

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA

**DANIELA NOGUEIRA PRADO DE SOUZA**

**EFEITO DE *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve*  
NA DIARRÉIA ASSOCIADA A ANTIMICROBIANO:  
EXPERIMENTO CLÍNICO DUPLO-CEGO**

Uberlândia – MG

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DANIELA NOGUEIRA PRADO DE SOUZA**

**EFEITO DE *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve*  
NA DIARRÉIA ASSOCIADA A ANTIMICROBIANO:  
EXPERIMENTO CLÍNICO DUPLO-CEGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Miguel Tanús Jorge

Uberlândia – MG

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

S729e Souza, Daniela Nogueira Prado de, 1981-  
Efeito de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve* na diarreia associada a antimicrobiano [manuscrito] : experimento clínico duplo-cego / Daniela Nogueira Prado de Souza. - 2010.  
52 f. : il.

Orientador: Miguel Tanús Jorge.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

1. Diarreia - Teses. 2. Diarreia - Tratamento - Teses. 3. Probióticos - Teses. 4. *Lactobacillus casei* - Teses. 5. *Bifidobacterium* - Teses. I. Jorge, Miguel Tanús. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 616.34-008.314.4

---

**DANIELA NOGUEIRA PRADO DE SOUZA**

**EFEITO DE *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve*  
NA DIARRÉIA ASSOCIADA A ANTIMICROBIANO:  
EXPERIMENTO CLÍNICO DUPLO-CEGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

**Uberlândia, 18 de Fevereiro de 2010**

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Augusto Diogo Filho – FAMED/UFU

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Marques Oliveira – FAMED/UFU

---

Prof. Dr. Mário Cícero Falcão – Faculdade de Medicina/ USP

Ao meu esposo, **Érico**, pelo estímulo, paciência, carinho e compreensão durante a execução deste trabalho e por todas as conquistas da minha vida.

Aos meus pais, **Antônio e Kátia**, e minha irmã, **Marcela**, pela compreensão da minha ausência durante os momentos de festividade e reuniões familiares, pelo apoio aos meus estudos, pela confiança e auxílio durante o surgimento de novos desafios e pela dedicação ao meu “crescimento” durante todas as fases de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Miguel Tanús Jorge**, por acreditar e apoiar na execução deste projeto e pela orientação sempre presente e precisa, transmitindo seriedade e tranquilidade durante todos os momentos.

À minha amiga **Liandra Freitas Marquez Bernardes**, pelo incentivo na elaboração e execução do trabalho e pela contribuição intelectual no início do projeto.

À minha chefia, **Samuel Amaro Júnior**, pelo apoio e compreensão nos momentos das aulas e coleta de dados e por permitir que o Serviço de Nutrição e Dietética do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Uberlândia pudesse colaborar com o meu trabalho.

Aos funcionários do **Serviço de Nutrição e Dietética**, pela colaboração na randomização dos pacientes, preparo e distribuição dos probióticos e placebos. Obrigada pela paciência e total empenho para realização do trabalho.

Às **nutricionistas e amigas** do Serviço de Nutrição e Dietética que me auxiliaram na busca pelos pacientes e colaboraram integralmente para que o protocolo planejado fosse cumprido. Obrigada, especialmente, a **Vanessa Custódio Afonso Rocha, Dalila Cristina de Almeida, Thatty Cristina, Renata Paniago Andrade de Lúcia, Cínara Knychala e Ana Carolina Cardoso Borges**, pelo companheirismo e pela amizade.

Ao estatístico **Rogério de Melo Costa Pinto** que me direcionou na organização e análise das informações coletadas.

Aos Professores Doutores **Augusto Diogo Filho e Sebastião Rodrigues Ferreira Filho** por contribuírem para uma melhor qualidade do trabalho com críticas construtivas, durante o exame de qualificação.

Aos Professores Doutores **Augusto Diogo Filho, Luiz Carlos Marques Oliveira e Mário Cícero Falcão** por aceitarem compor a banca examinadora da dissertação e contribuírem com críticas e sugestões preciosas para o enriquecimento do trabalho.

“O que prevemos raramente ocorre,  
o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli

## RESUMO

A diarreia associada ao uso de antimicrobiano (DAA) é caracterizada como aquela desenvolvida depois do início da terapia com antimicrobiano ou até seis a oito semanas após o término do tratamento. É considerada um importante efeito colateral dessa classe de fármacos e ocorre em aproximadamente 5% a 25% dos pacientes em uso de antimicrobiano. O objetivo do presente estudo foi conhecer o efeito do uso de probióticos no tratamento da DAA. Foram incluídos pacientes hospitalizados com diarreia desenvolvida durante o uso ou até sete dias pós a suspensão do ou dos antimicrobianos em uso. Os pacientes foram randomizados, de forma duplo cega, para receberem dieta padronizada associada, três vezes ao dia, ao probiótico (*Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve*) ou placebo. Para o grupo experimento e controle, respectivamente, o tempo médio de tratamento foi de  $5,06 \pm 2,18$  e  $5,49 \pm 3,17$  dias ( $p=0,95$ ) e o tempo médio de duração da diarreia, entre aqueles que se curaram, foi de  $4,87 \pm 2,13$  e  $4,52 \pm 2,55$  dias ( $p=0,36$ ). Quatro (11,43%) pacientes que receberam probiótico e dez (28,57%) daqueles que receberam placebo não se curaram e as proporções de cura e recidiva foram semelhantes entre os grupos. Sete pacientes do grupo probiótico e sete do placebo apresentaram, além da diarreia, distensão e/ou cólica abdominal e/ou vômito ( $p=1,00$ ). Diante do exposto, conclui-se que *L. casei* associado a *B. breve*, na dosagem e frequência administradas, não apresentam efeito na DAA.

Palavras-chave: Probióticos, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve*, diarreia associada a antimicrobiano.

## ABSTRACT

Antibiotic-associated diarrhea (AAD) is characterized as that developed after the start of antibiotic therapy or up to six to eight weeks after completion of treatment. It is considered an important side effect of this class of drugs and occurs in approximately 5% to 25% of patients on antimicrobials. The aim of this study was to investigate the effect of the use of probiotics in the treatment of DAA. The study included patients hospitalized with diarrhea developed during the use or up to seven days after the suspension of antimicrobial use. The patients were randomized blindly to receive standardized diet associated, three times a day, the probiotic (*Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve*) or placebo. For the experimental and control group, respectively, the average time of treatment was  $5.06 \pm 2.18$  and  $5.49 \pm 3.17$  days ( $p=0.95$ ) and the mean duration of diarrhea, among those who healed, was  $4.87 \pm 2.13$  and  $4.52 \pm 2.55$  days ( $p=0.36$ ). Four patients (11.43%) who received probiotics and ten (28.57%) of those who received placebo were not cured and no cure rates and relapse rates were similar between groups. Seven patients of probiotic group and seven of placebo group, showed ,in addition to diarrhea, bloating and / or abdominal cramps and / or vomiting ( $p=1.00$ ). In this light, it is concluded that *L. casei* associated with *B. breve*, in the administered dosage and frequency, have no effect on the DAA.

Keywords: Probiotics, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve*, antibiotic-associated diarrhea.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**B. breve** - *Bifidobacterium breve*

**B. infantis** - *Bifidobacterium infantis*

**B. lactis** - *Bifidobacterium lactis*

**B. longum BB536** - *Bifidobacterium longum BB536*

**C. difficile** - *Clostridium difficile*

**DAA** - Diarréia associada a antimicrobiano

**g** - gramas

**h** - hora

**HCU** - Hospital de Clínicas de Uberlândia

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana (sigla originada do inglês: Human Immunodeficiency Virus)

**kg** - quilograma

**L. acidophilus** - *Lactobacillus acidophilus*

**L. bulgaricus** - *Lactobacillus bulgaricus*

**L. casei immunitas** - *Lactobacillus casei immunitas*

**L. casei shirota** - *Lactobacillus casei shirota*

**L. rhamnosus GG** - *Lactobacillus rhamnosus GG*

**L. sporogens** - *Lactobacillus sporogens*

**ml** - mililitro

**mOsm** - miliosmole

**S. boulardii** - *Saccharomyces boulardii*

**SENUD** - Serviço de Nutrição e Dietética

**S. thermophilus** - *Streptococcus thermophilus*

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**TGI** - Trato gastrointestinal

**UFC** - Unidade Formadora de Colônia

**UFU** - Universidade Federal de Uberlândia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	12
1.1 A microbiota intestinal e o mecanismo da DAA	13
1.2 Os probióticos	14
1.3 Tolerância e funcionalidade de produtos contendo probióticos	17
<b>2 OBJETIVOS</b>	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
<b>3 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	20
3.1 Amostra	20
3.2 Randomização	20
3.3 Probiótico e placebo	23
3.4 Coleta de dados	24
3.5 Tempo de intervenção	25
3.6 Declaração de “confronto de interesse dos pesquisadores”	25
3.7 Análise estatística	25
3.8 Considerações éticas	26
<b>4 RESULTADOS</b>	27
<b>5 DISCUSSÃO</b>	31
<b>6 CONCLUSÃO</b>	35
<b>REFERÊNCIAS</b>	36
<b>ANEXOS</b>	43
Anexo 1a – Randomização dieta oral	44
Anexo 1b – Randomização dieta enteral	45
Anexo 2a – Ficha controle dieta oral	46
Anexo 2b – Ficha controle dieta enteral	48
Anexo 3 – Ficha de avaliação diária	50
Anexo 4 – Termo de consentimento livre esclarecido	51

## 1 INTRODUÇÃO

A diarreia associada ao uso de antimicrobiano (DAA) é definida como aquela desenvolvida depois do início da terapia com antimicrobiano ou até 6 a 8 semanas após a sua suspensão (BEAUGERIE; PETIT, 2004; DORON; HIBBERD; GORBACH, 2008), desde que descartado qualquer outro agente causador da diarreia.

A DAA ocorre em aproximadamente 5% a 25% dos pacientes em uso de antimicrobiano (BERGOGNE-BÉRÉZIN, 2000; HURLEY; NGUYEN, 2002). Esta frequência sofre importante influência artificial pela definição de DAA utilizada por diferentes autores e, também, com o uso de antimicrobianos específicos, como as cefalosporinas, clindamicina, amoxicilina-clavulanato e penicilinas de largo espectro, dosagem e uso prévio de agentes antimicrobianos (ARVOLA et al., 1999; BEAUGERIE; PETIT, 2004).

A definição de diarreia geralmente se baseia na frequência das evacuações e na consistência das fezes. Embora, seja relativamente fácil determinar a frequência das evacuações, há controvérsias quanto à forma mais adequada de se mensurar a quantidade e a consistência das fezes na prática clínica, o que dificulta a padronização do diagnóstico (WHELAN et al., 2001; WHELAN; JUDD; TAYLOR, 2003).

De uma forma geral, a diarreia aguda é definida como a ocorrência de três ou mais episódios de eliminação de fezes líquidas em 24 horas (OMS, 1988 apud MARANHÃO, 2001). No entanto, para a DAA não existe consenso. D'Souza e colaboradores (2002), por exemplo, para fins de realização de meta-análise, definiram esse tipo de diarreia como uma "mudança do hábito intestinal com duas ou mais evacuações líquidas durante, pelo menos, dois dias". Alguns autores também consideraram a consistência das fezes associada ou não ao aumento da frequência de evacuação para o diagnóstico de diarreia (GOTZ et al., 1979; THOMAS et al., 2001). Outros, ainda, basearam-se na eliminação de fezes aquosas, três ou mais vezes ao dia durante, pelo menos, dois dias (LEWIS; POTTS; BARRY, 1998; MADEO; WHITLOCK; MARTIN, 1999).

O tempo prolongado de uso e o uso de mais de um antimicrobiano em combinação constituem-se fatores de risco para DAA, assim como idade menor do que seis e maior do que 65 anos, cirurgia gastrointestinal, doenças graves,

imunossupressão e um maior tempo de hospitalização (BERGOGNE-BÉRÉZIN, 2000; KATZ, 2006).

### **1.1 A microbiota intestinal e o mecanismo da DAA**

A população bacteriana do trato gastrintestinal (TGI) humano formada por diversos tipos de microrganismos constitui um ecossistema complexo conhecido como microbiota intestinal. Nesse meio, habitam mais de 400 espécies diferentes de microrganismos que existem em concentrações que variam de  $10^3$  UFC/g de conteúdo no estômago a  $10^{12}$  UFC/g de conteúdo no cólon, predominando, sobretudo no cólon, as bactérias anaeróbicas (1000 anaeróbicas/1 aeróbica) (QUIGLEY; QUERA, 2006). Como as espécies microbianas não estão presentes em números iguais, a microbiota do cólon é distribuída em três estratificações: a dominante ( $10^9 - 10^{11}$  UFC/g de conteúdo intestinal), a subdominante ( $10^7 - 10^8$  UFC/g) e a residual ( $< 10^7$  UFC/g). Essa última corresponde ao número de bactérias “em trânsito intestinal” e é considerada potencialmente patogênica. (BOURLIOUX et al., 2003; GILL; GUARNER, 2004; DAMIÃO, 2006).

Quando em estado de equilíbrio, a microbiota intestinal não patogênica exerce importante influência no controle da população microbiana por meio do mecanismo de resistência à colonização que reprime a multiplicação de microrganismos nocivos ao organismo, mantendo-os em níveis baixos ou eliminando-os (DAMIÃO, 2006; WILLIAM, MABEL, ALBERTO, 2006).

No entanto, alguns fatores, como o uso de antimicrobianos, podem provocar desequilíbrio nesse ecossistema resultando na redução da proporção de bactérias anaeróbicas em relação às aeróbicas e, conseqüentemente, na alteração das funções bacterianas. Sendo assim, pode ocorrer tanto uma redução do processo de fermentação de carboidratos não digeríveis, levando a uma diarreia osmótica, como um impacto negativo sobre o mecanismo de resistência à colonização, criando um ambiente propício ao crescimento de microrganismos patogênicos resistentes a antimicrobianos e capazes de provocar diarreia (BERGOGNE-BÉRÉZIN, 2000; DORON; HIBBERD; GORBACH, 2008).

O *Clostridium difficile* é o patógeno mais comumente relacionado e está envolvido em cerca de 20% dos casos de DAA em indivíduos hospitalizados (KELLY; POTHOUKAKIS; LAMONT, 1994; LEWIS, FREEDMAN, 1998; PLUMMER et al, 2004). Esta pode manifestar-se como diarreia não complicada, colite inespecífica ou colite pseudomembranosa. Nessa última forma de apresentação, a grande maioria dos casos ocorre pela presença do *Clostridium difficile*, caracterizada pela presença de diarreia aquosa, febre, vômitos, dor e distensão abdominal, desidratação, leucocitose e hipoalbuminemia. O diagnóstico da colite pseudomembranosa pode ser realizado pela cultura das fezes em busca de *C. difficile* ou pela pesquisa das toxinas A (enterotoxina) ou B (citotoxina), no lúmen intestinal, ambas responsáveis por danos na mucosa e inflamação intestinal. Em alguns casos, a colonoscopia pode ser indicada (KELLY; POTHOUKAKIS; LAMONT, 1994; BERGOGNE-BÉRÉZIN, 2000). Esta doença pode ser contagiosa, especialmente em ambiente hospitalar (KELLY; POTHOUKAKIS; LAMONT, 1994; LEWIS, POTTS, BARRY, 1998; HURLEY; NGUYEN, 2002).

## 1.2 Os probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos e não patogênicos, que, quando ingeridos, podem colonizar o trato intestinal humano e atuar de forma benéfica ao hospedeiro, promovendo restauração da microbiota (FULLER, 1991; WILLIAN; MABEL; ALBERTO, 2006). Assim, eles participam da composição da microbiota intestinal, que é de grande importância para a manutenção da integridade da barreira intestinal. Esta possui três funções fundamentais: proteção, imunomodulação e benefícios nutricionais.

Na primeira, a microbiota intestinal exerce um importante mecanismo de proteção ao hospedeiro, impedindo a adesão e proliferação de bactérias patogênicas na mucosa intestinal (resistência à colonização). Isso ocorre devido a competição por sítios de ligação em receptores intestinais e por nutrientes, produção de substâncias antimicrobianas e redução do pH do meio, modificando o metabolismo microbiano e dificultando o crescimento dos microrganismos patogênicos (PENNA et al, 2000; KOPP-HOOLIHAN, 2001). A função

imunomoduladora envolve a interação da microbiota com células imunológicas presentes na mucosa intestinal ativando o sistema imunológico contra microrganismos nocivos ao hospedeiro. Finalmente, a última função está relacionada à produção, por meio da fermentação de carboidratos não digeríveis, principalmente de ácidos graxos de cadeia curta, substâncias essenciais à nutrição do enterócito (DAMIÃO, 2006), e também de vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, ácido fólico), vitamina K e biotina (COPPINI; MARCO; WAITZBERG, [200-]; KOPP-HOOLIHAN, 2001).

Para que uma espécie microbiana exerça suas atividades benéficas é necessário que se encontre em um número mínimo de células viáveis, o que corresponde a uma população maior ou igual a  $10^7$  UFC/g de conteúdo intestinal, quantidade representativa do número de células da microbiota residual (PENNA et al, 2000; WHELAN et al., 2001). Para isso, os probióticos precisam se manter em quantidades suficientes na sua forma de consumo, ser resistentes à ação do pH gástrico, secreções biliares e pancreáticas e ter boa capacidade de aderência à mucosa intestinal, fator esse essencial para a colonização (TUOMOLA et al., 2001; WHELAN et al, 2001).

Dentre os microrganismos probióticos que possuem a habilidade de atravessar o TGI e permanecer em sua forma ativa estão as bactérias do gênero *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium spp*, normalmente existentes ao longo do TGI. A sobrevivência dessas bactérias à passagem do TGI é de, aproximadamente, 10% e 30% da quantidade ingerida respectivamente (POCHART et al, 1992; BEZKOROVAINY, 2001).

O processo de colonização ocorre, principalmente, no cólon, uma vez que é neste segmento que o trânsito intestinal é mais lento, permitindo um importante crescimento desses microrganismos (BOURLIOUX et al., 2003). Também contribuem para a aderência microbiana intestinal o número de bactérias viáveis existentes no cólon, pH do meio e fatores nutricionais (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

No cólon humano as bactérias probióticas realizam o processo de fermentação de resíduos alimentares, destacando-se os carboidratos não digeríveis ou parcialmente digeríveis como fibras alimentares, amido resistente e alguns açúcares (arabinose, xilose, manose e ramnose), produzindo ácidos graxos de cadeia curta, especialmente os ácidos butírico, acético e propiônico, ácidos orgânicos (ácido lático) e gases, proporcionando benefícios às células intestinais. As

principais ações dessas substâncias são: propiciar fonte energética para os colonócitos, especialmente por meio do ácido butírico; regular a proliferação epitelial e diferenciação da mucosa colônica; diminuir o pH do cólon equilibrando a microbiota intestinal; intensificar a absorção de água, sódio e potássio e aumentar a concentração de bicarbonato, levando a um efeito importante na prevenção da diarreia; e, possivelmente, influenciar na motilidade intestinal (COPPINI et al., 2000, [200-]). A formação dos ácidos graxos de cadeia curta é dependente da microbiota intestinal e, portanto, pode ser influenciada pelo consumo de produtos contendo probióticos.

Os lactobacilos e as bifidobactérias são bactérias probióticas muito estudadas e estão presentes em produtos lácteos como os leites fermentados, iogurtes e queijos, e também em forma farmacêutica como cápsulas e sachês. Ainda, podem ser chamadas de bactérias lácticas, uma vez que contribuem para a caracterização das propriedades organolépticas dos produtos lácteos, estando, também, envolvidas na melhor digestibilidade da lactose (KOPP-HOOLIHAN, 2001; MATER; CORTIER, 2004).

Os lactobacilos são classificados como bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas e se encontram em menores proporções no TGI proximal (estômago: 0 –  $10^3$  UFC /g) em relação ao distal (íleo distal:  $10^3$  –  $10^5$  UFC /g; fezes:  $10^8$  -  $10^{12}$  UFC /g). No cólon, atingem concentrações de  $10^6$  –  $10^8$  UFC /g e, dependendo da cepa, exercem efeitos variáveis quanto à aderência intestinal, digestibilidade da lactose e capacidade de prevenir a diarreia. As bifidobactérias são bactérias anaeróbicas estritas, raramente encontradas no estômago, mas começam a exceder em número as bactérias aeróbicas a partir do íleo distal ( $10^2$  –  $10^5$  UFC /g). No cólon podem atingir o número de  $10^{11}$  –  $10^{12}$  UFC /g e, como os lactobacilos, sua capacidade de resistir à acidez gástrica e sais biliares é variável de uma cepa para outra (TRABULSI et al, 2000, TRABULSI; SAMPAIO, [200-], DOSSIÊ..., [20--?]).

Alguns autores (CREMONINI et al, 2002; D'SOUZA et al, 2002; FLOCH et al, 2008) reforçam a utilização de bactérias probióticas na prevenção da DAA. Duas meta-análises, envolvendo estudos randomizados sobre a prevenção da DAA com o uso de probióticos associado a diferentes antimicrobianos (*Lactobacillus spp*, *Saccharomyces boulardii*, *Enterococcus spp*), envolvendo 881 e 1214 pacientes adultos e crianças encontraram um risco relativo de 0,40 (95% IC 0,27-0,57) e 0,39 (95% IC 0,25-0,62), respectivamente (CREMONINI et al, 2002; D'SOUZA et al,

2002). Também, tem sido recomendado o uso de probióticos na prevenção de DAA em indivíduos idosos e em uso de vários antibióticos (DEL PIANO et al, 2004).

Ainda Sazawal e colaboradores (2006) demonstraram, em meta-análise, que dos 19 estudos avaliados, 18 apresentaram resultados positivos com o uso de probióticos dos gêneros *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. boulardii*, *B. longum* BB536, *B. infantis*, *L. rhamnosus* GG, *B. lactis* e *S. thermophilus* e suas associações na prevenção da DAA em crianças e adultos.

### **1.3 Tolerância e funcionalidade de produtos contendo probióticos**

Produtos lácteos contendo probióticos têm sido questionados quanto à sua funcionalidade, já que foram encontradas quantidades variáveis de microrganismos ao longo do seu tempo de vida útil (TUOMOLA et al., 2001; TIMMERMAN et al., 2004).

Dendukuri e colaboradores (2005), em revisão sobre o efeito preventivo e terapêutico dos probióticos na diarreia resultante da infecção por *Clostridium difficile*, discute dois pontos relevantes observados em alguns trabalhos. Um deles é a baixa dosagem de probióticos utilizada, por alguns, para adultos, sugerindo que esta seria a causa da ausência de efeitos positivos. O outro é o tipo do produto, uma vez que existem vários deles no mercado que não contêm quantidade de bactérias viáveis suficientes.

O número de bactérias pode estar diminuído devido às condições de armazenamento do produto, à combinação de espécies bacterianas inoculadas e à adição de componentes no produto que podem interagir negativamente com o probiótico (SHAH, 1999; HELLER, 2001; VINDEROLA, 2002).

Quanto à tolerância aos probióticos, existe, teoricamente, um baixo risco de infecção pelos mesmos, uma vez que eles são microrganismos não patogênicos. Contudo, foram observados trinta casos de fungemia em pacientes tratados com *Saccharomyces boulardii* e dois casos de infecção por probióticos com o gênero *Lactobacillus*, ambos com a espécie *rhamnosus*. A maioria das infecções ocorreu com probióticos na forma de sachê os quais foram misturados às dietas enterais para serem administrados aos pacientes, ou quando, em forma de cápsulas, estas

foram abertas. Vale destacar que, dentre os casos de fungemia, os pacientes se encontravam em estado de saúde grave, internados em Unidade de Terapia Intensiva, com cateter vascular implantado e, além disso, os sachês e as cápsulas foram abertas no leito do paciente (HENNEQUIN et al., 2000; MARTEAU; SEKSIK, 2004).

No entanto, Saavedra (2001), em seu artigo de revisão que abordou aplicações clínicas de agentes probióticos refere que não foram observados danos à saúde com o consumo diário de  $10^6 - 10^9$  UFC de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* por um período maior que um ano e considera que uma dosagem diária neste intervalo de valores é utilizada pela maioria dos estudos clínicos.

Os trabalhos até agora publicados avaliam efeito preventivo da diarreia com o uso do probiótico juntamente com o antimicrobiano e da sua recidiva associada ou não à presença de toxina para o *Clostridium difficile* (CORRÊA et al, 2005; HICKSON et al, 2007; PILLAI; NELSON, 2009). Entretanto, é também importante, para os pacientes que desenvolvem diarreia quando em uso de um ou mais antimicrobianos e para os profissionais da saúde que os atendem, o conhecimento do efeito do uso de probióticos após o aparecimento da DAA.

Neste contexto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de conhecer o efeito do tratamento com *Lactobacillus casei* associado ao *Bifidobacterium breve* nas manifestações clínicas da DAA e na ocorrência de recidiva.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Conhecer o efeito do uso da associação dos probióticos *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve* no tratamento DAA.

### 2.2 Objetivos específicos

- Conhecer o efeito do tratamento com a associação do *Lactobacillus casei* ao *Bifidobacterium breve* nas manifestações clínicas da DAA (diarréia e sintomas gastrointestinais);
- Conhecer o efeito do tratamento com a associação do *Lactobacillus casei* ao *Bifidobacterium breve* na ocorrência de recidiva da DAA.

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODO**

#### **3.1 Amostra**

Participaram do estudo pacientes com idade de 18 anos ou mais internados nas enfermarias de clínica médica, neurocirurgia, traumatologia, urologia, oncologia e cirurgia, do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU), no período de outubro de 2006 a dezembro de 2008. Aqueles incluídos recebiam alimentação via oral ou por sonda de alimentação (enteral), apresentavam diarreia e estavam em uso de antimicrobianos por período maior ou igual a 24 horas ou os tinham utilizado nos últimos 7 dias antes do início de diarreia. Esta foi definida como a presença de duas ou mais evacuações líquidas ou semi-líquidas nas últimas 24 horas.

Foram excluídos os pacientes: com história de diarreia crônica ou de etiologia presuntivamente viral; com infecção pelo vírus HIV, retocolite ulcerativa, doença de crohn, intolerância a lactose, distúrbio hidroeletrólítico ou síndrome do intestino curto; gravemente enfermos; submetidos a radio e/ou quimioterapia; pós gastrectomizados ou ostomizados e pós enterectomizados; em uso de dieta enteral com concentração maior do que 350mOsm/kg ou cuja suspeita da causa da diarreia era a rápida infusão da dieta (>120 ml/h).

#### **3.2 Randomização**

Após o consentimento esclarecido, os pacientes foram estratificados em dois grupos, os que recebiam dieta por via oral e aqueles que a recebiam via enteral. Posteriormente os pacientes de cada grupo foram randomizados separadamente, em blocos de quatro, de forma duplo cega, para constituição dos grupos experimento e controle (anexo 1a, b). Após a coleta de dados, os grupos experimento e controle oral e enteral foram unidos para constituição de dois únicos

grupos (experimento – oral e enteral e controle – oral e enteral) para análise dos mesmos, conforme figura 1.

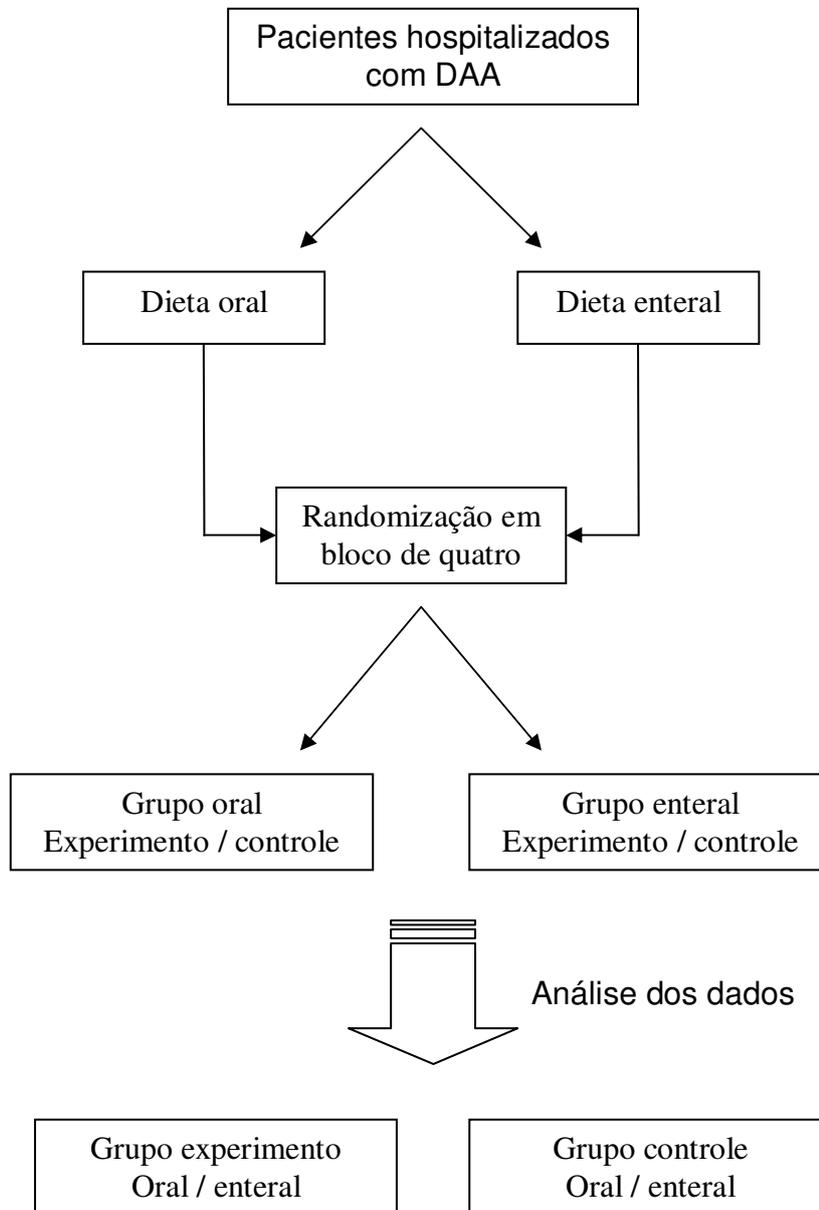


Figura 1 - Randomização estratificada duplo cega.

No grupo experimento, os pacientes com dieta por sonda de alimentação receberam dieta enteral industrializada padronizada pelo Serviço de Nutrição e Dietética - SENUD e suco de caju (concentração de 50%) contendo 1g de probióticos, oferecido no volume de 50ml, três vezes ao dia, após a dieta enteral. Os pacientes com dieta por via oral receberam dieta padronizada pelo SENUD (quadro 1) e suco de caju contendo 1g de probióticos, oferecido no volume de

100ml, três vezes ao dia. No grupo controle, os pacientes receberam as mesmas dietas do grupo experimento, tanto para aqueles por via oral quanto enteral, porém, ao invés do probiótico foi oferecido um placebo (amido de milho). As características da dieta enteral padronizada para os casos de DAA foram: ausência de sacarose, glúten, fibras e lactose; osmolalidade menor ou igual a 350mOsm/Kg.

A randomização foi realizada por funcionárias do Setor de Dietas Enterais do SENUD, devidamente capacitadas, responsáveis também pela manipulação e envase das dietas enterais e dos sucos contendo probióticos ou placebo. A distribuição dos pacientes no grupo probiótico ou placebo foi registrada em uma ficha controle (anexo 2a, b) acessível apenas aos responsáveis pelo sorteio.

<p><u>Desjejum:</u> chá (180ml); leite desnatado (180ml); bolacha (6 unidades) ou pão (50g) com margarina; banana prata ou maçã; suco caju.</p> <p><u>Almoço:</u> arroz; carne magra; macarrão, purês ou legumes cozidos não laxativos; banana prata.</p>	<p><u>Lanche da tarde:</u> chá (180ml); café (50ml); leite desnatado (180ml); bolacha (6 unidades) ou pão (50g) com margarina; gelatina (180ml).</p> <p><u>Jantar:</u> Igual ao almoço, porém sem frutas.</p> <p><u>Ceia:</u> chá (180ml); leite desnatado (180ml); bolacha (6 unidades) ou pão (50g) com margarina.</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Quadro 1 - Dieta padronizada por via oral no HC/UFU durante o período de estudo.

Fonte: Serviço de Nutrição e Dietética do HC/UFU.

O suco de caju incluído na padronização acima, geralmente oferecido em volume de 300ml uma vez ao dia foi redistribuído em três horários durante o dia (desjejum, lanche da tarde e ceia) com volume de 100ml cada refeição, acrescentando-se os probióticos ou placebo conforme randomização. Caso algum paciente tivesse alguma intolerância ao suco de caju, este seria substituído por outro que também não fosse laxativo.

### 3.3 Probiótico e placebo

O probiótico foi utilizado na forma de sachê com conteúdo de um grama, com 50mg de *Lactobacillus casei* ( $2 \times 10^7$  a  $10^9$  células) e 50mg de *Bifidobacterium breve* ( $5 \times 10^7$  a  $10^9$  células), conforme descrito pelo próprio fabricante (Yakult LB; Yakult Honsha Co., Tokyo, Japão). Para certificação do número de células viáveis, o produto foi submetido à análise laboratorial, cuja técnica baseia-se na semeadura da amostra ou de suas diluições em Ágar MRS para contagem de células seguida de incubação em temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas de acordo com Procedimento Operacional Padrão para contagem de bactérias lácticas do Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

A amostra do produto para análise foi obtida através da pesagem de  $25 \pm 0,2$  g do mesmo, adicionada de 225 mL de solução salina peptonada a 0,1% e homogeneizada por aproximadamente 60 segundos em "stomacher", constituindo-se a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, foram efetuadas diluições até aquela correspondente a  $10^{-8}$  em solução salina peptonada a 0,1%. Um mililitro das diluições -6, -7 e -8 foram semeados, em duplicata, em placas de Petri estéreis e acrescidos de, aproximadamente, 15 a 20 mL de Ágar MRS fundido e mantido em banho-maria a  $46-48^\circ\text{C}$ . As amostras foram homogeneizadas adequadamente e colocadas para solidificar em superfície plana (MORTON, 2001).

As placas foram incubadas em posição invertida a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas. Após esse o período, foi realizada a contagem das colônias de bactérias lácticas, obtendo-se uma quantidade média de  $6,1 \times 10^8$  UFC/g de bactérias lácticas totais (MORTON, 2001).

O probiótico e o placebo (725mg de amido de milho) tinham aparência e sabor semelhantes e eram totalmente diluídos em líquidos não quentes antes de serem oferecidos ao paciente.

Tanto os probióticos quanto o placebo foram armazenados em local fresco, sem exposição à luz solar, conforme instruções do fabricante do probiótico, e a manipulação e o envase foram realizados conforme procedimentos padronizados pelo Setor de Dietas Enterais do SENUD, obedecendo às exigências da Resolução

número 63 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 2000).

Após envasados em frascos próprios para dieta enteral, a serem oferecidos para pacientes com dieta por sonda enteral, ou em frascos descartáveis, para pacientes com dieta via oral, eram armazenados sob refrigeração, a no máximo 10°C, até sua utilização. A distribuição foi realizada em caixas térmicas por funcionárias do Setor de Dietas Enterais do SENUD.

O recebimento dos sucos com probióticos e placebo foi realizado por um dos coordenadores da equipe de enfermagem de cada enfermaria, que foram orientados, no caso das dietas por sonda, a adicionar água filtrada nos frascos, após o suco com probióticos ou placebo ser todo infundido, retirando todo o resíduo que tenha sedimentado nas paredes do frasco, conforme procedimento já padronizado para evitar obstrução da sonda de alimentação e para hidratação do paciente.

### **3.4 Coleta de dados**

A coleta dos dados foi realizada por um dos pesquisadores (SOUZA, D.N.P.) que não se envolveu no sorteio, preparo ou distribuição dos probióticos ou placebos.

Os seguintes dados foram registrados diariamente: antibióticos utilizados (inclusive para tratamento da DAA), tempo de uso, dosagem, posologia e rotina de administração do(s) antibiótico(s); número de evacuações ao dia, consistência das fezes e avaliação quanto à melhora ou piora do quadro; sintomas gastrointestinais e sua evolução após a intervenção; a data e o motivo do fim da intervenção e a ocorrência de recidiva de diarreia após a suspensão do probiótico ou placebo (anexo 3).

Quanto a avaliação do nível de melhora ou piora do quadro de diarreia, foi considerada melhora discreta quando o paciente apresentava melhora apenas do número de evacuações nas últimas 24 horas ou da consistência das fezes nesse mesmo período; melhora acentuada quando houvesse melhora de ambos os fatores; inalterada quando os mesmos não se modificavam; e piora quando um deles ou ambos pioravam.

### **3.5 Tempo de intervenção**

O tratamento foi iniciado após o diagnóstico de DAA para os grupos experimento e controle e suspenso após redução do número de evacuações ao dia e modificação da consistência das fezes para a habitual (cura) ou, após quatro dias, caso não tivesse havido nenhum grau de melhora.

Para avaliação das recidivas, caracterizadas pelo reaparecimento da diarreia naqueles indivíduos que apresentaram critérios de cura, os pacientes foram seguidos por visitas ao leito ou, caso tivessem recebido alta hospitalar, por contato via telefone, até que se completassem sete dias após o fim da intervenção.

### **3.6 Declaração de “confronto de interesse dos pesquisadores”**

Os pesquisadores não possuíram nenhum vínculo com a empresa Yakult<sup>®</sup>. O produto foi escolhido apenas por questões de praticidade e a Yakult<sup>®</sup> não foi idealizadora, não participou da elaboração do projeto e não realizou qualquer intervenção em nenhuma fase do trabalho. O motivo da parceria foi apenas o de obtenção dos probióticos que foram oferecidos sem restrição ao projeto encaminhado e à publicação do estudo, quaisquer que fossem os resultados encontrados.

### **3.7 Análise estatística**

Para comparação entre os grupos experimento e controle os pacientes dos grupos de dieta enteral e dieta por via oral foram avaliados conjuntamente (figura 1). Para detectar a diferença entre as médias das variáveis idade, tempo de tratamento e de cura, utilizou-se o teste t para dados paramétricos e, para dados não paramétricos, o teste U de Mann-Whitney. A análise das proporções entre os sexos

e faixa etária e da frequência de cura com e sem recidiva e não cura, entre os grupos, foi realizada utilizando-se o teste do Qui-quadrado com correção de Yates. Foi considerada diferença significativa, valor de  $p < 0,05$ .

### **3.8 Considerações éticas**

Todos os pacientes avaliados foram esclarecidos quanto à pesquisa e deram consentimento prévio, que foi documentado por escrito (anexo 4). O projeto do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa na Universidade Federal de Uberlândia (nº 120/06) e registrado na base de registro de ensaios clínicos ClinicalTrials.gov (identificação:NCT00700557).

## 4 RESULTADOS

Dos 73 pacientes que preencheram os critérios de inclusão para participação na pesquisa, três foram posteriormente excluídos da avaliação por terem falecido devido a causas não relacionadas à diarreia. Dos 70 restantes, 35 pertenciam ao grupo experimental e 35 ao grupo controle; 21 pacientes do grupo experimental e 20 do controle estavam em uso de alimentação enteral.

Não houve diferença significativa entre a média de idade, de  $56,17 \pm 20,47$  anos para o grupo experimento e de  $54,26 \pm 21,84$  anos para o grupo controle ( $p=0,71$ ), na proporção de pacientes do sexo masculino, de 48,60% dentre os pacientes do grupo experimental e 42,90% daqueles do grupo placebo ( $p=0,81$ ) e na proporção de pessoas com 60 anos ou mais, de 51,43% dentre os pacientes do grupo experimental e 48,57% daqueles do grupo placebo ( $p=1,00$ ).

Os antimicrobianos mais frequentemente envolvidos com a DAA foram os beta lactâmicos, especialmente as cefalosporinas (25,86% no grupo experimento e 34,69% no grupo controle) e os glicopeptídeos (24,14% no grupo experimento e 18,37% no grupo controle) (tabela 1). Também, vale ressaltar que, durante a intervenção nenhum antimicrobiano foi retirado ou trocado por outro em função da diarreia. A administração dos antimicrobianos ocorreu por via intravenosa na grande maioria dos pacientes (tabela 2).

Tabela 1 - Classes de antimicrobianos utilizados durante o tratamento no grupo experimento e controle

Classes do Antimicrobiano	Experimento		Controle	
	N	%	N	%
Antifúngicos	03	05,17	01	02,04
Carbapenêmicos (Beta-lactâmicos)	10	17,24	09	18,37

Continua

## Continuação

Tabela 1 - Classes de antimicrobianos utilizados durante o tratamento no grupo experimento e controle.

Classes do Antimicrobiano	Experimento		Controle	
	N	%	N	%
Cefalosporinas (Beta-lactâmicos)	15	25,86	17	34,70
Beta-lactâmicos + inibidores de beta-lactamases	00	00,00	01	02,04
Penicilinas (Beta-lactâmicos)	03	05,17	04	08,16
Glicopeptídeos	14	24,14	09	18,37
Lincosaminas	04	06,90	02	04,08
Metronidazol	05	08,62	02	04,08
Polimixina	01	01,73	00	00,00
Quinolonas	03	05,17	04	08,16
<b>TOTAL</b>	<b>58</b>	<b>100,00</b>	<b>49</b>	<b>100,00</b>

## Conclusão

A DAA iniciou-se, em média, no décimo dia de uso do antimicrobiano nos pacientes do grupo experimental e no sétimo naquele do grupo controle ( $p=0,02$ ). Em relação à quantidade de antimicrobiano utilizado no início do tratamento, para cada paciente, três indivíduos (8,57%) do grupo experimento e quatro (11,43%) do controle desenvolveram DAA somente após suspensão do(s) antimicrobiano(s) (tabela 3).

Tabela 2 - Forma de administração dos antimicrobianos utilizados pelos pacientes no início da DAA dos grupos experimento e controle.

Forma de administração	Experimento		Controle	
	N	%	N	%
IV	54	93,10	49	100,00
VO	02	03,45	00	00,00
SNE	02	03,45	00	00,00
TOTAL	58	100,00	49	100,00

Tabela 3 - Quantidade de antimicrobianos utilizados por cada paciente dos grupos experimento e controle no início da DAA.

Quantidade de antimicrobianos	Experimento		Controle	
	N	%	N	%
Sem antimicrobiano	03	08,57	04	11,43
Um antimicrobiano	12	34,29	13	37,14
Dois ou mais antimicrobianos	20	57,14	18	51,43
TOTAL	35	100,00	35	100,00

O tempo médio de uso do probiótico (tempo de tratamento) foi de  $5,06 \pm 2,18$  dias para o grupo experimento e de  $5,49 \pm 3,17$  dias para o grupo controle ( $p=0,95$ ) e o tempo de duração da diarreia (tempo de cura) entre aqueles que se curaram também foi similar entre os grupos ( $p=0,36$ ) (gráfico 1). O mesmo ocorreu para as proporções dos que melhoraram discretamente, acentuadamente ou que não melhoraram ao longo da intervenção ( $p>0,05$ ). As frequências de cura e de recidivas também foram proporcionalmente semelhantes entre os grupos (Tabela 4).

Sete pacientes do grupo experimento e sete do grupo controle tiveram distensão e/ou cólica abdominal e/ou vômito, além da diarreia ( $p=1,00$ ).

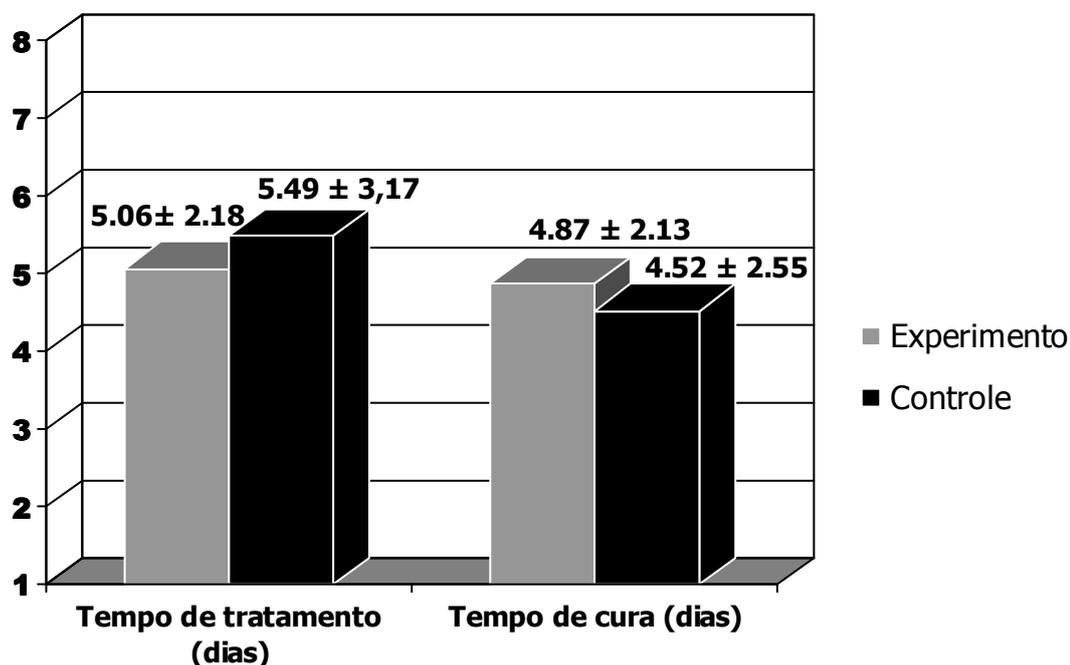


Gráfico 1 – Média de tempo de tratamento e cura entre os grupos experimento e controle.

Tabela 4 – Frequência de cura e de recidiva da DAA nos pacientes em uso de probióticos e naqueles em uso de placebo.

Variável	Probiótico		Placebo	
	N	%	N	%
Cura sem recidiva	19 <sup>a,d</sup>	54,28	17 <sup>a,d</sup>	48,57
Cura com recidiva	12 <sup>a,c</sup>	34,29	8 <sup>a,c</sup>	22,86
Não cura	04 <sup>b</sup>	11,43	10 <sup>b</sup>	28,57
<b>TOTAL</b>	<b>35</b>	<b>100,00</b>	<b>35</b>	<b>100,00</b>

<sup>a,b</sup> p=0,13, quando comparado o grupo probiótico e placebo em relação ao total de cura (com ou sem recidiva) e não cura.

<sup>c,d</sup> p=0,80, quando comparado o grupo probiótico e placebo em relação a recidiva.

## 5 DISCUSSÃO

Embora o presente estudo tenha mostrado ineficácia do uso de probiótico no tratamento da DAA, alguns problemas metodológicos limitam a abrangência da generalização desta conclusão. A quantidade de células viáveis oferecidas, as espécies microbianas administradas e o número de pacientes envolvidos podem ser fatores decisivos nos resultados encontrados.

Alguns investigadores (THOMAS et al., 2001; CONWAY et al., 2007) utilizaram *L. rhamnosus GG* e multiespécies bacterianas de *Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium spp*, profilaticamente, em quantidades similares ou até superiores às utilizadas no presente estudo e não demonstraram redução da incidência de DAA em crianças, adultos e idosos em uso de antibiótico, hospitalizados ou não. Contudo, outros autores, administrando  $2 \times 10^8$  UFC/ dia de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* (BENIWAL et al., 2003),  $4,4 \times 10^{10}$  UFC/dia de *L. bulgaricus* e *L. casei immunitas* (HICKSON et al., 2007) ou  $2 \times 10^{10}$  UFC/ dia de *L. acidophilus* (SALAZAR-LINDO et al., 2007) demonstraram eficácia na prevenção da DAA ou diarreia aguda.

Em uma meta-análise envolvendo um total de 707 pacientes de 0 e 18 anos em seis estudos, Johnston, Supina e Vohra (2006) observaram que quatro destes, que ofereciam doses de probióticos de diferentes espécies ou cepas (*L. casei GG*, *S. boulardii* ou *L. sporogens*) entre  $5,5$  e  $40 \times 10^9$  UFC/dia, demonstraram o efeito protetor dos probióticos na DAA (RR 0,36; 95%IC 0,25 – 0,53) e que nos que utilizaram doses menores do que  $2 \times 10^9$  UFC/dia, o benefício não foi alcançado. Como no presente estudo, a dose diária foi de  $1,83 \times 10^9$  UFC, esta pode ser a explicação para a ineficácia. Entretanto, é difícil atribuir o insucesso do tratamento da DAA exclusivamente à quantidade de probiótico oferecida, pois, avaliando-se algumas investigações da utilização de probióticos para prevenção de DAA, observa-se muita sobreposição de doses entre aqueles que demonstraram e os que não demonstraram eficácia. Na maioria daquelas que obtiveram efeitos positivos as doses diárias foram de  $2 \times 10^8$  a  $4,4 \times 10^{10}$  UFC (MCFARLAND et al., 1995; VANDERHOOF et al., 1999; ARMUZZI et al., 2001; BENIWAL et al., 2003; HICKSON et al., 2007), enquanto os trabalhos com resultados negativos as doses

administradas foram de  $1 \times 10^9$  a  $4 \times 10^{10}$  UFC (GOTZ et al., 1979; ARVOLA et al., 1999; THOMAS et al., 2001; PLUMMER et al., 2004; CONWAY et al., 2007).

*Lactobacillus spp* e *Bifidobacterium spp* apresentam perda da viabilidade quando expostos às secreções ácidas do estômago e aos sais biliares (CHARTERIS et al., 1998). No entanto, é observado aumento das unidades formadoras de colônias destas bactérias nas fezes de indivíduos que as ingerem, o que poderia levar a ações benéficas no paciente (POCHART et al., 1992; YUKI et al., 1999; BEZKOROVAINY, 2001).

Também, é conhecido que o antimicrobiano reduz as bactérias anaeróbias da microbiota intestinal, especialmente às bifidobactérias (ZOPPI et al., 2001; PLUMMER et al., 2005). Seki e colaboradores (2003) investigaram o comportamento da microbiota diante do uso de antimicrobiano associado ou não ao uso de probiótico. Eles classificaram 110 crianças e adolescentes, entre um mês e 15 anos de idade, segundo três grupos, a saber: os que recebiam apenas antimicrobiano, os que iniciavam o uso de probiótico durante o tratamento com antimicrobiano e os que combinavam probiótico e antimicrobiano desde o início do tratamento. No primeiro grupo houve redução das bactérias anaeróbias e de mais de 40% da quantidade de bifidobactérias intestinais; no segundo grupo ocorreu situação semelhante até o terceiro dia de antimicrobiano, quando foi iniciado o uso do probiótico ocorrendo elevação e até normalização da quantidade de microorganismos presentes. No terceiro grupo, os níveis de unidades formadoras de colônias se mantiveram constantes. Portanto, a reposição intestinal com esses microrganismos pode restabelecer os níveis de normalidade, o que seria a base de um efeito terapêutico na DAA. Como no presente estudo, o tratamento foi iniciado assim que se desenvolvia a diarreia, entre o sétimo e o décimo dia de uso de antimicrobiano, ou seja, quando provavelmente a microbiota intestinal já deveria estar gravemente desequilibrada, é lícito supor que a quantidade de probiótico necessária para o efeito terapêutico necessitasse ser maior do que a utilizada.

Outra possibilidade para justificar a ineficácia dos probióticos no tratamento da DAA, conforme o presente estudo são as espécies utilizadas ou a combinação entre elas. Isto não parece muito provável, pois, segundo Timmerman e colaboradores (2004), há maior possibilidade de eficácia justamente quando se utiliza mais de uma espécie ou até mais de uma cepa de bactérias probióticas. Eles descreveram estudos realizados em animais e humanos onde houve não só a

colonização das espécies *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Saccharomyces boulardii* e *Enterococcus faecium*, em concentrações que variaram de  $0,8 \times 10^8$  UFC/g a  $2,4 \times 10^9$  UFC/g, mas também o aumento da produção de IgA, especialmente pelas cepas *L. casei* e *L. casei shirota*. Tentam explicar a maior eficácia do uso de mais de uma espécie pela possibilidade de uma delas poder criar um meio mais apropriado para colonização e adesão da outra no epitélio intestinal.

Como o número de pacientes envolvidos no presente estudo foi modesto, é possível que tenha ocorrido um erro estatístico tipo II, ou seja, que um efeito existente possa não ter sido demonstrado, principalmente se for pequeno.

Em pesquisas com probióticos na prevenção da DAA (VANDERHOOF et al., 1999; CORRÊA et al., 2005) em crianças entre 6 meses e 10 anos de idade recebendo antimicrobiano associado a *L. casei GG*, *B. lactis* e *S. thermophilus*, também não foram encontradas diferenças no tempo de duração da diarreia, com média de 4,7 dias comparado a 5,8 dias do grupo placebo ( $p > 0,05$ ) em um estudo, e 3,92 dias em relação a 5,00 dias para o grupo placebo ( $p > 0,05$ ) em outro. Por estes dados vê-se também que, de uma forma geral, o principal sintoma da DAA parece perdurar por um período de aproximadamente cinco dias, o que é consistente com os dados do presente estudo.

Embora os antibióticos beta-lactâmicos tenham sido os mais utilizados pelos pacientes com DAA (55% do total de antimicrobianos utilizados) e tenha sido comum a terapia antimicrobiana múltipla, ou seja, uso de dois ou mais antimicrobianos (mais de 50% dos pacientes, tanto do grupo experimento quanto do grupo placebo), o desenho do presente estudo não foi adequado para avaliar a capacidade de cada antimicrobiano causar DAA e a predominância pode se dever apenas aos esquemas de antimicrobianos mais utilizados no HC/UFU e não à maior ou menor capacidade que têm de causar DAA.

Como as outras manifestações gastrointestinais possíveis de terem sido causadas pelo uso de probiótico ocorreram em percentual semelhante àquele encontrado no grupo controle, pode-se inferir que o uso do produto é, neste aspecto, seguro. Thomas e colaboradores (2001) e McFarland e colaboradores (1995), avaliando manifestações como náuseas, cólicas abdominais, flatulência e febre, também encontraram-nas em frequências semelhantes, ou até maiores, no grupo placebo do que no experimental. Como nestes, outro estudo também não encontrou diferença significativa na incidência de flatulência e distensão abdominal no grupo

que recebeu *Lactobacillus GG* juntamente com o antimicrobiano, para prevenção da recorrência de diarreia associada ao *Clostridium difficile*, em relação ao que recebeu placebo (LAWRENCE; KORZENIK; MUNDY, 2005).

## 6. CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo não demonstraram qualquer eficácia com o uso dos probióticos *L. casei* e *B. breve* na dosagem e frequência administradas tanto para o tratamento da DAA quanto para sua recuperação. Estudos similares, entretanto, ainda merecem ser realizados, mas com doses maiores destes ou de outros probióticos.

## REFERÊNCIAS

ARMUZZI, A. et al. The effect of oral administration of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 163-169, February, 2001.

ARVOLA, T. et al. Prophylactic *Lactobacillus GG* reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infectious: a randomized study. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 104, n. 5, p. 64-67, November, 1999.

BEAUGERIE, L.; PETIT, J.C. Antibiotic associated diarrhea. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 337-352, April, 2004.

BENIWAL, R. S. et al. A randomized trial of yogurt for prevention of antibiotic-associated diarrhea. **Digestive Disease Science**, Basel, v. 48, n. 10, p. 2077-2082, October, 2003.

BERGOGNE-BÉRÉZIN, E. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 521-526, December, 2000.

BEZKOROVAINY A. Probiotics determinants of survival and growth in the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 399S-405S, February, 2001. Supplement.

BOURLIOUX, P. et al. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The intelligent intestine", held in Paris, June 14, 2002. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 78, n. 4, p. 675-683, October, 2003.

**BRASIL**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, Resolução nº 63, de 6 de Julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico para Terapia de Nutrição Enteral. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Julho, 2000. 22p.

CHARTERIS, W.P. et al. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 5, p. 759-768, May, 1998.

CONWAY, S. et al. Does eating yogurt prevent antibiotic-associated diarrhoea? **British Journal of General Practice**, London, v. 57, n. 545, p. 953-959, December, 2007.

COPPINI, L.Z. et al. Fibras alimentares e ácidos graxos de cadeia curta. In: Waitzberg, D.L; **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**, 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.79-94.

COPPINI, L,Z; MARCO, D.; WAITZBERG, D.L. **Introdução à fibra terapêutica. Características e funções**. São Paulo: GANEP – Grupo de apoio de nutrição enteral e parenteral, [200-]. 47p.

CORRÊA, N. B. O. et al. A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 39, n. 5, p. 385-389, May/June, 2005.

CREMONINI, F et al. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic – associated diarrhoea. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 1461-1467, August, 2002.

DAMIÃO, A.O.M.C. Prebióticos, probióticos e simbióticos. Aplicações Clínicas. **Nestlé Bio. Nutrição e Saúde**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 18-24, Setembro, 2006.

DEL PIANO, M, et al. Clinical experience with probiotics in the elderly on total enteral nutrition. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 38, n. 2, p. S111-S114, July, 2004. Supplement.

DENDUKURI, N. et al. Probiotic therapy for the prevention and treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 173, n. 2, p. 167-170, July , 2005.

DORON S.I., HIBBERD P.L., GORBACH S.L. Probiotics for prevention of antibiotic-associated diarrhea. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 42, n. 2, p. S58-S63, July, 2008. Supplement.

DOSSIÊ científico. São Paulo: Nestlé, [20--?]. 16p.

D'SOUZA, A.L. et al. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. **British Medical Journal**, London, v. 324, n. 7350, p. 1361-1366, June, 2002.

FLOCH M. H. et al. Recommendations for probiotic use – 2008. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 42, n. 2, p. S104-S108, July, 2008. Supplement.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, London, v. 32, n. 4, p.439-442, April, 1991.

GILL, H.S.; GUARNER, F. Probiotics and human health: a clinical perspective. **Postgraduate Medical Journal**, London, v. 80, n. 947, p. 516-526, September, 2004.

GOTZ, V. et al. Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a lactobacillus preparation. **American Journal of Hospital Pharmacy**, Bethesda, v. 36, n. 6, p. 754-757, June, 1979.

HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 374s – 379s, February, 2001. Supplement.

HENNEQUIN, C. et al. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, Rotherdan, v. 19, n. 1, p. 16-20, February, 2000.

HICKSON M. et al. Use of probiotic Lactobacillus preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomized double blind placebo controlled trial. **British Medical Journal**, London, v. 335, n. 7610, p. 80-84, June, 2007.

HURLEY, B. W.; NGUYEN, C. C. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 162, n. 19, p. 2177-2184, October, 2002.

JOHNSTON, B. C.; SUPINA, A. L.; VOHRA, S. Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 175, n. 4, p. 377-383, August, 2006.

KATZ, J.A. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* diarrhea. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 40, n. 3, p. 249-255, March, 2006.

KELLY, C. P.; POTHOUKAKIS, C.; LAMONT, J. T. *Clostridium difficile* colitis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 330, n. 4, p. 257-262, January, 1994.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of The American Dietetic Association**, Philadelphia, v.101, n. 2, p. 229-238, February, 2001.

LAWRENCE, S. J.; KORZENIK, J. R.; MUNDY, L. M. Probiotics in recurrent *Clostridium difficile* disease. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 54, n. 9, p. 905-906, September, 2005.

LEWIS, S.J.; POTTS, L.F.; BARRY, R.E. The lack of therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-related diarrhoea in elderly patients. **Journal of Infection**, Philadelphia, v. 36, n. 2, p. 171-174, March, 1998.

LEWIS, S. J., FREEDMAN, A. R. Review article: the use of biotherapeutic agents in the prevention and treatment of gastrointestinal disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 12, n. 9, p. 807-822, September, 1998.

MADEO, M.; WHITLOCK, M.; MARTIN, C.R. A randomized controlled trial comparing *Lactobacillus* combined with *Bifidobacterium bifidum* against fructo-oligosaccharides in reducing the incidence of antibiotic associated diarrhoea: a preliminary investigation. **Clinical Effectiveness in Nursing**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 83-87, June, 1999.

MARANHÃO, H. de S. Diarréia aguda: aspectos clínicos-epidemiológicos, evolução nutricional e isolamento de enteropatógenos em lactentes na cidade do Natal, nordeste do Brasil. **The electronic journal of pediatric gastroenterology, nutrition and liver disease**, São Paulo, v. 5, n. 5, March, 2001. 225 f. Tese (Doutorado em Medicina)-Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2001. Disponível em: <<http://www.e-gastroped.com.br/teses/td012001.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2009.

MARTEAU, P.; SEKSIK, P. Tolerance of probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 38, n. 2, p. S67-S69, July, 2004. Supplement.

MATER, D.D.G.; CORTIER, G. Response of lactic acid bacteria to the digestive environment. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 38, n. 2, p.S64-S66, July, 2004. Supplement.

MCFARLAND, L. V. et al. Prevention of beta-lactm-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. **American Journal of Gastroenterology**, Omaha, v. 90, n. 3, p. 439-448, March, 1995.

MORTON, R.D. Aerobic plate count.in: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.63-67.

PENNA, F. J. et al. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 76, n. 7, p. S209-S217, Julho/Agosto, 2000. Suplemento.

PILLAI. A.; NELSON, R. L. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Malden, v. 1, n. D004611, January, 2008. Disponível em: <<http://interscience.wiley.com/cochrane/clsysrev/articles/CD004611/frame.html>> . Acesso em: 06 Dez. 2009.

PLUMMER, Sue et al. *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. **International Microbiology**, Barcelona, v. 7, n. 1, p. 59-62, March, 2004.

PLUMMER, Susan F. et al. Effect of probiotics on the composition of the intestinal microbiota following antibiotic therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 69-74, July, 2005.

POCHART P. et al. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 55, n. 1. p. 78-80, January, 1992.

QUIGLEY, E.M.M.; QUERA, R. Small intestinal bacterial overgrowth: roles of antibiotics, prebiotics, and probiotics. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 130, n. 2, p. S78-S90, February, 2006.

SAAVEDRA, J.M. Clinical applications of probiotic agents. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 6, p. 1147S-51S, June, 2001. Supplement.

SALAZAR-LINDO, E. et al. Effectiveness and safety of *Lactobacillus* LB in the treatment of mild acute diarrhea in children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 44, n. 5, p. 571-576, May, 2007.

SAZAWAL, S. et al. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomized, placebo-controlled trials. **Lancet Infectious Disease**, London, v. 6, n. 6, p. 374-382, June, 2006.

SEKI, H. et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. **Pediatrics International**, Tokyo, v. 45, n. 1, p. 86-90, February, 2003;

SHAH, N. P. Symposium: probiotic bacteria. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 4. p. 894-907, April, 2000.

TIMMERMAN, H.M. et al. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics – A comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 96, n. 3, p. 219-233, November, 2004.

THOMAS, M.R. et al. Lack of effect of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated diarrhea: a randomized, placebo-controlled trial. **Mayo Clinical Proceedings**, Rochester, v. 76, n. 9, p. 883-889, September, 2001.

TRABULSI et al. **Os probióticos e a saúde infantil**. São Paulo: Nestlé – nutrição infantil, 2000. 36p. (Temas de Pediatria Nestlé. Número especial).

TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.M.S.C. **A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo**. São Paulo: Nestlé – nutrição infantil, [200-]. 19p. (Os probióticos e a saúde infantil, 1)

TUOMOLA, E. et al. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 393S – 398S, February, 2001. Supplement.

VANDERHOOF, J. A. et al. *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. **Journal of Pediatrics**, New York, v. 135, n. 5, p. 564-568, November, 1999.

VINDEROLA, C.G. et al. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Edmonton, v. 12, n. 7, p. 579-589, July, 2002.

WHELAN, K. et al. The role of probiotics and prebiotics in the management of diarrhoea associated with enteral tube feeding. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 423-433, December, 2001.

WHELAN, K.; JUDD, P.A.; TAYLOR, M.A. Defining and reporting diarrhoea during enteral tube feeding: do health professionals agree? **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 21-26, February, 2003.

WILLIAM, M; MABEL, A; ALBERTO, B. Probióticos, prebióticos y simbióticos em pacientes críticos. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 155-162, Abril/Maio/Junho, 2006.

YUKI, N. et al. Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain *Shirota*, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 48, n. 1 p. 51-57, April, 1999.

ZOPPI, G. et al. Modulation of the intestinal ecosystem by probiotics and lactulose in children during treatment with ceftriaxone. **Current Therapeutic Research**, Maryland Heights, v. 62, n. 5, p. 418-435, May, 2001.

**ANEXOS**

**ANEXO 1a****RANDOMIZAÇÃO****DIETA ORAL**

N° FICHA	NOME	LEITO	PRT	ESTRATIFICAÇÃO	GRUPO	
					EXP.	CONT.
01				ORAL		
02				ORAL		
03				ORAL		
04				ORAL		

**DIETA ORAL**

N° FICHA	NOME	LEITO	PRT	ESTRATIFICAÇÃO	GRUPO	
					EXP.	CONT.
05				ORAL		
06				ORAL		
07				ORAL		
08				ORAL		

**DIETA ORAL**

N° FICHA	NOME	LEITO	PRT	ESTRATIFICAÇÃO	GRUPO	
					EXP.	CONT.
09				ORAL		
10				ORAL		
11				ORAL		
12				ORAL		

**ANEXO 1b****RANDOMIZAÇÃO****DIETA ENTERAL**

N° FICHA	NOME	LEITO	PRT	ESTRATIFICAÇÃO	GRUPO	
					EXP.	CONT.
01				ENTERAL		
02				ENTERAL		
03				ENTERAL		
04				ENTERAL		

**DIETA ENTERAL**

N° FICHA	NOME	LEITO	PRT	ESTRATIFICAÇÃO	GRUPO	
					EXP.	CONT.
05				ENTERAL		
06				ENTERAL		
07				ENTERAL		
08				ENTERAL		

**DIETA ENTERAL**

N° FICHA	NOME	LEITO	PRT	ESTRATIFICAÇÃO	GRUPO	
					EXP.	CONT.
09				ENTERAL		
10				ENTERAL		
11				ENTERAL		
12				ENTERAL		

## ANEXO 2a

## FICHA CONTROLE

## DIETA ORAL

N° ESTUDO	NOME	LEITO	PRT	ESTRATIFICAÇÃO	GRUPO	
					EXP.	CONT.
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						

26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33						
34						
35						
36						
37						
38						
39						
40						

**Anexo 2b****FICHA CONTROLE****DIETA ENTERAL**

N° ESTUDO	NOME	LEITO	PRT	ESTRATIFICAÇÃO	GRUPO	
					EXP.	CONT.
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						

26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33						
34						
35						
36						
37						
38						
39						
40						



## ANEXO 4

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_ aceito participar do estudo “*Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve* como probiótico no tratamento da diarreia associada a antimicrobiano: estudo clínico randomizado duplo-cego”.

Recebi informação que o estudo tem a finalidade de avaliar o efeito de probióticos (*Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve*) no tratamento da diarreia provocada pelo uso de antibiótico. O estudo tem a orientação do Prof. Dr. Miguel Tanús Jorge, professor do Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e participação da nutricionista Daniela Nogueira Prado de Souza, funcionária do Hospital de Clínicas de Uberlândia e aluna do referido Programa.

Pesquisas têm demonstrado que a utilização de probióticos em casos de diarreia associada ao uso de antibióticos resulta em melhora deste quadro clínico. Dentre vários estudos realizados com probióticos, apenas um relatou prejuízo para pacientes que já se encontravam em estado de saúde grave e estavam internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Os probióticos são considerados seguros uma vez que são micróbios considerados não patogênicos, que atuam de forma benéfica ao hospedeiro, promovendo restauração da microbiota intestinal.

A realização dessa pesquisa poderá demonstrar a utilidade de probióticos, na dosagem e frequência de administração estudados, na melhora ou cura de pacientes com diarreia associada ao uso de antibióticos. Todo paciente que aceitar entrar no estudo será sorteado para receber o probiótico ou farinha.

Nem o paciente nem o pesquisador saberão previamente à avaliação dos resultados, qual substância foi oferecida, evitando interferência do pesquisador para obter resultados válidos para a pesquisa. Se por um acaso houver algum problema, possivelmente relacionada à pesquisa, a informação deverá ser prestada ao médico e/ou ao paciente. O acompanhamento do paciente e a coleta de dados serão realizados pela pesquisadora Daniela Nogueira Prado de Souza.

O desconforto provocado pela pesquisa será, principalmente, uma eventual incompatibilidade do paciente com o gosto do produto que, no entanto, tem pouco sabor.

Ao final dessa pesquisa, os resultados se tornarão públicos, independente de serem favoráveis ou não e a identificação dos pacientes será mantida sob sigilo.

Caso eu não queira participar deste estudo, não sofrerei nenhuma limitação nos meus direitos como paciente; caso aceite também poderei, a qualquer momento, desistir de participar.

Qualquer dúvida sobre o estudo me será esclarecida pronta e pacientemente, tendo a minha disposição, para contato, os seguintes telefones:

Daniela N. P. de Souza - Residência: 3224-4788 Celular: 9135-1152  
CEP – Comitê de Ética e Pesquisa: 3239-4531

A assinatura deste documento ou a impressão datiloscópica no mesmo deverá ser realizada pelo paciente ou, caso este esteja momentaneamente ou ainda permanentemente incapacitado, por seu responsável legal. Deverá ser obtida pela própria pesquisadora: Daniela Nogueira Prado de Souza.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da minha participação na pesquisa e concordo em participar.

---

Assinatura do paciente ou  
responsável legal

---

Assinatura da testemunha

---

Assinatura da pesquisadora

Uberlândia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)