



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1006147-9 B1

(22) Data do Depósito: 12/01/2010

(45) Data de Concessão: 12/03/2024

(54) Título: COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM COMPONENTES PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS E SAIS MINERAIS, COM LACTOFERRINA E SEU USO

(51) Int.Cl.: A61K 35/74; C12N 1/20; A61P 1/00.

(30) Prioridade Unionista: 12/01/2009 IT MI2009A000019.

(73) Titular(es): PFIZER CONSUMER HEALTHCARE ITALY S.R.L..

(72) Inventor(es): VALERIA LONGONI; MARISA PENCI.

(86) Pedido PCT: PCT US2010020712 de 12/01/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/081126 de 15/07/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/07/2011

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM COMPONENTES PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS E SAIS MINERAIS, COM LACTOFERRINA. A presente invenção refere-se a composições que compreendem componentes probióticos e prebióticos, sais minerais, lactoferrina e possivelmente sacaromicetos, as quais realizam colonização correta e eficaz dos componentes probióticos administrados, com consequências entéricas que envolvem manter e/ou restaurar saúde intestinal e prevenir as consequências de disbiose comum do trato digestivo causada por estresse hábitos dietéticos incorretos e tratamentos com antibióticos. Essas composições também apresentam uma ação concomitante anti-inflamatória e imunomoduladora.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE COMPONENTES PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS E SAIS MINERAIS, COM LACTOFERRINA E SEU USO**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a composições que compreendem um probiótico, mais especificamente *Bifidobacterium longum*, e um material veículo que compreende materiais prebióticos, sais minerais e lactoferrina, não só apresentarão sobrevivência da espécie probiótica melhorada e/ou aumentada, como também realiza colonização eficaz dos componentes pro-

10 bióticos administrados com consequências entéricas de disbiose comum do trato digestivo causada por stresse, hábitos dietéticos incorretos, tratamentos antibióticos, doença e similares. Essas composições também têm uma ação concomitante anti-inflamatória e imunomoduladora. Além disso, a invenção é dirigida a métodos para aumentar e/ou melhorar a sobrevivência e

15 viabilidade de um organismo probiótico com as composições descritas aqui.

As composições da presente invenção podem ser usadas para a preparação de suplementos nutricionais e produtos de grau farmacêutico.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os consumidores estão se tornando crescentemente conscien-

20 tes de questões que podem ser necessárias para manutenção de seu ambiente, saúde e nutrição. Em resposta, a pesquisa científica tem se concentrado nos papéis que dieta, stresse e práticas médicas modernas (por exemplo, antibióticos e radioterapia) podem desempenhar como ameaça à saúde humana. Em particular, o deslocamento dinâmico de populações para socieda-

25 des mais antigas está aumentando a incidência de doenças que podem ser causadas por microflora deficiente ou comprometida tais como infecções do trato gastrointestinal (GIT), constipação, síndrome do intestino irritável (IBS), doença inflamatória do intestino (IBD) – doença de Crohn e colite ulcerativa, alergias alimentares, diarreia induzida por antibióticos, doença cardiovascu-

30 lar e certos cânceres (por exemplo, câncer colorretal).

Nos últimos anos, a produção comercial e a comercialização de alimentos funcionais (alimentos que afetam funções do corpo de uma manei-

ra orientada de modo a trazer efeitos positivos para a fisiologia e nutrição), particularmente alimentos contendo probióticos, espalhou-se do bem-estabelecido nicho de mercado japonês para o mercado global. Embora várias bactérias probióticas de origem humana estejam agora sendo exploradas comercialmente, a ciência está ainda emergindo não só em relação a aplicações potenciais desses produtos, como também sobre como melhorar a eficácia.

Probiótica tem sido definida como suplementos alimentares de micróbios vivos que afetam benéficamente o hospedeiro melhorando o equilíbrio intestinal microbiano, ou mais amplamente, como micro-organismos vivos, que após ingestão em certos números, exercem efeitos sobre a saúde além de nutrição básica inerente. Coquetéis de vários micro-organismos, particularmente das espécies *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, têm sido tradicionalmente usados em produtos derivados do leite fermentados para promover saúde. No entanto, para serem eficazes, os probióticos têm não só de sobreviver às condições de processo de fabricação, embalagem e armazenamento, como também, então, têm de sobreviver ao trânsito através do trato gastrointestinal de modo que o material probiótico permaneça viável para ter um efeito positivo sobre a saúde.

A história evolucionária do homem tem sido influenciada por bactérias, não apenas quanto a epidemias. Uma influência menos evidente e mais profunda é aquela da flora comensal, especialmente a flora residente no intestino humano, que realiza um importante papel "protetor" e "educacional" (o primeiro papel é realizado sobre todo o corpo e o segundo sobre seu sistema imune), e constantemente defende o indivíduo contra doença. Como é de fato bem conhecido, sob condições normais, a pele e muito das membranas mucosas do corpo são "habitadas" por uma variada flora de micro-organismos, que são frequentemente específicos a tecidos. Por exemplo, os micro-organismos predominantes no intestino (não menos de 500 cepas foram identificadas até agora), especialmente no intestino grosso, são *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococci*, leveduras e *Escherichia coli*. Essa flora microbiana comensal

pode ser dividida em duas categorias: flora "residente", que está quase sempre presente e, se alterada, pode ser rapidamente restaurada; e flora "transitória", que pode colonizar-se no hospedeiro por curtos períodos, devido à falta de capacidade da flora transitória em competir com os micro-organismos residentes ou com os mecanismos de defesa do hospedeiro. A flora transitória às vezes também inclui micro-organismos potencialmente patogênicos. A composição exata da flora é influenciada por fatores de origem microbiana e fatores específicos ao hospedeiro. Entretanto, como esses últimos fatores (idade, nível nutricional, hormônios e doença) são difíceis de modificar, a análise se concentrará nos primeiros.

Um importante fator microbiano que influencia a composição da flora comensal é a capacidade de bactérias em aderir às células epiteliais. Algumas bactérias apresentam tropismo marcado (afinidade) por células epiteliais particulares. A flora normal pode, então, interferir nos micro-organismos potencialmente patogênicos competindo com eles pelos receptores na superfície das células. A flora comensal pode também interferir em micro-organismos patogênicos produzindo bacteriocinas, substâncias que inibem o crescimento de outras bactérias (habitualmente da mesma espécie), ou proporcionando um ambiente ácido por meio da produção de ácidos graxos de cadeias curtas ou competindo pelos mesmos nutrientes. Outros mecanismos úteis são o estímulo a produzir anticorpos naturais com reatividade cruzada, ou estimulação de mecanismos de depuração. Contudo, estes últimos são muito menos importantes.

Devido a esses mecanismos, a flora normal forma uma barreira eficaz contra colonização das superfícies do hospedeiro por micro-organismos patogênicos. Isso é conhecido como "resistência à colonização".

Como pode, assim, ser facilmente inferido, qualquer fenômeno que reduz o efeito desses fatores microbianos sobre o ecossistema gastroentérico pode levar a graves problemas para a saúde do indivíduo. Por exemplo, tratamento com antibióticos de amplo espectro elimina todas as bactérias comensais da flora gastroentérica que são sensíveis ao agente antimicrobiano usado. Nesse caso, a resistência à colonização reduz-se e micro-

organismos potencialmente letais estão livres para colonizar a mucosa. Quando o tratamento é descontinuado, a flora residente pode ser restaurada, obviamente, com o tempo. Infelizmente, contudo, bactérias aeróbicas gram-negativas crescem mais rápido e colonizam as membranas mucosas mais cedo do que bactérias anaeróbicas gram-negativas, que proliferam mais lentamente, embora elas constituam 99% da flora comensal. Em pacientes cujas defesas imunes são de fato apenas parcialmente prejudicadas, esse desequilíbrio pode causar bacteremia gram-negativa.

Outras possíveis consequências associadas à supressão da flora normal por antibióticos de amplo espectro incluem crescimento excessivo de leveduras com a aparência de micose, ou crescimento excessivo da bactéria anaeróbica gram-negativa *Clostridium difficile*, que é infelizmente e relativamente resistente a antibióticos. Sua presença pode conduzir a uma série de muitos distúrbios comuns, que variam de diarreia a colite.

O sistema imune e suas funções são o resultado de milhares de anos de desenvolvimento, determinados dia após dia por constante interação com o mundo dos micro-organismos, especialmente em nível gastrointestinal.

Está provado cientificamente que condições assépticas obtidas com higiene excessiva ou uso excessivo de antibióticos não representam uma estratégia bem-sucedida em termos de saúde individual, especialmente em vista das excelentes condições da vida hoje (comparada com o passado recente). O dano que condições mesmo parcialmente assépticas podem causar é bem conhecido, a saber, intolerâncias alimentares, alergias e doenças autoimunes. Esses problemas resultam de falta de contato entre a flora comensal e o sistema imune. Por meio desse contato diário, a flora comensal ensina o sistema imune a como distinguir entre "eu" e "não eu". Uma grande quantidade de evidências epidemiológicas (e de testes experimentais conduzidos, por exemplo, com animais sem germes) prova essa teoria.

Um aumento significativo na taxa de intolerâncias alimentares e alergias (até 40%), e distúrbios autoimunes (até 30%) tais como esclerose múltipla, lúpus eritematoso e artrite reumatoide, tem sido observado nos paí-

ses economicamente desenvolvidos, desde os anos cinquenta e sessenta, em paralelo com a redução na mortalidade decorrente de doenças infecciosas (devido à disponibilidade de mais e mais antibióticos). Essa elevação é o resultado de uma mudança substancial na qualidade e quantidade de flora comensal gastroentérica devido a uso incorreto de antibióticos e a um estilo de vida cada vez mais estressante, e, também, no caso dos lactantes, a uma redução na amamentação. Na verdade, relata-se com frequência que crianças amamentadas sofrem de intolerâncias alimentares e alergias menores do que crianças que recebem o chamado leite "artificial". Ainda mais recentemente, a mesma correlação foi relatada para esclerose múltipla (uma doença autoimune). Contrariamente, análise da morbidez de indivíduos que vivem em ambientes tribais (em partes da África, Índia ou interior da Austrália) onde o estilo de vida é primitivo mostra uma ausência quase total de doenças tais como alergias e autoimunidade (embora haja obviamente uma alta taxa de doenças infecciosas).

Tratamento com antibiótico, estresse e falta de amamentação, que alteram a qualidade e quantidade da flora gastroentérica comensal, reduzem a possibilidade de que a flora comensal venha a entrar em contato com o sistema imune. Como resultado desse contato, as células do sistema imune, especialmente linfócitos T auxiliares tipos 1 e 2, são "ensinadas" a tolerar (isto é, não responder a) antígenos alimentares e antígenos não alimentares inócuos (tais como pólenes), ou as proteínas do corpo a que elas pertencem (prevenindo, assim, doenças autoimunes).

A excepcional importância da flora comensal para a saúde presente e futura de cada indivíduo é, portanto, evidente. Entretanto, seres humanos não nascem com flora comensal. Pelo contrário, no nascimento, o trato gastroentérico é estéril. Sua colonização é iniciada no momento do nascimento pela flora vaginal e flora anal da mãe, no caso de um nascimento vaginal, ou por exposição ao ambiente externo ao útero no caso de uma cesariana, e em ambos os casos é subsequentemente influenciada pelo tipo de leite dado e por fatores maternos/ambientais. Após o estágio neonatal, a flora gastroentérica comensal de um indivíduo saudável consiste em pelo

menos 10^{18} bactérias, 99% dos quais pertencem a algumas 30-40 espécies.

Essa flora, portanto, consiste em germes anaeróbicos (bifidobactérias, clostrídios, bacterioides, eubactérias e cocos gram-positivos) e germes aeróbicos (lactobacilos, estreptococos, estafilococos e coliformes). No entanto, essas quantidades não se distribuem igualmente ao longo do eixo gastroentérico: o teor de bactérias é relativamente baixo no estômago (abaixo de um milhão por grama), mas a quantidade aumenta substancialmente no íleo (100 milhões) e enormemente no cólon (100 bilhões).

Portanto, existe uma necessidade no estado da técnica de composições que contenham materiais probióticos que não só sobrevivam às condições de processo de fabricação, como também possam, por conseguinte, sobreviver no trato gastrointestinal, liberando, desse modo, materiais probióticos viáveis no hospedeiro com necessidade desses materiais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em seu aspecto mais amplo, a presente invenção proporciona uma composição probiótica que compreende: a) um ou mais componentes probióticos que compreendem *Bifidobacterium longum* e pelo menos uma espécie de bactérias selecionadas do grupo de bactérias que consiste em *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus plantarum*; e b) uma composição veículo que compreende: 1) um ou mais componentes prebióticos; 2) lactoferrina; 3) um ou mais sais minerais; e, opcionalmente, 4) glutatona.

Em um primeiro aspecto da invenção, é preferido que a *Bifidobacterium longum* é *Bifidobacterium longum* R175 ("Rosell 175"), que a *Lactobacillus helveticus* é *Lactobacillus helveticus* R52 ("Rosell 52"); que a *Lactobacillus rhamnosus* é *Lactobacillus rhamnosus* R11 ("Rosell 11") e que a *Lactobacillus plantarum* é *Lactobacillus plantarum* R1012 ("Rosell 1012"). *Lactobacillus helveticus* Rosell 52 é também conhecida na indústria como uma espécie *Lactobacillus acidophilus* e, portanto, como usada aqui, *Lactobacillus helveticus* R52 pode também ser conhecida como *Lactobacillus acidophilus* R52.

Em uma modalidade preferida, o que denominamos um ou mais

componentes prebióticos são inulina e frutose. Em outra modalidade preferida, o que denominamos um ou mais sais minerais é selecionado do grupo que consiste em zinco, magnésio, potássio e cobre. Em uma modalidade preferida, os sais minerais compreendem gliconato de zinco, gliconato de magnésio e citrato de potássio.

Um aspecto da invenção proporciona uma composição probiótica que compreende: a) uma mistura de componentes probióticos que compreende *Bifidobacterium longum*, 50 bilhões de CFU/g; *Lactobacillus helveticus*, 150 bilhões de CFU/g; e *Lactobacillus plantarum*, 150 bilhões de CFU/g; e b) um veículo que compreende: 1) uma mistura de prebióticos que compreende cerca de 80% da composição veículo total; 2) lactoferrina em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 10% da composição veículo total; 3) sais minerais selecionados do grupo que consiste em sais de magnésio, de potássio e de zinco, em que magnésio está presente na composição veículo em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 100%; em que o potássio está presente em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 100% da composição veículo; e em que o zinco está presente em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 100% da composição veículo; e 4) glutathione, e que a glutathione está presente em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 20% da composição veículo.

Em outro aspecto da invenção, é proporcionada uma composição probiótica a) uma mistura de componentes probióticos que consiste em *Bifidobacterium longum* R175 e *Lactobacillus rhamnosus* R11; b) um componente prebiótico que compreende inulina e frutose; c) lactoferrina; d) uma mistura de sais minerais que consiste em sais de magnésio e de zinco; e e) *Saccharomyces boulardii*.

Em ainda um aspecto adicional da invenção são proporcionados métodos de uso de composições que contêm probióticos para a preparação de formulações para administração oral para a manutenção e/ou restauração de saúde intestinal e para prevenção de disbiose de qualquer etiologia em mamíferos.

Em ainda um aspecto adicional da invenção, é proporcionado

um método de melhoramento da sobrevivência de bactérias *Bifidobacterium longum* que compreendem: misturar *Bifidobacterium longum* com *Lactobacillus helveticus* R52 e *Lactobacillus plantarum* R1012, em que a sobrevivência da *Bifidobacterium* é melhorada.

5 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Em adultos, tratamento com antibiótico, estresse, desequilíbrios dietéticos e doença (especialmente distúrbios gastroentéricos) alteram a qualidade e quantidade da flora comensal benéfica. O problema de obter um processo rápido e eficiente de recolonização conseqüentemente surge. Esse processo é significativamente facilitado por probióticos.

Verificou-se agora que uma combinação de uma mistura específica de componentes probióticos, mais especificamente *Bifidobacterium longum*, quando misturada em um veículo que compreende (A) um ou mais componentes prebióticos, (B) lactoferrina e (C) um ou mais sais minerais, e opcionalmente sacaromicetos, melhora a sobrevivência da espécie *Bifidobacterium longum*, bem como executa uma considerável ação de melhoramento de saúde, mantém e/ou restaura a saúde intestinal, controla as conseqüências do estresse e realiza uma atividade anti-inflamatória e imunomoduladora. Mais especificamente, as composições da invenção exibem aumento e/ou melhoramento de sobrevivência dos componentes probióticos após trânsito através do trato gastrointestinal.

As composições de acordo com a invenção são, portanto, caracterizadas por um considerável valor simbiótico (probiótico com prebiose sustentada), com um forte componente anti-inflamatório e imunomodulador, e são também capazes de lidar com alterações no equilíbrio fluido-sal. Elas conseqüentemente melhoram/restauram de maneira notável a saúde intestinal, e também apresentam repercussões favoráveis na prevenção de indisposição, infecções e todas as conseqüências de estresse em geral (especialmente estresse físico e ambiental).

Mesmo que tenha sido mostrado que, pelo menos para algumas cepas probióticas, probióticos mortos podem proporcionar um benefício clínico, o resultado clínico em humanos de bactérias mortas não é tão robusto

como no caso das células viáveis. Portanto, a fim de produzir um produto probiótico que é capaz de proporcionar o desejado efeito clínico, é necessário assegurar que a composição que contém probiótico tenha o mais alto percentual de sobrevivência cumulativa de probióticos à medida que eles transitam pelo trato gastrointestinal superior.

Os inventores verificaram que combinando *Bifidobacterium longum*, isoladamente ou em combinação com um ou mais componentes probióticos, tais como *Lactobacillus helveticus* e/ou *Lactobacillus plantarum*, com um veículo que compreende prebiótico, preferencialmente inulina, frutose e/ou FOS; sais minerais que compreendem magnésio, zinco e/ou potássio; lactoferrina; a *Bifidobacterium longum* aumenta sua sobrevivência através do trato digestivo e, portanto, as composições exibem maior eficácia.

Probióticos são tradicionalmente definidos como um suplemento nutricional que contém (preferencialmente) micróbios vivos que influenciam favoravelmente a saúde do hospedeiro melhorando o equilíbrio microbiano. Organismos probióticos devem também ser:

- componentes normais da flora intestinal humana ou em todo o caso imediatamente adaptável a esse habitat;
- capazes de atravessar a barreira gástrica, sem a ação dos ácidos biliares e enzimas pancreáticas;
- capazes de aderência específica ao epitélio intestinal;
- facilidade de uso em prática clínica.

As seguintes bactérias probióticas satisfazem a definição acima:

- bactérias produtoras de ácido láctico em geral;
- lactobacilos (*acidophilus*, *helveticus*, *bulgaricus*, *plantarum*, *casei*, *rhamnosus*, *lactis* e *reuteri*);
- *Streptococcus thermophilus*;
- *Enterococcus faecium*;
- *Bifidobacterium bifidum* e *longum*.

A mistura de componentes probióticos de acordo com esta invenção compreende pelo menos duas espécies de bactérias selecionadas do grupo de bactérias que consiste em:

- *Bifidobacterium longum*
- *Lactobacillus helveticus*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus rhamnosus* e
- 5 - *Lactobacillus plantarum*.

Em uma modalidade preferida da invenção, as composições probióticas compreendem *Bifidobacterium longum*.

Esses agentes microbianos vivos e essenciais são capazes de colonização rápida, que logo leva a realização de suas funções:

10 1) proteção por meio de antagonismo direto a populações potencialmente patogênicas (inibição de aderência ao epitélio; produção de bacteriocinas; competição por nutrientes e substratos; criação de condições de pH e microambientes redox desfavoráveis);

15 2) estimulação e ensinamento do sistema imune (ativação macrofágica, intensificação de células assassinas naturais, aumento de produção de interferons e equilíbrio de populações de células T auxiliares 1 e 2).

3) acidificação do meio colônico mediante liberação de lactato, propionato e butirato.

20 A comunidade científica concentrou recentemente seu interesse no estudo e caracterização daquelas cepas que parecem ser as melhores candidatas para o desenvolvimento de simbióticos (produtos que contêm tanto probióticos quanto prebióticos), a saber, lactobacilos (*acidophilus*, *helveticus*, *plantarum* e *rhamnosus*) e bifidobactérias. Essas diferentes cepas exibem uma variedade de propriedades: capacidade de atravessar a barreira

25 gástrica e biliar eficazmente; melhoria de constipação e sintomas associados à intolerância a lactose; atenuação de diarreia (incluindo tipos com uma etiologia viral); produção de bacteriocinas; capacidade de inibir patógenos tais como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Candida* e *Coli*; imunomodulação e muitas outras.

30 O gênero *Lactobacillus* pertence ao grupo de bactérias do ácido láctico, que são procaríotes gram-positivos. Elas são facilmente diferenciadas de bifidobactérias com base em teor de guanina e citosina, que é inferior

a 54% (em bifidobactérias, esse teor excede 54%). O gênero compreende aproximadamente 80 espécies, que são negativas a catalase, imóveis, sem esporos, negativas a citocromo oxidase, não hidrolisáveis em gelatina e não produtoras de indol, com um metabolismo sacarolítico e microaerofílico. Essas espécies também apresentam exigências nutricionais particulares, a saber, carboidratos solúveis, aminoácidos livres, peptonas, ácidos graxos e seus ésteres, sais, ácidos nucleicos e vitaminas. Elas são também classificadas com base no tipo de fermentação como espécies de homofermentação obrigada, heterofermentação obrigada e heterofermentação facultativa.

10 Bactérias de ácido láctico da espécie *rhamnosus* em particular foram originalmente identificadas e selecionadas a partir de cepas de origem intestinal humana. Elas possuem características específicas diferentes que elas apenas parcialmente compartilham com outras bactérias produtoras de lactato:

15 1) do ponto de vista imunológico elas melhoram a resposta de linfócitos T e B e a resposta "assassina natural" (NK) das células CD56+;

2) do ponto de vista clínico seu uso é um método eficaz de combater várias formas de diarreia (incluindo rotavírus, diarreia do viajante, diarreia causada por tratamentos com antibiótico e diarreia recorrente causada por superinfecções com *Clostridium difficile*);

20 3) relata-se também que elas reduzem colonização das vias aéreas superiores por patógenos.

No que se refere à colonização, sabe-se que as espécies são resistentes a acidez gástrica, bile e aos altos valores de pH típicos do intestino grosso onde, após colonização, elas promovem a proliferação de bifidobactérias influenciando favoravelmente as condições ambientais.

25 O gênero *Bifidobacterium* compreende 28 espécies e apresenta as seguintes características gerais: gram-positivas, anaeróbicas, imóveis, sem esporos, negativas a catalase, não ácido úrico, pleomórficas e produtoras de ácido acético (bem como, produtoras de lactato). Elas também usam

30 sais de amônio como fonte de nitrogênio e são capazes de sintetizar muitas vitaminas. Finalmente, seu desenvolvimento é influenciado pela presença de

fatores bifidogênicos (oligossacarídeos e peptonas).

Como já afirmado, durante seu trânsito e colonização, lactobacilos e bifidobactérias realizam uma série de ações, identificáveis como fisiológicas, tal como redução de intolerância à lactose; melhoria da motilidade intestinal; redução de colesterol sérico; acumulação de enzimas proteolíticas, proteínas e vitaminas; regulação de absorção de nutrientes; reativação da permeabilidade do epitélio intestinal; e melhoramento das condições de pacientes geriátricos.

Eles se caracterizam também por efeitos "não fisiológicos" tais como um efeito antidiarreia (diarreia infantil, diarreia dos viajantes e diarreia associada ao uso de antibióticos); um efeito antisséptico (devido à produção de bacteriocinas, ácido láctico e ácido acético e à liberação de acetila, aldeído acético, peróxido de hidrogênio e dióxido de carbono); um efeito antitumoral (principalmente localizado no cólon e reto); e um efeito imunomodulador (pacientes tratados com essas cepas têm respostas melhores de células NK, anticorpos, fagócitos e citocinas).

Além disso, uma série de atividades biológicas realizadas por essas várias cepas está sob discussão e devem logo ser confirmadas por estudos adicionais, tal como uma atividade analérgica (na esfera dos alimentos), atividade anti-inflamatória (na esfera intestinal), atividade antioxidante (com repercussões favoráveis na esfera aterosclerótica) e atividade protetora do fígado (especialmente na esfera associada a consumo de álcool).

De acordo com um aspecto preferido da invenção, a mistura de componentes probióticos compreende *Bifidobacterium longum* e pelo menos uma espécie adicional selecionada do grupo de bactérias que consiste em *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum*.

Na mistura acima mencionada de componentes probióticos, é preferido que a *Bifidobacterium longum* seja *Bifidobacterium longum* R175 ("Rosell 175"), que a *Lactobacillus helveticus* seja *Lactobacillus helveticus* R52 ("Rosell 52"), que a *Lactobacillus rhamnosus* seja *Lactobacillus rhamnosus* R11 ("Rosell 11") e que a *Lactobacillus plantarum* seja *Lactobacillus*

plantarum R1012 ("Rosell 1012"). *Lactobacillus helveticus* Rosell 52 é também conhecido na indústria como uma espécie *Lactobacillus acidophilus* e, portanto, como usada aqui, *Lactobacillus helveticus* R52 pode também ser conhecida como *Lactobacillus acidophilus* R52.

5 *Bifidobacterium longum* R175 é disponível a partir do *Institute Rosell, Inc. (Lallemand)*, Montreal, Qc, Canadá, sob o código de produto 75119.

10 *Bifidobacterium longum* R175 é um anaeróbio estrito, que consiste em bastões gram+ de várias formas, isolados ou em pares (1-1,5 µm x 6 µm). Ela forma pequenas colônias brancas em meio seletivos. *Bifidobacterium longum* R175 é heterofermentativa e produz tanto ácido L-láctico quanto ácido acético durante fermentação. Trata-se de catalase negativa. Em condições de laboratório, *Bifidobacterium longum* R175 cresce bem em meio comercialmente disponível para bactérias de ácido láctico (RCM) a 37° C
15 sob condições anaeróbicas. Em particular, ela é capaz de crescer nos seguintes açúcares (API 50 CH resulta após 48 horas a 37°C):

controle	-	galactose	+	α -metil-D-manosídeo	-	melibiose	+	D-turanose	+
Glicerol	-	D-glicose	+	α -metil-D-glicosídeo	-	sacarose	+	D-lixose	-
Eritritol	-	D-frutose	+	N-acetilglicosamina	-	trealose	-	D-tagatose	-
D-arabinose	-	D-manose	+	amigdalina	-	inulina	-	D-fucose	-
L-arabinose	+	L-sorbose	-	arbutina	-	melezitose	+	L-fucose	-
Ribose	-	ramnose	-	esculina	-	D-rafinose	+	D-arabitol	-
D-xilose	+	dulcitol	-	salicina	-	amido	-	L-arabitol	-
L-xilose	-	inositol	-	celbiose	-	glicogênio	-	gliconato	-
Adonitol	-	manitol	-	maltose	+	xilitol	-	2-cetogliconato	-
β -metilxilosídeo	-	sorbitol	-	lactose	+	β -gentobiose	-	5-cetogliconato	-

Além disso, *Bifidobacterium longum* R175 mostra o seguinte perfil de resistência a antibióticos:

Agente antimicrobiano	dose	resultado	Agente antimicrobiano	dose	resultado
Ampicilina	10mcg	susceptível	nitrofurantoína	300 mcg	susceptível
Bacitracina	10 unidades	susceptível	novobiocina	30 mcg	susceptível
cefalotina	30 mcg	susceptível	penicilina G	10 unidades	susceptível
cloranfenicol	30 mcg	susceptível	Polimixina B	300 unidades	resistente
eritromicina	15 mcg	susceptível	Rifampina	5 mcg	susceptível
gentamicina	10 mcg	resistente	estreptomicina	10 mcg	resistente
canamicina	30 mcg	resistente	sulfisoxazol	300 mcg	resistente
lincomicina	2 mcg	Intermediário	tetraciclina	30 mcg	susceptível
Neomicina	30 mcg	resistente	Vancomicina	30 mcg	susceptível

Lactobacillus helveticus R52 foi registrada com CNCM (Instituto Pasteur) sob número I-1722.

Lactobacillus rhamnosus R11 foi registrada com CNMC (Instituto Pasteur) sob número I-1720 e posteriormente sob número 990411 na Agência Canadense de Inspeção de Alimentos.

Lactobacillus plantarum R1012 foi registrada com CNMC (Instituto Pasteur) sob número MA 18/5U.

Uma mistura particularmente preferida de componentes probióticos compreende *Bifidobacterium longum*, preferencialmente *Bifidobacterium longum* R175 em combinação com *Lactobacillus*, preferencialmente *Lactobacillus helveticus* R52 em combinação com, e/ou *Lactobacillus plantarum*, preferencialmente *Lactobacillus plantarum* R1012.

A mistura específica de probióticos acima identificada apresenta características de estabilidade, aderência, colonização e capacidade ideal de proliferação para os fins da invenção.

De acordo com um aspecto preferido desta invenção, as composições de acordo com esta invenção conterão as espécies de bactérias que constituem a mistura de probióticos nas seguintes quantidades:

- *Bifidobacterium longum*, 50 bilhões de CFU/g;
- *Lactobacillus helveticus*, 150 bilhões de CFU/g;
- *Lactobacillus plantarum*, 150 bilhões de CFU/g.

Ainda em outro aspecto da invenção, a mistura preferida de componentes probióticos compreende *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus rhamnosus*.

As misturas específicas de probióticos acima identificadas apresentam características de estabilidade, aderência, colonização e capacidade ideal de proliferação para os fins da invenção.

Em um aspecto preferido da invenção, as composições da presente invenção conterão as espécies de bactérias que constituem a mistura de probióticos nas seguintes quantidades:

- *Bifidobacterium longum*, 50 bilhões de CFU/g
- *Lactobacillus rhamnosus*, 150 bilhões de CFU/g.

Em uma modalidade preferida, a mistura de componentes probióticos compreende *Bifidobacterium longum*, preferencialmente *Bifidobacterium longum* R175 e *Lactobacillus rhamnosus*, preferencialmente *Lactobacillus rhamnosus* R11.

5 A fim de aumentar e/ou melhorar a sobrevivência das espécies probióticas, é preferido que as espécies probióticas sejam combinadas com um veículo que compreende ingredientes não probióticos que não só funcionem como uma fonte de alimento para os probióticos, como também ajudem a elevar a eficácia global da composição como um todo.

10 Demonstra-se que quando lactobacilos e bifidobactérias são administrados para modular a flora intestinal, o efeito pode ser transitório, porque a proliferação de bactérias exógenas pode ser limitada. Os inventores mostram que *Bifidobacterium*, especificamente *Bifidobacterium longum*, tem sobrevivência insuficiente quando administrada em combinação. Suplementação combinada com prebióticos é exigida para resolver esse problema. Os inventores verificaram surpreendentemente que quando um componente probiótico, mais especificamente *Bifidobacterium longum*, é administrado com um veículo que compreende um prebiótico, a sobrevivência da *Bifidobacterium longum* é melhorada e/ou aumentada.

20 Prebióticos são substâncias usadas para proporcionar nutrição seletiva adequada a grupos bacterianos específicos, a chamada fração probiótica, a fim de sustentar sua resistência, capacidade de colonização e capacidade reprodutora no intestino. Em termos químicos, substâncias prebióticas correspondem a carboidratos digestíveis e indigestíveis e fibras dietéticas. Após serem ingeridas, essas substâncias atravessam quase todo o trato gastrointestinal superior intatas, sem sofrer qualquer processo digestivo. Quando elas atingem o cólon, elas representam o principal substrato de nutrientes das bactérias saudáveis/comensais cuja presença deve ser sustentada, as quais podem usar essas substâncias e digeri-las logo que elas funcionem como um substrato de nutrientes.

30

Nem todas as substâncias agrupadas sob o termo "prebiótico" apresentam as mesmas características específicas.

Prebióticos são uma família de ingredientes alimentares que são muito diferentes uns dos outros e que estimulam e facilitam o crescimento de algumas espécies bacterianas de uma maneira diferente de composto para composto.

- 5 Os prebióticos mais amplamente estudados são inulina e frutooligosacarídeos (FOS).

Inulina, descrita pela primeira vez no início do século XIX, é encontrada em muitas plantas. Inulina extraída de chicória é presentemente preferida para uso dietético. A adição de inulina a um produto (o que a torna um "simbiótico") garante a presença do substrato nutricional essencial ao equilíbrio fisiológico de toda a flora microbiana. Quando inulina, um polissacarídeo não hidrolisável, rompe-se (o que pode somente resultar de ação bacteriana), ela reduz o pH intestinal, conservando, assim, o ambiente do cólon inabitável para crescimento de patógenos.

- 15 FOS são também prebióticos amplamente usados. Em termos químicos, elas são frutanos de cadeia curta e, conseqüentemente, solúveis, com um grau de polimerização que não excede oito unidades de carboidratos. Do ponto de vista biológico, a adição dessa mistura de prebióticos parece ser adequada e bem-sucedida: conforme recentemente relatado, esses prebióticos modificam consideravelmente a composição da microflora intestinal, por exemplo, aumentando as bifidobactérias de 20 a 71% de toda a população intestinal.

O veículo para uso nas composições probióticas da presente invenção preferencialmente compreende um prebiótico, tal como um componente fibroso. O prebiótico pode funcionar como fonte alimentar para espécies probióticas tais como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*. No trato gastrintestinal superior a *Bifidobacterium* não cresce devido ao ambiente de oxigênio, mas o *Lactobacillus* pode ser metabolicamente ativo. Se processos enzimáticos do organismo tornam-se ativos, eles buscam uma fonte de alimento. A relação sinérgica entre o *Lactobacillus* como probióticos e um prebiótico, preferencialmente inulina, pode levar os lactobacilos a sofrer atividade metabólica. Isso pode ser benéfico ao hospedeiro como observado aci-

ma, mas também significaria que as células não podem sobreviver à ação fisiológica no trato gastrointestinal. Assim, pode-se acreditar que a relação sinérgica positiva entre os *Lactobacilli* e a inulina no trato GI superior aumente a capacidade de imunopotencialização das composições que contêm probióticos da presente invenção, mais do que a capacidade das cepas individuais de lactobacilos que não possuem o prebiótico presente, mas essa relação sinérgica ocorreria às custas da porcentagem de sobrevivência cumulativa.

As composições veículo das composições da presente invenção atuam adicionalmente no combate ao microambiente, típico de distúrbios intestinais, que neutraliza colonização eficaz após suplementação com probióticos. Probióticos com frequência encontram um ambiente caracterizado por inflamação, alteração de osmose tissular e situações pró-oxidativas, associadas à presença de cátions livres, que impedem colonização probiótica. Contudo, a composição assim desenvolvida permite taxas muito altas de colonização gastroentérica porque ela prepara o substrato para colonização eficaz simultaneamente à chegada da mistura probiótica.

Quanto aos componentes prebióticos, poderão ser empregados nesse caso carboidratos e fibras tais como GOS, xilooligossacarídeos, maltodextrinas indigestíveis, inulina, isomaltooligossacarídeos, lactitol, lactulose e transgalactooligossacarídeos, embora inulina, frutose e/ou frutooligossacarídeos (FOS) sejam particularmente preferidos no contexto da presente invenção. Em uma modalidade mais preferida o componente prebiótico compreende inulina, frutose e/ou FOS.

Em uma modalidade preferida, as composições que contêm probiótico da presente invenção compreendem um ou mais prebióticos em uma quantidade de cerca de 80% da composição total. Em uma modalidade mais preferida, o prebiótico é uma combinação de inulina e frutose. A inulina está presente em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 100% da composição veículo; mais preferencialmente, inulina está presente em uma quantidade de cerca de 10 a cerca de 100% do veículo; mais preferencialmente, a inulina é cerca de 20% do veículo. A frutose está presente em uma quantidade

de cerca de 1 a cerca de 100% da composição veículo; mais preferencialmente, frutose está presente em uma quantidade de cerca de 1 a cerca de 100% da composição veículo; ainda mais preferencialmente, a frutose está presente em uma quantidade superior a 50% do veículo da composição.

5 A composição veículo compreende ainda lactoferrina. Lactoferrina é uma glicoproteína particular com um peso de 80.000 Dáltons, que é descrita desde 1939. Ela se liga a ferro livre normalmente encontrado em leite materno, saliva, lágrimas, os grânulos secretores secundários dos neutrófilos e as secreções mucosas.

10 Lactoferrina apresenta várias atividades, especialmente atividades antibacterianas e anti-inflamatórias. Como demonstrado por numerosos estudos, lactoferrina exibe uma afinidade particular por ligar-se à parede externa de bactérias gram-negativas e a ferro livre: por meio do primeiro mecanismo de ação, lactoferrina exerce sua capacidade "assassina" sobre bactérias patogênicas, e por meio do segundo mecanismo, ela quebra ferro livre e
15 o remove do microambiente.

Lactoferrina, assim como limita o crescimento intestinal de bactérias patogênicas, proporciona propriedades anti-inflamatórias e de sequestro de radicais livres. Essa dupla capacidade é particularmente importante no
20 intestino, onde bactérias patogênicas às vezes encontram as condições ideais para se proliferarem perigosamente, à medida que o pH típico desse órgão limita a operação correta de transferrina, uma proteína normalmente responsável por remoção de ferro livre, que é uma fonte de radicais livres e consequente dano às membranas da mucosa intestinal. Em uma modalidade
25 preferida, a composição veículo compreende lactoferrina em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 10%; mais preferencialmente, a lactoferrina está presente em uma quantidade de cerca de 0,1% a cerca de 5%; ainda mais preferencialmente, a lactoferrina está presente em uma quantidade de cerca de 0,5%.

30 Lactoferrina tem sido também descrita como apresentando funcionamento como prebiótico, proporcionando um substrato para fermentação por bactérias comensais.

Os sais minerais empregados nas modalidades da presente invenção são um ou mais metais selecionados do grupo que consiste em magnésio, potássio, zinco e opcionalmente cobre, e os sais desses metais, incluindo, mas sem limitar aos mesmos, gliconato de magnésio, citrato de potássio, gliconato de zinco e citrato de cobre.

Como é bem conhecido, durante doenças, o metabolismo celular e tissular leva, especialmente se associado a uma perda de líquidos, a uma perda de sódio, potássio, magnésio e cloro. Esses eletrólitos são essenciais para o correto funcionamento das células das fibras musculares (incluindo as células lisas das fibras musculares intestinais), o equilíbrio de eletrólitos e o equilíbrio osmótico das células e tecidos. Em particular, uma redução nas reservas de potássio e magnésio gera fraqueza, contrações musculares ineficientes e uma deficiência na transmissão de pulsos nas placas neuromusculares, câibras. A adição de magnésio e/ou potássio previne deficiências no caso de estresse, infecção, elevação da temperatura ambiente, esforço físico, diarreia, etc.

Magnésio está presente na composição veículo da presente invenção em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 100%; mais preferencialmente, magnésio está presente em uma quantidade de cerca de 5 a cerca de 20%; ainda mais preferencialmente, de cerca de 14 a cerca de 16% da composição veículo. Mais preferencialmente, magnésio está presente como gliconato de magnésio.

Potássio está presente na composição veículo da presente invenção em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 100%; mais preferencialmente, potássio está presente em uma quantidade de cerca de 0,1 a cerca de 10%; ainda mais preferencialmente, cerca de 5% da composição veículo. Mais preferencialmente, o potássio está presente como citrato de potássio.

Zinco é um elemento vital que é essencial para sustentar a atividade de mais de 100 enzimas, incluindo DNA e RNA polimerases, nas quais ele opera como coenzima. Uma deficiência moderada de zinco leva a uma ligeira hipofunção do sistema imune, com um risco conseqüentemente ele-

vado de distúrbios relacionados com resfriado (tais como síndromes de parainfluenza e influenza). Em crianças, uma deficiência moderada de zinco pode levar a um ligeiro atraso no crescimento, embora uma grave deficiência cause interrupção do crescimento e hipogonadismo. Finalmente, a ausência de zinco durante a gravidez é teratogênica. A presença de zinco promove o funcionamento do sistema imune. Zinco está presente na composição veículo da presente invenção em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 100%; mais preferencialmente, zinco está presente em uma quantidade de cerca de 0,1 a cerca de 20%; ainda mais preferencialmente, cerca de 5% da composição veículo. Mais preferencialmente, o zinco está presente como gliconato de zinco.

Opcionalmente, cobre pode ser adicionado ao veículo da presente invenção. Cobre é um elemento que é absorvido em nível intestinal via mecanismos de transporte específicos. No fígado, ele se conjuga com ceruloplasmina, como resultado de distribuir-se em todos os tecidos. Ele é excretado através da bile e fezes. Nos tecidos, cobre é parte da estrutura de numerosas enzimas, incluindo amino-oxidase, ferro-oxidase, superóxido dismutase, tirosinase, etc. Deficiência de cobre, que é pouco comum, pode causar leucopenia, anemia, disfunções musculoesqueléticas e despigmentação da pele. Uma deficiência durante a gravidez pode levar a baixo peso do bebê no nascimento. Cobre, se presente, normaliza as funções imune, acima de tudo ajudando a combater doenças de inverno sustentadas por vírus comuns.

Opcionalmente, a composição veículo da presente invenção pode ainda compreender glutathione e/ou arabinogalactanas.

Glutathione, também conhecida como GSH, é um tripeptídeo que consiste em glicina, cisteína e glutamato. Ela opera dentro das células como um cofator das enzimas glutathione-transferase e glutathione-peroxidase, que são usadas pelas células para destruir moléculas letais tal como peróxido de hidrogênio. Devido à presença de um grupo sulfidril, glutathione pode passar alternadamente da forma reduzida para a forma oxidada, atuando como um antioxidante. Devido à sua capacidade de reagir com substâncias oxidantes

tais como radicais livres, hidroperóxidos e lipoperóxidos, é, portanto essencial, e é considerada uma enzima-chave na prevenção de envelhecimento celular. Embora ela seja um peptídeo, gastroproteção é desnecessária porque ela é pobremente hidrolisada pelos sucos gástricos e pelas peptidases presentes. A absorção oral é muito boa e ocorre no intestino. Ela foi também administrada recentemente em altas doses a pacientes submetidos a tratamento oncológico e de HIV. O produto é muito seguro. Nenhum dado de toxicidade parece existir. Aceitação por parte do paciente e tolerabilidade do produto são também muito elevadas. Glutathione, se presente, fortalece as defesas antioxidantes do corpo e previne envelhecimento das células e tecidos. Glutathione está presente na composição veículo da presente invenção em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 20%; mais preferencialmente, glutathione está presente em uma quantidade de cerca de 0,1 a cerca de 5%; ainda mais preferencialmente, cerca de 1% da composição veículo.

Arabinogalactanas são polissacarídeos com um alto peso molecular (cerca de 200.000 Dáltons), cuja cadeia principal é um polímero de ácido galacturônico que é parcialmente carboximetilado e acetilado em posições laterais com ramnogalacturonanas. Do ponto de vista biológico, elas são estimuladores macrófagos fortes (em macrófagos humanos e murinos uma excelente elevação na produção de óxido nítrico é observada durante atividade fagocítica se esta é estimulada por esses compostos) e estimulam a atividade das células T (tanto nas populações auxiliares como nas populações citotóxicas).

Arabinogalactanas, se presentes, realizam uma ação imunostimuladora e intensificam a resposta a infecção por patógenos. Mais particularmente, a adição opcional de um potente imunógeno não absorvido específico a células T (arabinogalactana) pode permitir ativação da resposta local específica a células T, que ocorre nas áreas dos nódulos linfáticos do intestino (placas de Peyer), levando assim a uma redução na fração patogênica simultaneamente com a chegada da fração probiótica piogênica. A simultaneidade dos dois eventos facilita adicionalmente os eventos de colonização e proliferação, que são caso contrário tornados difíceis pela fração patogêni-

ca sensível a células T.

Opcionalmente, as composições da presente invenção compreendem ainda sacaromicetos ou leveduras. A presença de sacaromicetos ou leveduras (se usados) é justificada pelo fato de que eles liberam elementos e vitaminas de traços com valor nutricional e competem com patógenos. Leveduras podem também ser empregadas na forma de um lisado enriquecido com glicanos, isto é, estruturas de polissacarídeo que limitam aderência bacteriana de patógenos à mucosa intestinal. De acordo com uma modalidade preferida, as composições de acordo com a invenção poderão conter em particular *Saccharomyces cerevisiae* e/ou *boulardii*. De acordo com uma modalidade particularmente preferida, a *Saccharomyces boulardii* empregada pela presente invenção é *Saccharomyces boulardii* ATCC 74012.

Com relação ao acréscimo adicional opcional de ingredientes que não são diretamente probióticos, seu principal objetivo é também proporcionar uma vantagem prebiótica adicional; o precedente aplica-se, por exemplo, a transportadores de cisteína, tais como N-acetilcisteína e similares; o mesmo se aplica a ingredientes com uma ação quelante sobre cátions e ânions livres tais como procianidinas, antocianos e catequinas com qualquer grau de polimerização, e similares; e o mesmo se aplica a elementos que já modulam a resposta imune em nível entérico, como as várias espécies de *Echinacea*, *Uncaria* e *Astragalus*. Finalmente, o mesmo se aplica à adição de macro ou micronutrientes e vitaminas solúveis em água ou em gordura. Por fim, a adição de antioxidantes pode ainda ter um efeito protetor sobre os probióticos contidos nas composições da presente invenção.

Verifica-se que as composições de acordo com a invenção possuem uma considerável atividade de melhoramento da saúde, mantêm e/ou restauram a saúde intestinal, previnem as consequências de estresse e realizam uma ação anti-inflamatória e imunomoduladora. Ao mesmo tempo, elas garantem colonização eficaz. O efeito das composições de acordo com a invenção é maior que aquele obtido após administração separada dos componentes individuais da combinação, aparentemente devido à sinergia entre os vários componentes.

Composições particularmente preferidas da presente invenção contêm:

- a) uma mistura de componentes probióticos que compreende *Bifidobacterium longum* R175, *Lactobacillus helveticus* R52 e *Lactobacillus plantarum* R1012;
- b) um veículo que compreende:
 - 1) componente prebiótico que compreende inulina e frutose;
 - 2) lactoferrina;
 - 3) uma mistura de sais minerais que consiste em sais de magnésio, de potássio e de zinco; e
 - 4) glutatona.

Em uma modalidade mais preferida, as composições da presente invenção contêm:

- a) uma mistura de componentes probióticos que compreende *Bifidobacterium longum*, 50 bilhões de CFU/g; *Lactobacillus helveticus*, 150 bilhões de CFU/g; e *Lactobacillus plantarum*, 150 bilhões de CFU/g; e
- b) um veículo que compreende:
 - 1) uma mistura de prebióticos que compreende cerca de 80% da composição veículo total na qual os prebióticos são inulina e frutose, em que a inulina está presente em uma quantidade de cerca de 10 a cerca de 100% da composição veículo; mais preferencialmente, a inulina é cerca de 20% do veículo e frutose está presente em uma quantidade de cerca de 1 a cerca de 100% da composição veículo; mais preferencialmente, frutose está presente em uma quantidade de cerca de 1 a cerca de 100% da composição veículo; ainda mais preferencialmente, a frutose está presente em uma quantidade maior que 50% do veículo da composição;
 - 2) lactoferrina em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 10%; mais preferencialmente, a lactoferrina está presente em uma quantidade de cerca de 0,1% a cerca de 5%; ainda mais preferencialmente, a lactoferrina está presente em uma quantidade de cerca de 0,5%;
 - 3) sais minerais selecionados do grupo que consiste em sais de magnésio, de potássio e de zinco, em que magnésio está presente na com-

posição veículo da presente invenção em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 100%; mais preferencialmente, em uma quantidade de cerca de 5 a cerca de 20%; ainda mais preferencialmente, cerca de 14 a cerca de 16% da composição veículo, e o magnésio é gliconato de magnésio; em que o potássio está presente em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 100%; mais preferencialmente, potássio está presente em uma quantidade de cerca de 0,1 a cerca de 10%; ainda mais preferencialmente, cerca de 5% da composição veículo, e, adicionalmente, o potássio é citrato de potássio; e ainda em que o zinco está presente na composição veículo da presente invenção em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 100%; mais preferencialmente, zinco está presente em uma quantidade de cerca de 0,1 a cerca de 20%; ainda mais preferencialmente, cerca de 5% da composição veículo, e em que o zinco está presente como gliconato de zinco; e

4) glutathione, em que a glutathione está presente na composição veículo da presente invenção em uma quantidade de cerca de 0 a cerca de 20%; mais preferencialmente, glutathione está presente em uma quantidade de cerca de 0,1 a cerca de 5%; ainda mais preferencialmente, cerca de 1% da composição veículo.

Além disso, composições particularmente preferidas da presente invenção contêm:

a) uma mistura de componentes probióticos que compreende *Bifidobacterium longum* R175 e *Lactobacillus rhamnosus* R11; e *Saccharomyces boulardii*; e

b) um veículo que compreende:

1) um componente prebiótico que consiste em inulina e frutose;

2) lactoferrina;

3) uma mistura de sais minerais que consiste em magnésio, sais de potássio e sais de zinco; e

4) glutathione.

De acordo com um aspecto preferido da presente invenção, as composições aqui descritas serão usadas para preparar suplementos dietéticos.

As composições de acordo com a invenção podem ser formuladas adequadamente para administração oral, e serão preparadas de acordo com métodos convencionais conhecidos em tecnologia farmacêutica, tais como aqueles descritos em *Remington's Pharmaceutical Handbook*, Mack
5 *Publishing Co.*, N.Y., USA, usando excipientes, diluentes, cargas e antiaglomerantes aceitáveis para seu uso final. Ingredientes adicionais exemplares incluem ácido cítrico, óxido de magnésio, dióxido de silício e outros ingredientes que aquele versado no estado da técnica consideraria.

As composições de acordo com a invenção podem ser formuladas, por exemplo, na forma de sachês solúveis, formas oralmente solúveis, cápsulas, comprimidos, comprimidos mastigáveis, comprimidos multicamada com liberação dependente do tempo e do pH, e granulados.

As composições da presente invenção podem ser usadas para aumentar e/ou melhorar a viabilidade e sobrevivência das espécies probióticas, mais particularmente para aumentar e/ou melhorar a viabilidade de *Bifidobacterium longum*. Esses métodos compreendem misturar o componente probiótico que compreende *Bifidobacterium longum* isoladamente ou em combinação com uma ou mais espécies probióticas e um veículo que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais prebióticos;
15 uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais sais minerais; uma quantidade terapeuticamente eficaz de lactoferrina e, opcionalmente, uma quantidade terapeuticamente eficaz de glutatona. Como usada aqui, "quantidade" refere-se à quantidade ou a concentração conforme apropriado ao contexto. A quantidade de um material que constitui uma quantidade terapeuticamente eficaz varia de acordo com fatores tais como a potência, eficácia e similares do material particular, a rota de administração, e da forma de dosagem usada. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um material particular pode ser selecionada por aqueles versados no estado da técnica com devida consideração de tais fatores. A concentração do material depende da dosagem desejada.
25
30

As composições formuladas, como descritas aqui, são estáveis sob armazenamento à temperatura ambiente.

Adicionalmente, as composições da presente invenção podem também ser usadas para melhorar e/ou aumentar o efeito terapêutico dos materiais probióticos. Uma vez que as composições da invenção têm de exibir sobrevivência probiótica melhorada, acredita-se que as formulações apresentam maior eficácia uma vez que uma quantidade maior do probiótico sobreviva ao trânsito através do trato gastrointestinal tanto superior quanto inferior. Consequentemente, as composições da presente invenção podem ser usadas para melhorar e/ou aumentar a saúde e/ou imunidade gastrointestinal em um indivíduo humano com necessidade desse tratamento.

Alguns exemplos de formulações de acordo com a invenção são apresentados abaixo. Não obstante, as faixas numéricas e parâmetros que estabelecem o amplo escopo da invenção são aproximações, os valores numéricos mostrados nos exemplos específicos são registrados o mais precisamente possível. Qualquer valor numérico, contudo, inerentemente contém certos erros necessariamente resultantes do desvio padrão encontrado em suas respectivas medições de teste. Os exemplos seguintes destinam-se a ilustrar a invenção sem limitar o escopo como resultado.

Os Exemplos seguintes são oferecidos para ilustrar o método reivindicado e sua prática.

20

EXEMPLOS

Exemplo 1

NOME DO COMPONENTE		mg/sachê
Material Probiótico:		
<i>Lactobacillus helveticus</i> Rosell 52	150 bilhões de CFU/g	73,333
<i>Bifidobacterium longum</i> R175	50 bilhões de CFU/g	20,000
<i>Lactobacillus plantarum</i> Rosell 1012	150 bilhões de CFU/g	20,000
Material do veículo:		
Óxido de magnésio		41,446
Gliconato de magnésio		341,297
Citrato de potássio		138,290

NOME DO COMPONENTE	mg/sachê
Gliconato de zinco	111,111
Glutaciona	20,000
Lactoferrina	11,364
Citrato de cobre	2,834
Inulina	500,000
Frutose	1291,125
Excipientes adicionais (opcionais)	
Sucralose	4,000
Acessulfame K	12,000
Aromatizante	150,000
Aerosil 200	40,000
Colorante: E124	2,200
Colorante: E102	1,000
Ácido cítrico anidro	220,000

A formulação descrita acima é preparada como segue: *Lactobacillus Plantarum*, *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum* são misturados com inulina e agitados sob 32 rpm por aproximadamente 10 min. Em seguida, frutose, gliconato de magnésio, gliconato de zinco, ácido cítrico, aromatizante, citrato de potássio, óxido de magnésio, dióxido de silício, glutaciona, acessulfame de potássio, lactoferrina e sucralose são adicionados a uma mistura e agitados sob 32 rpm por outros 10 min.

Exemplo 2

NOME DO COMPONENTE	mg/sachê
Materiais probióticos :	
<i>Saccharomyces boulardii</i> 20 bilhões de CFU/g	100,000
<i>Bifidobacterium longum</i> R175 50 bilhões de CFU/g	20,000
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Rosell 11 150 bilhões de CFU/g	46,667
Materiais do veículo:	
Gliconato de magnésio	511,945
Gliconato de zinco	50,000
Lactoferrina	11,364
Frutose	2585,024
Inulina	500,000
Excipientes adicionais (opcionais)	
Aromatizante damasco 502168AP0551	70,000
Ácido cítrico anidro	50,000
Colorante: 1% de betacaroteno	28,000
Sucralose	7,000
Aerosil 200	20,000
TOTAL	4000,00

Exemplo 3

NOME DO COMPONENTE	mg/sachê
Materiais probióticos:	
<i>Lactobacillus helveticus</i> Rosell 52 150 bilhões de CFU/g	73,333
<i>Bifidobacterium longum</i> R175 50 bilhões de CFU/g	20,000
<i>Lactobacillus plantarum</i> Rosell 1012 150 bilhões de CFU/g	20,000
Veículo:	
Óxido de magnésio	41,446
Gliconato de magnésio	341,297

NOME DO COMPONENTE	mg/sachê
Citrato de potássio	138,290
Gliconato de zinco	111,111
Glutaciona	20,000
Lactoferrina	11,364
Inulina	500,000
Frutose	1335,678
Excipientes adicionais (opcionais):	
Sucralose	4,000
Acessulfame K	12,000
Aromatizante	150,000
Aerosil 200	40,000
Colorante: E124	2,200
Colorante: E102	1,000
Ácido cítrico anidro	220,000
TOTAL	3000,00

A formulação descrita acima é preparada como segue: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum* são misturados com inulina e agitados sob 32 rpm por aproximadamente 10 min. Em seguida, frutose, gliconato de magnésio, gliconato de zinco, ácido cítrico, aromatizante, citrato de potássio, óxido de magnésio, dióxido de silício, glutaciona, acessulfame de potássio, lactoferrina e sucralose são adicionados a uma mistura e agitados sob 32 rpm por outros 10 min.

Exemplo 4

As espécies probióticas contidas na formulação descrita no exemplo 3 foram testadas para determinar a taxa de sobrevivência dos probióticos. Sobrevivência das cepas probióticas na composição da presente invenção em comparação com as cepas individuais foi testada em um modelo dinâmico *in vitro* do trato gastrointestinal superior, também conhecido co-

mo TIM-1. O modelo TIM-1 pode estimular condições na câmara gástrica e intestino delgado humano e, assim, pode ser usado para avaliar sobrevivência cumulativa percentual de probióticos à medida que eles transitam pelo trato gastrointestinal superior.

5 A composição do exemplo 3 testada em TIM-1 continha uma quantidade total de células probióticas (unidades formadoras de colônia ou CFU) de $9,81 \times 10^9$ CFU sob enumeração. Quando os níveis individuais das cepas probióticas contidas na composição do exemplo 3 foram avaliados, a quantidade de cada cepa quantificada por plaqueamento microbiano
10 foi:

<i>Lactobacillus helveticus</i>	$8,0 \times 10^9$ CFU
<i>Lactobacillus plantarum</i>	$8,7 \times 10^8$ CFU
<i>Bifidobacterium longum</i>	$9,1 \times 10^8$ CFU

O nível quantificado para cada cepa probiótica na composição
15 do exemplo 3 foi o nível alvo usado quando do teste das cepas individuais no modelo TIM-1. Em outras palavras, o nível das cepas probióticas, que no produto ou individualmente, foi ajustado para ser de 8×10^9 CFU para *L. helveticus*, $8,7 \times 10^8$ CFU para *L. plantarum* e $9,1 \times 10^8$ CFU para *B. longum*.

20 Nos experimentos efetivos, as cepas probióticas individuais e a composição do exemplo 3 são administrados com uma refeição (pequeno almoço do continente europeu). Desse modo, a quantidade final de cada cepa, quando misturadas com a refeição, foi confirmada e, assim, o nível médio de partida para cada probiótico que foi usado, tanto individualmente
25 como na composição do exemplo 3, foi:

<i>Lactobacillus helveticus</i>	$8,6 \times 10^9$ CFU
<i>Lactobacillus plantarum</i>	$7,0 \times 10^8$ CFU
<i>Bifidobacterium longum</i>	$1,4 \times 10^9$ CFU

Os resultados do teste TIM-1 são resumidos na tabela abaixo:

Cepa Probiótica		% de sobrevivência cumulativa	% média de sobrevivência cumulativa	Unidades Formadoras de Colônias (CFU)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Curso 1a	2,20	1,4	1,2 x 10E8 CFU
	Curso 2a	0,44		
	Curso 1b	2,55		
	Curso 2b	0,49		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Curso 1a	12,45	9,7	6,8 x 10E7 CFU
	Curso 2a	5,63		
	Curso 1b	12,92		
	Curso 2b	7,77		
<i>Bifidobacterium longum</i>	Curso 1a	29,55	42,9	6,0 x 10E8 CFU
	Curso 2a	31,20		
	Curso 1b	68,55		
	Curso 2b	42,11		

Em seguida, cada uma das cepas identificadas abaixo foi individualmente testada por meio de TIM-1. Os dados estão apresentados abaixo na tabela seguinte.

5

Cepa Probiótica		% de sobrevivência cumulativa	% média de sobrevivência cumulativa	Unidades Formadoras de Colônias (CFU)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Curso 1	13,11	13,1	1,1 x 10E9 CFU
	Curso 2	13,15		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Curso 1	45,17	39,2	2,7 x 10E8 CFU
	Curso 2	33,24		
<i>Bifidobacterium longum</i>	Curso 1	0,01	0,02	2,8 x 10E5 CFU
	Curso 2	0,02		

Esses dados mostram que há um efeito sinérgico da composição. Mais especificamente, o número de células probióticas de *Bifidobacterium longum* que sobrevivem ao trânsito pelo trato gastrointestinal superior é

1.000 vezes maior (superior a $3_{\log_{10}}$) do que quando testadas sem os outros probióticos e veículo. A *Bifidobacterium longum* quando administrada independentemente da composição da invenção não demonstrou sobrevivência robusta. De fato, a *Bifidobacterium longum* tinha apenas uma sobrevivência

5 cumulativa de 0,02% quando administrada sozinha em comparação com sobrevivência cumulativa de 42,9% quando administrada em combinação com *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* e o veículo que compreende: um prebiótico (inulina e frutose), gliconato de zinco, gliconato de magnésio, citrato de potássio; glutatona e lactoferrina; e, opcionalmente,

10 ácido cítrico, óxido de magnésio e dióxido de silício.

REIVINDICAÇÕES

10 1. Composição probiótica, caracterizada pelo fato de que com-
preende:

a) uma mistura de componentes probióticos que compreende

Bifidobacterium longum, 50 bilhões de CFU/g;

Lactobacillus helveticus, 150 bilhões de CFU/g; e

Lactobacillus plantarum, 150 bilhões de CFU/g; e

15 b) um veículo que compreende:

uma mistura de prebióticos que compreende inulina em uma
quantidade de 20% da composição veículo total e frutose em uma quantida-
de de cerca de 50% da composição veículo;

20 lactoferrina em uma quantidade de 0,5% da composição veícu-
lo;

gliconato de magnésio em uma quantidade de 14% a 16% da
composição veículo total;

citrato de potássio em uma quantidade de 5% da composição
veículo total;

25 gliconato de zinco em uma quantidade de 5% da composição
veículo total; e

glutathione, em que a glutathione está em uma quantidade de
cerca de 1% da composição veículo total.

30 2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada
pelo fato de que é para uso por administração oral para a manutenção e/ou
restauração da saúde intestinal ou para prevenir disbioses de qualquer etio-
logia em mamíferos.

35 3. Uso da composição, como definida na reivindicação 1, carac-
terizado pelo fato de que é para a preparação de uma formulação para ad-
ministração oral para a manutenção e/ou restauração da saúde intestinal ou
para prevenir disbioses de qualquer etiologia em mamíferos.