

**IMPACTO DA INGESTÃO DE UMA INFUSÃO DE FUNCHO PELAS MÃES NA
CÓLICA INFANTIL EM CRIANÇAS AMAMENTADAS**

BEATRIZ FERREIRA DE MATOS PINHEIRO HENRIQUES

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Nutrição Humana e Metabolismo
na Faculdade de Ciências Médicas | NOVA Medical School da Universidade NOVA de Lisboa

Março, 2023

IMPACTO DA INGESTÃO DE UMA INFUSÃO DE FUNCHO PELAS MÃES NA CÓLICA INFANTIL EM CRIANÇAS AMAMENTADAS

Beatriz Ferreira de Matos Pinheiro Henriques

Orientadores: Professora Doutora Célia Silva, Faculdade de Ciências Agrárias e do Ambiente |
Universidade dos Açores

Professora Doutora Cláudia Marques, Faculdade de Ciências Médicas | Nova Medical School da
Universidade de Lisboa

Doutora Susana Ribeiro, Instituto de Investigação e Tecnologias Agrárias e do Ambiente (IITAA) |
Universidade dos Açores

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Nutrição Humana e Metabolismo

Março, 2023

AGRADECIMENTOS

Quero começar por agradecer aos meus pais por todo o apoio e incentivo que me deram para terminar esta etapa importante da minha vida. Aos meus irmãos e em especial à minha irmã por ouvir os meus desabafos e por me ter ajudado a erguer-me numa fase muito difícil da minha vida que coincidiu com a realização da tese. Sem vocês não teria chegado até aqui.

Às minhas queridas amigas que sempre me ouviram e nunca me deixaram desistir. Especialmente, à Luciana, Mafalda, Juliana, Catarina, Raquel e Inês. Obrigada por tudo.

Quero também agradecer às minhas orientadoras Célia Silva, Susana Ribeiro e Cláudia Marques. Obrigada a todas pelos ensinamentos, orientação e apoio constantes. Obrigada, Professora Cláudia, pela paciência, compreensão e apoio sempre que necessário. Um agradecimento especial à Professora Célia Silva, por toda a compreensão, pelos conselhos e por ter acreditado sempre em mim e ainda um obrigada especial à Susana Ribeiro, por todos os ensinamentos e apoio em todo o meu trabalho de laboratório e ao longo de todo o estudo.

Quero agradecer pelo financiamento deste trabalho ao projeto Babymicro (Ref. M1.1.C/C.S./050/2021/01) financiado pela Direção Regional da Ciência e Tecnologia (DRCT).

Por fim, quero também agradecer ao Conselho de Administração do Centro de Saúde de Angra do Heroísmo por permitir a realização deste estudo e facultar as informações necessárias para a sua concretização.

ABREVIATURAS

ASV - Amplicon Sequence Variant

BAL - Bactérias do ácido láctico

CI – Cólica Infantil

DM – Dieta Mediterrânea

DV – Desvio Padrão

HMO – Oligossacarídeos do leite humano

IMC – Índice de Massa Corporal

LM – Leite Materno

OMS – Organização Mundial de Saúde

SCFA – Ácidos gordos de cadeia curta

ABSTRACT

Background: Infantile colic is one of the main causes of discomfort and suffering for an infant, as well as concern and psychological, emotional, and physical strain for the parents. For this reason, infantile colic is a field of clinical research both in terms of etiology and treatment. Some studies suggest that a large ratio of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in the intestinal microbiota of infants protects against colic and agitation. Other studies also point to fennel-based teas having a positive impact on improving symptoms of colic in infants. **Objective:** To assess the possible changes to the microbiota of the breast milk and of the feces of infants with or under five months old breastfed after the ingestion of a fennel-based tea by the mothers. To isolate and identify bacteria with a potential probiotic effect from the breast milk and feces of the infants. **Design:** This is a clinical study that includes newborn infants under five months old with symptoms of colic. The intervention involves the ingestion of 1 liter of fennel tea by the mothers throughout the day, over a period of 7 days. It was requested that the mothers collect a sample of their own breast milk and of their infants' feces. The samples were collected at the beginning and end of the intervention. These were used to identify the bacterial community with high throughput sequencing and to isolate the bacteria with a probiotic aspect. **Results:** 13 samples of feces and 5 samples of breast milk were examined at the level of the microbiota. Several species that belong to the genus *Bifidobacterium* were detected in the samples of feces. The number of ASVs in the samples of feces rose significantly ($P < 0.05$) after the intervention. There was also a significant rise ($P < 0.05$) of the ASVs belonging to the phylum *Firmicutes* in the samples of the feces after the intervention, excluding one sample that was drastically different to the rest. **Conclusion:** This study indicates that the bioactive compounds in fennel have a prebiotic effect in infants breastfed by mothers who consume fennel tea by selectively stimulating the rise of the number of beneficial bacteria in the intestinal microbiota, namely some genera belonging to the phylum *Firmicutes* and bacteria of the genus *Bifidobacterium*, thus reducing the symptoms of infantile colic. This study represents an inspiration for possible future studies who seek to better understand the effects of fennel tea in the decrease of symptoms of colic in infants. **Keywords:** *Foeniculum vulgare*, Fennel, Infantile colic, Breast milk

RESUMO

Introdução: A cólica infantil representa uma das principais causas de desconforto e sofrimento para a criança, bem como preocupação e desgaste psicológico, emocional e físico para os pais. Por essa razão, a cólica infantil é uma área de pesquisa clínica tanto em termos de etiologia quanto de tratamento. Alguns estudos sugerem que uma alta proporção de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* na microbiota intestinal infantil protege contra as cólicas e agitação. Outros estudos têm também indicado um impacto positivo de infusões à base de funcho na melhoria da sintomatologia das cólicas em crianças. **Objetivos:** Avaliar as possíveis alterações da microbiota do leite materno e fecal de crianças (com idade inferior ou igual a 5 meses) amamentadas, após a ingestão de uma infusão à base de funcho pelas mães. Proceder ao isolamento e identificação de bactérias do leite materno e fezes das crianças com possível efeito probiótico. **Desenho do estudo:** Este é um estudo clínico que inclui crianças com idade inferior a cinco meses e que apresentem sintomatologia de cólicas. A intervenção consiste na ingestão de 1 litro de infusão de funcho ao longo do dia pelas mães, durante um período de 7 dias. Foi solicitado às mães que fizessem uma recolha do seu próprio leite materno e das fezes dos lactentes. As amostras foram recolhidas no início e no final da intervenção. Estas foram utilizadas para identificação da comunidade bacteriana por sequenciação de alto rendimento e para o isolamento de bactérias com carácter probiótico. **Resultados:** Foram avaliadas, ao nível da microbiota, 13 amostras de fezes e 5 amostras de leite materno. Foram detetadas várias espécies nas amostras de fezes que pertencem ao género *Bifidobacterium*. O número de ASVs nas amostras de fezes aumentou significativamente ($P < 0,05$) após a intervenção. Observou-se igualmente um aumento significativo ($P < 0,05$) dos ASVs pertencentes ao filo *Firmicutes*, nas amostras de fezes após a intervenção, com a exclusão de uma amostra que se diferenciava drasticamente das restantes. **Conclusão:** Este estudo sugere que os compostos bioativos presentes no funcho têm um efeito prebiótico nos lactentes amamentados por mães consumidoras de infusão de funcho, ao estimular seletivamente o aumento do número de bactérias benéficas na microbiota intestinal, nomeadamente alguns géneros pertencentes ao filo *Firmicutes* e de bactérias do género *Bifidobacterium*, reduzindo assim os sintomas da cólica infantil. Este representa uma inspiração para possíveis estudos futuros que procurem perceber melhor o efeito da infusão de funcho na redução da sintomatologia das cólicas em crianças. **Palavras-chaves:** *Foeniculum vulgare*, Funcho, Cólica infantil, Leite materno

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	3
ABREVIATURAS	4
ABSTRACT	5
RESUMO	6
ÍNDICE DAS TABELAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
INTRODUÇÃO	10
<i>LEITE MATERNO</i>	<i>10</i>
<i>MICROBIOTA INTESTINAL INFANTIL.....</i>	<i>12</i>
<i>CÓLICA NEONATAL</i>	<i>13</i>
<i>FUNCHO.....</i>	<i>15</i>
<i>RELAÇÃO ENTRE CÓLICA INFANTIL, FUNCHO E MICROBIOTA INTESTINAL INFANTIL</i>	<i>16</i>
OBJETIVOS	18
METODOLOGIA	19
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	60

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1. Critérios de inclusão e exclusão para participação no estudo.	20
Tabela 2. Descrição dos grupos de alimentos e respectivas porções usados para determinar o score de aderência à DM.	24
Tabela 3. Caracterização das crianças.	27
Tabela 4. Caracterização das mães.	28
Tabela 5. Alteração do choro das crianças após a ingestão da infusão de funcho pelas mães e continuação ou não da ingestão após o término do período de intervenção.	28
Tabela 6. Total de ASVs nas amostras de fezes.	31
Tabela 7. Abundância de ASVs ao nível do filo nas amostras de fezes.	32
Tabela 8. Total ASVs nas amostras de leite materno.	39
Tabela 9. Identificação genética dos isolados obtidos do leite materno e fezes das crianças.	46
Tabela 10. Descrição das questões de adesão à Dieta Mediterrânea.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tempo de estudo entre colheitas de amostras, após obtenção do consentimento informado pelas participantes.....	20
Figura 2. Fluxograma que identifica a população do estudo.....	26
Figura 3. Índices da biodiversidade e riqueza.....	30
Figura 4. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível do filo nas fezes das crianças	31
Figura 5. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da classe nas fezes das crianças. ...	32
Figura 6. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da ordem nas fezes das crianças..	33
Figura 7. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da família nas fezes das crianças..	34
Figura 8. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível do género nas fezes das crianças..	34
Figura 9. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da espécie nas fezes das crianças..	36
Figura 10. Dendrograma de relações de co-ocorrência e co-exclusão entre os géneros observados nas fezes, baseados na correlação de Spearman dos ASV (amplicon sequence variants).....	37
Figura 11. Dendrograma e heat-map representando a distribuição (%) dos géneros bacterianos nas amostras de fezes.....	38
Figura 12. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) de ASVs identificados ao nível do género, de amostras de leite materno e fezes das crianças.....	39
Figura 13. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível do filo nas amostras de leite materno.....	40
Figura 14. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da classe nas amostras de leite materno.....	41
Figura 15. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da ordem nas amostras de leite materno.....	41
Figura 16. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da família nas amostras de leite materno.....	42
Figura 17. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível do género nas amostras de leite materno.....	43
Figura 18. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da espécie nas amostras de leite materno.....	44
Figura 19. Dendrograma de relações de co-ocorrência e co-exclusão entre os géneros observados no LM, baseados na correlação de Spearman dos ASV (amplicon sequence variants).....	45

INTRODUÇÃO

A cólica infantil (CI) representa uma das principais causas de desconforto e sofrimento para a criança, resultando em choro excessivo, bem como de preocupação e desgaste psicológico, emocional e físico para os pais¹. Por essa razão a CI é uma área de pesquisa clínica tanto em termos de etiologia quanto de tratamento. Várias teorias etiológicas foram propostas, mas nenhuma delas é forte o suficiente para descrever completamente esta condição². Embora multifatorial na sua etiologia, a cólica é diversas vezes associada à alimentação, fatores psicológicos e do neurodesenvolvimento³ e, mais frequentemente, a mecanismos relacionados com o trato gastrointestinal, como formação de gases, dismotilidade, inflamação e disbiose intestinal⁴.

Têm sido efetuados vários estudos que tentam compreender a etiologia das cólicas infantis e melhorar a sua sintomatologia¹. Entre esses estudos, existem vários que demonstram um impacto positivo de infusões à base de funcho na melhoria da sintomatologia das cólicas das crianças⁵⁻¹⁰. Este efeito positivo das infusões com funcho faz parte de um conhecimento empírico, onde é relatado por várias mães que ao ingerirem estas infusões notam um efeito positivo na redução das cólicas nas crianças. No entanto, pouco se conhece acerca do mecanismo bioquímico/fisiológico pelo qual os componentes ativos do funcho que passam para o leite materno (LM), exercem a sua bioatividade. No presente estudo é colocada a hipótese de que os componentes bioativos do funcho terão um efeito modulador na microbiota intestinal das crianças e na do leite materno.

Leite Materno

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que a amamentação seja exclusiva até aos 6 meses de idade devido à riqueza nutricional do leite materno e à sua importância para um bom crescimento e desenvolvimento da criança¹¹. O LM é uma fonte contínua de microrganismos que são transmitidos, juntamente com muitos nutrientes e compostos bioativos, para o intestino infantil durante um período crítico do desenvolvimento e maturação^{12,13}.

A composição microbiológica do LM varia consoante o tempo de lactação, duração da gestação, doenças maternas, uso excessivo de antibióticos, tipo de parto, higiene, stress contínuo, genótipo e dieta¹⁴⁻¹⁷.

Este contém a quantidade ideal de macro e micronutrientes fornecendo uma nutrição completa ao lactente. Para além desses nutrientes, o leite humano contém uma série de compostos

bioativos e imunológicos, como anticorpos, lisozima, fatores de crescimento, peptídeos antimicrobianos, microRNAs e oligossacarídeos do leite humano (HMOs), que têm impacto no desenvolvimento do sistema imunológico infantil e fornecem defesa contra agentes patogênicos. O leite materno é também uma fonte de bactérias benéficas, denominadas bactérias do ácido láctico (BAL), como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, cujos seus benefícios para a saúde já são conhecidos¹⁸⁻²². Os HMOs podem apoiar a proliferação destas bactérias no intestino infantil²³⁻²⁵, através da sua ação prebiótica, agindo como substrato para o seu crescimento, uma vez que estas bactérias possuem a capacidade de consumir HMOs, justificando a sua predominância no intestino de crianças amamentadas^{26,27}.

Vários estudos reportam a existência de alterações na composição do leite humano ao longo do período de lactação^{23,28,29}. No estudo de Lyons K. et al (2022), foram avaliadas as alterações e a evolução da microbiota do leite humano de mulheres entre 1, 4, 8 e 24 semanas de lactação. A abundância dos filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* apresentou variações significativas entre os diferentes períodos de lactação. Foram observadas igualmente diferenças entre a 1ª e 24ª semana a nível do género, incluindo um aumento significativo em *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Blautia* e *Faecalibacterium*, e uma diminuição significativa em *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudaminobacter* e *Flavobacterium* ao longo desse período. Embora as diferenças nos géneros tenham sido mais relevantes entre a 1ª e 24ª semanas, também foi possível observar uma flutuação de alguns géneros ao longo das 24 semanas. Por exemplo, neste estudo observou-se um aumento de *Bifidobacterium* até à 4ª semana, seguida de uma redução até à 24ª semana²³.

Segundo os resultados do estudo de Padilha M. et al (2019), a dieta materna influencia a microbiota do LM. No período de lactação, a ingestão alimentar materna a curto prazo foi correlacionada com pequenas alterações na abundância de géneros específicos. Especificamente, o ácido linoleico correlacionou-se positivamente com a abundância relativa dos géneros *Bifidobacterium* no leite humano, que podem desempenhar um papel importante na composição da microbiota intestinal infantil em desenvolvimento²⁹.

Alguns estudos associaram os partos por cesariana a concentrações bacterianas totais no leite mais elevadas do que o parto vaginal, com níveis mais elevados de *Streptococcus*, mas mais baixos de *Bifidobacterium*. Outros estudos indicam uma menor diversidade de espécies na microbiota do leite humano de mulheres submetidas a cesariana em comparação com parto normal¹⁶. Porém, num trabalho publicado recentemente não foi detetado qualquer efeito do tipo

de parto na microbiota do leite materno¹⁸, pelo que serão necessários mais estudos para comprovar esta associação²⁵.

O índice de massa corporal (IMC) materno e o ganho de peso durante a gravidez têm impacto na composição e diversidade taxonômica da microbiota do leite materno. Verificou-se que o leite de mães com obesidade (IMC ≥ 30 kg/m²) inclui uma comunidade bacteriana de menor diversidade em comparação com o leite de mães com peso normal (IMC ≤ 25 kg/m²). Foram detetadas maiores contagens de bactérias totais, *Staphylococcus* e *Lactobacillus* e números mais baixos de *Bifidobacterium* em mães com obesidade em comparação com mulheres com peso normal durante os primeiros 6 meses de amamentação^{25,28}. Um ganho de peso excessivo durante a gravidez foi também associado a maiores quantidades do género *Staphylococcus* e da espécie *Staphylococcus aureus* em amostras de leite recolhidas após 1 mês de lactação, bem como maiores quantidades de *Lactobacillus* e menores quantidades de *Bifidobacterium* em amostras recolhidas após 6 meses. Contudo, neste estudo foi definido como ganho de peso normal, de acordo com as recomendações do *Institute of Medicine*: 11,5-16,0 kg e 7,0-11,5 kg para mulheres com peso normal e mulheres com obesidade, respetivamente²⁸.

A genética também é um fator que influencia a composição do LM. Sabe-se que o polimorfismo W143X introduz um codão de terminação prematuro no gene FUT2 (rs601338) retirando a capacidade de sintetizar HMOs $\alpha(1-2)$ -fucosilados (fenótipo “não secretor”). Os não-secretadores expressaram menos HMOs em comparação com mães com fenótipo secretor (FUT2 ativo). Além disso, o estado secretor materno mostrou estar associado à composição da microbiota do leite humano¹⁴.

Microbiota Intestinal Infantil

O corpo humano está repleto de uma grande quantidade de microrganismos comensais, como bactérias, vírus e fungos, denominados coletivamente de microbiota. A aquisição inicial da microbiota ocorre tanto no ambiente externo quanto no materno, e a grande maioria deles coloniza o trato gastrointestinal³⁰. O aumento das taxas de nascimento por cesariana, exposição a antibióticos, alimentação com fórmula e dietas seletivas demonstraram afetar a composição da microbiota intestinal infantil^{31,32}.

A microbiota humana é moldada por uma interação de fatores, incluindo antecedentes genéticos, sistema imunológico, cultura, economia, comportamento e meio ambiente. É adquirido

e desenvolvido nos primeiros anos de vida e acredita-se que desempenhe um papel crítico nas vias imunológicas, endócrinas, metabólicas e outras vias de desenvolvimento da criança. Portanto, entender o processo de aquisição da microbiota e direcionar esse processo para o melhor benefício para a saúde é de extrema importância³³. O processo de colonização gastrointestinal neonatal pode ser influenciado por inúmeros fatores ambientais. Um dos fatores preponderantes é a dieta neonatal, sendo que o LM é considerado a dieta ideal para estimular o desenvolvimento da microbiota de forma mais adequada para o lactente^{14,34}.

O leite humano é uma fonte fundamental de componentes bioativos, incluindo bactérias que podem contribuir para a colonização gastrointestinal neonatal e desenvolvimento e maturação imunológica durante os estágios iniciais cruciais de desenvolvimento^{35,36}. A amamentação é uma fonte importante de BAL, provavelmente devido à ação combinada dos componentes do leite materno, como compostos antimicrobianos e substâncias prebióticas (HMOs) que podem estimular seletivamente o crescimento de BAL no intestino. Os lactobacilos e bifidobactérias presentes no leite materno podem igualmente contribuir para o estabelecimento e desenvolvimento da microbiota da criança, fornecendo-lhe uma fonte contínua de inoculação bacteriana³⁵.

As bifidobactérias são frequentemente encontradas como sendo as mais abundantes no intestino de crianças amamentadas, geralmente representando 50-90% da população bacteriana total detetada nas fezes destas crianças. Acredita-se que isso se deva à sua notável capacidade de metabolizar e consumir componentes prebióticos do leite humano²⁶. Dessa forma, a ingestão de LM durante toda a lactação auxilia na formação da microbiota intestinal infantil e, conseqüentemente, contribui para o desenvolvimento e maturação do sistema imunológico da criança. Por exemplo, o leite humano tem a capacidade de modular o desenvolvimento e colonização intestinal da criança através da transmissão da mãe para o filho de estirpes bacterianas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium* através da amamentação^{37,38}.

Cólica Neonatal

A cólica infantil é considerada um distúrbio gastrointestinal funcional que ocorre em aproximadamente 20% das crianças¹. Geralmente, a sintomatologia associada às cólicas atinge o seu pico às 6 semanas após o nascimento e diminui naturalmente em 12 semanas¹.

Em 1954, Wessel definiu como critérios de diagnóstico de CI a presença de episódios de choro paroxístico, com duração de pelo menos três horas por dia, por mais de três dias da semana,

durante pelo menos três semanas, em crianças previamente saudáveis e bem alimentadas³⁹. Mais tarde, surgiram os critérios de Roma, criados em 1994 por um grupo de especialistas em gastroenterologia que desenvolveram um sistema de classificação com critérios de diagnóstico para distúrbios gastrointestinais funcionais em adultos⁴⁰⁻⁴². Posteriormente, após diversas atualizações destes critérios, foi criada a distinção entre critérios específicos para distúrbios gastrointestinais funcionais em crianças recém-nascidas e crianças/adolescentes⁴³⁻⁴⁶. A mais recente atualização destes critérios foi em 2016, os critérios de Roma IV, onde estão presentes os critérios de diagnóstico da CI. Estes critérios definem a CI como períodos recorrentes e prolongados de choro, agitação ou irritabilidade, em crianças com idade inferior a 5 meses, relatados por cuidadores, que ocorrem sem causa óbvia e não conseguem ser evitados ou resolvidos⁴⁰. Para o diagnóstico de cólica, segundo os critérios de Roma IV, não deve existir nenhuma evidência de deficiência de crescimento da criança, febre ou doença. Para além disso, a criança deve chorar e ficar agitada por 3 ou mais horas por dia durante 3 ou mais dias, no período de uma semana e, por fim, o período de choro e agitação nas últimas 24 horas deve ser confirmado como sendo de 3 ou mais horas, através de pelo menos um diário de comportamento de 24 horas, mantido prospectivamente⁴⁷.

Para além de existirem critérios que auxiliam no diagnóstico de CI, também estão a ser realizados mais estudos com o objetivo de ajudar na melhoria da sua sintomatologia⁴⁸. Em alguns estudos, observou-se que a administração oral de probióticos a crianças amamentadas com cólica, resultava numa redução do tempo de choro de, pelo menos, 50%, em comparação com o placebo. Foi demonstrado que uma estirpe probiótica específica, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, reduz as cólicas em crianças amamentadas exclusivamente com leite materno, sugerindo fortemente uma associação entre a microbiota gastrointestinal e as cólicas^{1,48,49}.

No entanto, a eficácia dos probióticos para reduzir os sintomas de cólica em lactentes alimentados também com fórmula necessita de mais estudos. Numa revisão sistemática, não foram encontradas evidências suficientes para apoiar ou refutar a eficácia dos probióticos na prevenção da CI⁴⁸.

Estudos prospetivos demonstraram a possibilidade de existirem problemas a nível do comportamento, relacionamento familiar e emoções negativas, ligadas ao temperamento, após vários anos de resolução das cólicas⁵⁰⁻⁵². Uma das hipóteses para estas consequências a longo prazo, serão as interações biológicas do eixo intestino-cérebro, como o papel da microbiota intestinal no neuro-desenvolvimento, bem como efeitos psicossociais no humor dos pais e no vínculo pais-filhos durante um período crítico de desenvolvimento. Porém, independentemente das potenciais

consequências referidas anteriormente permanecerem controversas, a cólica não deixa de ser uma condição que requer interações do eixo intestino-cérebro, uma vez que apresenta alterações gastrointestinais e sintomatologia comportamental, através do choro e agitação³.

Num estudo transversal prospetivo, onde foram incluídas 150 mães com filhos com idade inferior a 6 meses, observou-se que 106 mães (70,7%) tinham filhos que apresentavam sintomas de cólicas⁵³. Para além disso, as mães demonstraram opiniões distintas quanto à utilização de infusões de ervas no tratamento das cólicas dos seus filhos: 36% das mães afirmaram que as infusões de ervas poderiam ser dadas às crianças em caso de dores relacionadas com a excessiva produção de gases, enquanto 55,3% afirmaram não querer administrar infusões de ervas e 8,7% afirmaram que desconheciam essa possibilidade. As mães que forneciam infusões de ervas aos seus filhos afirmaram que, na maioria das vezes, preferiam utilizar infusão de erva-doce (funcho)⁵³.

Funcho

O funcho (*Foeniculum vulgare*), comumente conhecido por erva-doce, é uma planta aromática perene, nativa do sul da Europa e da Região do Mediterrâneo, distribuída por vários países tropicais e subtropicais com propriedades antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes^{54,55}. Alguns estudos indicam que esta planta pode apresentar efeitos importantes na supressão da inflamação e da carcinogénese, possivelmente por ação de um composto presente na sua constituição, o anetol, que tem a capacidade de inibir as respostas mediadas pelo Fator de Necrose Tumoral, cuja sinalização está associada com inflamação e carcinogénese⁵⁴. Poder-se-á utilizar a semente do funcho, o extrato, em pó ou mesmo a própria planta, de forma a adquirir as suas propriedades benéficas.

Ignora-se se o funcho já existia nos Açores aquando da chegada dos primeiros navegadores portugueses ou se terá sido introduzida pelos primeiros colonos, mas sabe-se que o funcho é uma planta utilizada nos Açores há diversos anos, sobretudo na culinária, para aromatizar alguns dos cozinhados típicos e como planta medicinal, muito utilizada no tratamento das cólicas das crianças. Na indústria alimentícia e de aromas, as sementes de erva-doce são utilizadas em carnes, produtos vegetais, molhos de peixe, sopas, molhos para saladas, pães, queijos, doces, chás e bebidas alcoólicas. O óleo de erva-doce é também usado em molhos, sabonetes, cremes, perfumes e licores. A semente desta planta é igualmente utilizada como laxante, expetorante, espasmolítico, anticólica e estimulante de enzimas digestivas. O pó de funcho é utilizado ainda, topicamente, como

cataplasma para picadas de cobra. Nas culturas asiáticas, o funcho era também ingerido para acelerar a eliminação de venenos⁵⁶.

Recentemente, devido à carcinogenicidade de um composto presente no funcho, o estragol, este foi considerado perigoso para os seres humanos, especialmente se usado como decocção para crianças. Porém, essa alegação não considera o funcho como uma matriz de substâncias e as suas interações entre si, uma vez que algumas das substâncias presentes na sua composição têm efeitos antioxidante, de inibição da inflamação e da carcinogénese. Acresce ainda que os níveis de estragol variam consoante as variedades do funcho, sendo que as variedades *azoricum* e *dulce* apresentam níveis mais baixos deste composto quando comparadas com a variedade *vulgare* (58% de estragol no óleo da variedade *vulgare*, 12% no óleo de var. *azoricum* e 6% no óleo de var. *dulce*)⁵⁶.

Estudos recentes confirmam que o estragol puro é inativado por muitas substâncias contidas na decocção⁵⁶. Desta forma, os trabalhos com estragol como uma única substância em estudo podem ser enganosos e deturpar a sua atividade quando comparados com um extrato complexo de ervas. Em todos os estudos em animais, foi usado estragol isolado e purificado. Assim, os resultados fornecem um perfil toxicológico desta única molécula e não o perfil de risco de toda a decocção. Em humanos, o estragol geralmente é ingerido através da infusão de erva-doce ou através do tempero de alimentos com esta planta que, para além deste composto, contém muitas outras substâncias como nevadensina, epigallocatequina, outros flavonóides e anetol, que têm um papel protetor e, portanto, contrabalançam o possível efeito do estragol puro⁵⁶.

Relação entre Cólica Infantil, Funcho e Microbiota Intestinal Infantil

Vários estudos têm demonstrado que a microbiota intestinal das crianças com cólicas apresenta uma menor diversidade comparada com crianças sem cólicas^{4,57,58}. Em consonância, Weerth et al. (2013) relataram que a diversidade da microbiota em crianças sem cólica apresentou um aumento significativo nos primeiros 100 dias de vida, enquanto a diversidade da microbiota em crianças com cólica permaneceu reduzida^{4,58}.

Crianças com cólica podem apresentar disbiose da microbiota intestinal, alterações de barreira e inflamação gastrointestinal crónica leve⁵⁸⁻⁶². Um estudo que comparou a microbiota intestinal de crianças com cólica e sem cólica, identificou que as proteobactérias estavam significativamente aumentadas em crianças com cólica⁵⁸. Em contraste, as bifidobactérias e lactobacilos estavam significativamente reduzidos em crianças com cólicas, incluindo espécies com

efeitos anti-inflamatórios⁴. Além disso, o fenótipo da cólica correlacionou-se positivamente com gêneros pertencentes ao filo *Proteobacteria*, incluindo *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia* e *Pseudomonas*, mas negativamente com bactérias pertencentes aos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*⁵⁷. Esta, seria assim uma provável causa de inflamação, fermentação, dor e dismotilidade intestinal. Observou-se também uma diminuição do número de espécies produtoras de butirato nas crianças com cólica⁵⁸.

Foi abordada a possibilidade de bactérias com a capacidade de produzir gás como a *Klebsiella*, em conjunto com bactérias Gram-negativas com propriedades pró-inflamatórias como *Eubacterium*, contribuírem negativamente para a dor intestinal e o choro que caracterizam a cólica³. As evidências sugerem que uma alta proporção de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* na microbiota infantil protege contra as cólicas e agitação, devido ao seu efeito modulador da resposta imune e à capacidade dos *Lactobacillus* induzirem a expressão de genes anti-inflamatórios^{3,60,61}.

Rhoads et al. (2018) sugeriram que as alterações microbianas na cólica estão associadas a inflamação intestinal, medida pela calprotectina intestinal, uma proteína antimicrobiana liberada de neutrófilos entéricos usada para avaliar a inflamação intestinal. Os resultados encontrados neste estudo conseguiram demonstrar uma relação significativa entre a cólica e a calprotectina intestinal, uma vez que em crianças com cólica, a calprotectina intestinal encontra-se significativamente aumentada em comparação com crianças sem cólica, independentemente do tipo de alimentação⁶².

Existem vários estudos que demonstram a eficácia das preparações com funcho na diminuição da prevalência de cólicas infantis, reduzindo significativamente o tempo de choro provocado pelas cólicas⁵⁻¹⁰. No entanto, o mecanismo subjacente a este efeito do funcho ainda não foi bem explicado, sendo necessários mais estudos para compreendê-lo⁵⁻¹⁰.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo é avaliar as alterações da microbiota do leite materno e fecal das crianças (com idade inferior ou igual a 5 meses) amamentadas, após a ingestão de uma infusão à base de funcho pelas mães.

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Caracterizar a microbiota fecal de crianças com idade inferior a 5 meses;
- Caracterizar a microbiota do leite materno;
- Isolar e identificar bactérias do leite materno e fezes das crianças.

METODOLOGIA

Declaração de Ética

Este estudo, ensaio clínico não controlado com apenas um braço, foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade dos Açores, a Comissão de Ética da NOVA Medical School e a Comissão de Ética do Centro de Saúde de Angra do Heroísmo.

O presente trabalho foi financiado pelo projeto Babymicro (Ref. M1.1.C/C.S./050/2021/01) que, por sua vez, é financiado pela Direção Regional da Ciência e Tecnologia (DRCT).

Desenho do estudo e recrutamento dos participantes

As mães foram informadas dos objetivos e da metodologia do estudo, antes de assinarem um consentimento informado, onde constava a informação de que a sua participação era completamente voluntária e que todos os dados recolhidos permaneceriam anónimos. Posteriormente foi gerado um código para cada participante, de acordo com a proteção de dados, garantindo a confidencialidade e a ocultação no tratamento analítico e de resultados.

Os contactos das mães foram fornecidos pelos Centros de Saúde de Angra do Heroísmo e Praia da Vitória. Devido à pandemia por COVID-19, o inquérito de inclusão foi realizado por via telefónica. Posteriormente, toda a informação sobre o estudo e recolhas das amostras foram realizadas através da deslocação a casa de cada participante.

Foi também aplicado um questionário direto às mães para recolher informações sobre o seu estado de saúde e da criança, idade de ambos, uso de antibióticos nos últimos 3 meses, medicação atual, alimentação da criança, tipo de parto e sintomatologia de cólicas. Foram ainda realizadas medições do peso com auxílio de uma balança da marca Omron® OM-BF511 e recolhida informação relativamente à estatura das mães para posterior cálculo do IMC. Crianças cujas mães tivessem utilizado antibióticos nos últimos 3 meses não foram incluídas no estudo. Foram apenas recrutados os participantes que englobavam todos os critérios de inclusão presentes na Tabela 1. As mães também foram convidadas a preencher um questionário sobre a adesão ao Padrão Alimentar Mediterrânico.

Tabela 1. Critérios de inclusão e exclusão para participação no estudo.

Critérios de Inclusão e Exclusão	
Inclusão	Exclusão
- Crianças com idade inferior a 5 meses.	- Crianças alimentadas exclusivamente por fórmula.
- Crianças com sintomatologia de cólicas segundo os critérios de Roma IV ⁴⁰ .	- Crianças cujas mães tomaram antibiótico nos últimos 3 meses.
- Crianças de termo (idade gestacional entre 38 e 42 semanas).	

A intervenção consistiu na ingestão de 1 litro de infusão de funcho ao longo do dia pelas mães, durante um período de 7 dias. Foram fornecidos 7 sacos contendo 20 g de sementes de funcho cada um a todas as participantes e, de seguida, foi efetuada uma explicação de como deveriam proceder para a preparação da infusão. A variedade de funcho utilizada foi a *Foeniculum vulgare* var. *dulce*, devido à sua menor concentração de estragol quando comparada com outras variedades⁵⁶. Para preparar a infusão, a água (1L) foi fervida e em seguida foram adicionadas as sementes inteiras, ficando em repouso cerca de 5 minutos antes de serem retiradas da água. A infusão foi bebida em substituição da água que as mães beberiam normalmente, sem limitação do consumo diário de água, apenas limitação da ingestão de outras infusões de ervas, de forma a não interferir com os resultados. Foram recolhidas amostras do LM e das fezes das crianças antes da intervenção e uma semana após o início da ingestão da infusão de funcho por parte das mães (Figura 1).

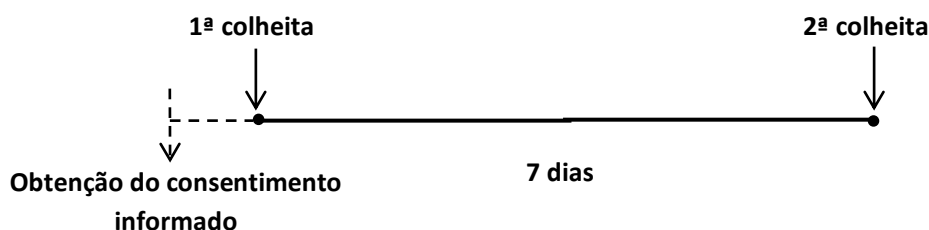


Figura 1. Tempo de estudo entre colheitas de amostras, após obtenção do consentimento informado pelas participantes.

Colheita das amostras

Foram recolhidas amostras de LM e fezes das crianças antes da ingestão da infusão de funcho por parte das mães, e uma semana após a ingestão. Foi fornecido um saco estéril para recolha do seu próprio leite por parte das mães e as amostras de fezes foram recolhidas através das fraldas das crianças. A recolha do leite foi realizada com o auxílio de uma bomba extratora por todas as mães incluídas no estudo. Após recolhidas as amostras, estas foram colocadas no frigorífico (4 °C) enquanto aguardavam a sua recolha, que foi realizada sempre num período inferior a 12h. No laboratório, as amostras foram imediatamente utilizadas para isolamento de bactérias e extração do DNA.

Extração do DNA das amostras

A extração do DNA das amostras foi efetuada no laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Agrárias e do Ambiente da Universidade dos Açores. Para a preparação das amostras de fezes, pesou-se 5 g de amostra e adicionou-se 45 mL de tampão citrato de sódio a 2%, e de seguida procedeu-se à homogeneização no *stomacher* (400 *Circulator*, Seward Medical, Londres, Inglaterra) durante 2 minutos a 230 rpm. Para a extração do DNA do leite, procedeu-se a uma prévia concentração. Centrifugou-se 10 mL de leite a $7000 \times g$ durante 10 minutos (centrífuga Beckman J2-HS). Descartou-se o sobrenadante, e lavou-se o *pellet* com tampão TE (Tris-EDTA – 2M Tris HCl, 0.5M EDTA, pH 8.0) duas vezes. Por fim, ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de tampão TE. O DNA genómico total foi extraído usando o *kit* de extração UltraClean® *Microbial DNA Isolation Kit* (MoBio, Carlsbad, CA). A quantidade e qualidade do DNA extraído foi avaliado pela medição da absorvância a 260 e 280 nm no leitor de microplacas (*LVis Plate*, Fluorstar Omega, BMG Labtech), sendo calculado o rácio 260/280. A qualidade do DNA extraído foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (w/v).

Sequenciação de alto rendimento e análises bioinformáticas

As amostras foram preparadas para a sequenciação através do sistema Illumina⁶³, por amplificação do gene rRNA 16S da comunidade bacteriana. O DNA foi amplificado para a região hipervariável V3-V4, com primers específicos e novamente reamplificado numa reação de PCR de ciclo limitado para adicionar adaptadores de sequenciamento e índices duplos. As primeiras reações

de PCR foram realizadas para cada amostra usando o Kit KAPA (HiFi HotStart PCR), de acordo com as sugestões do fabricante: 0,3 μ M de cada primer: forward primer Bakt_341F 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' e reverse primer Bakt_805R 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'^{64,65} e 2,5 μ L de DNA num volume total de 25 μ L. As condições de PCR envolveram uma desnaturação de 3 minutos a 95 °C, seguidas de 30 ciclos de 98 °C por 20 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, e uma extensão final a 72 °C por 5 min. As segundas reações de PCR adicionaram índices e adaptadores de sequenciação a ambas as extremidades da região alvo amplificada, de acordo com as recomendações do fabricante⁶³. Os controlos negativos de PCR foram incluídos para todos os procedimentos de amplificação. Os produtos de PCR foram então purificados e normalizados usando o kit SequalPrep (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA)⁶⁶, agrupados e sequenciados com o V3, no sequenciador Illumina MiSeq^{®63}, de acordo com as instruções do fabricante.

As leituras foram extraídas do Illumina MiSeq[®] System no formato fastq. O programa QIIME2 2020.2.0⁶⁷ foi utilizado para gerar *Amplicon Sequence Variant* (ASV) e identificação taxonómica. A filtragem do ruído foi realizada com DADA2⁶⁸. As quimeras foram detetadas e removidas com base no método de consenso e leituras filtradas phiX. Após filtrar o ruído, as atribuições taxonómicas foram determinadas para ASVs com o plugin classificador de recursos q2⁶⁹ com utilização do banco de dados SILVA⁷⁰. Estas análises foram efetuadas pela empresa GenoInseq (Cantanhede, Portugal). Foi realizada uma verificação das 965 sequências encontradas nas amostras através do programa BLAST.

Isolamento de bactérias potencialmente probióticas

As amostras de fezes e leite foram ainda utilizadas para isolamento de bactérias por plaqueamento em meio MRS com cisteína para a seleção de lactobacilos e *Bifidobacterium*. As placas foram incubadas a 37 °C, em anaerobiose, durante 72h. Foram isoladas 273 bactérias e realizadas as repicagens necessárias, nas mesmas condições no meio de cultura, até obtenção de culturas puras.

A confirmação da pureza e identidade dos isolados foi realizada através da sua morfologia (determinada por microscopia de contraste de fase), reação ao Gram, e os testes da oxidase e da catalase. O teste da catalase foi realizado numa lâmina com peróxido de hidrogénio a 30%. O teste da oxidase foi realizado com o kit Bactident[®] Oxidase (Merck, Alemanha). Foram selecionados os isolados Gram positivos, catalase e oxidase negativos. Estes isolados foram congelados em caldo

MRS suplementado com 30% (v/v) de glicerol e mantidos a -80 °C. Das 273 bactérias isoladas apenas 77 apresentaram o fenótipo Gram positivo, catalase e oxidase negativos.

Deste grupo de 76 bactérias, 22 foram identificadas por sequenciação do gene 16S rRNA. O DNA genómico total foi extraído usando o kit de extração UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA). Os fragmentos de aproximadamente 1388 pares de bases da região 16S rRNA foram amplificados por PCR, utilizando os primers universais 46F (5' GCYTAAYACATGCAAGTCG-3') e 1409R (5' GTGACGGGCRGTGTGTRCAA-3') que amplificam a região conservada do gene 16S rRNA.

A reação PCR foi realizada num volume de 20 µL, contendo uma solução tampão (Taq polymerase reaction buffer), dNTPs (0.25 mol L⁻¹), primers 46F e 1409R (0.13 mol L⁻¹) e 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas, Life Sciences, Waltham). O programa de amplificação foi realizado num termociclador, e consistiu numa primeira etapa de desnaturação a 94 °C durante 3 minutos, seguida por 25 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 90 segundos, e uma etapa final de extensão a 72 °C durante 10 minutos. Os produtos do PCR foram avaliados através de uma eletroforese em gel de agarose 1,5% (w/v).

O fragmento de cerca de 1388-bp do gene 16S rRNA foi sequenciado (STAB Vida). Para a visualização e edição das sequências de DNA, foi utilizado o programa Chromas; e para o alinhamento das sequências dos genes 46F (Forward) e 1409R (Reverse) foi usado o programa BioEdit Sequence Alignment Editor. As sequências do gene 16S rRNA editadas em formato Fasta foram analisadas pelo programa BLAST para pesquisa de sequências homólogas no GenBank, website NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação da espécie.

Adesão à Dieta Mediterrânica (DM)

Para avaliar a adesão à Dieta Mediterrânica foi aplicado o questionário PREDIMED (PREvención com Dieta MEDiterránea)^{71,72}, validado para a população portuguesa. Este questionário é constituído por 14 questões relacionadas com o consumo/frequência de consumo de alimentos típicos e não típicos do Padrão Alimentar Mediterrânico (Tabela 2). Para cada questão foi definido um critério relacionado com as características do Padrão Alimentar Mediterrânico. Para a análise dos dados, são pontuados com “um” as respostas às questões deste índice que cumprem com o critério, sendo a pontuação final obtida através do somatório da pontuação obtida para cada uma das perguntas. A pontuação final pode variar entre 0 e 14, sendo a adesão ao Padrão Alimentar Mediterrânico definida em dois níveis: baixa (< 10 pontos) e elevada (≥ 10 pontos)⁷³.

Tabela 2. Descrição dos grupos de alimentos e respetivas porções usados para determinar o score de aderência à DM.

Questões de adesão à Dieta Mediterrânica	Critérios para 1 ponto
1.Utiliza azeite como principal gordura culinária?	Sim
2.Que quantidade de azeite consome num dia (incluindo uso para fritar, temperar saladas, refeições fora de casa, etc.)?	≥ 4 colheres de sopa
3.Quantas porções de produtos hortícolas consome por dia (1 porção: 200 g; considere acompanhamentos como metade de uma porção)?	≥ 2 (≥ 1 se for porção em cru ou em salada)
4.Quantas peças de fruta (incluindo sumos de fruta natural) consome por dia?	≥ 3
5.Quantas porções de carne vermelha, hambúrguer ou produtos cárneos (presunto, salsicha, etc.) consome por dia? (1 porção: 100-150 g)	< 1
6.Quantas porções de manteiga, margarina, ou natas consome por dia? (1 porção: 12 g)	< 1
7.Quantas bebidas açucaradas ou gaseificadas bebe por dia?	< 1
8.Quantos copos de vinho bebe por semana?	≥ 7 copos
9.Quantas porções de leguminosas consome por semana? (1 porção: 150 g)	≥ 3
10.Quantas porções de peixe ou marisco consome por semana? (1 porção: 100-150 g de peixe ou 4-5 unidades ou 200 g de marisco)	≥ 3
11.Quantas vezes por semana consome produtos de pastelaria ou doces comerciais (não caseiros), como bolos, bolachas, biscoitos?	< 3
12.Quantas porções de oleaginosas (nozes, amêndoas, incluindo amendoins) consome por semana? (1 porção: 30 g)	≥ 3
13.Consome preferencialmente frango, peru ou coelho em vez de vaca, porco, hambúrguer ou salsicha?	Sim
14.Quantas vezes por semana consome hortícolas, massa, arroz ou outros pratos confecionados com um refogado (tomate, cebola, alho-francês ou alho e azeite)?	≥ 2

Análise Estatística

Os índices de biodiversidade (Número de ASVs, Taxa, Chao1, Equitatividade, índice de Shannon e índice de Simpson) foram determinados com o programa Past (v. 4.11, Hammer & Harper). Foi aplicado o teste H de Kruskal-Wallis (para $\alpha = 0,05$) para comparações dos índices de diversidade do leite e fezes, antes e após a ingestão da infusão de funcho. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. Os perfis de ASV de cada amostra foram

normalizados (*total sum normalization*) e comparados pela métrica de distância Bray-Curtis. As distâncias calculadas de Bray-Curtis foram posteriormente usadas para ordenar os perfis de ASV por Análise de Coordenadas Principais (PCoA). As relações de co-ocorrência e co-exclusão entre os gêneros observados nas amostras de leite e fezes, foram analisadas pela correlação de Spearman. A análise estatística foi realizada com o programa Past (PCoA) e SPSS Statistics (v. 25, IBM Corporation).

RESULTADOS

Foram contactadas 426 mães de crianças com idades inferiores a 5 meses através de contactos telefónicos fornecidos pelos Centros de Saúde de Angra do Heroísmo e Praia da Vitória. Foram recrutadas 10 crianças, porém um participante foi excluído do estudo, devido à percepção posterior de que a criança não apresentava realmente cólicas segundo os critérios de inclusão, acabando por ser incluídos no estudo 9 participantes. Duas das mães não concluíram o estudo (4 e 10), entregando apenas as amostras de fezes antes da intervenção. Três mães não entregaram amostras de leite antes e depois da intervenção, por dificuldade em extrair o leite. Foram recolhidas um total de 12 amostras de leite e 16 amostras de fezes (Figura 2).

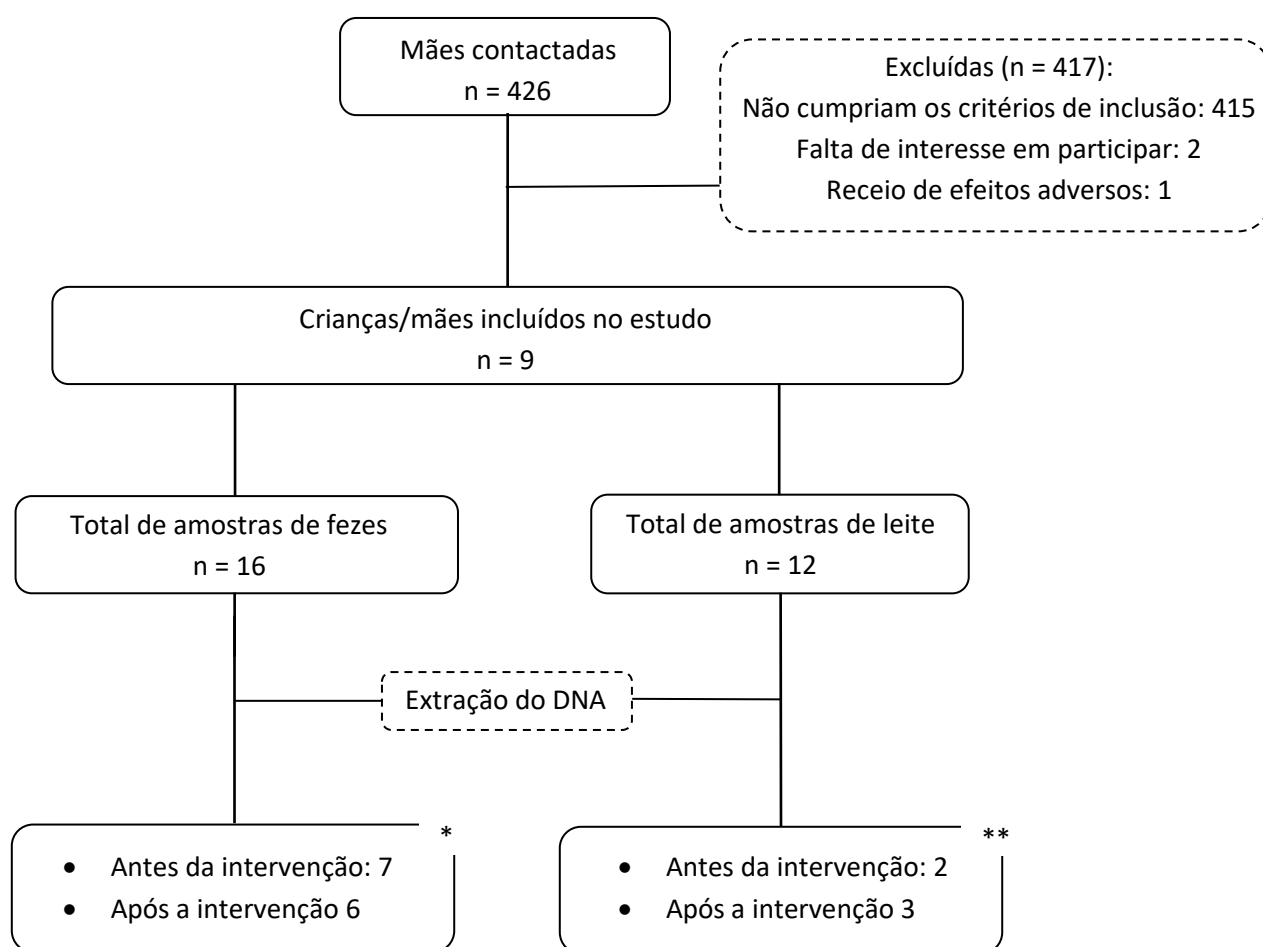


Figura 2. Fluxograma que identifica a população do estudo.

*Não foi possível extrair o DNA de 3 amostras de fezes.

**Não foi possível extrair o DNA de 7 amostras de leite.

Caracterização clínica das crianças e das mães

As crianças que integraram o estudo tinham entre 1 e 4 meses de idade e todas apresentavam cólicas segundo os critérios Roma IV⁴⁰. Cinco das crianças apresentava idade inferior a 2 meses. A maioria delas eram do sexo feminino (55,6%) e nasceram por parto normal (55,6%). Das crianças incluídas no estudo, apenas uma apresentava alimentação mista (Tabela 3), sendo o leite materno a principal fonte de alimentação desta criança, porém esta ingeria aproximadamente 320 ml de fórmula diariamente dividida por duas refeições de 160 ml cada. As restantes eram alimentadas com LM exclusivo (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização das crianças.

Sexo, n	
Feminino	5
Masculino	4
Idade, semanas (média ± DV)	10,4 ± 4,7
Idade gestacional semanas (média ± DV)	39,5 ± 1,0
Tipo de parto	
Vaginal	5
Cesariana	4
Tipo de alimentação, n	
LM exclusivo	8
LM + fórmula	1
Uso de medicação para cólicas, n	
Biogaia (5 gotas diariamente)	1
Colimil (1x/dia e 2x/dia)	2

As crianças cujas mães administravam suplementos probióticos (Biogaia e Colimil) não foram excluídos do estudo, devido à dificuldade no recrutamento de participantes e ao facto de continuarem a apresentar sintomatologia de cólica mesmo utilizando estes recursos. A utilização destes probióticos foi mantida durante o período de intervenção.

A idade materna variou entre 24 e 45 anos, com uma média de 32,8 anos (Tabela 4). Nenhuma das participantes e os seus filhos apresentava doença crónica ou tomava medicação diária durante a sua participação no estudo. Como consta da Tabela 4 e de acordo com a OMS, as mães com IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m² foram consideradas como tendo um peso normal para a sua

estatura, as mães com IMC entre 25,0 e 29,9, e IMC entre 30,0 e 34,9 foram consideradas como tendo excesso de peso e obesidade de grau I, respetivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização das mães.

Idade, anos (média ± DV)	32,8 ± 6,1
IMC pré-gestacional, n	
Peso normal	5
Excesso de peso	2
Obesidade grau I	2
Aumento de peso na gestação, kg	10,3 ± 3,3
IMC, kg/m² (média ± DV)	27,2 ± 4,3

As particularidades de cada participante que são importantes referenciar são as seguintes: as participantes 8 e 10 forneceram um suplemento probiótico (Colimil) aos seus filhos antes e durante a intervenção, a participante 5 também suplementava a criança com um probiótico (BioGaia) e esta foi a única participante onde a alimentação do lactente era mista (LM + dois biberões de 160 ml de fórmula cada). Por fim, a participante 3 destacava-se das restantes pelo facto de, antes de integrar o estudo, já ingerir diversos tipos de chá diariamente, sendo-lhe solicitado que bebesse apenas a infusão de funcho durante o período de intervenção.

Feedback das mães após ingestão da infusão de funcho

A opinião das mães relativamente à melhoria ou não da cólica dos seus filhos durante o período de ingestão da infusão de funcho é apresentada na Tabela 5. Podemos observar que a maioria das mães relatou uma melhoria considerável das cólicas dos seus filhos, uma vez que houve uma diminuição considerável do tempo de choro relacionado com a cólica (Tabela 5). Além disso, três mães continuaram a ingerir a infusão de funcho após o término do período de intervenção (Tabela 5). As mães 4 e 10 desistiram do estudo, pois relataram um aumento do período de choro diário da criança após iniciarem a ingestão da infusão de funcho.

Tabela 5. Alteração do choro das crianças após a ingestão da infusão de funcho pelas mães e continuação ou não da ingestão após o término do período de intervenção.

Participante	1	2	3	4	5*	6	7**	8	10
--------------	---	---	---	---	----	---	-----	---	----

Idade (dias)	32	104	43	49	119	48	125	58	77
Choro	↓	↓	↓	↑	↓	↓	=	↓	↑
Continuação	✗	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✗

*A mãe relatou que a criança deixou de ter cólicas após a ingestão da infusão.

**Não observou diferenças significativas no período de choro da criança.

Caracterização da microbiota das fezes das crianças

Num total de 16 amostras de fezes obtidas no estudo não foi possível a extração do DNA em 3 amostras. A composição taxonómica das comunidades bacterianas foi avaliada num total de 13 amostras de fezes. Só foi possível extrair o DNA de amostras completas de cinco participantes (amostras antes e depois da intervenção) (1FA/1FD, 5FA/5FD, 6FA/6FD, 7FA/7FD, 8FA/8FD). Para além dessas amostras, foi incluído na análise o DNA extraído em duas amostras antes da intervenção (3FA e 10FA) e numa amostra após a intervenção (2FD). A idade média destas crianças ao iniciarem o estudo foi de 10,2 semanas.

A riqueza e a diversidade das comunidades bacterianas foram avaliadas para as amostras de fezes, aplicando vários índices de riqueza e diversidade (Nº de ASVs, Taxa, Chao1, Equitabilidade, Índice de Shannon, Índice de Simpson e Índice de Fisher). Estes parâmetros são apresentados na Figura 3.

Neste estudo não se observaram diferenças significativas ($P > 0,05$) nos índices de biodiversidade Taxa, Dominância, Simpson, Shannon, Fisher e Chao-1, antes e após a intervenção. No entanto, observou-se uma tendência para um aumento da riqueza bacteriana nas fezes das crianças após a intervenção, embora não significativa ($P = 0,063$), refletida pelos índices Chao-1 e número de espécies (Taxa). Também o número de ASVs aumentou significativamente ($P < 0,05$) após a intervenção.

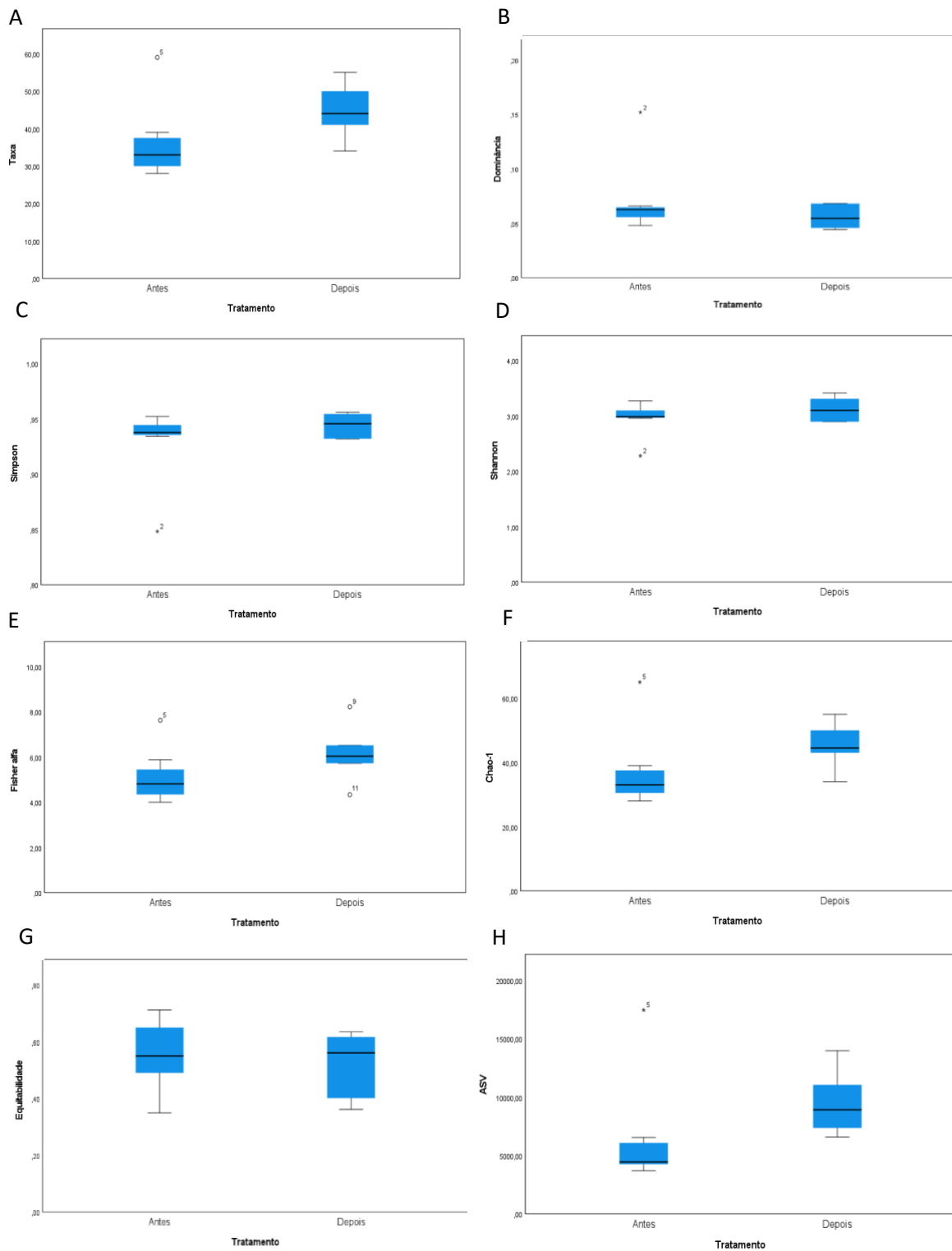


Figura 3. Índices de riqueza e diversidade bacteriana nas amostras recolhidas antes e após a intervenção.

Este aumento do número de ASVs após a intervenção foi observado na maioria das amostras (1,5,6 e 8), exceto na amostra 7, onde o número de ASVs no início da intervenção era anormalmente elevado em comparação com as restantes amostras (Tabela 6).

Tabela 6. Total de ASVs nas amostras de fezes. O número corresponde ao participante, FA e FD correspondem às amostras de fezes das crianças recolhidas antes e após a intervenção, respetivamente.

	1FA	1FD	2FD	3FA	5FA	5FD	6FA	6FD	7FA	7FD	8FA	8FD	10FA
TOTAL ASVs	6546	13969	6581	4134	5613	7359	4373	11048	17452	9801	4447	8024	3696

Nas amostras de fezes foram identificados 5 filós: *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. Porém, aqueles que contribuíram com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra, foram os filós *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* (Figura 4). O filo *Cyanobacteria* apenas estava presente na amostra 7FD e o filo *Firmicutes* foi observado em todas as amostras estudadas. De forma geral, o filo dominante em grande parte das amostras de fezes foi o *Actinobacteriota*, porém este filo não estava presente na amostra 3FA (Figura 4).

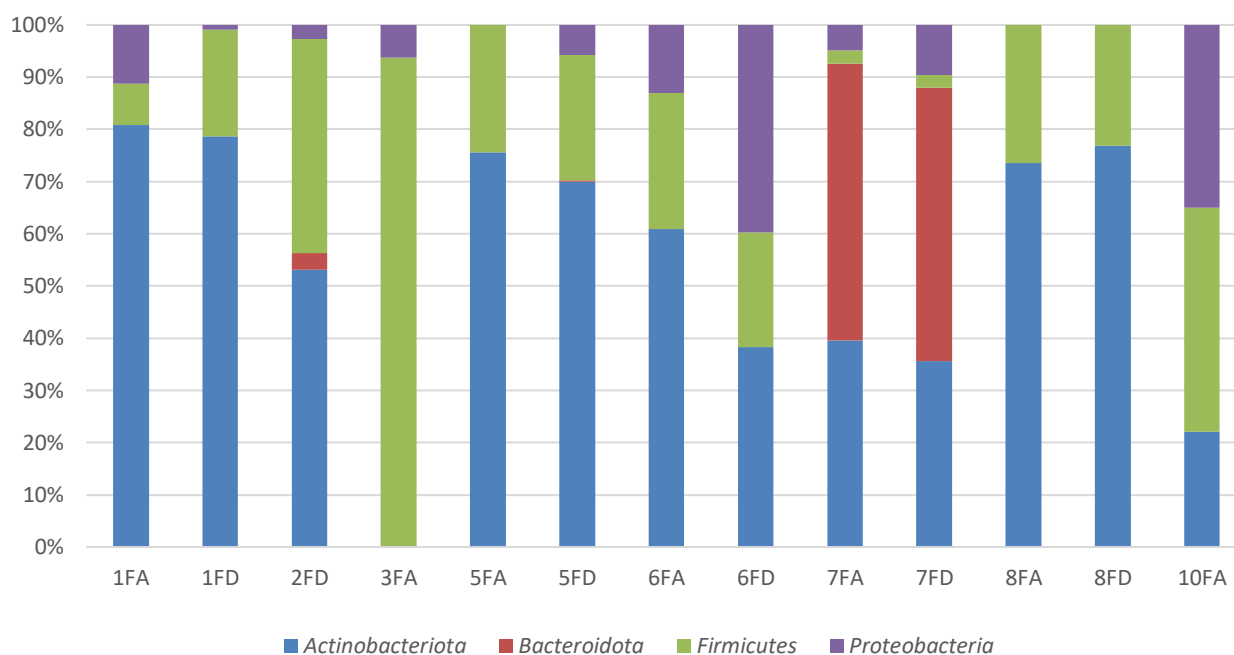


Figura 4. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível do filo nas fezes das crianças. São mostradas apenas os filós que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Não se observaram diferenças significativas ($P > 0,05$) na abundância de ASVs pertencentes aos diferentes filós nas amostras de fezes antes e depois da intervenção (Tabela 7). No entanto,

após a exclusão da amostra 7, que apresenta uma presença ASVs pertencentes ao filo *Bacteroidota* particularmente elevada, detetou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) dos ASVs pertencentes ao filo *Firmicutes*, após a intervenção.

Tabela 7. Abundância de ASVs ao nível do filo nas amostras de fezes.

	1FA	1FD	5FA	5FD	6FA	6FD	7FA	7FD	8FA	8FD
<i>Actinobacteriota</i>	5290	10980	4243	5148	2666	4235	6908	3488	3272	6163
<i>Bacteroidota</i>	0	0	0	19	0	0	9252	5128	0	0
<i>Cyanobacteria</i>	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0
<i>Firmicutes</i>	523	2860	1370	1767	1136	2426	453	238	1175	1861
<i>Proteobacteria</i>	733	129	0	425	571	4387	839	941	0	0

Nas Figuras 5 e 6 são apresentadas as abundâncias relativas das sequências identificadas ao nível da classe e ordem, respetivamente. A classe *Actinobacteria* domina na maioria das amostras. Contudo, no indivíduo 3 (3FA) esta classe não foi detetada, sendo a classe *Bacilli*, a dominante nesta amostra, correspondendo a 85% da abundância relativa (Figura 5). A amostra 10FA também apresentou uma menor proporção da classe *Actinobacteria*. As classes com maior abundância relativa nesta amostra foram a *Gammaproteobacteria* e *Clostridia*. De salientar, que o indivíduo 7 (7FA e 7FD) apresentou uma incidência da classe *Bacteroidia* elevada (>50%), não tendo sido detetados ASVs pertencentes a esta classe nas fezes das restantes crianças (com exceção de uma pequena percentagem nas amostras 2FD e 5FD).

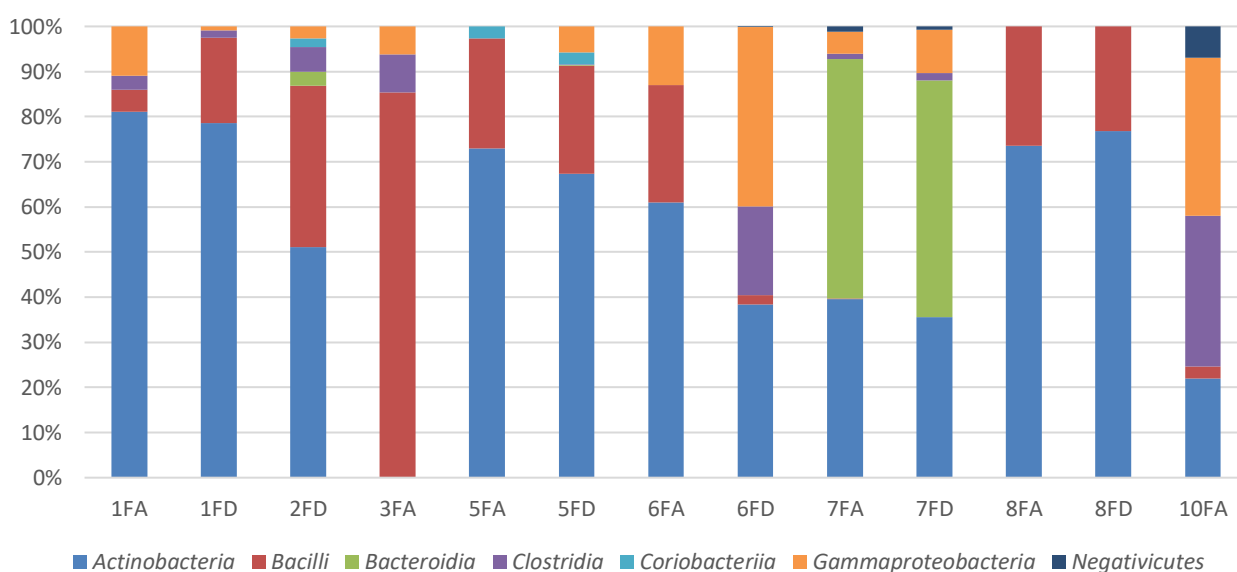


Figura 5. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da classe nas fezes das crianças. São mostradas apenas as classes que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Em relação à ordem, podemos observar na Figura 6 que a ordem dominante na maioria das amostras é a ordem *Bifidobacteriales*. A amostra 3FA destaca-se pela dominância da ordem *Lactobacillales* (80%). Nas amostras 7FA e 7FD a ordem dominante é a *Bacteroidales* (>50%). Por fim, as amostras 6FD e 10FA apresentam uma abundância relativa elevada de bactérias da ordem *Clostridiales* (15% e 33%, respectivamente) e *Enterobacterales* (39% e 35%, respectivamente) (Figura 6).

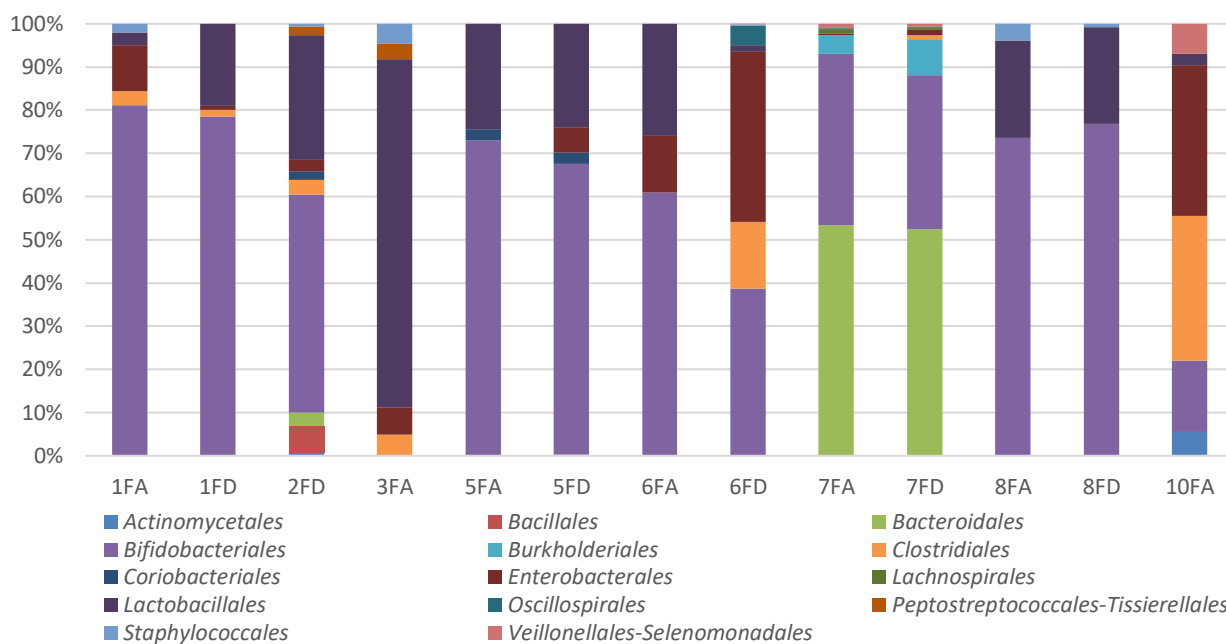


Figura 6. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da ordem nas fezes das crianças. São mostradas apenas as ordens que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Ao nível da família, as amostras que apresentam menor abundância da família *Bifidobacteriaceae* são a 3FA (0% da abundância relativa), seguida da amostra 10FA (17%). A família dominante na amostra 10FA é a *Enterobacteriaceae* (35%), seguida da *Clostridiaceae* (33%).

As restantes amostras têm a *Bifidobacteriaceae* como família dominante (Figura 7). As amostras do participante 7 apresentam um perfil microbiano, ao nível da família, distinto das restantes amostras, com uma abundância relativa elevada (>50%) de *Barnesiellaceae* e *Sutterellaceae* (4-8%).

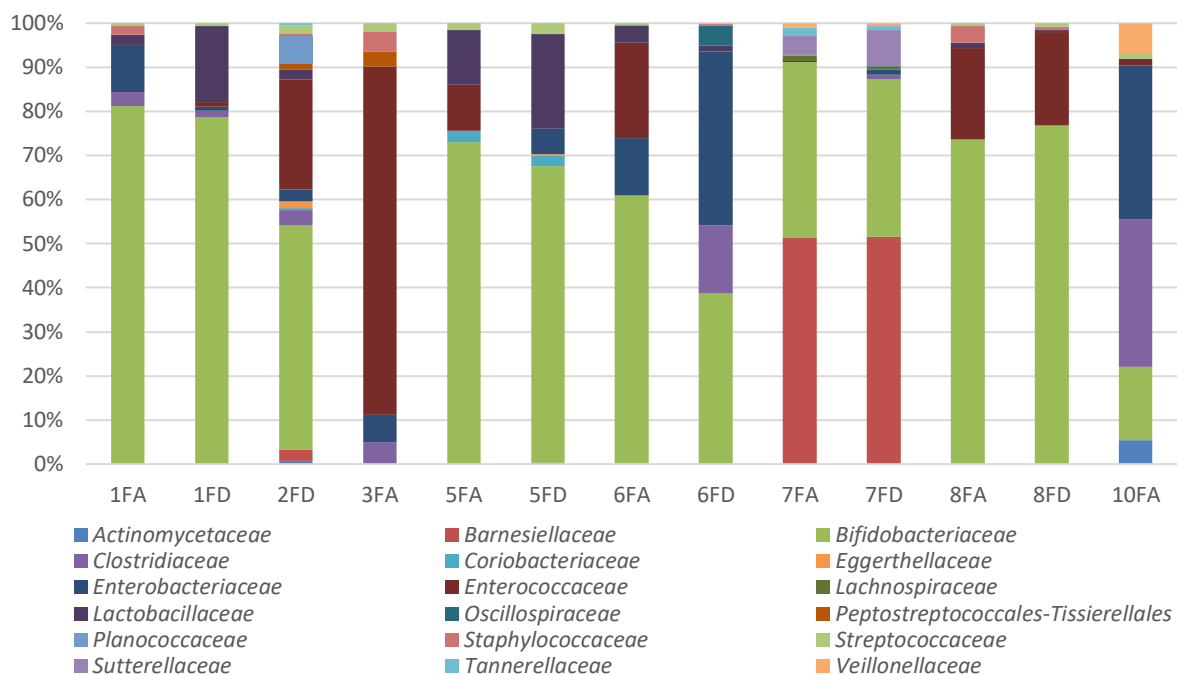


Figura 7. Abundância relativa (%) das seqüências identificadas ao nível da família nas fezes das crianças. São mostradas apenas as famílias que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

O gênero *Bifidobacterium* foi o gênero dominante na maioria das amostras. A amostra 3FA destacou-se pela diferença observada na sua composição bacteriana quando comparada com as restantes amostras, pois foi a única amostra onde não se observou o gênero *Bifidobacterium* e onde a abundância relativa de *Enterococcus* foi bastante superior às restantes (Figura 8).

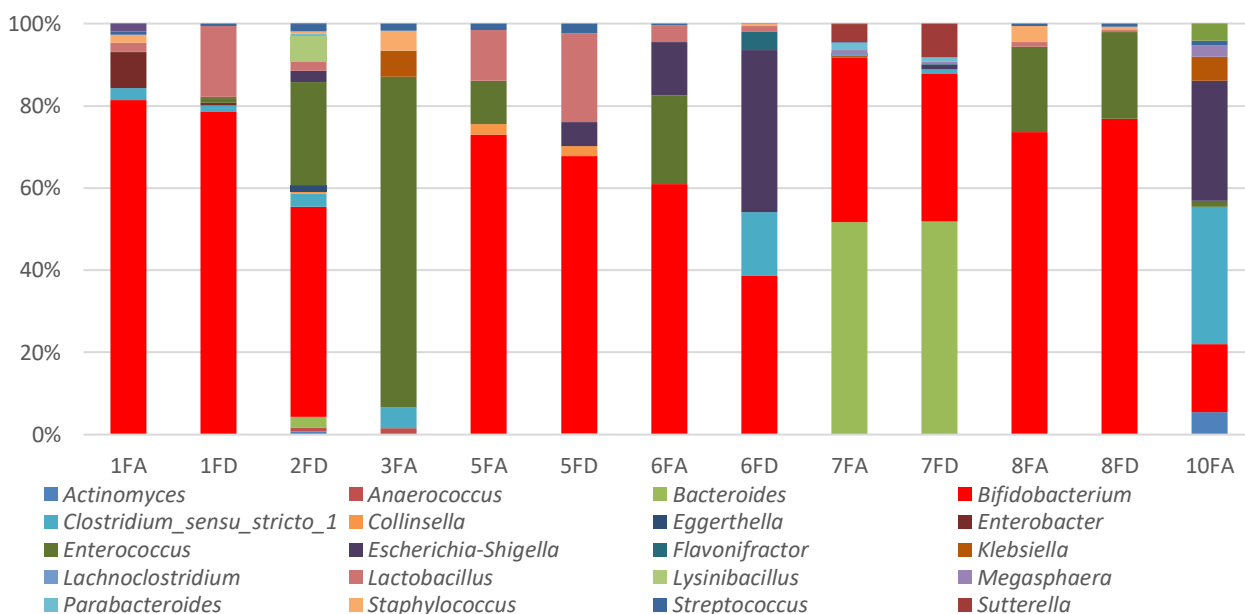


Figura 8. Abundância relativa (%) das seqüências identificadas ao nível do gênero nas fezes das crianças. São mostradas apenas os gêneros que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Através da verificação das sequências não identificadas no programa BLAST, foi possível identificar o gênero e a espécie de diversas bactérias que ainda não tinham sido identificadas nas amostras de fezes e leite materno. Também foi possível verificar que as bactérias que não tinham filo atribuído na verdade correspondiam a células somáticas, tendo sido excluídas da tabela de dados. No entanto, a abundância de espécies não atribuídas permaneceu muito elevada (Figura 9). A abundância relativa das sequências não identificadas ao nível da espécie foi entre 34 e 97%.

Foram detetadas um total de 82 espécies nas amostras de fezes das crianças e 23 destas contribuíram com mais de 1% da abundância relativa total em pelo menos uma amostra. Entre estas 23 espécies foram detetadas várias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*. As espécies de *Bifidobacterium* detetadas nas fezes das crianças foram *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium dentium* e *Bifidobacterium longum* numa abundância superior a 1% em pelo menos uma amostra. As amostras de fezes 6FA e 6FD destacaram-se das restantes por apresentarem uma abundância de *Bifidobacterium breve* muito superior, correspondendo a 61% e 38% da abundância total, respetivamente. As amostras de fezes do lactente 7 (7FA e 7FD) apresentaram uma elevada abundância de *Bacteroides faecis* (47-49%) e de *Sutterella wadsworthensis* (4-8%), ausentes nas amostras das restantes crianças. A amostra 3FA continha 4% da abundância total da espécie *Klebsiella pneumoniae*, sendo que as restantes apresentavam uma abundância inferior a 1% da abundância total. Por outro lado, a amostra 10FA apresentou uma abundância de *Bifidobacterium dentium* superior às restantes amostras. Na amostra 3FA não foram detetadas espécies de bactérias pertencentes aos géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, sendo que as espécies que predominavam nesta amostra pertencem aos géneros *Clostridium* e *Klebsiella* (Figura 9).

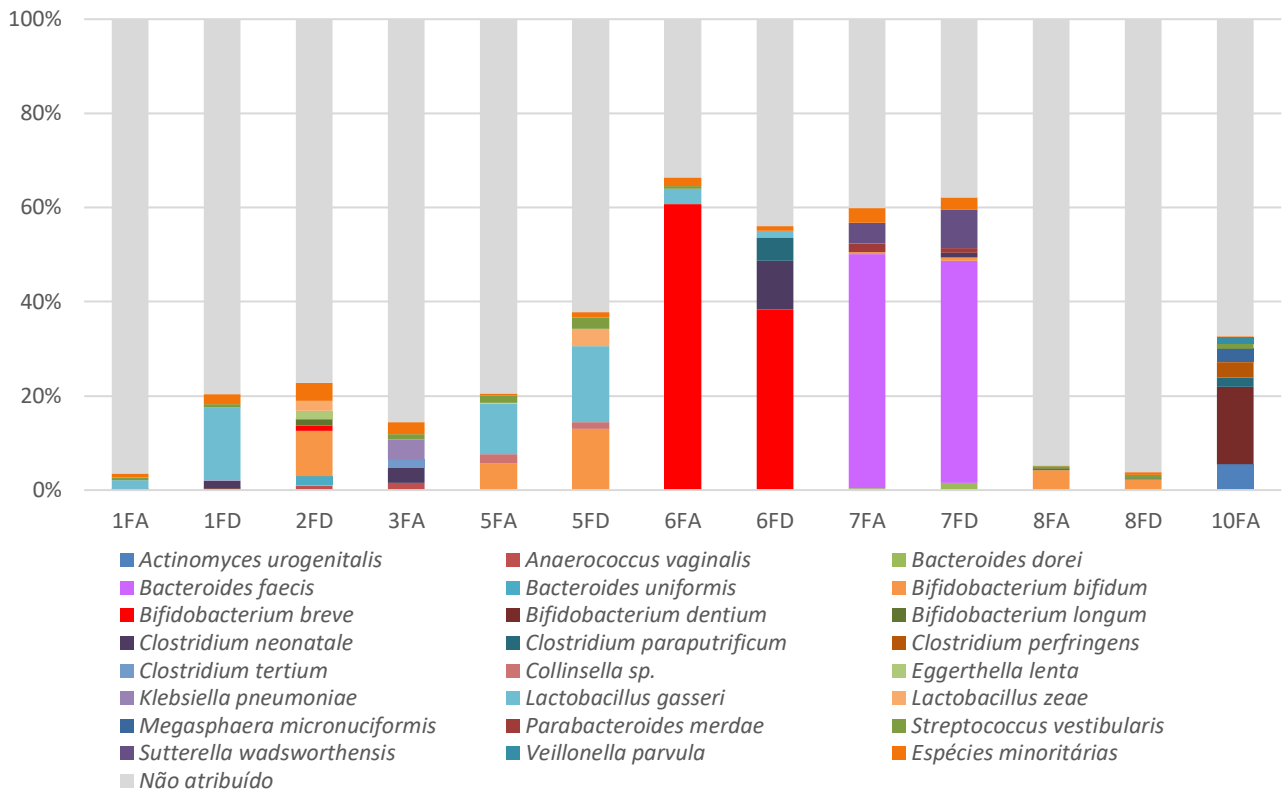


Figura 9. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da espécie nas fezes das crianças. São mostradas apenas as espécies que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Padrão de co-ocorrência e exclusão de ASVs

O padrão de co-ocorrência e exclusão de ASVs nas amostras de fezes é apresentado na Figura 10. Podemos observar uma forte correlação negativa entre géneros considerados capazes de produzir gás e que contribuem para a dor intestinal e o choro que caracterizam a cólica³, como a *Klebsiella* e a *Escherichia*, com os géneros considerados protetores a nível das cólicas, devido ao seu efeito modulador da resposta imune^{3,60,61}, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Em contraste, observou-se uma correlação positiva entre *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Figura 10).

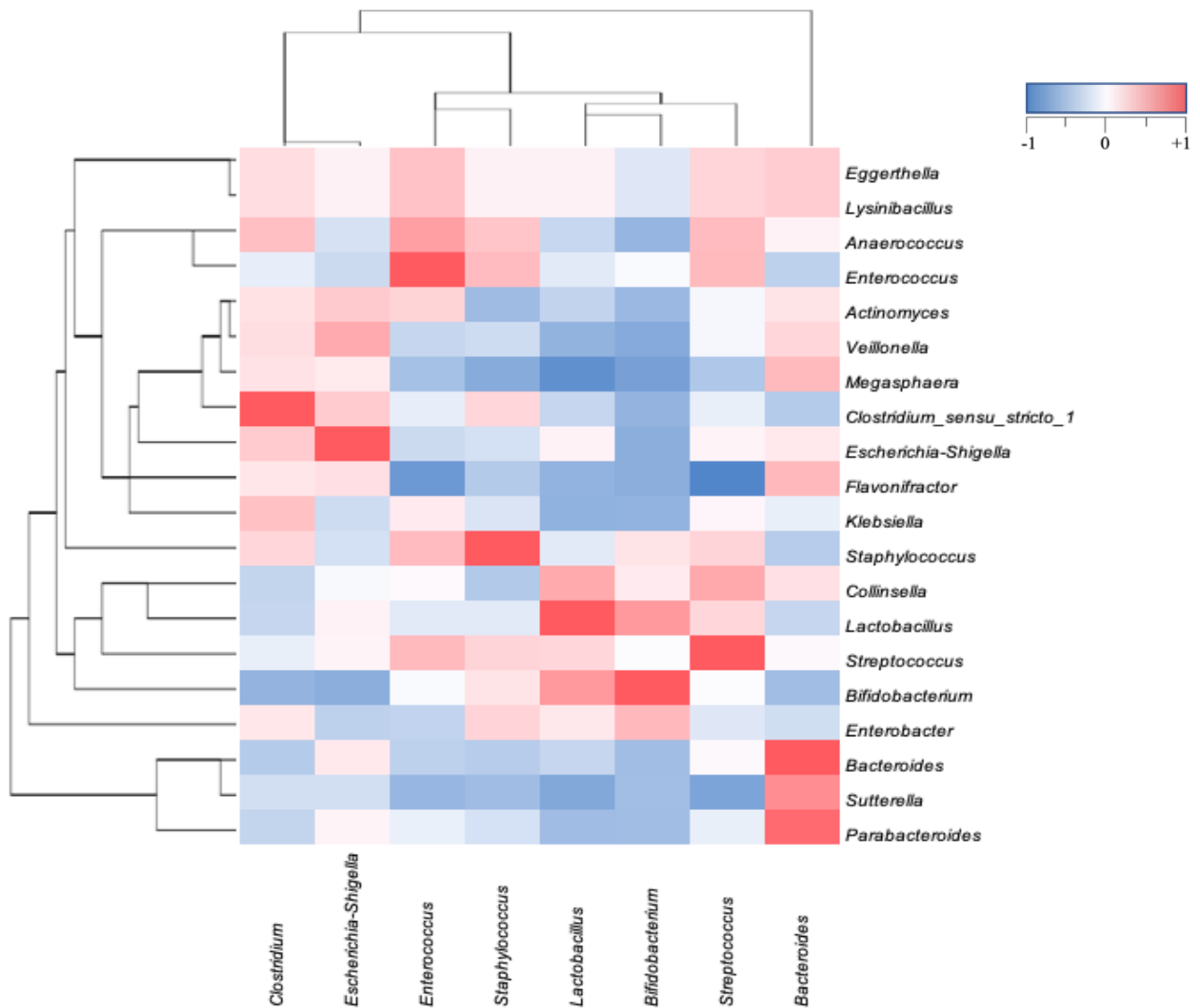


Figura 10. Dendrograma de relações de co-ocorrência e co-exclusão entre os gêneros observados nas fezes, baseados na correlação de Spearman dos ASV (amplicon sequence variants). São apresentados os gêneros com abundância superior a 1%, em pelo menos uma amostra. A cor da barra da escala indica a natureza da correlação, com +1 correspondendo a uma correlação positiva (vermelho escuro) e -1 correspondendo a uma correlação negativa (azul escuro).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Clostridium* apresentam uma correlação negativa, indicando que o aumento de *Lactobacillus* na microbiota intestinal poderá influenciar/reduzir a presença de bactérias do gênero *Clostridium*, nomeadamente algumas espécies toxigênicas de *Clostridium perfringens*. Os gêneros *Bacteroides*, *Sutterella*, *Parabacteroides*, *Klebsiella*, *Flavonifractor*, *Megasphaera*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Anaerococcus*, *Escherichia-Shigella* e *Clostridium* apresentam correlação negativa com o gênero *Bifidobacterium*. Também, na amostra 5, observamos um aumento de *Lactobacillus*, *Escherichia-Shigella* e um ligeiro aumento de *Streptococcus* (Figura 8), todos estes gêneros com alguma correlação positiva entre si (Figura 10),

contribuindo de forma positiva para um mútuo desenvolvimento. Por outro lado, na amostra 6, observamos um aumento de *Escherichia-Shigella* e *Clostridium* e, conseqüentemente, uma diminuição da abundância relativa de *Bifidobacterium* após a intervenção (Figura 8), uma vez que estes géneros apresentam correlação negativa entre si (Figura 10). Por fim, na amostra 7FD, também foi observada uma diminuição do género *Bifidobacterium*, podendo estar relacionado com o aumento de *Sutterella*, uma vez que estes géneros competem entre si (Figura 10).

Comparando a similaridade entre as amostras relativamente à distribuição dos géneros bacterianos (Figura 11), verificamos que, como seria esperado, aquelas que apresentam menos parecenças com as restantes são as amostras dos participantes 3, 7 e 10 (3FA, 7FA, 7FD e 10FA). Estas foram as amostras que apresentaram menor abundância do género *Bifidobacterium* e maior abundância de outros géneros menos frequentemente encontrados nas outras amostras, como por exemplo o género *Enterococcus* na amostra 3FA, *Escherichia-Shigella* e *Clostridium* na amostra 10FA e, ainda, *Bacteroides* nas amostras 7FA e 7FD (Figura 8). A amostra 6FD apresenta pouca similaridade com as restantes, pois após a intervenção, houve um aumento acentuado de *Escherichia-Shigella*. As amostras que demonstram maior similaridade entre si apresentam maior abundância de *Bifidobacterium* e outros géneros mais comumente encontrados na microbiota fecal das crianças.

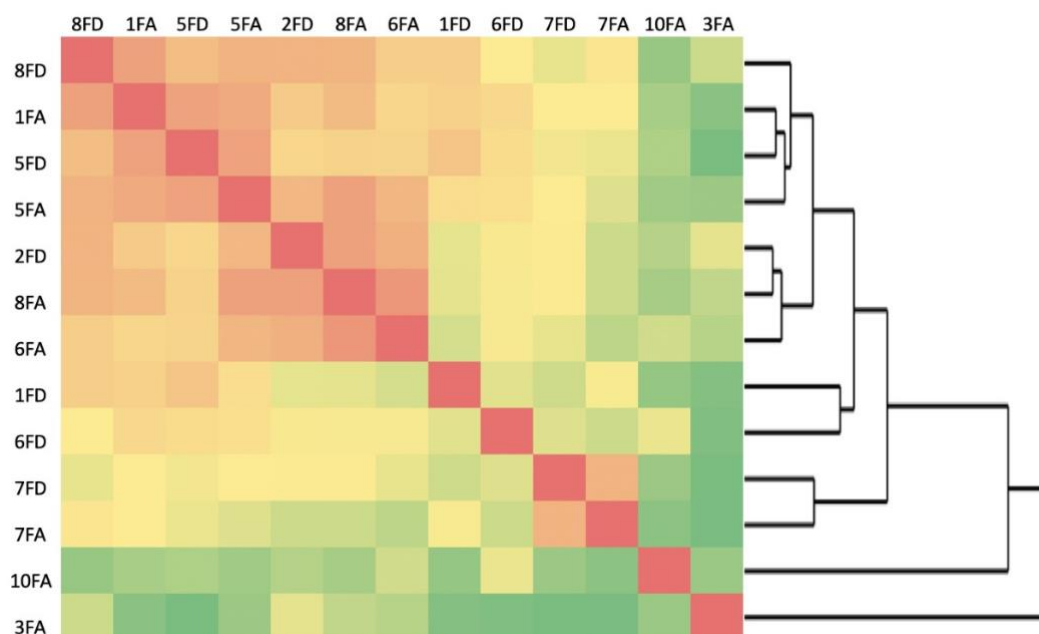


Figura 11. Dendrograma e heat-map representando a distribuição (%) dos géneros bacterianos nas amostras de fezes. O agrupamento das amostras foi obtido utilizando-se a similaridade de Bray-Curtis. O código de cores, de verde a vermelho, indica a similaridade entre as amostras, onde vermelho indica similaridade elevada (=1) e o verde uma reduzida similaridade entre as amostras.

Caracterização da microbiota do LM

Das 12 amostras de LM apenas foi possível extrair o DNA de 5 amostras. As amostras de leite materno depois da intervenção apresentam um número total de ASVs superior em relação às amostras anteriores a este período (Tabela 8).

Tabela 8. Total ASVs nas amostras de leite materno. O número corresponde ao participante, LA e LD correspondem às amostras de leite materno recolhidas antes e após a intervenção, respetivamente.

	1LA	1LD	2LD	8LA	8LD
TOTAL ASVs	2848	5288	1545	6903	8380

De forma a ilustrar as diferenças/semelhanças das comunidades bacterianas nas amostras de leite materno e fezes das crianças, os perfis da comunidade microbiana foram comparados pela análise de coordenadas principais (PCoA). Na Figura 12 é apresentada a análise PCoA de ASVs identificados ao nível do género. Os dois eixos PCoA representaram 60% da variabilidade total, com PCo1 e PCo2 descrevendo 44% e 16% da variabilidade, respetivamente. Quando comparados os perfis das comunidades bacterianas das amostras de leite materno e fezes obtêm-se dois grupos distintos: Grupo A – Leite e Grupo B – Fezes (Figura 12). No entanto, a amostra de fezes 3FA apresenta-se bem diferenciada das restantes amostras.

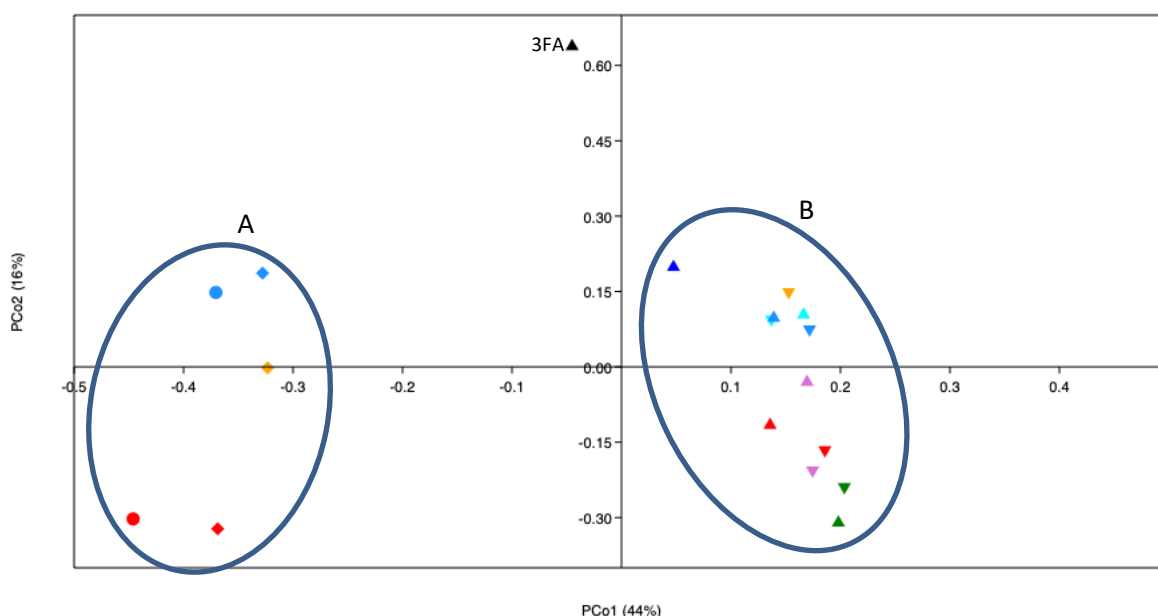


Figura 12. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) de ASVs identificados ao nível do género, de amostras de leite materno e fezes das crianças. As amostras de leite antes e depois da ingestão da infusão de funcho estão representadas por círculos e diamantes, respetivamente. As amostras de fezes estão representadas por triângulos e triângulos invertidos, respetivamente (cada cor representa um conjunto par mãe/criança).

As amostras de LM apresentam desta forma um padrão distinto a nível da composição bacteriana. As abundâncias relativas dos ASVs identificados ao nível do filo nas amostras do leite materno estão apresentadas na Figura 13. Os filios presentes nas amostras de LM em quantidade superior a 1% foram: *Actinobacteriota*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*, sendo o filo *Proteobacteria* predominante com exceção da amostra 2 (2LD), onde o filo dominante foi o filo *Firmicutes*.

É de salientar que todas as amostras de LM analisadas correspondem a mães que não apresentam obesidade (IMC < 30 kg/m²), a alimentação das crianças era exclusivamente LM e o parto de todas estas crianças foi vaginal. No entanto, as amostras de leite materno foram recolhidas em diferentes períodos de lactação (1LA - 4 semanas; 1LD - 5 semanas; 2LD - 14 semanas; 8LA - 8 semanas e 8LD - 9 semanas).

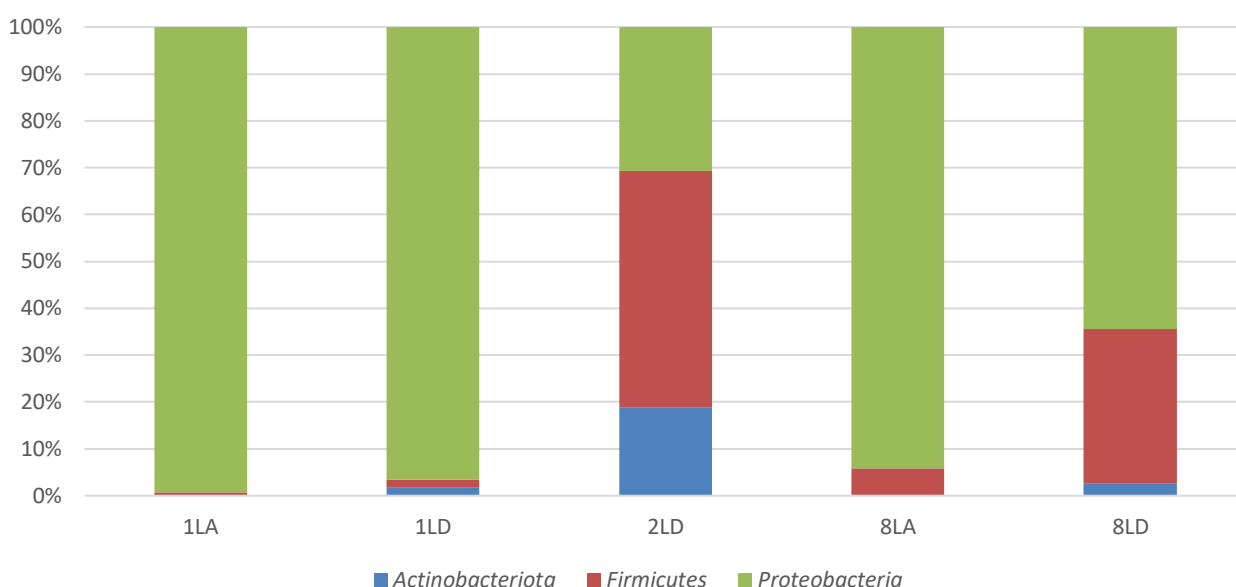


Figura 13. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível do filo nas amostras de leite materno. São mostrados apenas os filios que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Apenas quatro classes apresentaram abundância superior a 1%: *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacilli* e *Gammaproteobacteria* (Figura 14). A classe dominante na maioria das amostras foi a *Gammaproteobacteria*, exceto na amostra 2LD, onde a classe dominante foi a *Bacilli*. Na Figura 14 podemos observar um aumento acentuado da classe *Bacilli* na amostra 8 após a ingestão da infusão de funcho (8LD).

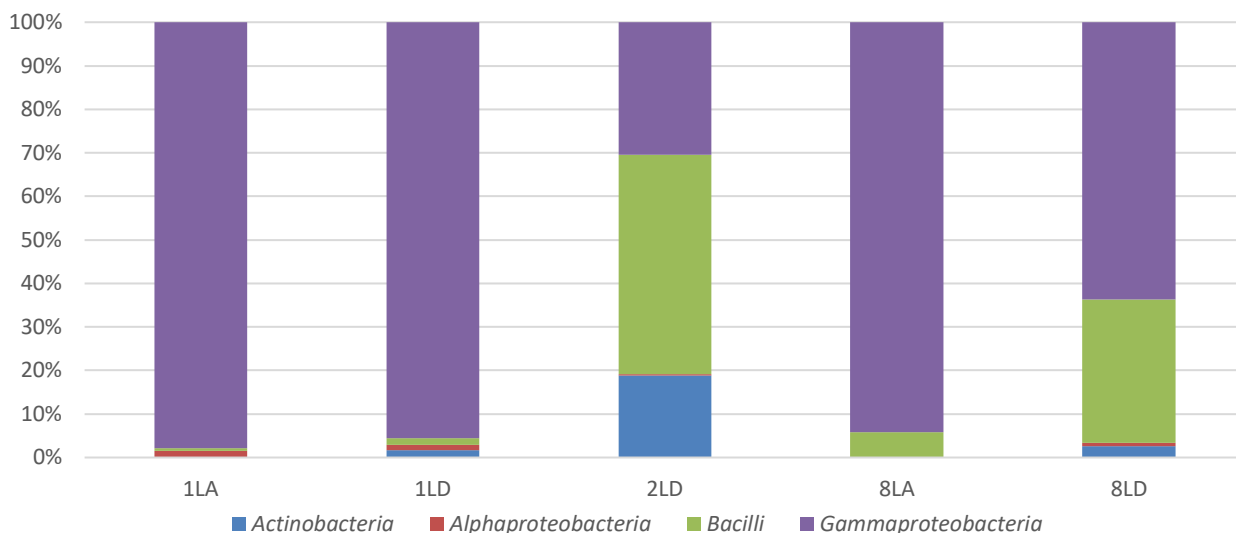


Figura 14. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da classe nas amostras de leite materno. São mostradas apenas as classes que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Quando avançamos ao nível da ordem (Figura 15), observamos que as amostras 1LA e 1LD apresentam maior abundância de *Enterobacteriales* (83% e 91% da abundância relativa, respectivamente). Por outro lado, na amostra 2LD a ordem dominante é a *Lactobacillales* (42% da abundância relativa). Nas amostras 8LA e 8LD, a ordem *Pseudomonadales* é dominante. No entanto, após o período experimental, e à semelhança da amostra da mãe 1, ocorre uma diminuição da abundância de *Pseudomonadales* no LM (de 77% para 56%).

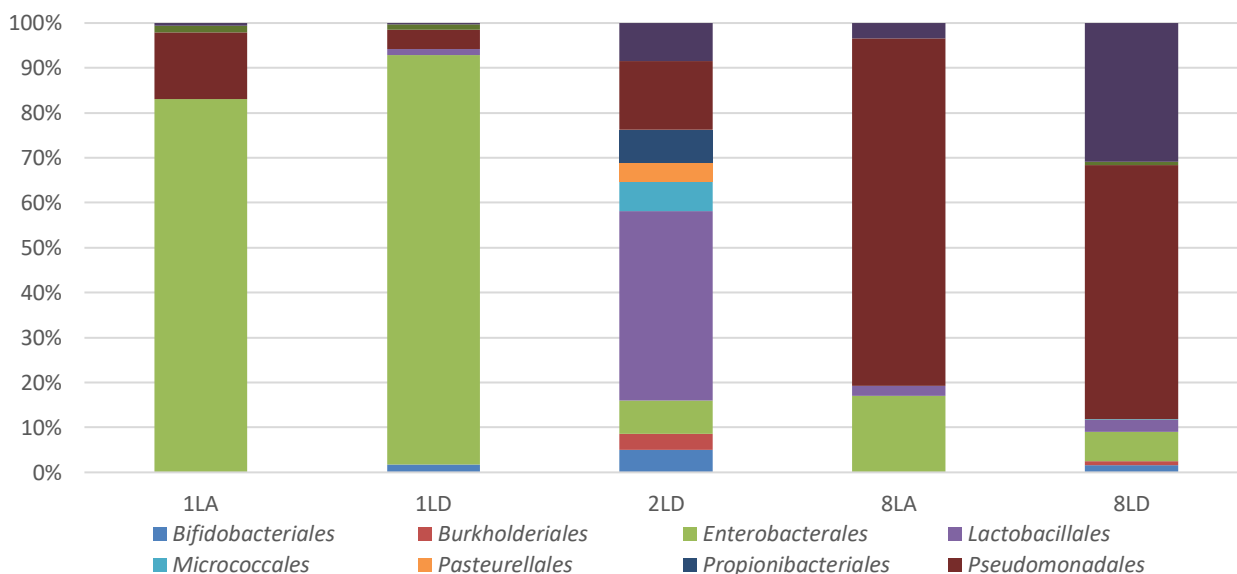


Figura 15. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da ordem nas amostras de leite materno. São mostradas apenas as ordens que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Ao nível da família (Figura 16), continua a observar-se uma elevada variação da microbiota do leite entre as mães. As amostras de LM da participante 1, antes e após a intervenção (1LA e 1LD) têm como família dominante a *Yersiniaceae*. Após a intervenção observou-se um aumento da abundância relativa de *Enterobacteriaceae* e uma diminuição da *Moraxellaceae*. A amostra 2LD apresentou uma maior variedade de famílias comparativamente às restantes amostras. Sendo que, a família dominante nesta amostra é a *Streptococcaceae*. Nas amostras 8LA e 8LD, a família dominante é *Moraxellaceae* (Figura 16). De salientar que não foi identificada nenhuma sequência referente à família *Bifidobacteriaceae* antes da intervenção, embora todas as amostras de leite materno recolhidas após a intervenção apresentassem ASVs desta família.

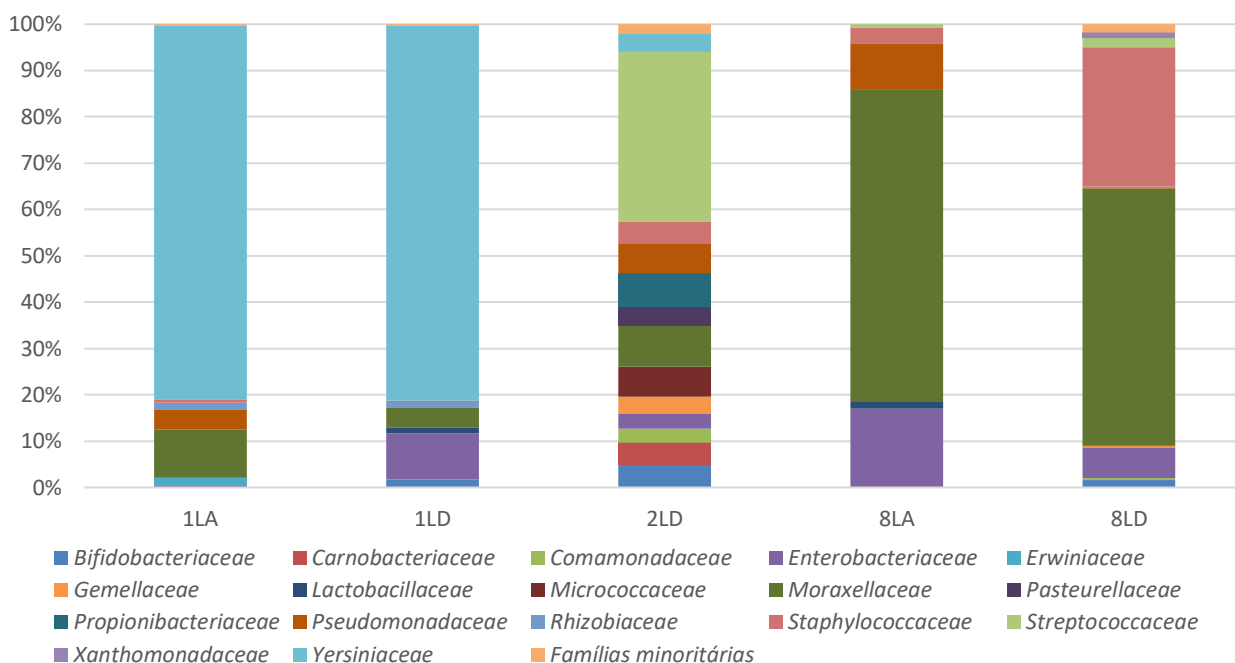


Figura 16. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da família nas amostras de leite materno. São mostradas apenas as famílias que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Os géneros mais abundantes nas amostras de leite materno foram: *Acinetobacter* (4 a 67% da abundância relativa), *Serratia* (<1 a 81%), *Streptococcus* (<1 a 34%), *Staphylococcus* (<1 a 30%), *Enterobacter* (<1 a 15%), *Pseudomonas* (<1 a 10%), *Raoultella* (<1 a 8%), *Rothia* (<1 a 7%), *Cutibacterium* (<1 a 7%), *Bifidobacterium* (<1 a 5%), *Granulicatella* (<1 a 5%), *Haemophilus* (<1 a 4%), *Gemella* (<1 a 4%), *Lactococcus* (<1 a 3%) e *Delftia* (<1 a 3%).

Nas amostras 1LA e 1LD, o género *Serratia* foi dominante em ambas as amostras (81%). Relativamente à participante 2, não foi possível obter a amostra antes da intervenção. No entanto,

podemos observar uma grande variedade de géneros na amostra 2LD, sendo o *Streptococcus* dominante, correspondendo a 34% da abundância relativa total. Por fim, nas amostras 8LA e 8LD, o género dominante foi o *Acinetobacter*, correspondendo a 67% e 55% da abundância relativa total, respetivamente (Figura 17).

Nenhuma das amostras de leite materno recolhidas antes da intervenção apresentava contagem do género *Bifidobacterium*, porém após a intervenção já foi possível identificar este género (Figura 17).

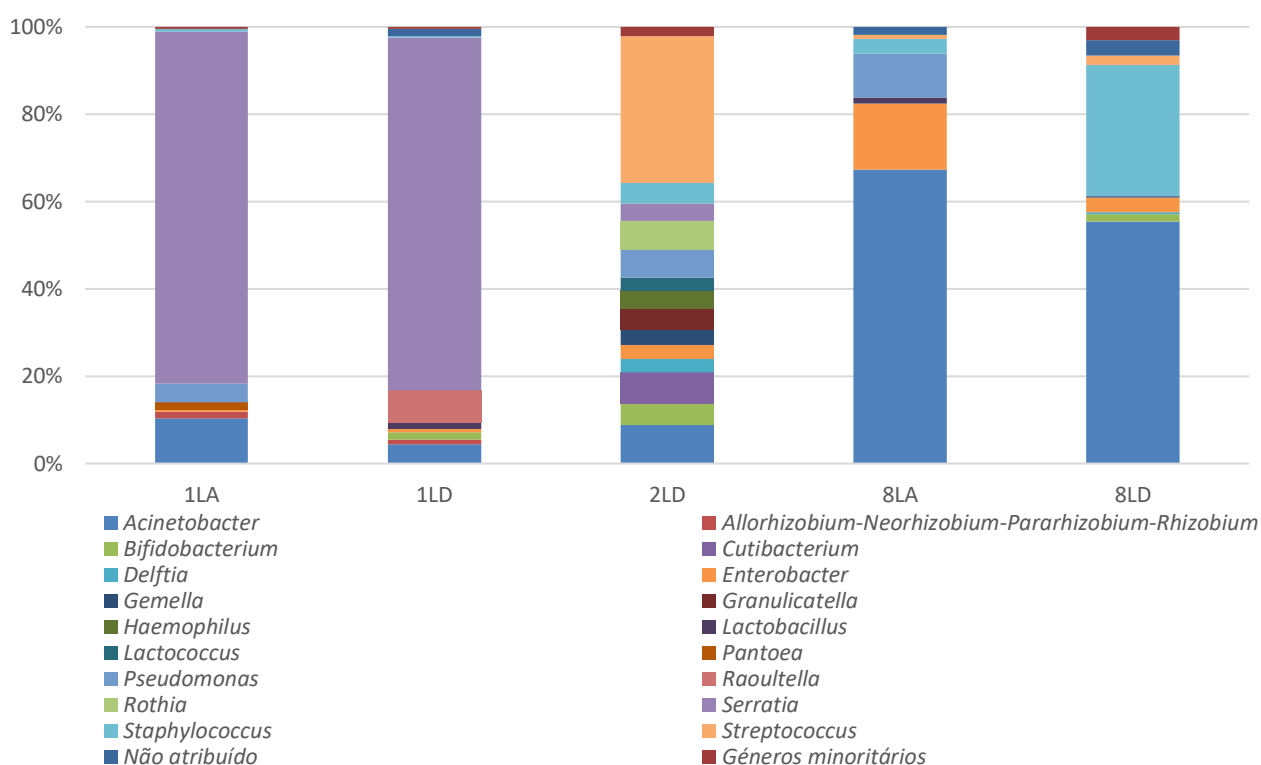


Figura 17. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível do género nas amostras de leite materno. São mostradas apenas os géneros que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Na Figura 18, está representada a abundância relativa de algumas espécies identificadas nas amostras de leite materno. Observou-se uma grande percentagem de espécies não identificadas (60 a 98% da abundância relativa total). No entanto, foram identificadas um total de 51 espécies no LM, sendo que apenas 20 contribuíram com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra. As únicas amostras onde foi detetada espécies do género *Bifidoctaeirium* foram as amostras 1LD e 8LD, sendo a espécie detetada a *Bifidoctaeirium bifidum*. Foram detetados também

as espécies *Lactobacillus gasseri* na amostra 1LD e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* nas amostras 2LD e 8LD (Figura 18).

As espécies mais frequentemente encontradas nas amostras de LM, com abundância total superior a 1%, em pelo menos uma amostra foram: *Acinetobacter johnsonii* (<1 a 9%), *Granulicatella elegans* (<1 a 5%), *Gemella haemolysans* (<1 a 4%), *Haemophilus haemolyticus* (<1 a 4%), *Acinetobacter ursingii* (<1 a 3%), *Klebsiella oxytoca* (<1 a 3%), *Lactococcus lactis* (<1 a 3%), *Pantoea sp.* (<1 a 2%), *Pseudomonas psychrotolerans* (<1 a 2%), *Pseudomonas putida* (<1 a 2%), *Streptococcus peroris* (<1 a 2%), *Streptococcus peroris/lactarius* (<1 a 2%), *Agrobacterium salinitolerans/Rhizobiumpusense* (<1%), *Delftia lacustris* (<1%), *Delftia tsuruhatensis* (<1%), *Lactobacillus gasseri* (<1%), *Rhizobium sp.* (<1%), *Serratia rubidaea* (<1%), *Staphylococcus epidermidis* (<1%).

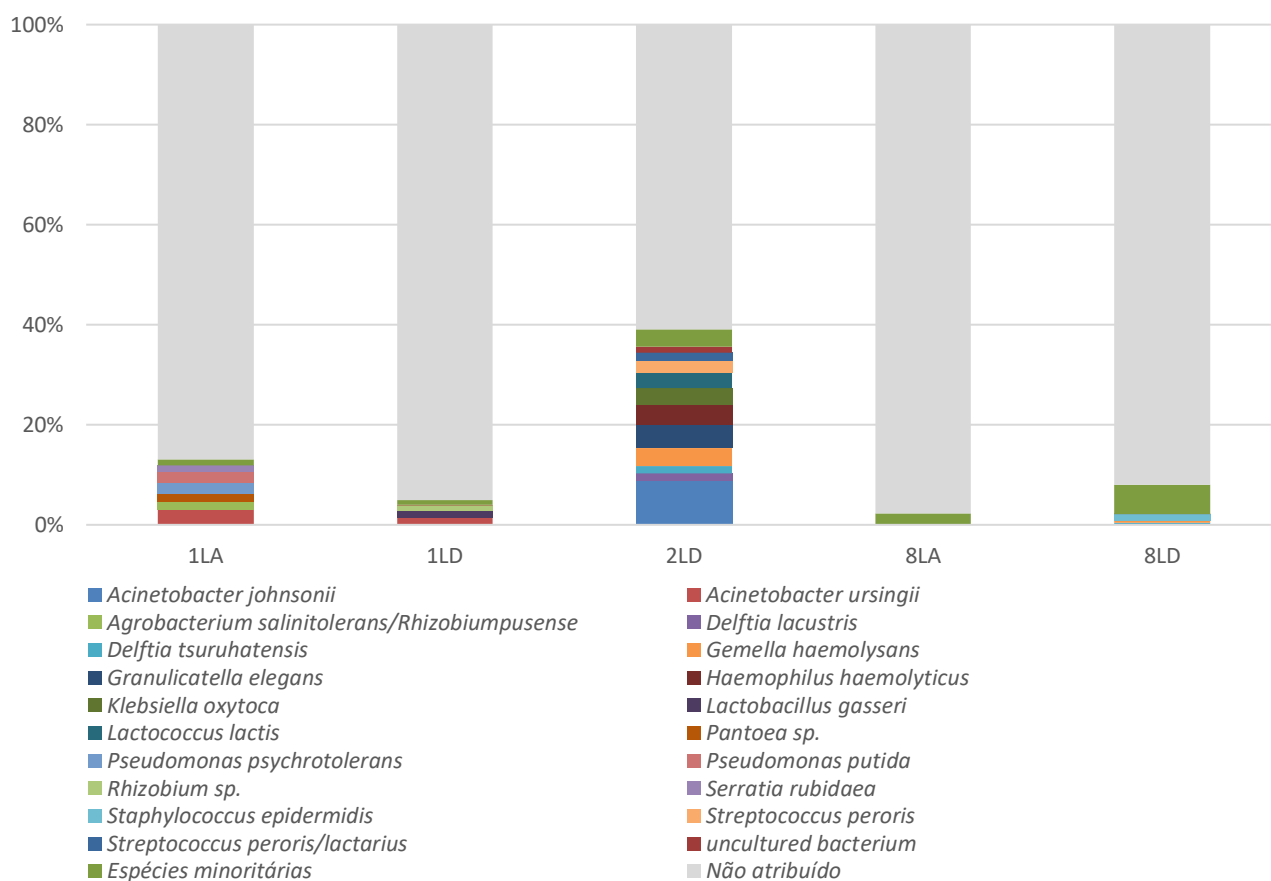


Figura 18. Abundância relativa (%) das sequências identificadas ao nível da espécie nas amostras de leite materno. São mostradas apenas as espécies que contribuem com mais de 1% da abundância total, em pelo menos uma amostra.

Comparação das comunidades bacterianas no LM

As relações de co-ocorrência e co-exclusão entre os gêneros observados no LM são apresentados na Figura 19. Observou-se uma forte correlação negativa entre *Bifidobacterium* e *Pseudomonas*, o que está de acordo com outros estudos onde se observou uma correlação negativa entre a abundância de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Rothia*) e a abundância relativa de bactérias Gram negativas (*Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Halomonas*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas*)⁷⁴. No entanto, no presente estudo, o gênero *Staphylococcus* apresentou uma correlação positiva com os gêneros *Acinetobacter* e *Enterobacter*. Por outro lado, os gêneros *Acinetobacter* e *Enterobacter* apresentam ambos uma correlação negativa com os gêneros *Rothia*. Já o gênero *Streptococcus* também apresentou uma correlação positiva com o gênero *Lactococcus* e *Rothia*.

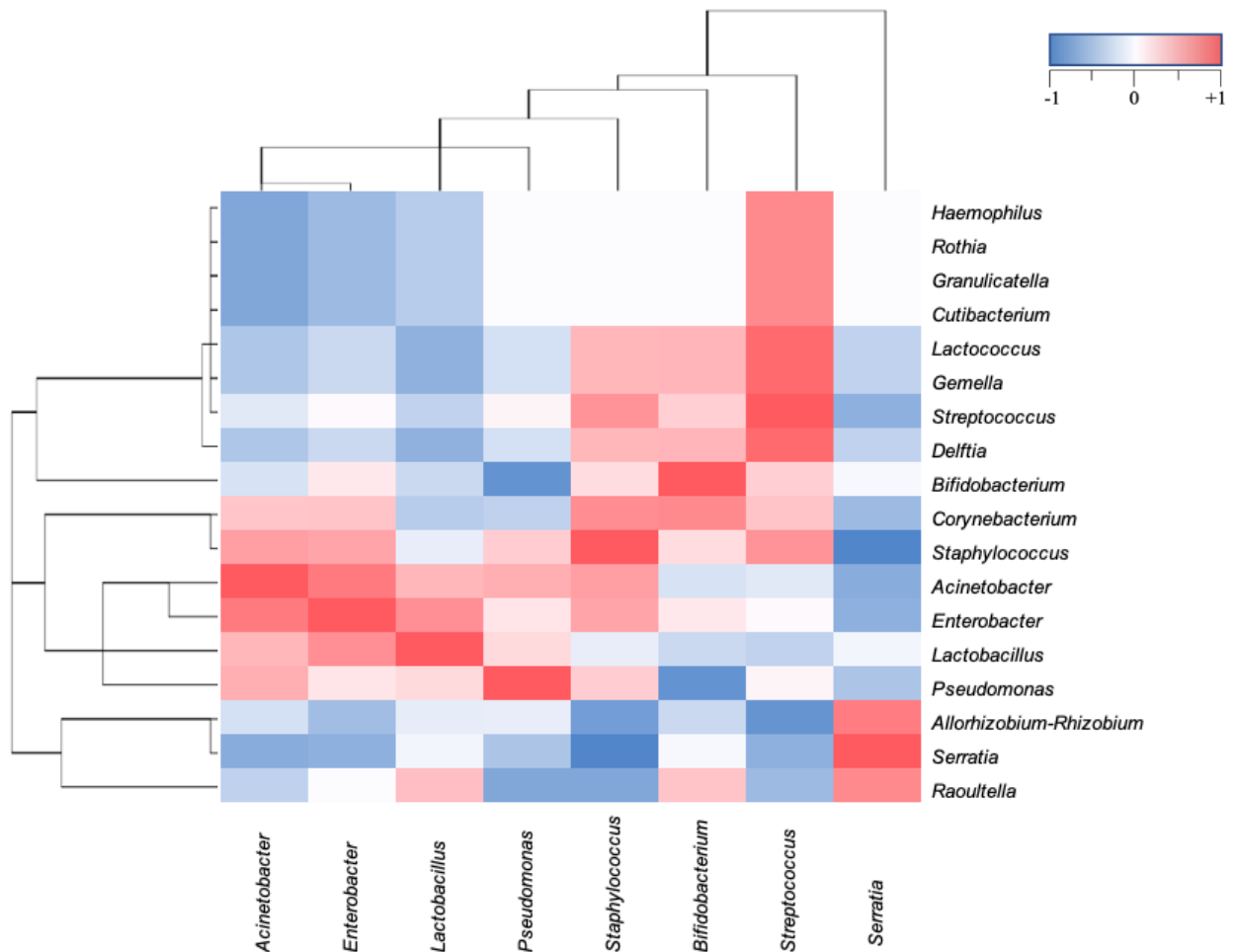


Figura 19. Dendrograma de relações de co-ocorrência e co-exclusão entre os gêneros observados no LM, baseados na correlação de Spearman dos ASV (amplicon sequence variants). São apresentados os gêneros com abundância superior a 1%, em pelo menos uma amostra. A cor da barra da escala indica a natureza da correlação, com +1 correspondendo a uma correlação positiva (vermelho escuro) e -1 correspondendo a uma correlação negativa (azul escuro).

Isolamento de bactérias com possível caráter prebiótico

Foram obtidos 273 isolados e, após a realização dos testes da coloração de Gram, catalase e oxidase, foram identificados e congelados 77 isolados (Gram +, catalase e oxidase negativos). Destes foram identificados 22 isolados (Tabela 9).

Tabela 9. Identificação genética dos isolados obtidos do leite materno e fezes das crianças.

Nº	Origem	Código do isolado	Identificação 16S DNA	% de similaridade	Acession Number (Genebank)
1	Leite	1LA1-R	<i>Lactobacillus gasseri</i>	99.84	OQ713687
2	Leite	1LA3-R	<i>Lactobacillus gasseri</i>	99.84	OQ713688
3	Leite	1LD4-R	<i>Lactobacillus gasseri</i>	99.92	
4	Leite	2LD1	<i>Streptococcus peroris</i>	99.92	OQ713690
5	Leite	5LA2-R	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	100	OQ713691
6	Leite	6LA1	<i>Lactobacillus gasseri</i>	99.92	OQ713692
7	Leite	6LD6-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	OQ713693
8	Leite	7LA4	<i>Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus</i>	99.68	OQ713694
9	Leite	7LD1	<i>Streptococcus infantis</i>	99.76	OQ713695
10	Leite	7LD2	<i>Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus</i>	100	OQ713696
11	Leite	7LD6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	OQ713697
12	Leite	7LD8	<i>Cutibacterium acnes</i>	100	OQ713698
13	Leite	7LD9	<i>Staphylococcus hominis subsp. novobiosepticus</i>	99.92	OQ713699
14	Leite	9LA1	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	OQ713700
15	Fezes	2FA1	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	100	OQ713701
16	Fezes	2FD1	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	100	OQ713702
17	Fezes	2FD1-R	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	100	OQ713703
18	Fezes	5FA6	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	100	OQ713704
19	Fezes	5FA5-R	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	100	OQ713705
20	Fezes	5FA8-R	<i>Lactobacillus gasseri</i>	99.92	OQ713706
21	Fezes	7FA1	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	100	OQ713707
22	Fezes	7FD4	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	100	OQ713708

Adesão à Dieta Mediterrânea (DM)

De acordo com os dados obtidos através do questionário PREDIMED, todas as participantes apresentaram uma baixa adesão à DM (< 10 pontos). A amostra apresenta uma baixa prevalência de consumo de hortícolas (22,2%), frutas (22,2%) e frutos oleaginosos (11,1%). Podemos também observar que nenhuma das participantes consumia uma quantidade de azeite superior ou igual a quatro colheres de sopa por dia (Tabela 10). Na Tabela 10, observamos que o consumo de carnes vermelhas foi superior (66,7%) ao consumo de carnes brancas (33,3%) e a maioria das participantes

consumia mais do que uma porção de carne vermelha por dia (66,7%). Para além disso, o consumo de peixe era inferior a três vezes por semana pela maioria das inquiridas (77,8%). A maioria das mães (55,6%) não apresentava um consumo de doces inferior a três vezes por semana, mas, em contrapartida, 88,9% das inquiridas não ingeria bebidas açucaradas ou gaseificadas diariamente.

Tabela 10. Descrição das questões de adesão à Dieta Mediterrânica.

Questões de adesão à Dieta Mediterrânica	0 pontos (%)	1 ponto (%)
1.Utiliza azeite como principal gordura culinária?	11,1	88,9
2.Que quantidade de azeite consome num dia (incluindo uso para fritar, temperar saladas, refeições fora de casa, etc.)?	100	0
3.Quantas porções de produtos hortícolas consome por dia (1 porção: 200 g; considere acompanhamentos como metade de uma porção)?	77,8	22,2
4.Quantas peças de fruta (incluindo sumos de fruta natural) consome por dia?	77,8	22,2
5.Quantas porções de carne vermelha, hambúrguer ou produtos cárneos (presunto, salsicha, etc.) consome por dia? (1 porção: 100-150 g)	66,7	33,3
6.Quantas porções de manteiga, margarina, ou natas consome por dia? (1 porção: 12 g)	55,6	44,4
7.Quantas bebidas açucaradas ou gaseificadas bebe por dia?	11,1	88,9
8.Quantos copos de vinho bebe por semana?	100	0
9.Quantas porções de leguminosas consome por semana? (1 porção: 150 g)	88,9	11,1
10.Quantas porções de peixe ou marisco consome por semana? (1 porção: 100-150 g de peixe ou 4-5 unidades ou 200 g de marisco)	77,8	22,2
11.Quantas vezes por semana consome produtos de pastelaria ou doces comerciais (não caseiros), como bolos, bolachas, biscoitos?	55,6	44,4
12.Quantas porções de oleaginosas (nozes, amêndoas, incluindo amendoins) consome por semana? (1 porção: 30 g)	88,9	11,1
13.Consome preferencialmente frango, peru ou coelho em vez de vaca, porco, hambúrguer ou salsicha?	66,7	33,3
14.Quantas vezes por semana consome hortícolas, massa, arroz ou outros pratos confecionados com um refogado (tomate, cebola, alho-francês ou alho e azeite)?	44,4	55,6

DISCUSSÃO

A cólica infantil está intimamente associada ao choro excessivo e incontrolável por parte das crianças nos primeiros meses de vida. Esta foi associada com uma diversidade da microbiota intestinal mais baixa quando comparada com crianças sem sintomatologia de cólica⁷⁵.

No presente estudo, a ingestão da infusão de funcho não produziu diferenças significativas na diversidade nas amostras de fezes, embora se tenha observado uma tendência para um aumento da riqueza bacteriana nas fezes das crianças após a intervenção, refletida pelos índices Chao-1 e número de espécies (Taxa). O número de ASVs também aumentou ($P < 0,05$) após a intervenção, refletindo um aumento da quantidade de bactérias nas amostras recolhidas. Rhoads et al. (2009) observaram uma diversidade de microbiota intestinal significativamente menor em crianças com cólica em comparação com o grupo controlo⁵⁷. De Weerth et al. (2013) relataram que a diversidade da microbiota intestinal (igualdade bacteriana, ou seja, quão semelhantes são as quantidades dos diferentes grupos bacterianos nas amostras) em crianças sem cólica aumentou ao longo dos primeiros 100 dias de vida, enquanto a diversidade da microbiota em crianças com cólicas permaneceu baixa⁵⁸. A nível da riqueza bacteriana (ou seja, o número de diferentes espécies encontradas nas amostras), um estudo demonstrou que esta foi semelhante em lactentes com cólicas e sem cólicas, porém outro estudo relatou riqueza bacteriana significativamente maior em lactentes com cólicas⁴.

Neste trabalho detetou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) dos ASVs pertencentes ao filo *Firmicutes*, após a intervenção, após a exclusão da amostra 7, que apresentava uma presença ASVs pertencentes ao filo *Bacteroidota* particularmente elevada. Este resultado vem ao encontro de alguns estudos que demonstraram uma correlação negativa entre o fenótipo da cólica e bactérias pertencente ao filo *Firmicutes*⁵⁷. Os resultados obtidos no nosso trabalho demonstraram uma menor abundância relativa do filo *Proteobacteria* em crianças com cólicas em comparação com crianças saudáveis incluídas noutra estudo³⁶, ao contrário do que é sugerido na literatura⁵⁸. Comparando também os géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, verificou-se que as bifidobactérias apresentavam uma abundância bastante superior em crianças com cólicas (mediana da abundância relativa de 60%) comparativamente a outros trabalhos³⁶. Outros estudos referem também que as bifidobactérias estão reduzidas em crianças com cólicas⁴.

Uma revisão sistemática detetou uma associação positiva entre a sintomatologia de cólica e a família *Enterobacteriaceae*⁴, podendo justificar a sua abundância numa das nossas amostras (amostra 10FA).

Um estudo demonstrou que níveis abaixo da média de *Bifidobacterium* no LM correlacionam-se com níveis baixos de *Bifidobacterium* no intestino infantil, permitindo o aumento da abundância do género *Bacteroides*⁷⁶. Este estudo também demonstrou uma correlação negativa entre os géneros *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. As amostras de fezes do participante 7 (7FA e 7FD) apresentam uma abundância deste género muito superior às restantes (51% nas amostras 7FA e 7FD e, 0 a 3% nas restantes amostras).

Relativamente à correlação entre géneros nas amostras de fezes, resultados semelhantes foram reportados por outros estudos sobre a microbiota fecal de crianças onde foi observada uma associação entre uma abundância baixa de *Bifidobacterium* e uma elevada abundância de *Clostridium*⁷⁷, tal como foi apresentado nos resultados do presente trabalho.

As evidências sugerem que uma alta proporção de *Bifidobacterium* na microbiota intestinal de crianças protege contra as cólicas e agitação^{3,60,61}. Foram detetadas várias espécies nas amostras de fezes que pertencem ao género *Bifidobacterium*. No entanto, diferentes espécies/estirpes deste género podem exercer efeitos distintos na imunidade e no risco de doenças das crianças. Por exemplo, as crianças que apresentam maior incidência de alergias são mais frequentemente colonizadas por *Bifidobacterium adolescentis*, enquanto as crianças consideradas saudáveis abrigam principalmente estirpes de *Bifidobacterium bifidum*⁷⁸. Neste trabalho, as espécies de *Bifidobacterium* detetadas nas fezes das crianças foram *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium dentium* e *Bifidobacterium longum* numa abundância superior a 1% em pelo menos uma amostra.

Um estudo demonstrou que a colonização precoce por *Bifidobacterium longum* pode ter um impacto positivo no sofrimento da criança relacionado com as cólicas. Por outro lado, a quantidade de *Bifidobacterium breve* foi associada a um aumento do choro diário e agitação durante os primeiros meses de vida⁷⁸. Estas duas espécies de *Bifidobacterium* apresentaram grandes diferenças para o desenvolvimento inicial do sistema imunológico, porém os mecanismos precisos pelos quais essas espécies podem impactar no comportamento de choro da criança precisam ser esclarecidos⁷⁸.

A maioria das amostras apresentaram uma grande abundância de espécies não identificadas, porém as amostras de fezes 6FA e 6FD destacaram-se das restantes por apresentarem uma abundância de *Bifidobacterium breve* muito superior. A elevada abundância desta espécie de

Bifidobacterium pode estar relacionada com a sintomatologia de cólicas apresentada por esta criança. Mais uma vez, as amostras de fezes do lactente 7 (7FA e 7FD) destacam-se, por apresentarem uma elevada abundância de *Bacteroides faecis* (47-49%) e de *Sutterella wadsworthensis* (4-8%), ausentes nas amostras das restantes crianças. Os géneros *Sutterella* e *Bacteroides* apresentaram correlação negativa com o género *Bifidobacterium*, podendo justificar o facto desta mãe não relatar alterações no tempo de choro do lactente aquando da ingestão da infusão de funcho. Num estudo, que comparou a microbiota fecal de crianças com doença inflamatória intestinal com a microbiota fecal de crianças que não apresentavam problemas intestinais, detetou que a *Sutterella wadsworthensis* foi comum em ambos os grupos⁷⁹. Outro estudo, não identificou diferenças na prevalência desta espécie em adultos com colite ulcerosa em comparação com adultos sem problemas intestinais e, além disso, foi apresentada uma grande prevalência de *Sutterella wadsworthensis* em ambos os grupos⁸⁰. Um estudo identificou o género *Sutterella* em crianças amamentadas numa abundância relativa superior a 0,05% e não demonstrou diferenças significativas na presença deste género em crianças com amamentação exclusiva em comparação com crianças alimentadas por fórmula⁸¹.

No estudo de De Weerth et al. (2013), as crianças pertencentes ao grupo controlo mostraram uma maior estabilidade da microbiota intestinal ao longo do tempo, em comparação com crianças com cólica, que tiveram uma similaridade menor entre as amostras recolhidas na 1ª e 2ª semanas após o nascimento. Em consonância, diversos estudos relataram um aumento da variabilidade individual e variabilidade entre amostras em crianças com cólica em comparação com o grupo controlo^{4,58}. Esta observação poderá justificar o facto de as amostras de fezes apresentarem um perfil microbiano tão distinto entre si.

Estudos relatam que crianças com cólica apresentam maior quantidade de coliformes em comparação com crianças sem cólica^{49,82}, em particular a *Escherichia coli* foi mais abundante em lactentes com cólicas. Outros coliformes, como *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* foram isolados das fezes de crianças com cólicas⁴⁹. Várias espécies de *Escherichia* e *Klebsiella* são conhecidas pelas suas propriedades de produzir gás, bem como pela potencial produção de lipopolissacarídeos inflamatórios⁷⁵. Neste estudo, a espécie *Escherichia coli* apenas foi detetada numa das amostras e numa abundância relativa inferior a 1%. A amostra 3FA continha 4% da abundância total da espécie *Klebsiella pneumoniae*, sendo que as restantes apresentavam uma abundância inferior a 1% da abundância total.

O perfil bacteriano na amostra 3FA ao nível da espécie poderá ser indutor de choro e agitação associado à cólica, pois as bactérias consideradas protetoras da cólica (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*)^{3,60,61} são inexistentes e as bactérias relatadas como indutoras de cólica, como a *Klebsiella*⁵⁷, são mais abundantes. No entanto, existem muitas espécies nesta amostra que não foram identificadas.

Os HMOs presentes no LM são um fator importante que contribui para proliferação da microbiota intestinal dos lactentes^{23–25,83}. Este componente do leite materno contribui para o crescimento de bactérias benéficas para a saúde da criança, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*^{23–27,35}. Os HMOs presentes no LM são dos fatores mais importantes relativamente à colonização e formação da microbiota intestinal de crianças amamentadas⁸³. A capacidade da criança metabolizar diferentes HMOs está fortemente correlacionada com a composição da sua microbiota intestinal e, mais especificamente, dos géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Lactobacillus*. A degradação de HMOs específicos pode estar correlacionada com um aumento da abundância relativa de *Bifidobacterium* e, em menor extensão, dos géneros *Bacteroides* e *Lactobacillus*⁸³.

Mães que apresentam polimorfismo W143X apresentam um fenótipo não-secretor que afeta a capacidade de expressar HMOs, tendo uma menor expressão de HMOs do que mães com um fenótipo secretor. Este fenótipo influencia a microbiota intestinal de crianças amamentadas por mães não secretoras, sendo que estas crianças apresentaram um atraso no desenvolvimento da sua microbiota intestinal, especificamente a nível de *Bifidobacterium*¹⁴. Uma das limitações deste trabalho, assenta no facto de não se ter avaliado o genótipo das mães incluídas, uma vez que a genética influencia a composição do leite materno e, conseqüentemente, a microbiota intestinal infantil.

O Colimil® é um suplemento alimentar à base de extratos de camomila e de erva-cidreira, e probióticos (*Lactobacillus acidophilus*) tinalizados considerado eficaz na melhoria dos sintomas causados pela cólica infantil⁸⁴. O BioGaia® é um suplemento alimentar em gotas que contém a estirpe *Limosilactobacillus reuteri* Protectis (anteriormente designada de *Lactobacillus reuteri*) e é utilizado como probiótico na cólica infantil⁸⁵. Apesar da participante 5 suplementar o seu filho com BioGaia®, a espécie *Limosilactobacillus reuteri* apenas foi detetado na amostra 5FD e numa abundância inferior a 1%, podendo este aumento dever-se à suplementação contínua deste probiótico durante o período de intervenção. Ambos estes probióticos são comumente associados à redução do tempo de choro diário da criança associado às cólicas⁸⁴. No entanto, apesar dos probióticos serem, frequentemente, considerados seguros e benéficos para a saúde, estes podem

induzir efeitos prejudiciais, sobretudo em indivíduos com o sistema imunitário debilitado⁸⁶. O funcho, torna-se, assim, uma alternativa possivelmente mais económica e, como não necessita de suplementação direta, poderá trazer menos riscos associados à translocação bacteriana.

Um estudo piloto, que comparou a composição microbiana do leite materno com as fezes dos filhos amamentados, demonstrou que 70-88% da abundância relativa total das amostras fecais dos lactentes corresponde a géneros compartilhados através do leite materno³⁶. Os géneros tipicamente associados ao intestino eram comuns ao leite humano e às fezes das crianças, incluindo *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Escherichia-Shigella* e membros da família *Lachnospiraceae*³⁶. No entanto, no presente trabalho observamos uma abundância do género *Bifidobacterium* (mediana 60%) nas fezes das crianças muito superior à apresentada nesse estudo (mediana < 25%). Para além disso, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as amostras de leite anteriores à intervenção (1LA e 8LA) não apresentaram qualquer contagem do género *Bifidobacterium*. Dos géneros referidos apenas o *Coprococcus* não foi identificado nas amostras de fezes do nosso trabalho e apenas os géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* estavam presentes nas amostras de leite materno numa abundância superior a 1%. No leite materno, o género *Enterococcus* estava apenas presente na amostra 8LD (abundância < 1%). Assim como o género *Escherichia-Shigella* foi detetado apenas na amostra 2LD (abundância < 1%). As crianças amamentadas por estas mães apresentavam também essas bactérias na sua microbiota fecal. Porém, as amostras de LM apresentaram um padrão distinto a nível da composição bacteriana neste estudo. Outro estudo, demonstrou que, apesar dos géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* estarem muitas vezes presentes na microbiota fecal de lactentes, verificou-se uma baixa abundância destes géneros no LM (0,1-1% para *Bifidobacterium* e 0,1-3% para *Lactobacillus*)²⁹. Esses dados vão ao encontro dos resultados obtidos neste trabalho, uma vez que as amostras de leite materno apresentaram baixa abundância destes géneros (0-0,1% para ambas as espécies, exceto as bifidobactérias na amostra 2LD com uma abundância de 5%). Outros estudos, relataram uma abundância de 3% para *Lactobacillus* e, ainda, 2% de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* nas primeiras semanas após o nascimento²⁹.

Em crianças com um mês de idade, saudáveis e alimentadas com leite materno exclusivo, observou-se que os géneros predominantes na microbiota fecal destas crianças eram *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Escherichia-Shigella* e *Parabacteroides*, numa abundância relativa de 32% (0-91,5%), 21,3% (0-76,7%), 11,8% (0-57,8%), e 6,7% (0-64%), respetivamente⁸³. No nosso estudo, nas amostras de fezes de crianças com cólicas observamos que os géneros mais abundantes

foram: *Bifidobacterium* 61% (0-81%), *Clostridium* 1% (0-33%), *Enterococcus* 1% (0-79%) e *Lactobacillus* 1% (0-22%). No entanto, um estudo apresenta uma correlação positiva entre o fenótipo de cólica e os gêneros pertencentes ao filo *Proteobacteria*, incluindo *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia* e *Pseudomonas*⁵⁷. Porém, nenhum destes gêneros está entre os mais abundantes nas amostras de fezes do presente trabalho.

Existem diversos fatores que poderão afetar a microbiota do LM, incluindo o período de lactação^{23,28,29}, higiene, stress contínuo, genótipo, alimentação^{14,15}, IMC materno^{25,28} e aumento de peso durante a gravidez²⁸. Vários estudos referem que os filios predominantes no LM são os *Firmicutes* e *Proteobacteria* e que os menos abundantes são *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*⁷⁴, à semelhança dos resultados encontrados neste estudo. Noutro estudo, os filios predominantes no LM foram: *Firmicutes* (média de 70%), *Actinobacteria* (14,5%), *Proteobacteria* (14%) e *Bacteroidetes* (1%)²⁹. Um estudo que avaliou diferenças na composição da microbiota do leite materno ao longo do tempo (1, 4, 8 e 24 semanas), demonstrou que até às 8 semanas o filo dominante no leite foi o filo *Proteobacteria* (semana 1-8, 40-54%)²³. No entanto, após as 24 semanas, o filo *Firmicutes* apresentou maior abundância relativa (53%)²³. No presente estudo observamos que as amostras de leite materno obtidas num período de lactação mais precoce apresentam uma maior quantidade de *Proteobacteria* (1LA>1LD>8LA>8LD>2LD). Na amostra 2LD, que corresponde a 14 semanas de lactação, já observamos uma maior abundância de *Firmicutes* (50%), em comparação com as restantes amostras. No entanto, seriam necessárias mais amostras para confirmar estas associações.

Os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* são reportados como os gêneros mais abundantes nas amostras de leite materno^{29,36,38,87}. Um estudo transversal, que incluiu 94 lactantes saudáveis, um total de 85 gêneros foram identificados em amostras de leite humano²⁹. Do total de gêneros identificados nesse trabalho, três estavam presentes em todas as amostras: *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium* (abundância média relativa de 42%, 22% e 7%, respetivamente)²⁹. Em contraste, a abundância média relativa destes gêneros foi inferior no presente trabalho: *Streptococcus* 7,3% (mediana < 1%), *Staphylococcus* 7,8% (mediana 3,4) e o género *Corynebacterium* apenas estava presente numa amostra e numa abundância inferior a 1%. A amostra 2LD foi a única que apresentou o género *Streptococcus* como sendo dominante (33,6%). As amostras de leite materno das participantes 1 e 8 apresentaram os gêneros *Serratia* e *Acinobacter* como sendo os mais abundantes (81% do género *Serratia* nas amostras 1LA e 1LD e

Acinobacter nas amostras 8LA e 8LD numa abundância de 67% e 55%, respetivamente), ao contrário do observado noutros estudos^{29,74,88}.

No presente estudo a classe dominante na maioria das amostras de LM foi a *Gammaproteobacteria*. No entanto, num estudo onde se comparou a microbiota do leite materno em diferentes populações, observaram-se diferenças na composição bacteriana do leite de mães de diferentes países e de diferentes meios (rural e urbano)⁸⁹. Ao nível da classe, a comunidade urbana apresentou uma abundância de *Gammaproteobacteria* significativamente ($P < 0,0001$) superior à comunidade rural (91,8% e 52,8%, respetivamente). Este estudo demonstrou que diferenças na composição da microbiota do leite materno poderão também ser consequência do estilo de vida associado ao meio onde a pessoa reside⁸⁹.

Apesar de nenhuma das amostras de leite materno recolhidas antes da intervenção apresentar contagem do género *Bifidobacterium*, após o período de intervenção, já foi possível identificar este género. Relativamente à participante 2, não foi possível obter a amostra antes da intervenção. No entanto, podemos observar uma grande variedade de géneros na amostra 2LD, sendo o *Streptococcus* o género dominante nesta amostra, correspondendo a 34% da abundância relativa total.

Alguns estudos têm relatado a eficácia das preparações com funcho na diminuição do tempo de choro provocado pelas cólicas⁵⁻¹⁰, porém estes estudos focaram-se na melhoria da sintomatologia e não no mecanismo associado à diminuição do tempo de choro da criança. Sendo, por isso, necessários mais estudos para compreender a ação do funcho na melhoria da sintomatologia associada às cólicas. Em consonância, neste estudo a maioria das mães relatou uma diminuição considerável do tempo de choro da criança aquando da ingestão da infusão de funcho. Além disso, três mães continuaram a ingerir a infusão de funcho após o término do período de intervenção, devido à eficácia observada na diminuição das cólicas.

As bactérias isoladas das fezes e leite materno foram identificadas com o intuito de, posteriormente, avaliar a possibilidade de serem utilizados como probióticos. Para isso, primeiro será necessário avaliar o perfil de segurança dos isolados em relação ao organismo humano. Também será necessário avaliar a presença de genes de resistência a antibióticos que possam ser transmissíveis a outros microrganismos. Para além disso, estes isolados devem conseguir sobreviver às condições rigorosas presentes no trato gastrointestinal e possuir capacidade de adesão à mucosa intestinal, de forma a conseguirem colonizá-lo eficazmente. Por fim, estes microrganismos devem produzir um efeito benéfico para o organismo humano⁹⁰. Dos isolados do leite materno, 4 isolados

eram *Lactobacillus gasseri*, 3 correspondiam a *Staphylococcus hominis* subsp. *Novobiosepticus*, 2 eram *Staphylococcus epidermidis* e os restantes foram apenas isolados uma vez (*Streptococcus peroris*, *Streptococcus infantis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Cutibacterium acnes* e *Enterococcus faecalis*). Nas amostras de fezes os isolados mais frequentemente encontrados foram *Bifidobacterium bifidum* (3 isolados), *Lacticaseibacillus paracasei* (3 isolados), *Lacticaseibacillus rhamnosus* (1 isolado) e *Lactobacillus gasseri* (1 isolado).

Num estudo, foram recolhidas amostras de leite humano de 20 lactantes e amostras de fezes dos seus filhos com idade inferior a 5 meses. Das bactérias isoladas do leite materno destas mães, as espécies *Staphylococcus epidermidis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri* e *Staphylococcus hominis* estavam entre as mais frequentemente encontradas⁹¹. Outro estudo, identificou *L. gasseri* e *E. faecium* como as espécies mais frequentes isoladas das amostras de LM⁹².

Um estudo que analisou o potencial probiótico da espécie *Enterococcus faecalis* isolada do leite humano determinou a presença de alguns genes de virulência, aconselhando uma monitorização de *Enterococcus* relativamente à segurança de utilização destes isolados para o ser humano⁹³.

As bactérias do género *Cutibacterium* são naturalmente encontradas na pele e não são comuns no leite materno. No entanto, um artigo de revisão refere que esta espécie foi mais frequentemente isolada de biópsias dos ossos do que da superfície da pele, sugerindo que esta espécie pode ser um agente patogénico em vez de um contaminante⁹⁴. As espécies *S. peroris* e *S. infantis* foram isoladas da superfície dos dentes e faringe de humanos⁹⁵.

As BAL, sobretudo dos géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, são frequentemente utilizadas como probióticos na prevenção de algumas doenças²¹. A utilização de BAL como probiótico induz a produção de ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) no intestino, que, por sua vez, contribuem para a homeostase intestinal^{96,97}.

Um estudo em roedores, onde as espécies *Lactobacillus gasseri* e *Lacticaseibacillus paracasei* foram isoladas de produtos lácteos fermentados e de fezes de crianças saudáveis, determinou que a combinação dos probióticos *L. paracasei* JY062 e *L. gasseri* JM1 tem o potencial para aliviar os distúrbios da motilidade GI, induzindo homeostase intestinal⁹⁸. Outro estudo realizado em ratos, relatou que diferentes estirpes de *Lacticaseibacillus rhamnosus* podem aliviar os sintomas relacionados com obstipação através de vias independentes da regulação dos SCFAs⁹⁹. Para além disso, um estudo reportou uma melhoria a nível do metabolismo dos lípidos em ratos com hiperdislipidémia após serem suplementados com *L. rhamnosus* hsrlym 1301¹⁰⁰.

Um estudo sugere que o *L. fermentum* KGC1601 pode ser utilizado como um potencial agente probiótico anti-inflamatório¹⁰¹. Das amostras de leite da mãe 7, foram isoladas as bactérias pertencente à espécie *Staphylococcus hominis subsp. Novobiosepticus*. Esta espécie tem vindo a ser relacionada com processos infecciosos¹⁰². Num caso raro reportado de abscesso mamário numa mulher jovem não lactante, levantou-se a hipótese desta espécie estar associada a infeções graves como abscessos mamários¹⁰². A espécie *Staphylococcus epidermidis* aparece como sendo a mais presente nas amostras de leite humano. Alterações no equilíbrio entre o hospedeiro e bactérias *S. epidermidis* podem causar conjuntivite e as bactérias isoladas mostraram suscetibilidade a antibióticos tópicos¹⁰³.

A origem da microbiota do leite materno continua incerta, porém existe a hipótese de que as bactérias presentes no intestino materno possam ser transportadas, através de células dendríticas, para o leite materno¹⁰⁴. Para além das bactérias, os seus metabolitos também podem contribuir para a composição bacteriana do LM. Por exemplo, os SCFAs, que são produzidos principalmente pelo colón, são absorvidos e distribuídos pela corrente sanguínea. A dieta materna, pode afetar a composição de SCFAs no LM, demonstrando mais uma vez a interação entre a microbiota intestinal da mãe e a composição do seu leite podendo levar, conseqüentemente, a alterações da microbiota intestinal do lactente, por transferência de compostos presentes no leite materno^{14,104}.

A DM é diversas vezes associada a uma redução de todas as causas de mortalidade¹⁰⁵. Esta dieta é considerada uma fonte de polifenóis, gorduras polinsaturadas e fibra, que contribuem para a saúde de quem a pratica. Para além disso, é associada a uma microbiota intestinal específica¹⁰⁵. No entanto, nenhuma das mães apresentou uma boa adesão a esta dieta. A alimentação praticada pela maioria das mães era uma alimentação com elevado consumo de carne vermelha e açúcares refinados e, ainda, pobre no consumo peixes e hortofrutícolas. Este tipo de dieta é relacionado, em diversos estudos, com um impacto direto sobre o sistema imunológico e intestinal, causando disbiose¹⁰⁵.

Uma das limitações deste estudo assenta no tamanho da amostra. Será necessário um número superior de participantes para se poder tirar conclusões e obter dados estatisticamente significativos. Outra limitação é o facto de não ter sido possível obter um grupo controlo. Neste grupo controlo, as crianças apresentariam sintomatologia de cólicas e a mãe beberia água em vez de infusão de funcho. Porém, não seria ético pedir às mães que não intercedessem nos sintomas das cólicas, por todo o desgaste físico e psicológico associado. O recrutamento de participantes que

utilizaram probióticos antes e durante o estudo é outra limitação, pois esta utilização poderá causar alterações na microbiota fecal da criança. No entanto, devido à dificuldade sentida no recrutamento dos participantes, seja por falta de disponibilidade, dificuldade na ingestão da infusão de funcho e receio de possíveis riscos associados à ingestão da infusão, foi necessário alargar os critérios de inclusão. O tipo de parto também corresponde a uma limitação, uma vez que o estudo englobou mães que tiveram parto normal e cesariana. A auto-recolha das amostras de leite materno corresponde a outra limitação, uma vez que não é possível garantir que o saco fornecido não foi contaminado no momento da recolha. Para além disso, não houve uniformidade relativamente ao momento da mamada em que foi efetuado a recolha da amostra de leite materno nem o momento do dia. O IMC das mães também variou, sendo que duas mães apresentavam obesidade, fator que também poderá ter influência na microbiota do LM e, conseqüentemente, na microbiota fecal das crianças. Relativamente à microbiota intestinal das crianças, não foi recolhida informação sobre o peso ao nascer nem sobre a forma como eram alimentados (contacto direto com a mama ou alimentados com leite materno por biberão). Por fim, uma das crianças incluídas no estudo apresentava alimentação mista, que poderá ter repercussões na sua microbiota fecal. Além disso, estudos realizados com humanos apresentam algumas limitações intrínsecas relativamente ao facto de não ser possível garantir que as mães beberam a infusão diariamente e na quantidade adequada e, para além disso, a percepção da melhoria das cólicas poderá ser diferente entre participantes.

CONCLUSÃO

Vários estudos já demonstraram que o funcho contribui para a melhoria das cólicas das crianças, porém o seu mecanismo de ação continua incerto. O possível aumento da presença de bifidobactérias no LM após a ingestão do funcho pelas mães poderá ser um dos seus modos de atuação, uma vez que se sabe que as bifidobactérias presentes no LM podem desempenhar um papel importante na composição da microbiota fecal infantil em desenvolvimento¹⁵. Porém, serão necessários estudos com uma maior amostragem para confirmar esta alteração no LM e perceber se existem efetivamente alterações a nível da microbiota fecal das crianças amamentadas induzidas pela ingestão da infusão de funcho pelas mães. Desta forma será possível compreender se o funcho apresenta um efeito prebiótico e se, no futuro, poderá ser recomendado para melhoria da sintomatologia associada às cólicas infantis. Também nas amostras de fezes houve um aumento do género *Bifidobacterium* na maioria das amostras, após o período experimental, com a exceção da amostra 7. Levanta-se assim a hipótese de que o efeito dos compostos bioativos presentes no funcho possa ser exercido através da sua passagem para o leite materno e servir como prebiótico ao estimular seletivamente o crescimento do género *Bifidobacterium* no intestino de lactentes.

As amostras de leite materno recolhidas depois da intervenção apresentaram um número total de ASVs superior em relação às amostras anteriores a este período, demonstrando um possível aumento da riqueza bacteriana potenciado pela ingestão da infusão de funcho pelas mães. A maioria das mães (6 de 9) que integraram o estudo reportaram uma diminuição do tempo de choro do lactente durante a ingestão da infusão de funcho. No presente estudo observou-se também um aumento de ASVs do filo *Firmicutes* nas amostras de fezes das crianças após a ingestão da infusão pelas mães, exceto no participante 7 cuja mãe não relatou uma redução do período de choro durante a intervenção. Esta amostra apresentou uma microbiota distinta das restantes, podendo ser uma explicação para a infusão de funcho não demonstrar alterações ao nível da riqueza bacteriana nem na sintomatologia das cólicas. A amostra 10FA também apresentava um perfil bacteriano distinto ao nível da classe, ordem, género e espécie quando comparado com as restantes amostras recolhidas antes do início do estudo, o que poderá justificar a não obtenção de um efeito positivo na sintomatologia de cólicas após o período experimental.

Como conclusão, apesar deste estudo apresentar algumas limitações representa uma inspiração para possíveis estudos futuros que procurem perceber melhor o efeito da infusão de funcho na redução da sintomatologia das cólicas infantis. Seria também interessante avaliar uma

possível associação entre a Dieta Mediterrânea e a disbiose da microbiota fecal materna e, conseqüentemente, uma alteração da microbiota fecal da criança por transferência de bactérias do LM.

REFERÊNCIAS

1. Ouald Chaib, A., Levy, E. I., Ouald Chaib, M. & Vandenplas, Y. The influence of the gastrointestinal microbiome on infant colic. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 919–932 (2020).
2. Sarasu, J. M., Narang, M. & Shah, D. Infantile Colic: An Update. *Indian Pediatrics* vol. 55 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s13312-018-1423-0> (2018).
3. Loughman, A. *et al.* Infant microbiota in colic: Predictive associations with problem crying and subsequent child behavior. *J Dev Orig Health Dis* **12**, (2021).
4. Hofman, D. *et al.* Faecal Microbiota in Infants and Young Children with Functional Gastrointestinal Disorders: A Systematic Review. *Nutrients* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nu14050974> (2022).
5. Harb, T., Matsuyama, M., David, M. & Hill, R. J. Infant colic - What works: A systematic review of interventions for breast-fed infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* vol. 62 Preprint at <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001075> (2016).
6. Shojaei, H. *et al.* The Effect of Fennel on Infantile Colic: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Pediatr* **0**, (2019).
7. Alexandrovich, I., Rakovitskaya, O., Kolmo, E., Sidorova, T. & Shushunov, S. The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed oil emulsion in infantile colic: A randomized, placebo-controlled study. *Altern Ther Health Med* **9**, (2003).
8. Mohammadi, G., Ghazanfarpour, M., Kargarfard, L. & Babakhanian, M. Effectiveness of Herbal Medicines Containing Phytoestrogens to Treat Infantile Colic: A Meta-analysis Review. *J Pediatr Rev* (2018) doi:10.32598/jpr.7.1.1.
9. Anheyer, D. *et al.* Herbal medicines for gastrointestinal disorders in children and adolescents: A systematic review. *Pediatrics* vol. 139 Preprint at <https://doi.org/10.1542/peds.2017-0062> (2017).
10. Biagioli, E., Tarasco, V., Lingua, C., Moja, L. & Savino, F. Pain-relieving agents for infantile colic. *Cochrane Database of Systematic Reviews* vol. 2016 Preprint at <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009999.pub2> (2016).
11. World Health Organization. *The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding: A Systematic Review.* https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_2 (2001).
12. Boix-Amorós, A. *et al.* Mycobiome Profiles in Breast Milk from Healthy Women Depend on Mode of Delivery, Geographic Location, and Interaction with Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **85**, (2019).
13. Oikonomou, G. *et al.* Milk Microbiota: What Are We Exactly Talking About? *Front Microbiol* **11**, (2020).
14. Golan, Y. & Assaraf, Y. G. Genetic and physiological factors affecting human milk production and composition. *Nutrients* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nu12051500> (2020).

15. Gomez-Gallego, C., Garcia-Mantrana, I., Salminen, S. & Collado, M. C. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* vol. 21 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.siny.2016.05.003> (2016).
16. Łubiech, K. & Twarużek, M. Lactobacillus Bacteria in Breast Milk. *Nutrients* **12**, 3783 (2020).
17. Soto, A. *et al.* Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk: Influence of Antibiotherapy and Other Host and Clinical Factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **59**, 78–88 (2014).
18. Azad, Md. A. K., Sarker, M. & Wan, D. Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res Int* **2018**, 1–10 (2018).
19. Fang, F., Xu, J., Li, Q., Xia, X. & Du, G. Characterization of a Lactobacillus brevis strain with potential oral probiotic properties. *BMC Microbiol* **18**, 221 (2018).
20. Sánchez, B. *et al.* Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res* **61**, 1600240 (2017).
21. Azad, Md. A. K., Sarker, M., Li, T. & Yin, J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *Biomed Res Int* **2018**, 1–8 (2018).
22. Kaźmierczak-Siedlecka, K., Roviello, G., Catalano, M. & Polom, K. Gut Microbiota Modulation in the Context of Immune-Related Aspects of Lactobacillus spp. and Bifidobacterium spp. in Gastrointestinal Cancers. *Nutrients* **13**, 2674 (2021).
23. Lyons, K. E. , S. CA. O. , G. G. *et al.* The human milk microbiome aligns with lactation stage and not birth mode. *Sci Rep* **12**, (2022).
24. Boudry, G. *et al.* The Relationship Between Breast Milk Components and the Infant Gut Microbiota. *Frontiers in Nutrition* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.629740> (2021).
25. Moubareck, C. A. Human milk microbiota and oligosaccharides: A glimpse into benefits, diversity and correlations. *Nutrients* **13**, (2021).
26. Walsh, C., Lane, J. A., van Sinderen, D. & Hickey, R. M. Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. *J Funct Foods* **72**, (2020).
27. Marcobal, A. & Sonnenburg, J. L. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clinical Microbiology and Infection* **18**, (2012).
28. Cabrera-Rubio, R. *et al.* The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *American Journal of Clinical Nutrition* **96**, (2012).
29. Padilha, M. *et al.* The human milk microbiota is modulated by maternal diet. *Microorganisms* **7**, (2019).
30. Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M.-C., Ramer-Tait, A. E. & Walter, J. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome* **5**, 48 (2017).

31. Wong, E., Lui, K., Day, A. S. & Leach, S. T. Manipulating the neonatal gut microbiome: current understanding and future perspectives. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* vol. 107 Preprint at <https://doi.org/10.1136/archdischild-2021-321922> (2022).
32. Hasan, N. & Yang, H. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ* vol. 2019 Preprint at <https://doi.org/10.7717/peerj.7502> (2019).
33. Kaan, A. M. & Zaura, E. Oral Microbiome Transmission and Infant Feeding Habits. *mBio* **13**, (2022).
34. Zhang, X. *et al.* The Composition and Concordance of Lactobacillus Populations of Infant Gut and the Corresponding Breast-Milk and Maternal Gut. *Front Microbiol* **11**, (2020).
35. Solís, G., de los Reyes-Gavilan, C. G., Fernández, N., Margolles, A. & Gueimonde, M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* **16**, (2010).
36. Murphy, K. *et al.* The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Sci Rep* **7**, (2017).
37. Fernández, L. *et al.* The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research* vol. 69 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.001> (2013).
38. Fitzstevens, J. L. *et al.* Systematic review of the human milk microbiota. *Nutrition in Clinical Practice* vol. 32 Preprint at <https://doi.org/10.1177/0884533616670150> (2017).
39. Wessel, M. A., Cobb, J. C., Jackson, E. B., Harris, G. S. & Detwiler, A. C. PAROXYSMAL FUSSING IN INFANCY, SOMETIMES CALLED 'COLIC'. *Pediatrics* **14**, 421–435 (1954).
40. Benninga, M. A. *et al.* Childhood Functional Gastrointestinal Disorders: Neonate/Toddler. *Gastroenterology* **150**, 1443-1455.e2 (2016).
41. Drossman, D. A. Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features, and Rome IV. *Gastroenterology* **150**, 1262-1279.e2 (2016).
42. Zeevenhooven, J., Koppen, I. J. N. & Benninga, M. A. The New Rome IV Criteria for Functional Gastrointestinal Disorders in Infants and Toddlers. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* **20**, 1–13 (2017).
43. Rasquin-Weber, A. *et al.* Childhood functional gastrointestinal disorders. *Gut* **45**, ii60–ii68 (1999).
44. Drossman, D. A. The Functional Gastrointestinal Disorders and the Rome III Process. *Gastroenterology* **130**, 1377–1390 (2006).
45. Hyman, P. E. *et al.* Childhood Functional Gastrointestinal Disorders: Neonate/Toddler. *Gastroenterology* **130**, 1519–1526 (2006).
46. Rasquin, A. *et al.* Childhood Functional Gastrointestinal Disorders: Child/Adolescent. *Gastroenterology* **130**, 1527–1537 (2006).
47. Benninga, M. A. *et al.* Childhood functional gastrointestinal disorders: Neonate/toddler. *Gastroenterology* **150**, (2016).

48. Simonson, J., Haglund, K., Weber, E., Fial, A. & Hanson, L. Probiotics for the Management of Infantile Colic. *MCN: The American Journal of Maternal/Child Nursing* **46**, 88–96 (2021).
49. Savino, F. *et al.* Antagonistic effect of Lactobacillus strains against gas-producing coliforms isolated from colicky infants. *BMC Microbiol* **11**, (2011).
50. Canivet, C., Jakobsson, I. & Hagander, B. Infantile colic. Follow-up at four years of age: still more “emotional”. *Acta Paediatr* **89**, 13–17 (2007).
51. Rautava, P., Lehtonen, L., Helenius, H. & Sillanpää, M. Infantile Colic: Child and Family Three Years Later. *Pediatrics* **96**, 43–47 (1995).
52. Savino, F. *et al.* A prospective 10-year study on children who had severe infantile colic. *Acta Paediatr* **94**, 129–132 (2005).
53. Türkoğlu Ünal, E., Bülbül, A., Kara Elitok, G., Avşar, H. & Uslu, S. Evaluation of levels of information and attitudes of mothers concerning infantile colic. *Haydarpaşa Numune Med J* **61**, 38–44 (2021).
54. Garg, C., Khan, S. A., Ansari, S. H., Suman, A. & Garg, M. Chemical composition, therapeutic potential and perspectives of Foeniculum vulgare. *Pharmacognosy Reviews* vol. 3 Preprint at (2009).
55. Khan, R. U. *et al.* Perspective, Opportunities and Challenges in Using Fennel (Foeniculum vulgare) in Poultry Health and Production as an Eco-Friendly Alternative to Antibiotics: A Review. *Antibiotics* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020278> (2022).
56. Gori, L. *et al.* Can estragole in fennel seed decoctions really be considered a danger for human health? A fennel safety update. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* vol. 2012 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2012/860542> (2012).
57. Rhoads, J. M. *et al.* Altered fecal microflora and increased fecal calprotectin in infants with colic. *Journal of Pediatrics* **155**, (2009).
58. De Weerth, C., Fuentes, S., Puylaert, P. & De Vos, W. M. Intestinal microbiota of infants with colic: Development and specific signatures. *Pediatrics* **131**, (2013).
59. Zeevenhooven, J., Browne, P. D., L’Hoir, M. P., de Weerth, C. & Benninga, M. A. Infant colic: mechanisms and management. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0008-7> (2018).
60. Tintore, M., Colome, G., Santas, J. & Espadaler, J. Gut Microbiota Dysbiosis and Role of Probiotics in Infant Colic. *Arch Clin Microbiol* **08**, (2017).
61. Savino, F. *et al.* Comparison of formula-fed infants with and without colic revealed significant differences in total bacteria, Enterobacteriaceae and faecal ammonia. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* **106**, (2017).
62. Rhoads, J. M. *et al.* Infant Colic Represents Gut Inflammation and Dysbiosis. *Journal of Pediatrics* **203**, (2018).

63. P. C. R. Amplicon, P. C. R. Clean-Up & P. C. R. Index. '16S Metagenomic sequencing library preparation.' *Illumina: San Diego, CA, USA* Preprint at (2013).
64. Herlemann, D. P. *et al.* Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J* **5**, 1571–1579 (2011).
65. Klindworth, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* **41**, e1–e1 (2013).
66. Comeau, A. M., Douglas, G. M. & Langille, M. G. I. Microbiome Helper: a Custom and Streamlined Workflow for Microbiome Research. *mSystems* **2**, (2017).
67. Bolyen, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* **37**, 852–857 (2019).
68. Callahan, B. J., McMurdie, P. J. & Holmes, S. P. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* **11**, 2639–2643 (2017).
69. Bokulich, N. A. *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* **6**, 90 (2018).
70. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* **41**, D590–D596 (2012).
71. Martínez-González, M. A. *et al.* Cohort Profile: Design and methods of the PREDIMED study. *Int J Epidemiol* **41**, 377–385 (2012).
72. Martínez-González, M. A. *et al.* A 14-Item Mediterranean Diet Assessment Tool and Obesity Indexes among High-Risk Subjects: The PREDIMED Trial. *PLoS One* **7**, e43134 (2012).
73. Lisa Afonso, Teresa Moreira & Andreia Oliveira. Índices de adesão ao padrão alimentar mediterrânico - a base metodológica para estudar a sua relação com a saúde. *Revista Factores de Risco* **31** 48–55 (2014).
74. Zimmermann, P. & Curtis, N. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *Journal of Infection* **81**, 17–47 (2020).
75. de Weerth, C., Fuentes, S. & de Vos, W. M. Crying in infants. *Gut Microbes* **4**, 416–421 (2013).
76. Urbaniak, C., Angelini, M., Gloor, G. B. & Reid, G. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome* **4**, 1 (2016).
77. Nagpal, R. *et al.* Gut dysbiosis following C-section instigates higher colonisation of toxigenic *Clostridium perfringens* in infants. *Benef Microbes* **8**, 353–365 (2017).
78. Pärty, A., Kalliomäki, M., Endo, A., Salminen, S. & Isolauri, E. Compositional Development of Bifidobacterium and Lactobacillus Microbiota Is Linked with Crying and Fussing in Early Infancy. *PLoS One* **7**, e32495 (2012).
79. Hansen, R. *et al.* The Microaerophilic Microbiota of De-Novo Paediatric Inflammatory Bowel Disease: The BISCUIT Study. *PLoS One* **8**, e58825 (2013).

80. Mukhopadhyaya, I. *et al.* A Comprehensive Evaluation of Colonic Mucosal Isolates of *Sutterella wadsworthensis* from Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One* **6**, e27076 (2011).
81. Wang, M. *et al.* Fecal Microbiota Composition of Breast-Fed Infants Is Correlated With Human Milk Oligosaccharides Consumed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **60**, 825–833 (2015).
82. Savino, F. *et al.* Molecular identification of coliform bacteria from colicky breastfed infants. *Acta Paediatr* **98**, 1582–1588 (2009).
83. Borewicz, K. *et al.* Correlating Infant Fecal Microbiota Composition and Human Milk Oligosaccharide Consumption by Microbiota of 1-Month-Old Breastfed Infants. *Mol Nutr Food Res* **63**, 1801214 (2019).
84. Martinelli, M. *et al.* Efficacy of a standardized extract of *Matricariae chamomilla* L., *Melissa officinalis* L. and tyndallized *Lactobacillus acidophilus* (HA122) in infantile colic: An open randomized controlled trial. *Neurogastroenterology & Motility* **29**, e13145 (2017).
85. Schreck Bird, A., Gregory, P. J., Jalloh, M. A., Risoldi Cochrane, Z. & Hein, D. J. Probiotics for the Treatment of Infantile Colic: A Systematic Review. *J Pharm Pract* **30**, 366–374 (2017).
86. Liong, M.-T. Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutr Rev* **66**, 192–202 (2008).
87. Seferovic, M. D. *et al.* Maternal diet alters human milk oligosaccharide composition with implications for the milk metagenome. *Sci Rep* **10**, 22092 (2020).
88. Notarbartolo, V., Giuffrè, M., Montante, C., Corsello, G. & Carta, M. Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* **25**, 194 (2022).
89. Vaidya, Y. H. *et al.* Human milk microbiome in urban and rural populations of India. *Meta Gene* **13**, 13–22 (2017).
90. Reis, N. A. *et al.* Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. *J Appl Microbiol* **121**, 811–820 (2016).
91. Martín, V. *et al.* Sharing of Bacterial Strains Between Breast Milk and Infant Feces. *Journal of Human Lactation* **28**, 36–44 (2012).
92. Martín, R. *et al.* Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* **143**, 754–758 (2003).
93. Mojgani, N. & Khalkhali, S. *Bacteriocinogenic potential and virulence traits of Enterococcus faecium and E. faecalis isolated from human milk.* <http://ijm.tums.ac.ir>.
94. Zimmermann, P. & Curtis, N. The role of *Cutibacterium acnes* in auto-inflammatory bone disorders. *Eur J Pediatr* **178**, 89–95 (2019).
95. Kawamura, Y. *et al.* *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 921–927 (1998).

96. Vitellio, P. *et al.* Effects of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamnosus* on Gut Microbiota in Patients with Lactose Intolerance and Persisting Functional Gastrointestinal Symptoms: A Randomised, Double-Blind, Cross-Over Study. *Nutrients* **11**, 886 (2019).
97. Akhtar, M. *et al.* Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation. *Animal Nutrition* **8**, 350–360 (2022).
98. Cheng, S. *et al.* The Probiotic Combination of *Lacticaseibacillus paracasei* JY062 and *Lactobacillus gasseri* JM1 Alleviates Gastrointestinal Motility Disorder via Improving Gut Microbiota. *Nutrients* **15**, 839 (2023).
99. Wang, G. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* Strains Relieve Loperamide-Induced Constipation via Different Pathways Independent of Short-Chain Fatty Acids. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, (2020).
100. Chen, D. *et al.* The effect of *Lactobacillus rhamnosus* hsryfm 1301 on the intestinal microbiota of a hyperlipidemic rat model. *BMC Complement Altern Med* **14**, 1–9 (2014).
101. Kim, H. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of *Limosilactobacillus fermentum* KGC1601 Isolated from *Panax ginseng* and Its Probiotic Characteristics. *Foods* **11**, 1707 (2022).
102. Datta, P. *et al.* *Staphylococcus hominis* Subsp. *Hominis* Causing Non-Lactational Breast Abscess: A Rare Pathogen Reported. *J Evol Med Dent Sci* **4**, 2830–2832 (2015).
103. Begović, J. *et al.* Genotypic diversity and virulent factors of *Staphylococcus epidermidis* isolated from human breast milk. *Microbiol Res* **168**, 77–83 (2013).
104. Sindi, A. S. *et al.* Can we modulate the breastfed infant gut microbiota through maternal diet? *FEMS Microbiol Rev* **45**, (2021).
105. Merra, G. *et al.* Influence of Mediterranean Diet on Human Gut Microbiota. *Nutrients* **13**, 7 (2020).