precipitação com sulfato de amônio), precipitações alcoólicas ou qualquer outro método proteíno -
20 químico, biológico molecular, bioquímico, imunológico, químico ou físico.

De acordo com a invenção, os lisados são também preparações de frações de moléculas a partir dos lisados acima mencionados. Estas frações podem ser obtidas através de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, cromatografia, incluindo, por exemplo, cromatografia por afinidade,
25 cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de fase reversa, e cromatografia com qualquer outro material cromatográfico em métodos de coluna ou de batelada, outros métodos de fracionamento, por exemplo, métodos de filtração, por exemplo, ultrafiltração, diálise, diálise e concentração com exclusão de tamanho em

centrifugação, centrifugação em gradientes de densidade ou matrizes de estágio, precipitação, por exemplo, precipitações por afinidade, salinização dentro ou salinização fora (precipitação com sulfato de amônio), precipitações alcoólicas ou outros métodos proteíno- químicos, biológicos moleculares, bioquímicos, imunológicos, químicos ou físicos para separar os componentes acima dos lisados. Em ainda uma modalidade preferida, aquelas frações, que são mais imunogênicas do que outras, são preferidas. Aqueles versados na técnica são capazes de selecionar um método adequado e determinar o seu potencial imunogênico por referência às explanações gerais acima e a explanações específicas nos exemplos neste, e modificando ou alterando aqueles métodos de um modo apropriado, se necessário.

Deste modo, o termo “forma inativada ou análoga” também abrange os filtrados do microorganismo da invenção, em que os referidos filtrados retêm, de um modo preferido, a capacidade para reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A)m, como acima descrito, e/ ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*. Estas propriedades podem ser testadas como aqui descrito e de um modo particular como descrito nos Exemplos apensos. No caso, um filtrado do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, tal como acima descrito, pode não apresentar a capacidade de reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), como aqui acima descrito e/ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*, e então a pessoa versada na técnica pode, por exemplo, purificar adicionalmente o referido filtrado através de métodos conhecidos na técnica, que são aqui exemplificados abaixo, de um modo a remover as substâncias, que inibem a redução e/ ou a estimulação do crescimento. Depois disso, a pessoa versada na técnica pode novamente testar

o referido filtrada, quanto a que seja capaz de reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), tal como aqui acima descrito, e/ou estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*.

5 O termo “filtrado” também significa uma solução isenta de células ou uma suspensão do microorganismo da invenção, como aqui acima descrito, que tenha sido obtida como o sobrenadante de um procedimento de centrifugação de uma cultura do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias de ácido láctico, em qualquer líquido, meio
10 ou agente de tamponamento apropriado, conhecido daqueles versados na técnica. No entanto, o termo não deve ser construído, de modo algum, como limitativo. O filtrado compreende, por exemplo, macromoléculas, tais que DNA, RNA, proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídeos e os similares e/ ou micromoléculas, tais que aminoácidos, açúcares, ácidos lipídicos e os
15 similares, ou frações dos mesmos. Métodos para a preparação de filtrados de microorganismos são conhecidos na técnica. De um modo adicional, “filtrado” refere-se a vários métodos conhecidos na técnica. O método exato não é importante e qualquer método, que possa alcançar a filtração das células do microorganismo da invenção, tal como acima descrito, pode ser
20 empregado. O termo filtrado também inclui sobrenadantes da cultura, por exemplo, obtidos através da transformação em grânulos das células através de centrifugação e recuperando o sobrenadante resultante.

Em ma modalidade particularmente preferida, o filtrado, de um modo ainda mais preferido o sobrenadante da cultura, é adicionalmente
25 tratado, em particular por calor ou por liofilização, tal como acima descrito.

Um “fragmento” do microorganismo de acordo com a invenção abrange qualquer parte das células do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias de ácido láctico. De um modo preferido, o referido fragmento é uma fração de membrana, obtida através de

uma preparação de membrana. Preparações de membrana de microorganismos pertencentes ao gênero de *Lactobacillus* podem ser obtidas através de métodos conhecidos na técnica, por exemplo, através do emprego do método descrito em Rollan et al., *Int. J. Food Microbiol.* 70 (2001), 303-307, Matsuguchi et al. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 (2003), 259- 266 ou Stentz et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000), 4272 – 4278 ou Varmanen et al., *J. Bacteriology*, 182 (2000), 146- 154. De um modo alternativo, uma preparação celular total é também considerada. De um modo preferido, o derivado ou fragmento neste descrito do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, retém a capacidade para reduzir a concentração de peptídeo no ensaio (a) e/ ou no ensaio (A), como aqui acima descrito e/ ou para estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius* e não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou *Porphyromonas gingivalis*.

15 A presente invenção também refere-se a uma composição, que compreende o microorganismo acima selecionado de acordo com a presente invenção, forma inativada, derivado ou mutante ou um análogo ou fragmento dos mesmos. A composição é, de um modo preferido, uma composição cosmética ou uma composição farmacêutica, por exemplo, para o tratamento e/ ou a prevenção do mau odor e/ ou halitose, ou uma composição de ração ou de alimento.

25 Em uma modalidade preferida, a referida composição compreende um microorganismo, tal como acima descrito, em uma quantidade de entre 10^2 a 10^{12} células, preferivelmente de 10^3 a 10^8 células por mg em uma forma sólida da composição. No caso de uma forma líquida das composições, a quantidade de microorganismos está entre 10^2 a 10^{13} células por ml. No entanto, para composições específicas, a quantidade do microorganismo pode ser diferente, tal como aqui descrito.

A composição cosmética pode compreender um veículo ou

excipiente cosmeticamente ou oralmente aceitável. A composição farmacêutica pode compreender um veículo ou excipiente farmacêuticamente ou oralmente aceitável. A composição de alimento ou ração pode compreender um veículo ou excipiente oralmente aceitável.

5 A presente composição também refere-se ao uso de um microorganismo de acordo com a presente invenção, forma inativada, derivado ou mutante ou um análogo ou fragmento do mesmo para a preparação de uma composição compreendendo o microorganismo acima mencionado de acordo com a presente invenção, forma inativada, derivado ou
10 mutante ou um análogo ou fragmento do mesmo, em particular uma composição cosmética, uma composição de alimento ou de ração ou uma composição farmacêutica para a prevenção e/ ou o tratamento do mau odor oral e/ ou halitose.

Uma tal composição pode ser produzida através de um
15 método, que compreende o estágio de formular um microorganismo de acordo com a invenção com um veículo ou excipiente cosmeticamente, oralmente ou farmacêuticamente aceitável.

O termo “composição, como usado de acordo com a presente invenção, refere-se a (a) composição(ões), que compreende(m) pelo menos
20 um microorganismo ou mutante ou derivado, como acima descrito, ou uma forma inativada ou análogo ou mutante ou fragmento do referido microorganismo. É considerado que as composições, como usadas de acordo com a presente invenção, que são aqui abaixo descritas, compreendem os ingredientes antes mencionados em qualquer combinação. Elas podem,
25 opcionalmente, compreender pelo menos um ingrediente adicional, adequado para a prevenção e/ou mau odor oral e/ ou halitose. Deste modo, elas podem opcionalmente compreender qualquer combinação dos ingredientes adicionais aqui a seguir descritos. O termo “ingredientes adequados para a prevenção e/ ou mau odor e/ ou halitose” compreende compostos ou composições e/ ou

combinações dos mesmos, que são conhecidas na técnica como reduzindo o mau odor oral. Exemplos são os sais metálicos, tais que o cloreto de zinco, ou desinfetantes, tais que o álcool ou clorexidina, que são usados para tratar a língua. Um outro exemplo são os compostos, que auxiliam a manter o pH da saliva em um nível fisiologicamente normal. Estes podem ser substâncias tendo um efeito de elevação do pH ou de tamponamento do pH (por exemplo, bicarbonatos, carbamidas, fosfatos, proteínas e/ ou sais). É conhecido que as espécies microbianas associadas com as cáries e as infecções da mucosa favorecem um pH ácido; as espécies microbianas associadas com o desenvolvimento da doença periodontal favorecem um pH acima do normal, enquanto que as espécies microbianas associadas com uma boa saúde oral favorecem um pH neutro. Um outro exemplo são as bactérias probióticas (por exemplo, *Lactobacillus* e *Streptococcus*), tal como exposto na US 200707137, US 2006018843 e WO 2007/ 077210 ou as bactérias do ácido láctico pertencentes ao gênero *Weissella*, que inibem o crescimento de bactérias que produzem VSC através da interação com as mesmas e a geração de peróxido de hidrogênio sob condições aeróbicas e anaeróbicas, tal como descrito na US 2006045870. Finalmente, cepas de *Streptococcus salivarius* que produzem BLIS (substâncias inibidoras tipo bacteriocina) e extratos das mesmas poderiam ainda ser mencionadas neste contexto (US 2006171901).

É observado que a composição, como usada de acordo com a presente invenção, pode opcionalmente compreender um ou mais dos ingredientes opcionais antes mencionados, que são adequados para a prevenção e/ ou mau odor e/ ou halitose. Deste modo, a referida composição pode conter pelo menos dois, três, quatro, cinco, etc, isto é, “n” ingredientes opcionais, em que “n” é um inteiro maior do que 2, que não está limitado. Tais ingredientes opcionais podem ser combinados em qualquer possível combinação.

A composição pode estar em forma sólida, líquida ou gasosa e

pode estar, entre outros, sob a forma de (um) pó(s), (um) comprimido(s), (uma) preparação(ões) de filme, (uma) solução (ões), um aerossol (óis), grânulos, pílulas, suspensões, emulsões, cápsulas, xaropes, líquidos elixires, extratos, tintura ou extratos de fluido, ou em uma forma que seja particularmente adequada para a administração oral.

As preparações líquidas, adequadas para a administração oral, por exemplo xaropes, podem ser preparadas usando água, sacarídeos convencionais, tais que sacarose, sorbitol e frutose, glicóis, tais que polietileno glicol e propileno glicol, óleos, tais que óleo de semente de sésamo, óleo de oliva e óleo de soja, antissépticos, tais que éster de p-hidroxibenzoato, conservantes, tais que derivados de p-hidroxibenzoato, por exemplo metil p- hidroxibenzoato e benzoato de sódio, e outros materiais, tais que flavorizantes, por exemplo flavorizante de morango ou de menta.

Além disso, as preparações adequadas para a administração oral, por exemplo, comprimidos, pós e grânulos, podem ser produzidas usando sacarídeos convencionais, tais que sacarose, glicose, manitol, e sorbitol, amidos, tais que batata, trigo e milho, materiais inorgânicos, tais que carbonato de cálcio, sulfato de cálcio, hidrogeno carbonato de sódio, e cloreto de sódio, pós de planta, tais que celulose de cristal, pó de licor e pó de gengiano, excipientes, tais que pinedex, agentes de desintegração, tais que amido, ágar, pó de gelatina, celulose de cristal, carmelose sódica, carmelose cálcica, carbonato de cálcio, hidrogeno carbonato de sódio, e alginato de sódio, lubrificantes, tais que estearato de magnésio, talco, óleos vegetais hidrogenados, macrogol, e óleo de silicone, aglutinantes, tais que o álcool polvinílico, hidroxipropil celulose, metil celulose, etil celulose, carmelose, gelatina, e fluido de cola de amido, tensoativos, tais que o éster de ácido graxo, e os plastificantes, tais que a glicerina. Uma preparação(ões) de filme e pode(m) ser preparada (s) através de métodos conhecidos na técnica. Um exemplo para a preparação de um filme é fornecida no Exemplo 19 neste.

No caso de uma administração oral ordinária, a dose do microorganismo acima descrito, ou análogo ou fragmento, poderia ser (em peso seco) tal como aqui acima descrita com relação ao número celular ou com relação à massa, por exemplo, de 1 µg a 50 g, de 1 µg a 10 g, de 1 µg a 5 mg, de 1 µg a 1 mg ou qualquer outro peso por paciente, por dia, ou em várias porções diariamente. No caso da dosagem a animais não-humanos, além disso, a dose varia dependendo da idade e da espécie do animal e da natureza ou da severidade dos sintomas dos mesmos. Sem qualquer limitação específica, a dose para animais é de 0,1 mg a 10 g por 1 kg de peso corpóreo, de um modo preferido de 1 mg a 1 g por 1 kg de peso corpóreo uma vez ao dia ou em várias porções diárias. No entanto, estas doses e o número de dosagens irá variar dependendo das condições individuais.

De um modo preferido, a composição de acordo com a presente invenção é uma composição cosmética, que compreende ainda um veículo ou excipiente cosmeticamente aceitável. De um modo mais preferido, a referida composição é um dentífrico, goma de mascar, pastilha, colutório, enxaguadura bucal, fio dental ou fita dental.

A composição cosmética de acordo com a presente invenção compreende o microorganismo, forma inativada, mutante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo, como acima descrito, em conexão com a composição da invenção, e ainda um veículo cosmeticamente ou oralmente aceitável. De um modo preferido, como mencionado em conexão com a composição de acordo com a presente invenção, o microorganismo, forma inativada, mutante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo, é um microorganismo, forma inativada, mutante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo, como aqui acima descrito. De um modo preferido, a composição cosmética de acordo com a presente invenção destina-se ao uso em aplicações orais. Deste modo, ela pode estar sob a forma de uma pasta de dentes, dentífrico, pó dental, gel oral tópico, enxaguadura bucal, produto de

dentadura, pulverização bucal, pastilha, comprimido oral, goma de mascar, fio dental ou fita dental.

O termo “veículo oralmente ou cosmeticamente aceitável”, como aqui usado, compreende um veículo adequado, que pode ser usado para aplicar as presentes composições à cavidade oral, de um modo seguro e efetivo. Um tal veículo pode incluir materiais, tais que fontes de íon de fluoreto, agentes anticálcio adicionais, agentes de tamponamento, outros agentes abrasivos, fontes de peróxido, sais de bicarbonato de metal alcalino, materiais de espessamento, umectantes, água, tensoativos, dióxido de titânio, sistema flavorizante, agentes edulcorantes, xilitol, agentes colorantes, e misturas dos mesmos. O termo “quantidade segura e eficaz”, como aqui suado, compreende uma quantidade suficiente para limpar os dentes e reduzir o manchamento/ placa/ gengivite/ cálculo, sem prejudicar os tecidos e as estruturas da cavidade oral.

O pH das composições aqui presentemente descritas está, de um modo preferido, em uma faixa de cerca de 3,0 a cerca de 9,0, com o pH preferido sendo de cerca de 5,5 a cerca de 9,0 e o pH mais preferido sendo de 7,0 a cerca de 8,5 ou 9,0.

A composição cosmética é um produto, que no curso ordinário de uso, não é intencionalmente engolido para propósitos de administração sistêmica de agentes terapêuticos particulares, mas é, de preferência, retido na cavidade oral durante um período de tempo suficiente para contatar substancialmente todas as superfícies dentais e/ ou tecidos orais para propósitos de atividade oral. A composição oral pode ser uma composição oral de fase única ou pode ser uma combinação de duas ou mais composições orais.

O termo “dentifricio”, como aqui usado, compreende pasta, gel, ou formulações líquidas, a não ser que especificado de um outro modo. A composição de dentifricio pode estar em qualquer forma desejada, tal que

profundamente listada, superficialmente listada, em várias camadas, tendo o gel circundando a pasta, ou em qualquer combinação dos mesmos. A composição de dentifrício pode estar contida em um compartimento fisicamente separado de um dispensador e ser dispensada lado a lado. As composições de dentifrício são, por exemplo, descritas na EP- B1 0 617 608.

Composições de dentifrício preferidas são descritas nos Exemplos 13 a 16. Em adição aos componentes acima descritos, as composições de dentifrício desta invenção podem conter uma variedade de ingredientes de dentifrício opcionais, alguns dos quais são descritos abaixo.

Os ingredientes opcionais incluem, por exemplo, mas não estão limitados a, adesivos, agentes contra o suor, agentes flavorizantes, agentes adoçantes, agentes antiplaca adicionais, abrasivos adicionais, e agentes colorantes. Estes e outros componentes opcionais são ainda descritos, por exemplo, na US 5.004. 597, US 4.885. 155, US 3.959. 458 e US 3.937.807.

Por exemplo, a pasta de dentes pode incluir tensoativos, agentes de quelação, fontes de fluoreto, substâncias ativas para o branqueamento dos dentes e substâncias de modificação da cor dental, agentes de espessamento, umectantes, agentes flavorizantes e adoçantes, sal de bicarbonato de metal alcalino, veículos mistos e/ ou outros agentes ativos.

Um dos agentes opcionais preferidos, como usado de acordo com a presente invenção, é um tensoativo, de modo preferido um selecionado a partir do grupo, que consiste de tensoativos de sarcosinato, tensoativos de isetionato e tensoativos de taurato. São preferidos para o uso neste os sais de metal alcalino ou amônio destes tensoativos. Aqui são mais preferidos os sais de sódio e de potássio dos que se seguem: sarcosinato de lauroíla, sarcosinato de miristoíla, sarcosinato de palmitoíla, sarcosinato de estearoíla, e sarcosinato de oleoíla.

Um outro agente opcional preferido é um agente de quelação, tal que o ácido tartárico e os sais farmacêuticamente aceitáveis do mesmo,

ácido cítrico e citratos de metal alcalino e misturas dos mesmos. Os agentes de quelação são capazes de complexar o cálcio encontrado nas paredes celulares das bactérias. Os agentes de quelação podem também romper a placa através da remoção de cálcio a partir das pontes de cálcio, que ajudam a
5 manter esta biomassa intata.

É comum que um composto de fluoreto solúvel em água adicional esteja presente em dentifrícios e em outras composições orais em uma quantidade suficiente para fornecer uma concentração de íon de fluoreto na composição a 25°C, e/ ou quando ele é usado de a partir de cerca de
10 0,0025% a cerca de 5,0%, em peso, de um modo preferido de cerca de 0,005% a cerca de 2,0%, em peso, de um modo a prover uma eficácia anticárie. Uma ampla variedade de materiais que fornecem íon de fluoreto podem ser empregados como fontes de fluoreto solúvel nas presentes composições. Exemplos de materiais que fornecem íon de fluoreto adequados são
15 encontrados na US 3.535.421 e na US 3.678.154. Fontes de íon de fluoreto representativas incluem o fluoreto estanoso, fluoreto de sódio, fluoreto de potássio, monofluorofosfato de sódio, e muitas outras. O fluoreto estanoso e o fluoreto de sódio são particularmente preferidos, assim como misturas dos mesmos.

20 As composições de cuidado oral como as da presente invenção podem também compreender substâncias ativas para o branqueamento dos dentes, incluindo agentes de alveamento ou de oxidação, tais que peróxidos, perboratos, percarbonatos, peroxiácidos, persulfatos, cloritos metálicos, e combinações dos mesmos. Os compostos de peróxido adequados incluem o
25 peróxido de hidrogênio, peróxido de uréia, peróxido de cálcio e misturas dos mesmos. Um percarbonato preferido é o percarbonato de sódio. Outros agentes de branqueamento adequados incluem persulfatos de potássio, amônio, sódio e lítio e mono- e tetraidratos de perborato, e peróxi hidrato de pirofosfato de sódio. Os cloritos de metal adequados incluem o clorito de

cálcio, clorito de bário, clorito de magnésio, clorito de lítio, clorito de sódio, e o clorito de potássio. O clorito preferido é o clorito de sódio. Substâncias ativas de branqueamento adicionais podem ser o hipoclorito e o dióxido de cloro.

5 Em adição a agentes de alvejamento como agentes de branqueamento dos dentes, substâncias de modificação da cor dental podem ser consideradas dentre as substâncias ativas para o cuidado oral, úteis na presente invenção. Estas substâncias são adequadas para modificar a cor dos dentes, de um modo a satisfazer o consumidor. Estas substâncias
10 compreendem partículas que, quando aplicadas sobre a superfície dental, modificam aquela superfície em termos de absorção e, ou reflexão da luz. Tais partículas proporcionam um benefício de aparência quando um filme contendo tais partículas é aplicado sobre as superfícies de um dente ou dentes.

 Na preparação de uma pasta dental ou de géis, é necessário
15 adicionar algum material de espessamento, de um modo a prover uma consistência desejável da composição, de um modo a prover características de liberação de substância ativa desejável quando do uso, de um modo a prover a estabilidade em prateleira, e de um modo a prover a estabilidade da composição, etc. Agentes de espessamento preferidos são os polímeros de
20 carboxivinila, carragenano, hidroxietil celulose, LAPONITE® (fabricado pela Rockwood Additives Limited) e sais solúveis em água de éteres de celulose, tais que carboximetil celulose de sódio e carboximetil hidroxietil celulose. Gomas naturais, tais que a goma caraia, goma xantano, goma arábica, e a goma tragacanto podem ser também usadas. O silicato de magnésio e
25 alumínio coloidal ou a sílica finamente dividida podem ser usados como parte do agente de espessamento, de um modo a melhorar ainda mais a textura.

 Um outro componente opcional dos veículos orais, tópicos, das composições da presente invenção é um umectante. O umectante evita com que as composições de pasta de dentes endureçam mediante a exposição

ao ar, para proporcionar às composições uma sensação úmida na boca, e, para umectantes particulares, para conferir uma doçura desejável de flavorizante às composições de pasta de dentes. O umectante, em uma base de umectante pura, compreende, de um modo geral, de cerca de 0% a cerca de 70%, de um modo preferido de cerca de 5% a cerca de 25%, em peso, das composições neste. Umectantes adequados para o uso nas composições da presente invenção incluem os álcoois poliídricos comestíveis, tais que glicerina, sorbitol, xilitol, butileno glicol, polietileno glicol, e propileno glicol, em especial sorbitol e glicerina.

10 Agentes flavorizantes e adoçantes podem ser também adicionados às composições. Agentes flavorizantes adequados incluem o óleo de gaultéria, óleo de menta, óleo de hortelã, óleo de semente de cravo, mentol, anetol, salicilato de metila, eucaliptol, cássia, acetato de l-mentila, sálvia, eugenol, óleo de salsa, oxanona, alfa-irisona, manjerona, limão, laranja, propenil guaetol, canela, vanilina, timol, linalol, cinamaldeído glicerol acetal, conhecido como CGA, e misturas dos mesmos. Agentes flavorizantes são usados, de um modo geral, nas composições em níveis de a partir de cerca de 0,001% a cerca de 5%, em peso, da composição.

20 Os agentes edulcorantes, que podem ser usados, incluem sacarose, glicose, sacarina, dextrose, levulose, lactose como aqui acima descrito, manitol, sorbitol, frutose, maltose, xilitol, sais de sacarina, taumatina, aspartame, F-triptofano, diidrochalconas, acessulfame e sais de ciclamato, em especial o ciclamato de sódio e a sacarina sódica, e misturas dos mesmos. Uma composição contém, de um modo preferido, de cerca de 25 0,1 % a cerca de 10% destes agentes, de um modo preferido de cerca de 0,1 % a cerca de 1%, em peso, da composição.

A composição da presente invenção pode também incluir um sal de bicarbonato de metal alcalino. Os sais de bicarbonato de metal alcalino são solúveis em água e a não ser que estabilizados, tendem a liberar dióxido

de carbono em um sistema aquoso. Bicarbonato de sódio, também conhecido como soda calcinada, é o sal de bicarbonato de metal alcalino preferido. A presente composição pode também conter de cerca de 0,5% a cerca de 30%, de um modo preferido de cerca de 0,5% a cerca de 15%, e de um modo ainda mais preferido de cerca de 0,5% a cerca de 5% de um sal de bicarbonato de metal alcalino.

A água empregada na preparação de composições orais comercialmente adequadas deve, de um modo preferido, ser de um baixo conteúdo iônico e livre de impurezas orgânicas. A água compreende, de um modo geral, de cerca de 10% a cerca de 50%, e de um modo preferido de cerca de 20% a cerca de 40%, em peso, das composições de pasta de dentes neste. Estas quantidades de água incluem a água livre, que é adicionada, além daquela que é introduzida com outros materiais, tais que com sorbitol. O dióxido de titânio pode ser também adicionado à presente composição. O dióxido de titânio é um pó branco, que acresce opacidade às composições. O dióxido de titânio compreende, de um modo geral, de cerca de 0, 25% a cerca de 5%, em peso, das composições de dentifício.

O pH das composições da invenção é ajustado, de um modo preferido, através do uso de agentes de tamponamento. Os agentes de tamponamento, como aqui usados, referem-se a agentes, que podem ser usados para ajustar o pH das composições a uma faixa de cerca de 4,5 a cerca de 9,5. Os agentes de tamponamento incluem fosfato monossódico, fosfato trissódico, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, pirofosfato ácido sódico, ácido cítrico e citrato de sódio. Os agentes de tamponamento podem ser administrados em um nível de a partir de cerca de 0,5 % a cerca de 10%, em peso, das presentes composições. O pH das composições de dentifício é medido a partir de 3:1 de uma suspensão aquosa de dentifício, por exemplo, 3 partes de água para 1 parte de pasta de dentes.

Outros agentes opcionais, que podem ser usados nas presentes

composições, incluem dimeticona copolióis selecionados a partir de alquil e alcóxi dimeticona copolióis, tais que alquil dimeticona copolióis C12 a C20 e misturas dos mesmos. É altamente preferido um cetil dimeticona copoliol, comercializado sob a Marca Registrada Abil EM 90. O dimeticona copoliol está presente, de um modo geral, em um nível de a partir de cerca de 0,01% a cerca de 25%, de um modo preferido de cerca de 0,1 % a cerca de 5%, e de um modo mais preferido de cerca de 0,5% a cerca de 1,5%, em peso. Os dimeticona copolióis auxiliam no provimento de benefícios para a sensação dos dentes positiva. Outros veículos úteis incluem as formulações de dentifício bifásicas, tais que aquelas expostas na US 5.213.790; US 5.145.666; US 5.281.410; US 4.849.213 e US 4.528.180.

A composição cosmética pode também incluir outros agentes ativos, tais que agentes antimicrobianos. Incluídos entre tais agentes estão os agentes antimicrobianos não- catiônicos insolúveis em água, tais que os éteres difenílicos halogenados, compostos fenólicos, incluindo fenol e os seus homólogos, mono- e poli- alquil e halofenóis aromáticos, resorcinol e os seus derivados, compostos bisfenólicos e salicil anilidas halogenados, ésteres benzóicos, e carbanilidas halogenadas. Os agentes antimicrobianos solúveis em água incluem os sais de amônio quaternários e os sais de bis- biguanida, dentre outros. O monofosfato de triclosano é um agente antimicrobiano solúvel em água adicional. Os agentes de amônio quaternários incluem aqueles, nos quais um ou dois dos substitutos no nitrogênio quaternário possuem um comprimento de cadeia de carbono (tipicamente um grupo alquila)) de cerca de 8 a cerca de 20, de um modo típico de cerca de 10 a cerca de 18 átomos de carbono, enquanto que os substitutos remanescentes (tipicamente um grupo alquila ou benzila) possuem um número mais baixo de átomos de carbono, tal que de cerca de 1 a cerca de 7 átomos de carbono, tipicamente grupos metila ou etila. Brometo de dodecil trimetil amônio, cloreto de tetradecil piridínio, brometo de domifeno, cloreto de N-tetradecil-

4-etil piridínio, brometo de dodecil dimetil (2- fenoxietil) amônio, cloreto de benzil dimetilestearil amônio, cloreto de cetil piridínio, 5-amino-1,3- bis (2-etil-hexil)-5-metil hexa hidropirimidina quaternizado, cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio e cloreto de metil benzetônio são exemplares de agentes antibacterianos de amônio quaternário típicos. Outros compostos são bis [4)R-amino)-1-piridínio] alcanos, tal como exposto na US 4. 206.215. Outros agentes antimicrobianos, tais que bisglicinato de cobre, glisinato de cobre, citrato de zinco e lactato de zinco podem ser também incluídos. As enzimas são um outro tipo de substância ativa, que pode ser usada nas presentes composições. Enzimas úteis incluem aquelas, que pertencem à categoria de proteases, enzimas líticas, inibidores de matriz de placa e oxidases: as proteases incluem papaína, pepsina, tripsina, ficina, bromelina; as enzimas líticas da parede celular incluem lisozima; os inibidores de matriz de placa incluem dextranases, mutanases e as oxidases incluem glicose oxidase, lactato oxidase, galactose oxidase, oxidase de ácido úrico, as peroxidases incluindo peroxidase de raiz forte, mieloxidase, lactoperoxidase, cloroperoxidase. As oxidases também possuem a atividade de branqueamento/ limpeza, em adição a propriedades antimicrobianas. Tais agentes são expostos na US 2. 946.725 e na US 4.051.234. Outros agentes antimicrobianos incluem clorexidina, triclosano, monofosfato de triclosano, e óleos flavorizantes, tais que o timol. O triclosano e outros agentes destes tipo estão expostos na US 5.015. 466 e na US 4. 894. 222. Estes agentes, que proporcionam benefícios anti-placa, podem estar presentes em níveis de a partir de cerca de 0,01 % a cerca de 5, 0%, em peso, da composição de dentifrício.

25 O termo “ goma de mascar”, como aqui definido, compreende uma composição de confeitaria, que é adequada para mascar e que compreende qualquer quantidade adequada de elastômero, conhecido daqueles versados na técnica, de um modo preferido uma quantidade de 2% ou maior, em peso, da composição. Componentes de pastilhas e de goma de

mascar adequados são, por exemplo, expostos na US 4.083.955; US 6.770.264 ou US 6.270.781. As pastilhas preferidas são aquelas descritas nos Exemplos 11 e 12. Uma composição de goma de mascar preferida é descrita no Exemplo 17.

5 As composições de acordo com a presente invenção compreendem, de um modo preferido, um elastômero ou uma mistura de vários elastômeros diferentes. Os materiais elastoméricos são geralmente conhecidos na técnica, mas exemplos ilustrativos incluem borracha de estireno- butadieno (SBR), gomas sintéticas; poliisobutileno e copolímeros de 10 isobutileno- isopreno; gomas naturais; chicletes; borracha natural; jetulong; balata; gutapércia; lechi caspi; sorva; e misturas dos mesmos. As composições da presente invenção compreendem, de um modo preferido, de cerca de 2 % a cerca de 30%, de um modo mais preferido de cerca de 5% a cerca de 25%, em peso, de elastômero. Estes níveis são determinados pela textura final desejada 15 da goma de mascar, pois quando o nível total de elastômero está abaixo de cerca de 2 % a composição base carece de elasticidade, textura de goma de mascar e coesividade, enquanto que, em níveis acima de cerca de 30%, a formulação apresenta-se dura, gumosa e mantém uma textura de goma de mascar dura. Os solventes elastoméricos estão também presentes, de um 20 modo preferido, nas composições da presente invenção, pois eles auxiliam ao amolecimento do componente elastomérico. Exemplos preferidos de solventes elastoméricos para o uso neste caso incluem o éster de pentaeritritol de colofônia de madeira parcialmente hidrogenada, éster de pentaeritritol de colofônia de madeira, éster de glicerol de colofônia parcialmente dimerizada, 25 éster de glicerol de colofônia polimerizada, éster de glicerol de talóleo, colofônia de goma ou madeira, éster de glicerol de colofônia parcialmente hidrogenada, éster metílico de colofônia parcialmente hidrogenada, e misturas dos mesmos. As composições da presente invenção compreendem, de um modo preferido, de cerca de 2 % a cerca de 50%, de um modo mais preferido

de cerca de 10% a cerca de 35%, em peso, do solvente elastomérico.

As pastilhas de acordo com a presente invenção podem ser preparadas, por exemplo, através de técnicas reconhecidas na técnica para a formação de comprimidos prensados, em que o dissacarídeo é dispersado sobre um veículo sólido compressível, opcionalmente combinado com quaisquer auxiliares de formação de comprimido apropriados, tais que um lubrificante (por exemplo, o estearato de magnésio) e é prensado sob a forma de comprimidos. O componente do veículo sólido para tais formulações de formação de comprimido pode ser um sólido solúvel em saliva, tal que um amido solúvel em água fria ou um monossacarídeo, de um modo tal que a pastilha será prontamente dissolvida na boca, de um modo a liberar o ácido de dissacarídeo contido na solução de saliva para o contato com e a absorção pela mucosa oral/ faríngea, quando a pastilha é mantida na boca. O pH das formulações acima descritas pode estar em uma faixa de cerca de 4 a cerca de 8,5.

As pastilhas de acordo com a presente invenção podem ser também preparadas usando outras técnicas de formulação de dosagem unitária sólida reconhecidas.

Uma colutório ou de enxaguadura bucal de acordo com a presente invenção poderia, de um modo preferido, ser tal como se segue:

	A	Olium menthae	1,2 partes
		Tinctura Arnicae	3,0 partes
		Tinctura Myrrhae	3,0 partes
		Tween	5,0 partes
25	B	Spiritus 90%	50,0 partes
	C	Benzoato de Sódio	0,2 partes
		Agente adoçante (por ex., aspartame)	0,02 partes
		Água destilada	até 100,

A deve ser bem misturado, B é adicionado sob agitação e C é

adicionado subsequentemente. O líquido claro resultante deve ser filtrado dentro de 48 horas após a preparação. Uma outra colutório preferida é descrita no Exemplo 18.

5 Independentemente da forma de dosagem, líquida ou sólida, em uma modalidade preferida da presente invenção, a forma de dosagem é mantida na boca do paciente durante um período de tempo, de um modo a promover o contato do microorganismo, ou análogo ou fragmento de um microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático, com a cavidade oral do paciente.

10 Os termos “fio dental” e “fita dental”, como aqui usados, referem-se a um material para desalojar e remover o material alimentar em decomposição, que foi acumulado nas superfícies interproximal e subgingival e para desalojar e remover bactérias, placa e/ ou cálculo, que foi acumulado na cavidade oral. O fio dental ou a fita dental podem ainda conter, em adição
15 aos microorganismos de acordo com a presente invenção, como aqui acima descrito, agentes de limpeza, abrasivos, ingredientes para o controle do tártaro, agentes branqueadores, tensoativos e/ ou ingredientes ativos, tais que fluoretos, agentes antimicrobianos, agentes quimioterapêuticos, ou antibióticos. Outros agentes adicionais são agentes antiplaca, agentes
20 flavorizantes e agentes colorantes. O fio dental ou a fita dental pode estar em qualquer forma adequada, conhecida daqueles versados na técnica, por exemplo, sob a forma de PTFE (Teflon); os fios dentais são descritos, por exemplo, na US 3.664. 915, US 3. 953.566, US 3. 952.153, US 4. 096. 227, US 4. 187. 390, US 4. 256. 806, US 4. 385.093, US 4. 478. 665, US 4.776.358, US 5.033.488, US 5. 209. 251, US 5.220.932, US 5. 518.012, US 5.718.251, US 5.765.576 ou US 5.911.228, sob a forma de dispositivos interproximais monofilamentares descritos, por exemplo, na US 3.800. 812, US 4. 974.615, US 5.760.117, US 5.433. 226, US 5. 479. 952, US 5.503.842, US 4. 974. 615, US 5.670.117, US 5.433. 226, US 5. 479. 952, US 5.503.

842, US 5.755.243, US 5.884. 639, US 6.003.525 ou US 6.027.592, ou sob a forma de fitas bicomponentes. De um modo preferido, o fio dental ou a fita dental pode estar sob a forma de um monofilamento revestido elastomérico como descrito, por exemplo, na US 20050226820 ou sob a forma de uma fita dental termoplástica orientada como descrito, por exemplo, na US 20020144704.

As composições cosméticas, como aqui acima descrito, podem ser usadas no âmbito da administração oral humana, assim como no âmbito da administração oral veterinária, de um modo preferido para mamíferos não-humanos, de um modo mais preferido para animais domésticos. Se a composição cosmética for usada no âmbito da administração oral veterinária, a composições pode conter ingredientes adicionais, adequados para uma tal administração, como conhecido por uma pessoa versada na técnica.

A presente invenção também se refere ao uso de um microorganismo de acordo com a invenção ou de uma forma inativada do mesmo, para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento e/ ou a profilaxia do mau odor e/ ou halitose. De um modo preferido, a composição farmacêutica compreende ainda um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

As composições farmacêuticas compreendem uma quantidade terapeuticamente efetiva do microorganismo da presente invenção e podem ser formuladas em várias formas, por exemplo, em uma forma liofilizada sólida, líquida, pulverizada, aquosa.

A composição farmacêutica pode ser administrada com um veículo farmacêuticamente aceitável a um paciente, como aqui descrito. Em uma modalidade específica, o termo “ farmacêuticamente aceitável “ significa aprovado por uma agência reguladora ou uma outra farmacopéia genericamente reconhecida para o uso em animais, e de um modo mais particular em seres humanos.

O termo “veículo” refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente, ou veículo, com o qual o agente terapêutico é administrado. Um tal veículo é farmacologicamente aceitável, isto é, não- tóxico para um receptor na dosagem e na concentração empregadas. Ele é, de um modo preferido, isotônico, hipotônico ou fracamente hipertônico e possui uma força iônica relativamente baixa, tal como provido por uma solução de sacarose. Tais veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais que água e óleos, incluindo aqueles de origem de petróleo, animal, vegetal ou sintética, tais que o óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de sésamo, e os similares. As soluções salinas e as soluções de dextrose aquosa e de glicerol podem ser também empregadas como veículos líquidos, em particular para soluções injetáveis. Excipientes farmacêuticos adequados incluem amido, glicose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, gesso, sílica gel, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, íon sódico, leite desnatado seco, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e os similares. O excipiente pode conter lactose como aqui acima descrito, de um modo preferido ele sendo livre de lactose. A composição, se desejado, pode também conter quantidades menores de agentes de umectação ou de emulsificação, ou agentes de tamponamento de pH. Estas composições podem assumir a forma de soluções, suspensões, emulsão, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, formulações para a liberação sustentada e os similares. A formulação oral pode incluir veículos padrão, tais que os graus farmacêuticos de manitol, amido, estearato de magnésio, sacarina sólida, celulose, carbonato de magnésio, etc. Exemplos de veículos farmacêuticos adequados são descritos em “Remington's Pharmaceutical Sciences” por E. W. Martin. Leite desnatado, pó de leite desnatado, produtos contendo não- leite e não- lactose podem ser também empregados. O pó de leite desnatado é convencionalmente suspenso em solução salina tamponada com fosfato (PBS), autoclavado ou filtrado para erradicar os contaminantes proteicos e vivos, e então secado por

congelamento, secado por calor, secado a vácuo, ou liofilizado. Alguns outros exemplos de substâncias, que podem servir como veículos farmacêuticos, são açúcares, tais que glicose e sacarose; amidos, tais que amido de milho e amido de batata; celulose e seus derivados, tais que carboximetil celulose de sódio, etil celulose e acetatos de celulose; tragacanto pulverizado; malte ;
5 gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnésio; sulfato de cálcio; carbonato de cálcio; óleos vegetais, tais que óleos de amendoim, óleo de caroço de algodão, óleo de sésamo, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de teobroma; polióis, tais que propileno glicol, glicerina, sorbitol, manitol e
10 polietileno glicol; ágar; ácidos algínicos; água isenta de pirogênio; solução salina isotônica; extratos de oxicoco; e solução de tampão de fosfato; assim como outras substâncias compatíveis não- tóxicas, usadas em formulações farmacêuticas, tais que Vitamina C, estrogênio e equináceos, por exemplo. Os agentes de umectação e lubrificantes, tais que lauril sulfato de sódio, assim
15 como os agentes de coloração, agentes de aromatização, lubrificantes, excipientes, agentes de formulação de comprimidos, estabilizadores, antioxidantes e conservantes, podem também estar presentes.

Vários veículos e/ ou excipientes, adequados para a administração ora, que são bem conhecidos na técnica, podem ser usados para
20 o propósito desta invenção. A composição pode, se desejado, conter ainda vários aditivos conhecidos, tais que, por exemplo, conservantes, agentes de endurecimento, lubrificantes, emulsificantes,estabilizadores, essências e os similares. Tais composições irão conter uma quantidade terapeuticamente efetiva dos compostos antes mencionados, preferivelmente em forma
25 purificada, junto com uma quantidade adequada do veículo, de um modo a prover a forma para a administração apropriada ao paciente.

De um modo geral, os ingredientes são supridos ou separadamente ou misturados juntos em uma forma de dosagem unitária, por exemplo, como um pó liofilizado seco ou como um concentrado isento de

água, em um recipiente hermeticamente vedado, tal que uma ampola ou sachê, que indica a quantidade de agente ativo. Quando a composição deve ser administrada através de infusão, ela pode ser dispensada com uma garrafa de infusão contendo água de grau farmacêutico estéril ou uma solução salina.

5 A composição farmacêutica da invenção pode ser formulada como uma forma neutra ou salina. Os sais farmacêuticamente aceitáveis incluem aqueles formados com ânions, tais que aqueles derivados a partir de ácidos clorídrico, fosfórico, acético, tartárico, etc., e aqueles formados com cátions, tais que aqueles derivados de sódio, potássio, amônio, cálcio, 10 hidróxidos férricos, isopropil amina, trietil amina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Os ensaios *in vitro* podem ser empregados, de um modo opcional, para auxiliar a identificar as faixas de dosagem ótimas. A dose precisa a ser empregada na formulação irá também depender da via de 15 administração, e da seriedade da doença ou do distúrbio, e deve ser decidida de acordo com o julgamento do médico assistente e das circunstâncias do paciente. Doses efetivas podem ser extrapoladas a partir de curvas de dose-resposta, derivadas a partir de sistema de teste de modelo animal e *in vitro*. De um modo preferido, a composição farmacêutica é administrada diretamente 20 ou em combinação com um adjuvante. Os adjuvantes podem ser selecionados a partir do grupo, que consiste de uma cloroquina, de compostos polares próticos, tais que propileno glicol, polietileno glicol, glicerol, EtOH, 1-metil L-2-pirrolidona ou os seus derivados, ou compostos polares apróticos, tais que sulfóxido de dimetila (DMSO), sulfóxido de dietila, sulfóxido de di-n- 25 propila, dimetil sulfona, sulfolano, dimetil formamida, dimetil acetamida, tetrametil uréia, acetonitrila ou os seus derivados. Estes compostos são adicionados em condições que respeitem as limitações de pH. A composição, como usada de acordo com a presente invenção, pode ser administrada a um vertebrado. “Vertebrado”, como aqui usado, tem a intenção de ter o mesmo

significado que comumente entendido por aquele de habilidade ordinária na técnica. Em particular, “vertebrado” compreende mamíferos, e de um modo mais particular seres humanos.

5 O termo “administrado” compreende a administração de uma dose terapêuticamente efetiva da composição antes mencionada. Por “dose terapêuticamente efetiva” é compreendida uma dose, que produz os efeitos para os quais ela é administrada, de um modo preferido este efeito sendo anticariogênico. A dose exata irá depender do propósito do tratamento, e poderá ser determinada por aquele versado na técnica através do uso de técnicas conhecidas. Como é conhecido na técnica e descrito acima, ajustes quanto à distribuição sistêmica contra a localizada, idade, peso corpóreo, saúde em geral, sexo, dieta, tempo de administração, interação da droga e severidade da condição podem ser necessários, e poderão ser determinados através de experimentação de rotina por aqueles versados na técnica.

15 Os métodos são aplicáveis tanto a aplicações de terapia humana, como veterinária. Os compostos aqui descritos, tendo a atividade terapêutica desejada, podem ser administrados em um veículo fisiologicamente aceitável a um paciente, tal como aqui descrito. Dependendo do modo de introdução, os compostos podem ser formulados em uma variedade de modos, tal como abaixo discutido. A concentração do composto terapêuticamente ativo na formulação pode variar de cerca de 0,1- 100%, em peso. Os agentes podem ser administrados de um modo isolado ou em combinação com outros tratamentos.

25 A administração da composição farmacêutica poderá ser efetuada em uma variedade de modos, tal como discutido acima, incluindo, mas não limitada a, por via oral, subcutânea, intravenosa, intrarterial, intranodal, intramedular, intratecal, intraventricular, intranasal, intrabronquial, transdérmica, intranodal, intrarretal, intraperitonal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, retal, ou intraocular.

De um modo preferido, a administração é oral ou bucal. O médico assistente e os fatores clínicos irão determinar o regime de dosagem. Como é bem conhecido na técnica médica, as dosagem para qualquer paciente dependem de muitos fatores, que incluem o tamanho do paciente, a área superficial corporal, e o composto particular a ser administrado, sexo, tempo e via de administração, saúde em geral, e outras drogas que estejam sendo administradas concorrentemente. Uma dose típica pode estar, por exemplo, na faixa de 0,001 a 1000 µg; no entanto, doses abaixo ou acima desta faixa exemplar são consideradas, em especial considerando os fatores antes mencionados.

As dosagens são preferivelmente fornecidas uma vez por semana, no entanto, durante o progresso do tratamento, as dosagens podem ser administradas em intervalos de tempo muito mais longos e, caso necessário, podem ser administradas em intervalos de tempo muito mais curtos, por exemplo, diariamente. Em um caso preferido, a resposta imune é monitorada usando os métodos aqui descritos e outros métodos conhecidos daqueles versados na técnica e as dosagens são otimizadas, por exemplo, no tempo, quantidade, e/ ou composição. O progresso pode ser monitorado através de avaliação periódica. A composição farmacêutica da invenção pode ser administrada por via local ou sistêmica. É também considerado que as composições farmacêuticas são empregadas em abordagens co-terapia, isto é, em co-administração com outros medicamentos ou drogas. Por exemplo, outras drogas para a prevenção, o tratamento ou a melhora de cáries, que são aqui descritas.

Em uma outra modalidade, a presente invenção refere-se ao uso de um microorganismo de acordo com a presente invenção para a preparação de uma composição para o tratamento e/ ou a profilaxia do mau odor oral e/ ou halitose, em que a composição é um gênero alimentício ou uma ração, que compreende um microorganismo de acordo com a presente

invenção, forma inativada do mesmo, mutante, derivado, análogo ou fragmento. De um modo preferido, uma composição sob a forma de um gênero alimentício ou de uma ração é uma composição de alimento ou ração, que compreende um microorganismo, forma inativada, mutante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo, tal como descrito acima, que compreende ainda um veículo ou excipiente oralmente aceitável.

“Alimento” ou “ração” compreende qualquer gênero comestível, palatável e/ ou bebida para mamíferos, por exemplo, para seres humanos ou animais, por exemplo, animais domésticos, tal como aqui descrito. Os alimentos e rações são descritos neste em um outro local. Um “veículo oralmente aceitável” é aqui acima descrito e é, de um modo preferido, não – tóxico e de grau alimentar ou ração. No entanto, este termo também abrange os veículos mencionados em conexão com a composição farmacêutica, como usada de acordo com a presente invenção.

De acordo com a presente invenção, o termo “gênero alimentício” abrange todos os alimentos comestíveis e que possam ser sorvidos, e bebidas. Deste modo, o microorganismo, forma inativada, derivado, análogo ou fragmento do mesmo, pode ser incluído em um alimento ou bebida. Estes são, por exemplo, gomas, pulverizações, bebidas, doces, fórmulas infantis, sorvetes, sobremesas congeladas, coberturas para salada doces, preparações lácteas, queijo, coalho, iogurte isento de lactose, leite acidificado, café capucino ou café cremoso.

Os produtos à base de leite estão incluídos dentro da abrangência da invenção. O leite é, no entanto, entendido como compreendendo aquele de origem animal, tal que de vaca, cabra, ovelha, búfalo, zebra, cavalo, jumento, ou camelo, e os similares. O leite pode estar em um estado nativo, pode ser um leite reconstituído, um leite desnatado ou um leite suplementado com os compostos necessários ao crescimento de bactérias ou para o processamento subsequente de leite fermentado, tais que

gordura, proteínas de um extrato de levedura, peptona e/ ou um tensoativo, por exemplo. O termo leite também aplica-se ao que é comumente denominado leite vegetal, ou seja, dizer extratos de material de planta, que foram tratados, ou de um outro modo, tais que plantas leguminosas (feijão de

5 soja, ervilha, lentilha e os similares) ou sementes oleosas (colza, soja, sésamo, algodão, e os similares), cujo extrato contém proteínas em solução ou em suspensão coloidal, que são coaguláveis através de ação química, através de fermentação ácida e/ ou por calor. Finalmente, a palavra leite também denota misturas de leites animais e de leites vegetais.

10 Quando o microorganismo desta invenção, forma inativada, ou derivado ou análogo ou fragmento do mesmo são adicionados a iogurte e os similares tendo conteúdos similares, é suficiente, de um modo geral, adicionar o microorganismo desta invenção em uma concentração de cerca de 10^5 - 10^7 células/ ml.

15 Tal bebida alimentar ou alimento pode ser produzido através de um método geral para a produção de alimentos e bebidas ou rações, incluindo a adição do ingrediente ativo a um material cru ou cozido do alimento, bebida, ou ração. O alimento, bebida ou ração de acordo com a presente invenção pode ser moldado e granulado do mesmo modo que

20 geralmente usado para alimentos, bebidas ou rações. O método de moldagem e de granulação inclui métodos de granulação, tais que a granulação em leito fluido, a granulação por agitação, a granulação por extrusão, a granulação por laminação, a granulação com corrente gasosa, a granulação por moldagem e compactação, a granulação por craqueamento, a granulação por pulverização,

25 e a granulação por injeção, métodos de revestimento, tais que, revestimento em panela, revestimento de camada fluida e o revestimento a seco, secagem por baforadas, método de vapor em excesso, método de esteira de espuma, métodos de expansão, tais que o método de incubação em microondas e métodos de extrusão, com máquinas de granulação por extrusão e extrusoras.

O alimento, bebida ou ração da presente invenção inclui qualquer alimento, bebida ou ração, que compreenda o microorganismo da invenção, forma inativada, derivado ou análogo ou fragmento do mesmo como o ingrediente ativo. O ingrediente ativo no alimento, bebida ou ração não está limitado, de um modo específico, a qualquer concentração, desde que o alimento, bebida, ou ração resultante possa exercer a sua atividade de redução do mau odor oral. A concentração do ingrediente ativo é, de um modo preferido, de 0,001 a 100%, em peso, de um modo mais preferido de 0,01 a 100%, em peso, e de um modo ainda mais preferido de 0,1 a 100%, em peso, do alimento, bebida ou ração compreendendo um tal ingrediente ativo, ou com relação ao número celular daqueles aqui descritos.

Alimentos ou bebidas específicos, aos quais o ingrediente ativo é adicionado, incluem, por exemplo, sucos, bebidas refrescantes, sopas, chás, bebidas de leite azedo, produtos lácteos, tais que leites fermentados, sorvetes, manteiga, queijo, leite processado e leite desnatado, produtos de carne, tais que presunto, salsicha e hamburger, produtos em torta de carne de peixe, produtos de ovo, tais que rolos de ovo temperados, e coalhadas de ovo, confeitos, tais que biscoitos, geléias, aperitivos, e goma de mascar, pães, macarrões, conservas em salmoura, produtos defumados, peixes fritos e temperos. A forma do alimento ou bebida inclui, por exemplo, alimentos pulverizados, alimentos em folhas, alimentos em garrafa, alimentos enlatados, alimentos de retorta, alimentos em cápsula, alimentos em comprimidos e alimentos fluidos.

O alimento ou a bebida de acordo com a invenção, a serem ingeridos por crianças, são, de um modo preferido, composições nutritivas para crianças. Tais composições nutritivas para crianças incluem leite modificado preparado para crianças, leite decomposto em proteína, leite modificado nutricionalmente específico, ou alimentos para bebês e alimentos preparados para crianças pequenas. A forma da composição nutritiva para

crianças inclui, mas não está limitada, de um modo específico, a leites em pó secados e pulverizados e alimentos para bebê, e também incluem alimentos em geral, tais que sorvetes, leite fermentado, e gelatina para a ingestão infantil.

5 A composição nutritiva para crianças de acordo com a presente invenção é composta principalmente de proteína, lipídeos, sacarídeos, vitaminas e/ ou minerais. Na composição nutritiva, o ingrediente ativo é misturado com estes componentes.

10 A proteína inclui proteínas de leite, tais que o leite desnatado, caseína, soro de queijo, concentrado de proteína de soro de leite e isolados de proteína de soro de leite e suas frações como alfa s- caseína, beta-caseína, alfa- lactoalbumina, e beta-lactoalbumina. Além disso, proteína de ovo, tal que a proteína de gema de ovo, proteína de clara de ovo e ovalbumina, ou proteína de soja, tal que a proteína de soja sem gordura, proteína de soja
15 separada, e a proteína de soja concentrada podem ser usadas. Outras que estas, proteínas, tais que glúten de trigo, proteína de carne de peixe, proteína de carne de gado e colágeno podem ser também usadas, de um modo satisfatório. Além disso, frações destas proteínas, peptídeos do tratamento ácido ou enzimático das mesmas, ou ácidos livres podem ser igualmente
20 usados, de um modo satisfatório. Além disso, frações destas proteínas, peptídeos do tratamento ácido ou enzimático das mesma ou ácidos livres podem ser igualmente usados, de um modo satisfatório. Os aminoácidos livres servem como fontes de nitrogênio e podem ser adicionalmente usados para fornecer ações fisiológicas específicas. Tais aminoácidos livres incluem, por
25 exemplo, taurina, arginina, cisteína, cistina e glutamina. O lipídeo inclui gorduras e óleos animais, tais que gordura de leite, toucinho, gordura de carne e óleo de peixe, óleos vegetais, tais que óleo de soja, óleo de colza, óleo de milho, óleo de coco, óleo de palma, óleo de caroço de palma, óleo de açafrão, óleo de perila, óleo de linhaça, óleo de prímula, triglicerídeos de ácido graxo

de cadeia média, e óleo de caroço de algodão, gorduras e óleos gerados bacterionalmente e óleos fracionados dos mesmos, óleos hidrogenados dos mesmos, e óleos de troca de éster dos mesmos. A quantidade de lipídeo a ser misturada varia, dependendo do uso.

5 O sacarídeo inclui, por exemplo, um ou mais de amido, polissacarídeos solúveis, dextrina, monossacarídeos, tais que sacarose, lactose como aqui descrito, maltose, glicose e frutose e outros oligossacarídeos. A quantidade total de um tal sacarídeo é, de um modo preferido, de 40 a 80%, em peso, do sólido total na composição nutritiva. Além disso, adoçantes
10 artificiais, tais que o aspartame, podem ser usados, de um modo satisfatório. A quantidade de um adoçante artificial é apropriadamente de 0,05 a 1,0%, em peso, por sólidos totais, na composição nutritiva.

As vitaminas incluem, mas não estão limitadas a, licopeno como um componente essencial e incluem, de um modo adicional, por
15 exemplo, vitaminas, tais que a vitamina A, vitaminas do grupo B, vitaminas C, D e E e vitaminas do grupo K, ácido fólico, ácido pantotênico, nicotinamida, carnitina, colina, inositol e biotina, desde que estas vitaminas possam ser administradas a crianças. Tais vitaminas são preferivelmente de
20 10 mg a 5 g por peso, por sólidos totais, na composição nutritiva para crianças.

Além disso, os minerais incluem cálcio, magnésio, potássio, sódio, ferro, cobre, zinco, fósforo, cloro, manganês, selênio e iodo. Tais minerais constituem, de um modo preferido, de 1 mg a 5 g, em peso, por sólidos totais, na composição nutritiva para crianças.

25 Outros que estes componentes acima descritos, a composição nutritiva para crianças de acordo com a presente invenção pode ser misturada com qualquer componente desejavelmente misturado em composições nutritivas, por exemplo, fibra dietética, nucleotídeos, ácidos nucleicos, flavorizantes e colorantes.

O alimento ou a bebida de acordo com a presente invenção pode ser usado como um alimento ou bebida saudável ou como um alimento ou bebida funcional, de um modo a prevenir e/ ou a tratar o mau odor oral.

Quando o alimento ou a bebida de acordo com a presente invenção é ingerido, a quantidade a ser ingerida não está especificamente limitada. A quantidade a ser ingerida é, de um modo geral, de 0,1 a 50 g, de um modo preferido de 0,5 a 20 g diariamente, com base na quantidade total do ingrediente ativo. O alimento ou a bebida é ingerido, de um modo contínuo, nesta quantidade, durante um período de a partir de um único dia a até 5 anos, de um modo preferido de 2 semanas a um ano. Neste caso, a quantidade ingerida pode ser ajustada a uma faixa apropriada, dependendo da severidade dos sintomas do indivíduo que ingere o alimento ou a bebida, da idade e do peso corpóreo do mesmo, e os similares.

A ração de acordo com a presente invenção pode ser qualquer ração, que compreenda o ingrediente ativo. A ração inclui, por exemplo, rações para animais domésticos, para cachorros, gatos e ratos, rações para gado, para vacas e porcos, rações para galinha, para galinhas e perus, e rações para o cultivo de peixes, para pargos e savelhas.

A ração pode ser produzida pela mistura apropriada do ingrediente ativo, como aqui acima descrito, em um material de ração cru, incluindo, por exemplo, cereais, farelos, farinhas de sementes oleosas, materiais de ração crus derivados de animal, outros materiais de ração crus e produtos purificados.

Os cereais incluem, por exemplo, milho, trigo, cevada, aveia, centeio, arroz integral, trigo-sarraceno, milho rabo-de-raposa, milho Chinês, relva Deccan, milho e soja.

Os farelos incluem, por exemplo, farelo de arroz, farelo de arroz sem gordura, farelo, farinha de grau inferior, germe de trigo, farelo de cevada, grânulos de varredura, farelo de milho e germe de trigo.

As farinhas de sementes oleosas incluem, por exemplo, farinha de soja, pó de soja, farinha de linhaça, farinha de caroço de algodão, farinha de amendoim, farinha de açafrao, farinha de coco, farinha de palma, farinha de sésamo, farinha de girassol, farinha de colza, farinha de semente de paina e
5 farinha de mostarda.

Os materiais de ração crus derivados de animal incluem, por exemplo, pós de peixe, farinha importada, farinha inteira, e farinha de costa, solúvel de peixe, pó de carne, carne e pó de osso, pó de sangue, cabelo decomposto, pó de osso, subprodutos de açougue, farinha de penas, pupa de
10 bicho-da-seda, caseína, soro de leite seco e krill.

Outros materiais de ração crus incluem, por exemplo, caules de planta e folhas, tais que alfafa, cubo de feno, farinha de folha de alfafa, e pó de folha de alfarroba, subprodutos de indústrias de processamento de milho, tais que farinha de glúten de milho, ração de glúten de milho e licor de
15 infusão de milho, amido, açúcar, levedura, subprodutos da indústria de fermentação, tais que resíduos de cerveja, raiz de malte, resíduo de licor e resíduo de caldo de soja, e subprodutos agrícolas, tais que resíduo processado de limão, resíduo de coalho de soja, resíduo de café e resíduo de café, mandioca, fava-de-cavalo, farinha de guar, ervas marinhas, espirulina e
20 clorela.

Os produtos purificados incluem, por exemplo, proteínas, tais que caseína e albumina, aminoácidos, amido, celulose, sacarídeos, tais que sacarose e glicose, minerais e vitaminas.

No caso do provimento a animais da ração de acordo com a
25 presente invenção, a quantidade da ração a ser ingerida não está especificamente limitada, mas é, de um modo preferido, por exemplo, de 0,1 mg a 50 g por 1 kg de peso corpóreo por dia, de um modo preferido de 0,5 mg a 20 g por 1 kg de peso corpóreo por dia, com base na quantidade de ingrediente ativo. A ração é ingerida de um modo contínuo, nesta quantidade,

durante um período a partir de um único dia a 5 anos, de um modo preferido de 2 semanas a um ano. De novo, a quantidade a ser ingerida pode ser ajustada a uma faixa apropriada, dependendo da espécie, da idade e do peso corpóreo do animal que ingere a ração, e os similares.

5 Em ainda uma outra modalidade, a invenção refere-se a um aditivo para alimentos, bebidas ou rações, que compreende um microorganismo de acordo com a presente invenção, uma forma inativa do mesmo, mutante, derivado, análogo ou fragmento, assim como o uso de um microorganismo de acordo com a presente invenção, uma forma inativa do
10 mesmo, mutante, derivado, análogo ou fragmento para a preparação de uma composição para o tratamento e/ou a profilaxia do mau odor oral e/ ou da halitose, em que a composição é um aditivo para alimentos, bebidas ou rações. De um modo preferido, o aditivo para alimentos ou bebidas inclui o aditivo para composições nutritivas para crianças pequenas.

15 O aditivo para alimentos pode ser produzido através de um método geral para a produção de aditivos para alimentos, bebidas ou rações. Se necessário, os aditivos para o uso geral em alimentos, bebidas ou rações, por exemplo, os aditivos descritos em Food Additive Handbook (The Japan Food Additives Association; publicado em 6 de janeiro de 1997) pode ser
20 adicionado de um modo satisfatório, incluindo adoçantes, colorantes, conservantes, espessantes e estabilizadores, antioxidantes, agente de fixação da cor, alvejantes, antissépticos, base de goma, acidulantes, enzimas, agentes de abrillhantamento, acidificantes, temperos, emulsificantes, agentes de intensificação, agentes para a manufatura, flavorizantes, e extratos
25 condimentados. Além disso, sacarídeos convencionais, amido, materiais inorgânicos, pós de planta, excipientes, agentes de desintegração, lubrificantes, aglutinantes, tensoativos, e plastificantes antes mencionados para comprimidos farmacêuticos podem ser adicionados de um modo satisfatório.

Os aditivos incluem os aditivos que se seguem.

Os adoçantes incluem aspartame, alcaçuz, estévia, xilose e rancana (fruta *Momordica grosvenori*). Os colorantes incluem os carotenóides e oleoresina açafrão, flavonóides, cor caramelo, cor espirulina, clorofila, cor de batata doce púrpura, cor de inhame púrpura, cor perila, e cor de amora.

Os conservantes incluem, por exemplo, sulfito de sódio, benzoatos, extrato de benzoína, sorbatos, e propionatos. Os espessantes e estabilizadores incluem, por exemplo, gomas, tais que goma arábica e goma xantano, alginatos, quitina, quitosano, extrato de aloe, goma guar, hidroxipropil celulose, caseína sódica, amido de milho, carboximetil celulose, gelatina, ágar, dextrina, metil celulose, álcool polivinílico, celulose de microfibras, celulose microcristalina, celulose de algas marinhas, poliacrilato de sódio, polifosfato de sódio, carragenano ou parede celular de levedura.

Os antioxidantes incluem, por exemplo, o grupo de vitamina C, etileno diamina acetato de sódio, etileno diamina tetraacetato de cálcio, ácido eritórbico, orizanol, catequina, quercetina, extrato de cravo, rutina tratada com enzima, extrato de maçã, extrato de semente de sésamo, dibutil hidróxi tolueno, extrato de erva-doce, extrato de raiz forte, extrato de aipo, extrato de chá, tocoferóis, extrato de colza, extrato de café, extrato de semente de girassol ácido ferúlico, butil hidróxi anisol, extrato de folha de amora, extrato de própolis, extrato de pimenta, extrato balsâmico de jardim, ácido gálico, extrato de eucalipto e extrato de alecrim.

Os agentes de fixação de cor incluem, por exemplo, o nitrito de sódio. Os alvejantes incluem, por exemplo, o sulfito de sódio.

Os antissépticos incluem, por exemplo, o- fenil fenol. A base de goma inclui, por exemplo, acetil ricinoleato metila, cera de urushi, goma de éster, resina de elemi, cera de urucuri, goma de cauri, cera de carnaúba, éster de ácido graxo de glicerina, cera de espermacete, bálsamo de copaíba, resina copal, borracha, cera de farelo de arroz, cerca de cana, shelac, jelutong,

éster de ácido graxo de sacarose, borracha natural despolimerizada, cera de parafina, bálsamo de abeto, éster de ácido graxo de propileno glicol, polpa pulverizada, cascas de arroz pulverizadas, óleo de jojoba, poliisobutileno, polibuteno, cera microcristalina, goma de mástique, cera de abelhas e fosfato de cálcio.

Os acidulantes incluem, por exemplo, ácido iso-alfa- amargo, cafeína, extrato de kawaratake (*Coriolus versicolor*), extrato de redbark cinchona, extrato de cascas de Felodendrona, extrato de raiz genciana, extratos condimentados, naringina enzimaticamente modificada, extrato de cássia da Jamaica, teabromina, naringina, extrato de cássia, extrato de absinto, extrato de isodonis, chá de oliva, extrato de laranja amarga (*Citrus aurantium*), extrato de lúpulo e extrato de absinto.

As enzimas incluem, por exemplo, amilase, tripsina ou coalho.

Os agentes de brilhantamento incluem, por exemplo, cera de urushi e cera japonesa. Os acidificantes incluem, por exemplo, ácido adípico, ácido itacânia, ácidos cítricos, ácidos succínicos, acetato de sódio, ácidos tartáricos, dióxido de carbono, ácido láctico, ácido fítico, ácido fumárico, ácido málico e ácido fosfórico. Os tempos incluem, por exemplo, aminoácidos, tais que asparagina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, alanina, isoleucina, glicina, serina, cistina, tirosina, leucina, e pralina, ácidos nucleicos, tais que inosinato de sódio, uridinato de sódio, guanilato de sódio, ciridilato de sódio, ribonucleotídeo de cálcio e ribonucleotídeo de sódio, ácidos orgânicos, tais que o ácido cítrico e o ácido succínico, cloreto de potássio, salmoura diminuída com cloreto de sódio diminuído, cloreto de potássio bruto, sal de soro de leite, fosfato tripotássico, hidrogeno fosfato dipotássico, diidrogeno fosfato de potássio, hidrogeno fosfato dissódico, diidrogeno fosfato sódio, fosfato trissódico, e extrato de clorela.

Os agentes de intensificação incluem, por exemplo, os sais de zinco, grupo da vitamina C, vários aminoácidos, ácido 5- adenílico, cloreto de

ferro, hesperidina, vários cálcios calcinados, vários cálcios não- calcinados, dibenzoil tiamina, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio, sal de hidrocloreto de tiamina, Dunalela, Oaroteno, tocoferol, ácido nicotínico, caroteno de cenoura, caroteno de óleo de palma, pantotenato de cálcio, 5 vitamina A, hidroxiprolina, diidrogeno pirofosfato de cálcio, pirofosfato ferroso, pirofosfato férrico, ferritina, ferro heme, manquinona, ácido fólico e riboflavina.

Os agentes para a manufatura incluem, por exemplo, os auxiliares de processamento, tais que a acetona e a resina de troca iônica. Os 10 flavorizantes incluem, por exemplo, essência de baunilha e os extratos condimentados incluem, por exemplo, o extrato de pimenta-da-guiné.

Os vários aditivos podem ser adicionados ao ingrediente ativo, levando em consideração o modo de administração, de acordo com a presente invenção.

15 A composição de acordo com a presente invenção compreende um microorganismo de acordo com a invenção. É considerado que as composições compreendem o microorganismo sob a forma de um microorganismo probiótico. Ou seja, em adição ao efeito probiótico, o microorganismo probiótico acima mencionado, pertencente ao grupo de 20 bactérias do ácido láctico, é útil para o tratamento e/ ou a prevenção do mau odor oral e/ ou da halitose. A quantidade do referido microorganismo probiótico é suficientemente alta para modificar, de um modo positivo, a condição a ser tratada, de um modo preferido o mau odor oral, mas suficientemente baixa para evitar efeitos colaterais sérios (em uma razão 25 benefício/ risco razoável), dentro do escopo do julgamento médico seguro. Uma quantidade efetiva do referido microorganismo probiótico irá variar de acordo com o objetivo particular a ser alcançado, com a idade e a condição física do paciente sendo tratado, e com a severidade da doença subjacente, a duração do tratamento, a natureza da terapia concorrente e o microorganismo

específico empregado. A quantidade efetiva do referido microorganismo probiótico irá, deste modo ser a quantidade mínima, que irá prover o efeito desejado. A presença de, por exemplo, 1×10^9 bactérias, como células viáveis ou não- viáveis, em 0,05 ml de solução de solução salina tamponada com fosfato, ou em 0,05 ml de suspensão de ágar, ou o peso seco equivalente de todos os fragmentos da parede celular, é efetiva quando administrada em quantidades de a partir de cerca de 0,05 ml a cerca de 20 ml.

Uma vantagem prática decisiva é a de que o organismo probiótico pode ser administrado, de um modo conveniente, tal que por via oral. Dependendo da via de administração, pode ser requerido que os ingredientes ativos, que compreendem os referidos organismos probióticos, sejam revestidos em um material, de um modo a proteger os referidos organismos contra a ação de enzimas, ácidos e de outras condições naturais, que inativam os referidos organismos. De um modo a administrar os organismos probióticos, de um outro modo que através de administração parenteral, eles poderiam ser revestidos por, ou administrados com, um material para evitar a inativação. Por exemplo, os organismos probióticos podem ser co-administrados com inibidores de enzima ou em lipossomas. Os inibidores de enzima incluem o inibidor de tripsina pancreático, fluorofosfato de diisopropila (DFP) e trasilol. Os lipossomas incluem emulsões água-em-óleo-em-água P40, assim como lipossomas convencionais e designados especificamente, que transportam lactobacilos ou os seus subprodutos para a superfície urogenital. Podem ser também preparadas dispersões, por exemplo, em glicerol, polietileno glicóis líquidos, e misturas dos mesmos, e em óleos. De um modo geral, as dispersões são preparadas através da incorporação de vários organismos probióticos esterilizados em um veículo estéril, que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos a partir daqueles acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são as

técnicas de secagem a vácuo e de secagem por congelamento, que fornecem um pó do ingrediente ativo, além de qualquer outro ingrediente desejado adicional a partir de uma solução previamente filtrada do mesmo. Métodos preferidos adicionais de preparação incluem, mas não estão limitados, à liofilização e à secagem por calor.

A composição também abrange os produtos destinados a serem administrados por via oral, ou bucal, que compreendem um veículo farmacêutico aceitável, como aqui descrito, ao qual, ou sobre o qual, as células do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido lático, são adicionadas em uma forma fresca, concentrada ou secada, por exemplo. De fato, também uma forma inativada, derivado ou análogo ou fragmento do referido microorganismo pode ser adicionado ou qualquer combinação do referido microorganismo, derivado e/ ou análogo e/ ou fragmento do mesmo, que esteja aqui exposta. Estes produtos podem ser providos sob a forma de uma suspensão que pode ser ingerida, um gel, um difusor, uma cápsula, uma cápsula de gelatina dura, um xarope, ou em qualquer outra forma galênica, conhecida das pessoas versadas na técnica.

Quando os organismos probióticos são, de um modo adequado, protegidos como aqui acima descrito, o composto ativo pode ser administrado por via oral, por exemplo, com um diluente inerte ou com um veículo comestível assimilável, ou ele pode ser projetado de um modo a passar através do estômago (isto é, entericamente revestido), ou ele pode ser incorporado diretamente com o alimento da dieta. Para a administração terapêutica oral, os organismos probióticos podem ser incorporados com os excipientes e usados sob a forma de comprimidos que podem ser ingeridos, comprimidos bucais, pastilhas, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, bolachas, e os similares. As composições ou as preparações de acordo com a presente invenção são preparadas, de um modo a que a forma de unidade de dosagem oral contenha, por exemplo, cerca de 1×10^9 lactobacilos viáveis ou

não- viáveis, por exemplo, por ml. O organismo probiótico é composto para a administração conveniente e efetiva, em quantidades efetivas, com um veículo farmacologicamente aceitável ou alimentar aceitável, como aqui antes exposto. Uma forma de dosagem unitária pode, por exemplo, conter o

5 composto ativo principal, em uma quantidade que se aproxime de 10^9 , por exemplo, lactobacilos viáveis ou não- viáveis, por ml. No caso das composições contendo ingredientes suplementares, tais que os probióticos, as dosagens são determinadas por referência à dose usual e ao modo de administração dos referidos ingredientes.

10 Em ainda uma outra modalidade adicional, a presente invenção refere-se a um método de profilaxia e/ ou tratamento do mau odor oral e/ ou halitose. De um modo preferido, o método de profilaxia e/ ou tratamento compreende administrar a um paciente, um microorganismo de acordo com a presente invenção ou uma forma inativada, ou um mutante, derivado, análogo

15 ou fragmento do referido microorganismo, como aqui acima descrito.

De um modo preferido, o paciente a ser tratado é um animal. De um modo ainda mais preferido, o animal é um mamífero, ainda mais preferivelmente o mamífero é um mamífero doméstico. Em uma modalidade preferida, o animal doméstico é um cachorro, um gato, um criceto, um

20 macaco, um rato ou um camundongo. Em ainda uma outra modalidade preferida, o animal é gado, um cavalo, um porco, um macaco, uma ovelha ou uma cabra. Em ainda uma outra modalidade preferida, o mamífero é um ser humano.

A administração de um microorganismo de acordo com a

25 invenção no contexto do método de tratamento e/ ou profilaxia da presente invenção pode ser executada em qualquer forma desejada, conhecida daqueles versados na técnica. De um modo preferido, a administração abrange o uso e a aplicação de composições, como aqui acima descrito, que podem conter, de um modo opcional, por exemplo, veículos farmacêuticos ou cosméticos, ou

excipientes, como aqui acima descrito. A dosagem e o curso do período de tempo da administração podem ser estabelecidos de acordo com qualquer informação adequada, conhecida daqueles versados na técnica. De um modo preferido, a referida dosagem e o curso do período de tempo podem ser estabelecidos, tal como aqui acima descrito.

A invenção é ilustrada pelas Figuras 1 a 7, tal como descrito a seguir:

Figura 1: apresenta os resultados de um experimento, que analisa a influência da redução da concentração de peptídeos pelos lactobacilos sobre a produção de H₂S pelas bactérias aeróbicas gram-negativas, presentes na saliva.

Figura 2: apresenta os resultados de um experimento, que analisa a influência dos sobrenadantes do lactobacilo sobre o crescimento de *S. salivarius*, tal como descrito no Exemplo 3.

Figura 3: apresenta os resultados de um experimento, que analisa a influência do lactobacilo sobre o crescimento de *P. gingivalis*, tal como descrito no Exemplo 5.

Figura 4: apresenta os resultados de um experimento, que analisa a influência do sobrenadante lactobacilo tratado por calor sobre o crescimento de *S. salivarius*, tal como descrito no Exemplo 6.

Figura 5: apresenta os resultados de um experimento, que analisa a redução da concentração de peptídeos pelo lactobacilo de acordo com a invenção.

Figura 6: apresenta os resultados de um experimento, que analisa a redução da concentração de peptídeo pelos lactobacilos liofilizados de acordo com a invenção.

Figura 7: apresenta um perfil de aminoácido típico de um extrato de PTU.

Uma melhor compreensão da presente invenção e de suas

muitas vantagens será obtida a partir dos exemplos que se seguem, oferecidos unicamente para fins ilustrativos, e que não têm a intenção de limitar o escopo da presente invenção, de nenhum modo.

Exemplo 1

5 **Meios**

Meio TSY:

Mistura de TSY (Difco, USA) 30 g/l

Extrato de levedura (Deutsche Hefewerke, Alemanha) 3 g/l

10 Meio MRS leve:

Peptona Trypticase: 1,0 g/l

Extrato de Levedura: 0,5 g/l

Hidrogeno citrato de diamônio 0,2 g/l

Acetato de sódio 0,5 g/l

15 Heptaidrato de $MgSO_4$ 0,050 g/l

Monoidrato de $MnSO_4$ 0,025 g/l

Monoidrato de D- Glicose: 1 g/l

K_2HPO_4 : 0,2 g/l

Ácido Oleico: 0,1 % (p/v)

20 Meio Sintético:

Guanina: 0,1 g/l

Citosina: 0,1 g/l

Timidina: 0,1 g/l

2'-Deoxiadenosina: 0,1 g/l

25 2'-Deoxiuridina: 0,1 g/l

K_2HPO_4 : 2 g/l

Acetato de Sódio 5 g/l

Heptaidrato de $MgSO_4$ 0,1 g/l

Hidrogeno citrato de diamônio: 2 g

	Diidrato de CaCl ₂ :	0,5 g/l
	Ácido Oleico:	0,1% (p/v)
	Cianocobalamina:	0,02 mg/l
	Riboflavina:	10 mg/l
5	Ácido Fólico:	0,2 mg/l
	5-Fosfato- monidrato de piridoxal	10 mg/l
	Ácido 4-Aminobenzóico:	0,2 mg/l
	D (+)-Biotina:	1 mg/l
	Ácido Ascórbico:	500 mg/l
10	Ácido Nicotínico:	10 mg/l
	Pantotenato de Ca:	10 mg/l
	Tiamina:	1 mg/l
	Nitrato- Hexaidrato de Cobalto (II) :	500 mg/l
	Monidrato de MnSO ₄ :	20 mg/l
15	Heptaidrato de MgSO ₄ :	500 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ :	0,04mg/ml
	Extrato de PTU (Ohly, Deutsche Hefewerke Germany):	15 g/l
	(ou como mencionado em outro local)	
20	Monidrato de D- Glicose:	10 g/l
	<u>Meio FAB:</u>	
	Mistura de Peptona	15,0 g/l
	Extrato de Levedura	10,0 g/l
	Tioglicolato de Sódio	0,5 g/l
25	Cloreto de Sódio	2,5 g/l
	Ágar Nº 1	0,75 g/l
	HCl L- Cisteína	0,5 g/l
	Resazurina	0,001 g/l
	Bicarbonato de Sódio	0,4 g/l

Hemina	0,005 g/l
Vitamina K	0,0005 g/l

Armazenamento e Crescimento

O armazenamento e o crescimento de cepas pode ocorrer de acordo com procedimentos ordinários. Por exemplo, as cepas podem ser armazenadas como materiais congelados, a -80 °C. 1 ml de uma cultura pode ser deixado ser desenvolvido a uma fase estacionária (OD₆₀₀/ mL 4-8) em Meio MRS e misturado com 500 µl de uma solução de glicerina a 50% estéril e congelado.

Culturas de *S. salivarius* foram desenvolvidas em meio TSY até uma fase estacionária (OD₆₀₀ ml 1-2) e tratadas como acima mencionado. A cepa de *S. salivarius* preferivelmente usada nos experimentos foi *S. salivarius* DSM 20560 (Andrews and Horder, 1906).

O cultivo de *S. salivarius* (DSM 20560) assim como de isolados foi efetuado de um modo anaeróbico em placas de 6 reservatórios com 8 ml de Meio TSY, durante a noite, a 37 °C.

Lactobacilos (DSM 19825, 19826, 19827) foram cultivados de um modo anaeróbico em 150 µl de meio sintético em placas de 96 reservatórios, durante 24 horas, a 37 °C.

A mistura de lactobacilos e de *S. salivarius* foi efetuada em razões de contagem celular de 1:100 (lactobacillus: *S. salivarius*) em ½ meio TSY. Isto foi efetuado em placas de 96 reservatórios.

A suspensão da cultura foi incubada durante 12 horas em um espectrofotômetro de microplaca Bio Tek PowerWave, a 37°C.

Como um controle, ½ Meio TSY não- consumido ou Meio MRS leve foi usado, em vez da cultura de lactobacilos.

A estimulação do crescimento de *S. salivarius* foi visível pela comparação da densidade óptica máxima (OD_{600, max}) ou da taxa de crescimento máxima (V_{max}) com e sem lactobacilos, após 10 horas de

incubação ($OD_{600, \max}$) ou durante o crescimento exponencial (V_{\max}).

A estimulação é definida como uma densidade óptica máxima aumentada ($OD_{600, \max}$) ou a taxa de crescimento máximo (V_{\max}) em pelo menos 10%.

5 Exemplo 2

Classificação taxonômica de cepas

A classificação taxonômica das cepas foi efetuada de acordo com o seu padrão de fermentação de carboidrato. Este foi determinado usando o sistema API 50 CH (bioMerieux, França) e analisado usando a versão de software APILAB PLUS 3.3.3 (bioMerieux, França).

Exemplo 3

Teste sobre a estimulação do crescimento de *Streptococcus salivarius* com o sobrenadante de lactobacilos

As bactérias foram cultivadas como no Exemplo 1. O sobrenadante de lactobacilos (em particular DSM 19826) foi obtido através de centrifugação em 4000 x g durante 15 minutos. A mistura do sobrenadante de lactobacilos com *S. salivarius* foi efetuada em razões volumétricas de 2:1 para 4:1 (*S. salivarius*: sobrenadante de lactobacilos) em ½ Meio TSY. Isto foi efetuado em placas de 96 reservatórios. A suspensão da cultura foi incubada durante 12 horas em um espectrofotômetro de microplaca Bio Tek PowerWave, a 37°C. Como um controle, ½ Meio TSY não- consumido ou Meio MRS leve foi usado em vez do sobrenadante de lactobacilos.

A estimulação do crescimento foi testada como no Exemplo 1. Uma estimulação bem sucedida do crescimento de *S. salivarius* com sobrenadantes dos lactobacilos pôde ser observada. Estes resultados são mostrados na Figura 2.

Exemplo 4

Não-estimulação do membro do patógeno oral da flora oral *S. Mutans*

As culturas de *S. salivarius* foram desenvolvidas como no

Exemplo 1. *Streptococcus mutans* (DSM 20 253) foi desenvolvido em 5 ml de Meio TSY em tubos Falcon de 15 ml fechados durante a noite. As bactérias orais foram misturadas em uma razão volumétrica de 2:1 com o sobrenadante de lactobacilos e o crescimento foi testado como no Exemplo 1. Como um controle, as bactérias orais foram cultivadas com ½ Meio TSY não consumido, em vez do sobrenadante de lactobacilos.

Não foi observada nenhuma estimulação do crescimento do patógeno oral *S. mutans* pelos lactobacilos.

Além disso, a não-estimulação do crescimento de *S. mutans* pode ser testada pelo ensaio que se segue:

Lactobacilos (por exemplo, DSM 19825, 19826, 19827) foram cultivados, de um modo anaeróbico, em 150 µl de meio sintético, em placas de 96 reservatórios, durante 24 horas, a 37°C. *Streptococcus mutans* (DSM 20 253) é desenvolvido sob condições anaeróbicas, em 5 ml de meio TSY, em tubos Falcon de 15 ml fechados, durante a noite, a 37°C. (lactobacilus: *S. mutans*) em ½ meio TSY. Isto é efetuado em placas de 96 reservatórios. A suspensão da cultura é incubada, de um modo aeróbico, durante 12 horas, em um espectrofotômetro de microplaca Bio Tek PowerWave, a 37°C. Como um controle, ½ meio TSY não- consumido é usado em vez da cultura de lactobacilos.

Exemplo 5

Não-estimulação do membro do patógeno oral da flora oral *P. Gingivalis*

As culturas de *S. salivarius* foram desenvolvidas como no Exemplo 1. *Porphyromonas gingivalis* (DSM 20709) foi desenvolvido, de um modo anaeróbico, em 5 ml de meio FAB, em tubos Falcon de 15 ml fechados, a 37°C, durante a noite. *P. gingivalis* foi misturado em uma razão volumétrica de 2:1 com o sobrenadante de lactobacilos (de DSM 19826) e cultivado, de um modo anaeróbico, em placas de 96 reservatórios. Como um controle, *P. gingivalis* foi cultivado com meio FAB não- consumido, em vez do

sobrenadante de lactobacilos.

Não foi observada estimulação do crescimento do patógeno oral *P. gingivalis* pelos lactobacilos. Os resultados são apresentados na Figura 3.

5 Além disso, a não-estimulação do crescimento de *P. gingivalis* pode ser testada através do ensaio que se segue:

Lactobacilos (por exemplo, DSM 19825, 19826, 19827) são cultivados, de um modo anaeróbico, em 150 µl de meio sintético em placas de 96 reservatórios, durante 24 horas, a 37°C. *Porphyromonas gingivalis* (DSM 10 20 709) é desenvolvido, de um modo anaeróbico, em 5 ml de meio FAB, em tubos Falcon de 15 ml fechados, a 37°C, durante a noite. A mistura de lactobacilos e de *P. gingivalis* é efetuada em razões de contagem celular de 1:100 (lactobacilo : *P. gingivalis*) em um meio FAB. Isto é efetuado em placas de 96 reservatórios. A suspensão da cultura é incubada, de um modo 15 aeróbico, durante 45 horas, em uma estação de trabalho anaeróbica Whitley DG250 (Meintrup- DWS, Alemanha), a 37°C. Como um controle, o meio FAB não- consumido é usado, em vez da cultura de lactobacilos.

Exemplo 6

Resistência à temperatura da capacidade estimulante dos lactobacilos

20 As bactérias foram desenvolvidas como no Exemplo 1. Os sobrenadantes dos lactobacilos (de DSM 19827) foram incubados a 80°C, durante 10 minutos, em uma incubadora. Após o resfriamento do sobrenadante à temperatura ambiente, o sobrenadante de lactobacilos foi misturado, em uma razão volumétrica de 1:2, com culturas de *S. salivarius* 25 desenvolvidas e a estimulação foi testada como no Exemplo 1, incluindo os experimentos de controle. (A estimulação foi testada, assim como o uso de bactérias do patógeno oral, tal como descrito nos Exemplos 4 e 5. Foi demonstrado que o comportamento não -estimulante dos lactobacilos em relação às bactérias de oral- patógeno não é influenciado pelo tratamento

térmico). Nenhuma influência através do tratamento térmico sobre a atividade de estimulação em relação a *S. salivarius* pôde ser observada. Os resultados são apresentados na Figura 4.

Exemplo 7

5 Sensibilidade da estimulação à liofilização

S. salivarius foi desenvolvido como no Exemplo 1. Lactobacilos foram cultivados, de um modo anaeróbico, em 50 ml de meio sintético, em garrafas de 100 ml fechadas (Schott, Alemanha), durante a noite, a 37°C. O sobrenadante dos lactobacilos foi obtido através de centrifugação a 10 4000 x g, durante 15 minutos. 20 ml do sobrenadante foram congelados a -80°C e liofilizados, sob vácuo, durante 16 horas. O sobrenadante liofilizado foi novamente suspenso em 20 ml de H₂O. O sobrenadante novamente suspenso foi misturado com a cultura de *S. salivarius* em uma razão de 2:1 (*S. salivarius*: sobrenadante novamente suspenso) em ½ meio TSY, em placas 15 de 96 reservatórios. A estimulação do crescimento foi testada como no Exemplo 1, incluindo os experimentos de controle.

A atividade de estimulação não foi diminuída através de liofilização.

Exemplo 8

20 Redução da concentração de peptídeos pelos lactobacilos

Lactobacilos (DSM 19827) foram cultivados como no Exemplo 1. A cultura principal foi cultivada em um meio sintético contendo 15g/l de peptídeos (extrato de PTU). O meio foi inoculado com 10 µl da suspensão da cultura e cultivado, de um modo anaeróbico, a 37°C, durante 24 25 horas. Então, a concentração de peptídeos foi determinada e foi revelado que ela havia diminuído em pelo menos 20%, após 24 horas.

Os resultados demonstraram uma redução efetiva da concentração de peptídeos através do crescimento dos lactobacilos e são ilustrados pela Figura 5.

Exemplo 9**Sensibilidade da redução da concentração de peptídeos à liofilização**

Lactobacilos (DSM 19827) foram cultivados em 100 ml de meio sintético a 37°C, durante 24 horas. A totalidade da cultura foi centrifugada a 4000 x g durante 15 minutos e novamente suspensa em 20 ml de H₂O. 20 ml de lactobacilos novamente suspensos foram congelados a –80°C e liofilizado, sob vácuo, durante 16 horas.

Para o ensaio de absorção de peptídeos, 10 mg de lactobacilos liofilizados foram novamente suspensos em H₂O e centrifugados a 4000 x g, durante 10 minutos. 1 ml de meio sintético contendo 7g/l de peptídeos foi adicionado ao grânulo, e após 5 minutos de incubação a 37°C, as células foram removidas através de centrifugação. A concentração de peptídeo no sobrenadante foi determinada. A concentração de peptídeo no meio, após a remoção da célula, foi reduzida para 2 g/l. Isto corresponde a uma absorção de 0,5 mg de peptídeo/ mg de lactobacilos liofilizados.

Estes resultados mostram uma redução efetiva na concentração de peptídeos pelos lactobacilos em um estado liofilizado, tal como ilustrado na Figura 6.

Exemplo 10

Influência da redução da concentração de peptídeos pelos lactobacilos sobre a produção de H₂S pelas bactérias anaeróbicas gram- negativas.

Os lactobacilos foram cultivados e liofilizados como no Exemplo 8. Para o experimento, 10 mg de lactobacilos liofilizados foram novamente suspensos em H₂O, em uma placa de reservatório profundo, e centrifugados a 4000 x g, durante 10 minutos. 1 ml de meio sintético, contendo 3 g/l de peptídeos, foi adicionado ao grânulo e, após 5 minutos de incubação a 37°C, as células foram removidas através de centrifugação. O pH do meio não foi alterado pela incubação. O meio foi então inoculado com 50 µl de saliva humana não- estéril e incubado, de um modo anaeróbico, durante

6 horas, a 37°C. A placa de reservatório profundo foi coberta com papel de filtro estéril, impregnado com acetato de chumbo. A produção de sulfeto de hidrogênio pelos microorganismos da saliva foi monitorada pelo escurecimento do papel de filtro.

5 Uma produção reduzida de H₂S no meio tratado com lactobacilos foi observada através da comparação do escurecimento com o experimento de controle, sem a incubação prévia com lactobacilos.

Estes resultados mostram que uma incubação prévia do meio com lactobacilos resulta em uma produção diminuída de H₂S, durante a
10 incubação subsequente do meio com os microorganismos a partir da saliva humana.

Exemplo 11

Composição de pastilha (I)

A composição de pastilha é preparada, de um modo preferido,
15 como descrito no Exemplo 4, na página 8 da DE-C2 36 45 147, em que, em adição aos ingredientes mencionados no referido Exemplo 4, o microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, é adicionado em uma quantidade de 10² a 10¹², de um modo preferido de 10³ a 10⁸ células por mg da pastilha.

20 **Exemplo 12**

Composição de pastilha (II)

A composição de pastilha é preparada, de um modo preferido, como descrito no Exemplo 5, na página 8 da DE -C2 36 45 147, em que, em adição aos ingrediente mencionados no referido Exemplo 5, o
25 microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, é adicionado em uma quantidade de 10² a 10¹², de um modo preferido de 10³ a 10⁸ células por mg da pastilha.

Exemplo 13

Composição de Dentifrício

A composição de dentifrício é preparada, de um modo preferido, como descrito no Exemplo 3, na página 8 da DE -C2 45 147, em que, em adição aos ingredientes mencionados no referido Exemplo 3, o microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , de um modo preferido de 10^3 a 10^8 células por mg do dentifrício.

Exemplo 14

Composição de dentifrício à base de giz

A composição de dentifrício à base de giz é preparada, de um modo preferido, como descrito no capítulo 7.1.4.4 “Rezepturbeispiel”, na página 205 do livro texto “Kosmetik”, W. Umbach (editor), 2ª edição, Thieme Verlag, 1995, em que, em adição aos ingredientes mencionados no referido capítulo na página 205, o microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , de um modo preferido de 10^3 a 10^8 células por mg do dentifrício à base de giz.

Exemplo 15

Gel- Dentifrício à base de ácido silício / fluoreto de sódio

O gel- dentifrício com base na composição de dentifrício de ácido silícico/ fluoreto de sódio é preparado, de um modo preferido, tal como descrito no capítulo 7.1.4.4 “Rezepturbeispiel”, na página 205 do livro texto “Kosmetik”, W. Umbach (editor), 2ª edição, Thieme Verlag, 1995, em que, em adição aos ingrediente mencionados no referido capítulo na página 205, o microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , de um modo preferido de 10^3 a 10^8 células por mg do gel- dentifrício, com base em ácido silícico/ fluoreto de sódio.

Exemplo 16

Composição de dentifrício contra o tártaro

A composição de dentifrício contra o tártaro é preparada, de um modo preferido, como descrito no capítulo 7.1.4.4 “Rezepturbeispiel” na página 206 do livro texto “Kosmetik”, W. Umbach (editor), (2^a edição), Thieme Verlag, 1995, em que, em adição aos ingredientes mencionados no referido capítulo, na página 206, o microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias de ácido láctico, é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , de um modo preferido de 10^3 a 10^8 células por mg de dentifrício contra o tártaro.

Exemplo 17

10 Composição de goma de mascar

A composição de goma de mascar é preparada, de um modo preferido, tal como descrito no Exemplo 6, na página 9 da DE-C2 36 45 147, em que, em adição aos ingredientes mencionados no referido Exemplo 6, o microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , de um modo preferido de 10^3 a 10^8 células por mg da goma de mascar.

Exemplo 18

Composição de colutório concentrada

A composição de colutório concentrada é preparada, de um modo preferido, tal como descrito no capítulo 7.1.4.4 “Rezepturbeispiel”, na página 206 do livro texto “kosmetik”, W. Umbach (editor), 2^a edição, Thieme Verlag, 1995, em que, em adição aos ingredientes mencionados no referido capítulo na página 206, o microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico, é adicionado em uma quantidade de 10^2 a 10^{13} células por ml da composição de colutório concentrada.

Exemplo 19

Preparação de Filme

Preparação de filmes:

1. Fase aquosa:

- água quente a 60°C
- aspartame (adoçante) é adicionado sob agitação
- aspartame é completamente dissolvido
- um formador de filme solúvel em água polimérico, similar,

5 por exemplo, a Kollicoat IR (polietileno glicol em álcool polivinílico) ou PVP (polivinil pirrolidona) em polímeros naturais, tais que alginatos, são adicionados sob agitação até que eles sejam dissolvidos;

- após 10 minutos, o resto da espuma é removido

10 - o microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias de ácido láctico, em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} , de um modo preferido de 10^3 a 10^8 células por filme de aroma final são adicionadas após o resfriamento da mistura; de um modo alternativo, o mutante ou derivado do microorganismo acima mencionado, pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico ou um análogo ou fragmento das mesmas, o microorganismo
15 acima mencionado pertencendo ao grupo de bactérias de ácido láctico podendo ser adicionado;

2. Fase oleosa

- mentol é dissolvido em óleo de hortelã-pimenta
- polisorbato 80 é adicionado à mistura de óleo de hortelã-
20 pimenta-mentol, sob agitação;
- esta mistura é então adicionada a propileno glicol, sob agitação
- colorantes opcionais (tais que pigmentos, lacas) podem ser adicionado

25 3.

- sob agitação, a fase oleosa é lentamente misturada com a fase aquosa

4.

- os filmes delgados são gerados mecanicamente usando um

dispositivo de corte.

Formulações de amostra:

	formulação I		formulação II	
	peso [g]	composição no filme [%]	peso [g]	composição no filme [%]
Fase I				
Aspartame	0,7	1,4	0,7	1,8
Kollicoat IR	35,0	68,5	25,0	65,8
Ácido ascórbico	-	-	1,0	2,6
Flavorizante cereja			6,0	15,8
Água desmineralizada	85,0	-	80,0	
Fase II				
mentol	1,4	2,7	-	
óleo de hortelã-pimenta	5,6	11,0	-	
polisorbato 80	0,7	1,4	-	
propileno glicol	7,0	13,7	5,0	13,2
laca verde	0,7	1,4	-	
laca azorubina	-	-	0,3	0,8
soma	136,1	100,0	118,0	100,0
conteúdo de sólidos	51,1		38,0	

Outras modalidades e usos da invenção serão evidentes para aqueles versados na técnica, a partir da consideração do relatório e da prática da invenção aqui exposta. Todas as referências aqui citadas, que por qualquer razão, incluam todas as publicações, todas as patentes U.S. e todas as patentes estrangeiras e todos os pedidos de patente U.S. estrangeiros, são especificamente e inteiramente incorporadas a este, a título referencial, para todos os propósitos. É intencionado que o relatório e os exemplos sejam considerados exemplares apenas com o escopo e o espírito verdadeiros da invenção indicada pelas reivindicações apensas.

Requerente ou agente: Referência de Arquivo N3128 PCT	Funcionário autorizado:
--	-------------------------

INDICAÇÕES RELACIONADAS A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(Regra PCT 13bis)

A. As indicações feitas abaixo se referem ao microorganismo referido na descrição na página 25, linha 19-29	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO	Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional <input type="checkbox"/>
Nome da instituição depositária: DSMZ-Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Endereço da instituição depositária (<i>incluindo código postal e país</i>) Inhoffenstr. 7B D-38124 Braunschweig DE	
Data do depósito 1 de Novembro de 2007	Número de Acesso DSM 19825
C. INDICAÇÕES ADICIONAIS (<i>deixar em branco se não aplicável</i>) Esta transformação continua em uma folha adicional <input type="checkbox"/>	
Requerente faz uso dos direitos sob a Regra 32 EPC	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA OS QUAIS FORAM FEITAS INDICAÇÕES (<i>se as indicações não são para todos os Estados designados</i>)	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INFORMAÇÕES (<i>deixar em branco se não aplicável</i>)	
As indicações relacionadas abaixo serão submetidas ao Escritório Internacional posteriormente (especificar a natureza geral das indicações, por exemplo, " <i>Número de Acesso do Depósito</i> ")	

Somente para uso do Escritório receptor	Somente para uso do Escritório Internacional
<input type="checkbox"/> Esta folha foi recebida com o pedido internacional	<input type="checkbox"/> Esta folha foi recebida pelo Escritório internacional
Funcionário autorizado:	Funcionário autorizado:

Forma PCT/RO/134 (Julho de 1998; reimpresso em janeiro de 2004)

Requerente ou agente: Referência de arquivo N3128 PCT	Funcionário autorizado:
--	-------------------------

INDICAÇÕES RELACIONADAS A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(Regra PCT 13bis)

A. As indicações feitas abaixo se referem ao microorganismo referido na descrição na página 25, linha 19-29	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO	Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional <input type="checkbox"/>
Nome da instituição depositária: DSMZ-Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Endereço da instituição depositária (<i>incluindo código postal e país</i>) Inhoffenstr. 7B D-38124 Braunschweig DE	
Data do depósito 1 de Novembro de 2007	Número de Acesso DSM 19826
C. INDICAÇÕES ADICIONAIS (<i>deixar em branco se não aplicável</i>) Esta transformação continua em uma folha adicional <input type="checkbox"/>	
Requerente faz uso dos direitos sob a Regra 32 EPC	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA OS QUAIS FORAM FEITAS INDICAÇÕES (<i>se as indicações não são para todos os Estados designados</i>)	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INFORMAÇÕES (<i>deixar em branco se não aplicável</i>)	
As indicações relacionadas abaixo serão submetidas ao Escritório Internacional posteriormente (especificar a natureza geral das indicações, por exemplo, "Número de Acesso do Depósito")	

Somente para uso do Escritório receptor	Somente para uso do Escritório Internacional
<input type="checkbox"/> Esta folha foi recebida com o pedido internacional	<input type="checkbox"/> Esta folha foi recebida pelo Escritório internacional
Funcionário autorizado:	Funcionário autorizado:

Forma PCT/RO/134 (Julho de 1998; reimpresso em janeiro de 2004)

Requerente ou agente: Referência de Arquivo N3128 PCT	Funcionário autorizado:
--	-------------------------

INDICAÇÕES RELACIONADAS A UM MICROORGANISMO DEPOSITADO

(Regra PCT 13bis)

A. As indicações feitas abaixo se referem ao microorganismo referido na descrição na página 25, linha 19-29	
B. IDENTIFICAÇÃO DO DEPÓSITO	Outros depósitos estão identificados em uma folha adicional <input type="checkbox"/>
Nome da instituição depositária: DSMZ-Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Endereço da instituição depositária (<i>incluindo código postal e país</i>) Inhoffenstr. 7B D-38124 Braunschweig DE	
Data do depósito 1 de Novembro de 2007	Número de Acesso DSM 19827
C. INDICAÇÕES ADICIONAIS (<i>deixar em branco se não aplicável</i>) Esta transformação continua em uma folha adicional <input type="checkbox"/>	
Requerente faz uso dos direitos sob a Regra 32 EPC	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA OS QUAIS FORAM FEITAS INDICAÇÕES (<i>se as indicações não são para todos os Estados designados</i>)	
E. FORNECIMENTO SEPARADO DE INFORMAÇÕES (<i>deixar em branco se não aplicável</i>)	
As indicações relacionadas abaixo serão submetidas ao Escritório Internacional posteriormente (especificar a natureza geral das indicações, por exemplo, "Número de Acesso do Depósito")	

Somente para uso do Escritório receptor	Somente para uso do Escritório Internacional
<input type="checkbox"/> Esta folha foi recebida com o pedido internacional	<input type="checkbox"/> Esta folha foi recebida pelo Escritório internacional
Funcionário autorizado:	Funcionário autorizado:

Forma PCT/RO/134 (Julho de 1998; reimpresso em janeiro de 2004)

REIVINDICAÇÕES

1. Composição cosmética, caracterizada pelo fato de compreender um microrganismo selecionado do grupo consistindo em microrganismos possuindo número de acesso DSMZ DSM 19825, DSM 19826 ou DSM 19827 e um excipiente ou veículo cosmeticamente ou oralmente aceitável para reduzir o mau odor oral

em que o microrganismo é capaz de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius*, mas de não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ou de *Porphyromonas gingivalis*

2. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender um microrganismo selecionado do grupo consistindo em microrganismos possuindo número de acesso DSMZ DSM 19825, DSM 19826 ou DSM 19827 e um excipiente ou veículo farmacêuticamente ou oralmente aceitável para reduzir o mau odor oral

em que o microrganismo é capaz de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius*, mas de não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*.

3. Composição de alimento ou ração, caracterizada pelo fato de compreender um microrganismo selecionado do grupo consistindo em microrganismos possuindo número de acesso DSMZ DSM 19825, DSM 19826 ou DSM 19827 e um excipiente ou veículo oralmente aceitável para reduzir o mau odor oral

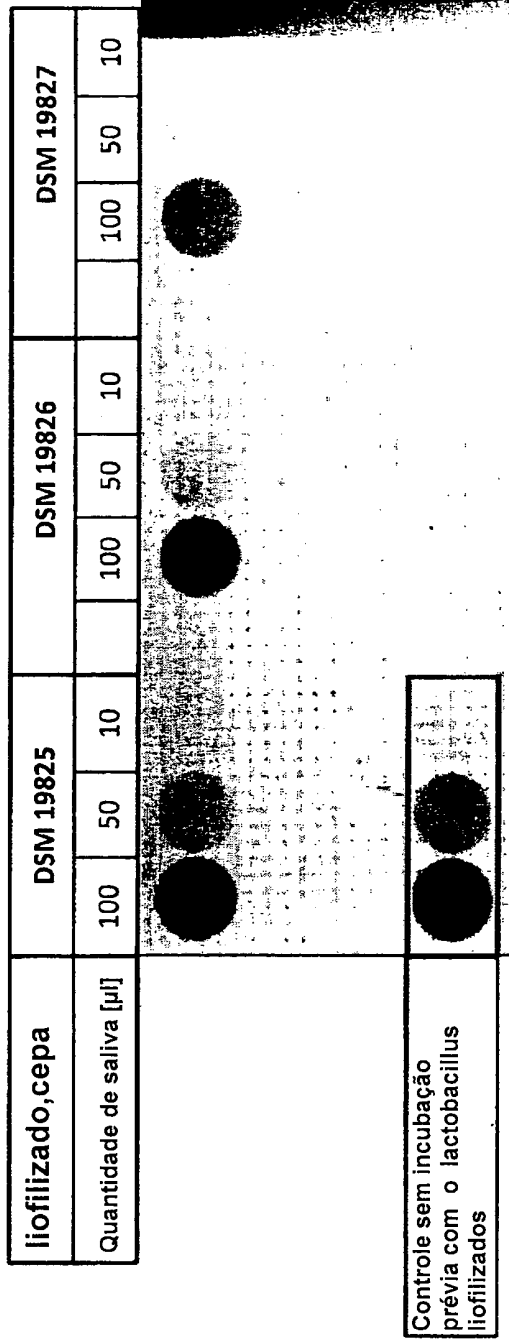
em que o microrganismo é capaz de estimular o crescimento de *Streptococcus salivarius*, mas de não estimular o crescimento de *Streptococcus mutans* e/ ou de *Porphyromonas gingivalis*.

4. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida composição é um dentífrico, goma de mascar, pastilha, colutório, enxaguadura bucal, fio dental ou fita dental.

5. Composição de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o microrganismo está em uma quantidade de 10^2 a 10^{12} células por mg ou em uma quantidade 10^2 a 10^{13} células por ml de composição.

- 5 6. Uso de um microrganismo selecionado do grupo consistindo em microrganismos possuindo número de acesso DSMZ DSM 19825, DSM 19826 ou DSM 19827, caracterizado pelo fato de ser para a redução do mau odor oral e/ou da halitose.



meio: meio sintético com 3 g/l PTU
 incubação prévia com 10 mg de liofilizado,
 taxa de sobrevivência < 0,01.

FIGURA 1

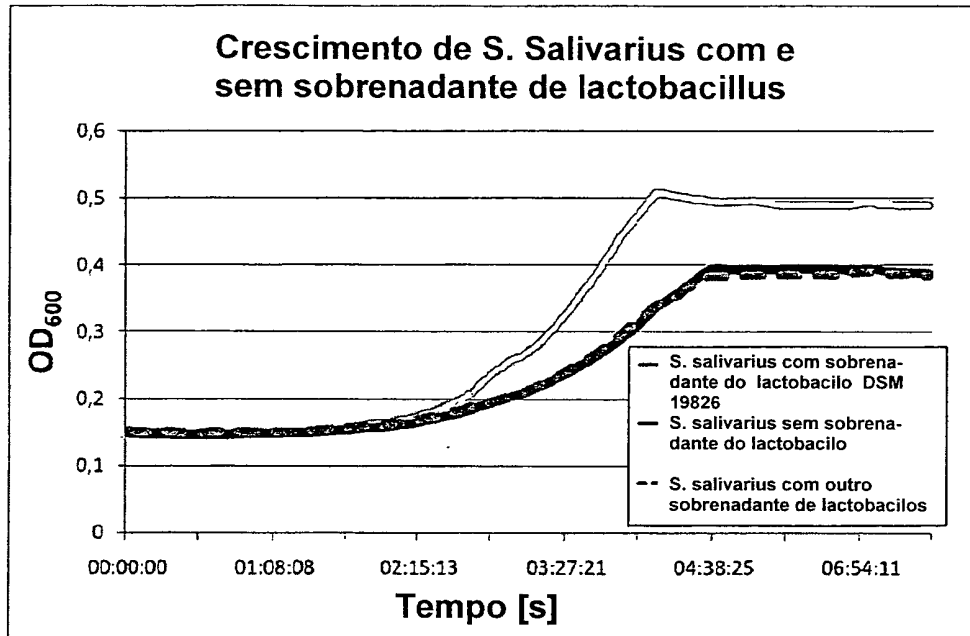


FIGURA 2

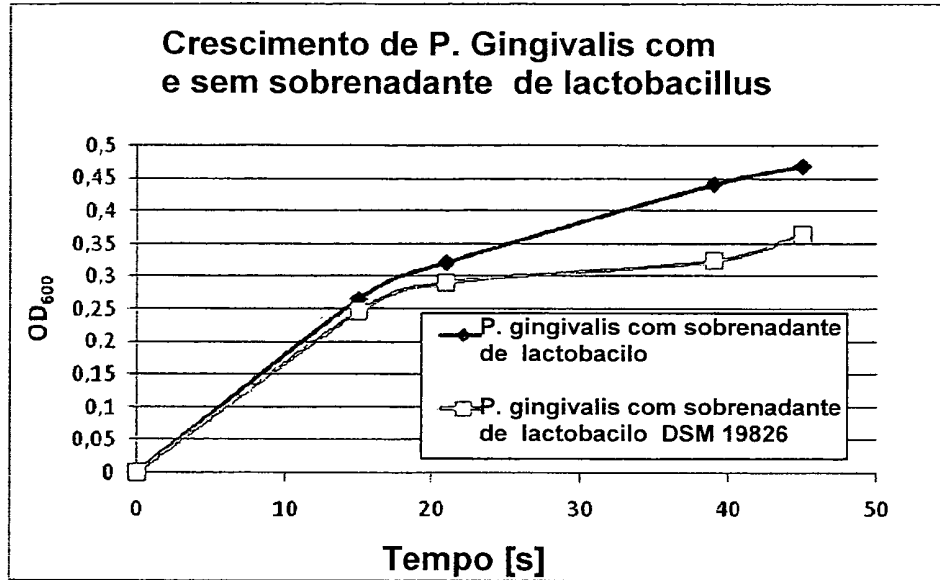


FIGURA 3

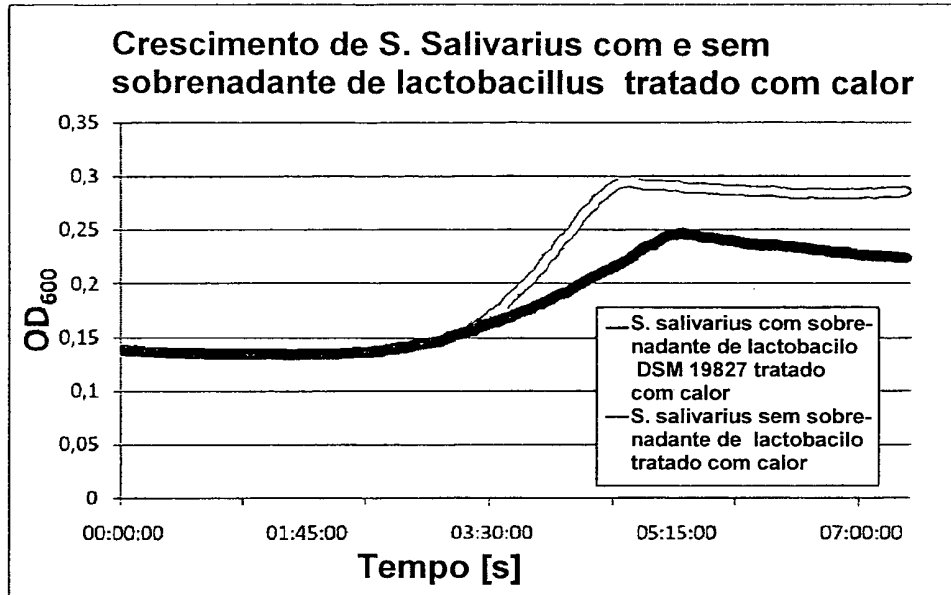


FIGURA 4

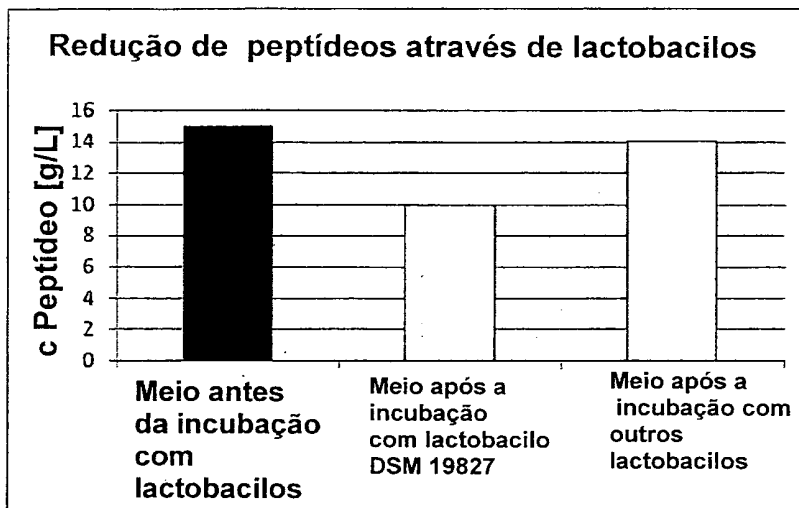


FIGURA 5

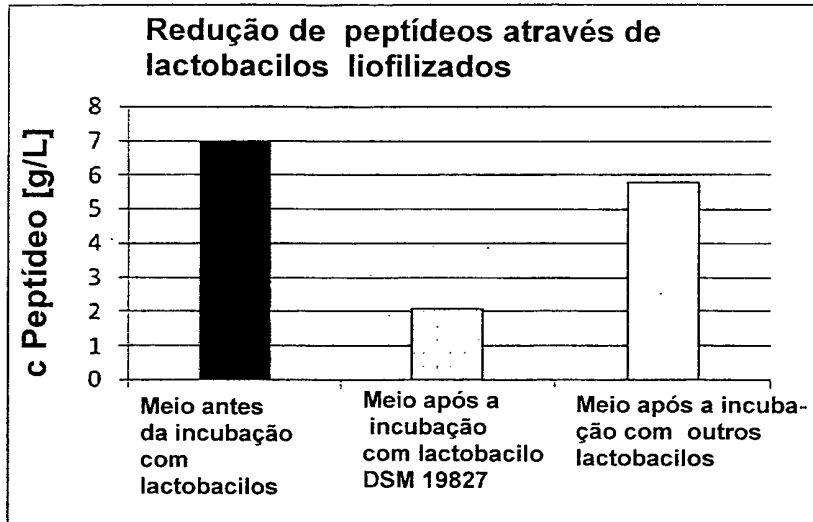


FIGURA 6

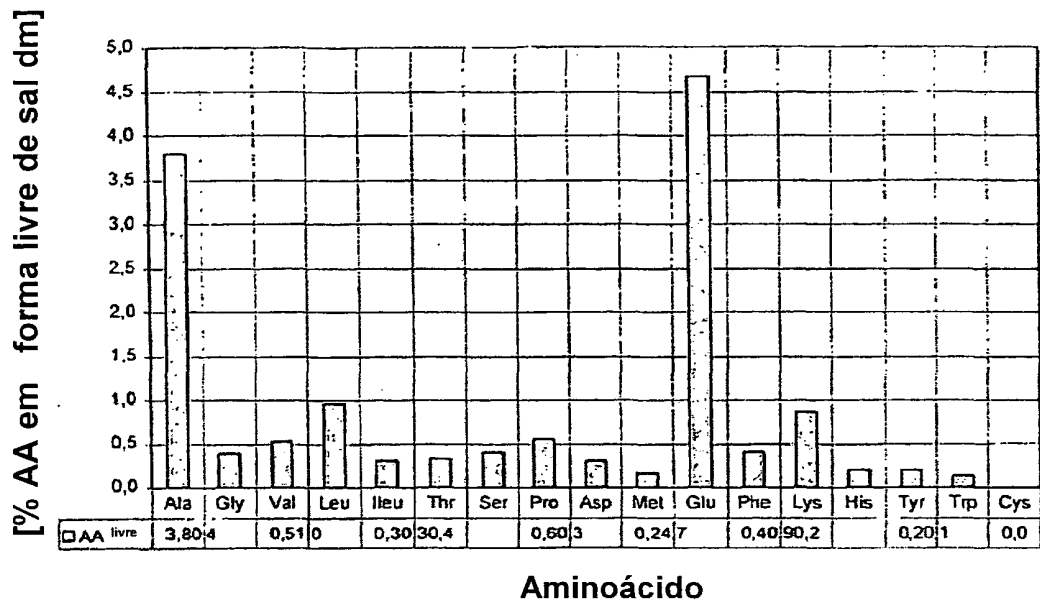


FIGURA 7