

Jacinta Paula Ribeiro da Rocha

Probióticos: Aplicações Farmacêuticas

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2015

Jacinta Paula Ribeiro da Rocha

Probióticos: Aplicações Farmacêuticas

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2015

Jacinta Paula Ribeiro da Rocha

Probióticos: Aplicações Farmacêuticas

Atesto a originalidade do trabalho:

(Jacinta Paula Ribeiro da Rocha)

Projeto de Pós Graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador:
Professora Doutora Ana Catarina da Cruz Rodrigues da Silva

Porto, 2015

Resumo

De acordo com a Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), os probióticos são microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

A segurança, especificidade, resistência e compatibilidade dos probióticos são fatores essenciais para a sua administração. Entre os microorganismos mais utilizados em probióticos destacam-se as bactérias dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e a levedura *Saccharomyces boulardii*.

Os probióticos promovem o equilíbrio da microbiota intestinal, não só pela produção de substâncias bacteriostáticas, como também pela competição com os microorganismos patogénicos pelos locais de adesão ao epitélio intestinal. Os seus efeitos no hospedeiro, obtidos por mecanismos de ação variados, parecem ter benefícios na prevenção e tratamento de diversas patologias.

Os probióticos têm demonstrado benefícios, não só em patologias gastrointestinais (por exemplo, doenças inflamatórias intestinais, cancro do cólon e infeção por *Helicobacter pylori*), mas também em outras patologias (por exemplo, doença periodontal, infeções genito-urinárias e alergias).

As formas farmacêuticas contendo probióticos devem assegurar a sua resistência às condições fisiológicas adversas (por exemplo, a acidez gástrica), garantindo a sua viabilidade e eficácia.

Abstract

According to the Food and Agriculture Organization / World Health Organization (FAO / WHO), probiotics are live microorganisms that when administered in adequate amounts confer health benefits to the host.

The safety, specificity, strength and compatibility of probiotics are essential for its administration. The most widely used probiotic microorganisms include the bacteria *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and the yeast *Saccharomyces boulardii*.

Probiotics promote the balance of intestinal microflora, producing bacteriostatic substances and by competing for the adhesion of pathogenic microorganisms to the intestinal epithelium. Their different mechanisms of action seem beneficial for the prevention and treatment of various diseases.

Probiotics have shown benefits in gastrointestinal disorders (e.g., inflammatory bowel disease, colon *Helicobacter pylori* infection and cancer) and other disorders (e.g., periodontal disease, genital and urinary infections, and allergies).

Dosage forms containing probiotics should guarantee their resistance to the harsh physiological conditions (e.g., acid gastric pH), ensuring viability and effectiveness.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Ana Catarina da Cruz Rodrigues da Silva, orientadora da minha tese, pelo seu apoio, pela sua dedicação e disponibilidade durante a sua realização.

Agradeço aos meus pais e irmãos por me acompanharem e apoiarem em todos os momentos da minha vida e pela grande ajuda na concretização do meu sonho pessoal.

Agradeço aos meus amigos pela paciência, otimismo e ombro amigo.

Por fim, agradeço aos meus colegas da Faculdade por todo o companheirismo e pela amizade que me ofereceram neste percurso.

A todos um *MUITO OBRIGADA!!*

Índice

I. Introdução.....	1
II. Probióticos	3
2.1. Perspetiva histórica	3
2.2. Probióticos <i>versus</i> prebiótico.....	4
III. Microorganismos utilizados em probióticos	6
3.1. Seleção dos microorganismos.....	6
3.2. <i>Lactobacillus</i>	7
3.3. <i>Bifidobacterium</i>	8
3.4. <i>Saccharomyces boulardii</i>	8
IV. Mecanismos de ação dos probióticos	9
4.1. Atividade antimicrobiana.....	10
4.2. Reforço da função de barreira intestinal	10
4.3. Estimulação e modulação do sistema imunológico do hospedeiro.....	12
V. Aplicações terapêuticas dos probióticos	15
5.1. Infecção por <i>Helicobacter pylori</i>	15
5.2. Doença inflamatória intestinal	16
5.3. Cancro do cólon	19
5.4. Intolerância à lactose.....	20
5.5. Diarreia	21
5.6. Hipercolesterolemia	21
VI. Formas farmacêuticas contendo probióticos	23
6.1. Pós.....	24
6.2. Cápsulas	24
6.3. Comprimidos	25
6.4. Óvulos.....	26
6.5. Outras formas de dosagem contendo probióticos	26

VII. Dose terapêutica e efeitos adversos	27
7.1. Dose terapêutica.....	27
7.2. Efeitos adversos	27
VIII. Conclusões e perspectivas futuras	28
IX. Referências bibliográficas	29

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos de ação dos probióticos.....9

Figura 2. Estimulação e modulação do SI pelos probióticos.....14

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais diferenças entre probióticos e prebióticos.....	4
Tabela 2. Exemplos de microorganismos usados como probióticos.....	7
Tabela 3. Exemplos dos resultados obtidos em estudos realizados com probióticos na doença de Crohn.....	18
Tabela 4. Exemplos dos resultados obtidos em estudos realizados com probióticos na colite ulcerosa	19
Tabela 5. Exemplos de formas farmacêuticas à base de pós contendo probióticos.....	24
Tabela 6. Exemplos de cápsulas contendo probióticos.....	25
Tabela 7. Exemplos de óvulos contendo probióticos comercializados no mercado internacional.....	26

Abreviaturas

APCs – Células apresentadoras de antígenos

CDs – Células dendríticas

FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of United Nations/ World Health Organization

FOS – Frutooligossacarídeos

FP 9 – Farmacopeia Portuguesa 9

HDL – Lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*)

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

INFARMED – Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein*)

MALT – Tecido linfóide associado à mucosa

MHC – Complexo de histocompatibilidade

NOD2 – *Nucleotide-binding oligomerization domain - 2*

NK – Células *Natural-Killer*

SI – Sistema imunológico

TGF- β – Fator de crescimento transformante- β

TGI – Trato gastrintestinal

Th – Células auxiliares T

TJ – Junções apertadas (*tight junctions*)

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

I. Introdução

A microbiota humana é uma comunidade microbiana complexa e abundante que reside no organismo humano. Os organismos que a constituem distribuem-se pelos tratos gastrintestinal, respiratório e genito-urinário. Esta distribuição depende de um conjunto de fatores, tais como a humidade, acidez, temperatura e disponibilidade de nutrientes (Zhu, 2011).

A grande maioria dos microorganismos que constituem a microbiota humana localiza-se no trato gastrintestinal (TGI). Neste local, a densidade bacteriana aumenta de um modo muito significativo no sentido distal, em particular no intestino delgado distal e no cólon (estômago: 10^1 - 10^3 UFC/ml; duodeno: 10^1 - 10^3 UFC/ml; jejuno/íleo: 10^4 - 10^7 UFC/ml e cólon: 10^{11} - 10^{12} UFC/ml) (Hara e Shanahan, 2007).

A colonização do TGI ocorre de forma contínua e progressiva. Inicia-se logo após o nascimento e sofre influência de diversos fatores, tais como: o tipo de parto, a flora intestinal materna, as condições de higiene e o tipo de nutrição oferecida. Durante a infância, a diversidade da microbiota tende a aumentar e a sua composição a modificar. As alterações que ocorrem durante a infância podem trazer consequências na idade adulta, nomeadamente no estado de saúde (Fiocchi e Souza, 2012).

Em adultos saudáveis, a microbiota intestinal é estável e o número de bactérias anaeróbias é cerca de 10 a 1000 vezes superior às bactérias aeróbias. Os géneros mais vulgares de bactérias anaeróbias incluem as *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* e *Eubacterium*. Dentro das bactérias aeróbias destacam-se a *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Klebsiela* (Hara e Shanahan, 2007).

A microbiota intestinal humana desempenha um papel importante no normal funcionamento do intestino (Saad, 2006). A homeostasia da microbiota pode ser influenciada por diversos fatores endógenos e exógenos, tais como a dieta, o sedentarismo, a idade, a antibioterapia, as doenças hepáticas e renais e a vacinação. (Bernstein e Shanahan, 2008). A suplementação da dieta com probióticos, prebióticos e simbióticos contribui para restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal (Saad, 2006).

De acordo com a Food and Agriculture Organization of United Nations/ World Health Organization, os probióticos são “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Com efeito, os probióticos restabelecem o equilíbrio da mucosa intestinal e promovem efeitos benéficos na prevenção e tratamento de diversas patologias (Rao e Samak, 2013).

O uso de probióticos é cada vez mais aceito pela comunidade científica, graças aos seus inúmeros benefícios. Estes microorganismos têm demonstrado eficácia no controle de infecções gastrintestinais, no estímulo da motilidade intestinal, na melhoria da absorção de determinados nutrientes e da intolerância à lactose, na diminuição dos níveis de colesterol, têm efeito anticarcinogênico e estimulam o sistema imunológico (Guarner *et al.*, 2012).

Esta dissertação tem como principal objetivo, uma revisão da literatura científica atual, sobre o papel dos probióticos na saúde do hospedeiro. Com a pesquisa dos conhecimentos em relação aos probióticos pretende-se compreender de que forma estes podem influenciar a microbiota humana. O aprofundamento dos estudos dos mecanismos de ação dos probióticos pode abrir portas à sua aplicação em diferentes áreas de investigação.

II. Probióticos

2.1. Perspetiva histórica

O interesse científico pelos microorganismos, como agentes que influenciam positivamente a saúde humana, surge das observações de Elie Metchnikoff, que no princípio do século XX, atribuiu a longevidade dos camponeses da Bulgária ao consumo de produtos à base de leite fermentado (Fuller, 1997). Este cientista propôs que o consumo de produtos à base de leite fermentado possibilitava modificações da microbiota intestinal, substituindo os microorganismos nocivos por microorganismos benéficos para a saúde humana (Mackowiak, 2013). Desde então, e ao longo de mais de cem anos de estudos, vários autores se esforçaram por conhecer as distintas funções dos microorganismos benéficos para a saúde humana, mais concretamente os produtos láteos fermentados (Amores *et al.*, 2004).

O termo probiótico foi utilizado pela primeira vez, em 1965, por Lilly e Stillwell, para descrever as substâncias libertadas por microorganismos que estimulavam o crescimento de outros, em oposição ao termo antibiótico, entendido como qualquer composto químico utilizado para eliminar ou inibir o crescimento de microorganismos nocivos. Em 1974, Parker, utilizou o termo probiótico, de acordo com o sentido que lhe atribuímos atualmente, ou seja, microorganismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal (Barbosa *et al.*, 2011).

Em 1989, Roy Fuller, tentou melhorar a definição de Parker e definiu probiótico como “suplemento alimentar com microorganismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro animal, por incrementar o balanço da microbiota intestinal” (Coppola e Turnes, 2004).

Muitas outras definições foram avançadas, sendo a definição atualmente aceite internacionalmente a proposta pela FAO/WHO, em 2002, referida na seção da introdução.

2.2. Probióticos *versus* prebiótico

O termo prebiótico foi usado pela primeira vez por Gibson e Roberfroid, em 1995. Estes definiram prebióticos como ingredientes alimentares não digeríveis, com benefícios para o hospedeiro, pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou a atividade de um número limitado de bactérias no cólon (Karkow *et al.*, 2007).

Os prebióticos são compostos geralmente por hidratos de carbono de tamanhos diferentes, não hidrolisáveis nem absorvidos no intestino delgado. Estes estimulam o crescimento e o metabolismo de bactérias endógenas, principalmente do género *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Denipote *et al.*, 2010; Roberfroid, 2007).

As principais características de um prebiótico incluem a resistência à hidrólise e absorção no intestino delgado, a metabolização seletiva no cólon por um número de bactérias benéficas e a capacidade de alterar a microbiota intestinal, induzindo efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (Reig e Anesto, 2002).

Os prebióticos identificados até à atualidade são hidratos de carbono não digeríveis. Entre eles podemos referir a inulina, a lactulose e alguns oligossacarídeos não digeríveis (por exemplo, os frutooligossacarídeos - FOS) (Cummings e Macfarlane, 2002).

Na tabela seguinte, resumem-se as principais diferenças entre probióticos e prebióticos.

Tabela 1. Principais diferenças entre probióticos e prebióticos (adaptado de Karkow *et al.*, 2007).

Prebióticos	Probióticos
<ul style="list-style-type: none"> • Hidratos de carbono 	<ul style="list-style-type: none"> • Microorganismos vivos
<ul style="list-style-type: none"> • Ingredientes alimentares 	<ul style="list-style-type: none"> • Suplementos alimentares, fármacos
<ul style="list-style-type: none"> • Atuam essencialmente no cólon 	<ul style="list-style-type: none"> • Atuam em vários locais do organismo

Associado aos conceitos de probióticos e prebióticos, surgem os simbióticos. Estes são componentes dietéticos funcionais, que resultam da combinação entre probióticos e

prebióticos, o que potencia a eficácia dos probióticos, uma vez que aumenta a sua estabilidade (Denipote *et al.*, 2010).

III. Microorganismos utilizados em probióticos

3.1. Seleção dos microorganismos

A identificação, caracterização e o mecanismo de ação dos microorganismos utilizados em probióticos são necessárias. Segundo a FAO/WHO, os microorganismos devem ser avaliados e apresentar determinadas características para serem usados como probióticos, tais como: ter uma identificação internacionalmente conhecida (espécie e subespécie); resistir à acidez gástrica e à ação dos sais biliares; apresentar efeitos benéficos para o hospedeiro, demonstrados *in vivo* e *in vitro*, por meio de uma dose conhecida; ter a capacidade de adesão ao muco ou epitélio intestinal; apresentar segurança comprovada e garantir a manutenção de viabilidade até ao momento da administração ou quando adicionado a produtos láteos.

O método de seleção dos microorganismos ideais a ser usados como probióticos compreende três passos essenciais (Costa e Miglioranza, 2013): i) na fase inicial, faz-se a identificação da espécie bacteriana, usando técnicas fenotípicas convencionais; ii) posteriormente faz-se a caracterização funcional, que tem como finalidade avaliar a resistência do microorganismo ao suco gástrico, pancreático e biliar. Esta caracterização funcional é realizada através de ensaios *in vitro*, utilizando sucos artificiais, e ensaios *in vivo*, em animais; iii) na última fase efetuam-se os ensaios de segurança, onde são avaliadas a inocuidade, eficácia e efetividade dos microorganismos.

A validação dos microorganismos nas fases descritas anteriormente permite a sua utilização como probióticos e sua posterior introdução no mercado (Costa e Miglioranza, 2013).

Na atualidade, a grande maioria de culturas de probióticos é originária do intestino humano ou animal, sendo os géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* os mais usados (Tabela 2). Com esta seleção pretende-se um aumento da eficácia, uma vez que o local de ação vai ser semelhante ao local de isolamento. Uma exceção é a levedura *Saccharomyces boulardii*, que apesar de não ser de origem humana ou animal é usada na indústria farmacêutica desde 1960 (Antunes *et al.*, 2007).

Tabela 2. Exemplos de microorganismos usados como probióticos (adaptado de Souza *et al.*, 2010).

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	Outras espécies
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Lactococcus cremoris</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Lactococcus diacetylactis</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>	<i>Streptococcus lactis</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>		<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>		

3.2. *Lactobacillus*

Os lactobacilos foram isolados pela primeira vez por Moro, a partir de fezes de latentes amamentados com leite materno. As bactérias do género *Lactobacillus* estão amplamente distribuídas no meio ambiente, especialmente nos vegetais e no TGI e genital (Gomes e Malcata, 1999). Estes microorganismos caracterizam-se por ser Gram-positivos, não formadores de esporos, não flagelados e geralmente anaeróbicos facultativos. São fermentadores, caracterizadas por produzir ácido láctico a partir de hidratos de carbono. Crescem a uma temperatura que varia entre os 2 e os 53°C, com valores ótimos entre os 30 e os 40°C, e pH entre os 5,5 e os 6,3 (Stamatova e Meurman, 2009).

O género *Lactobacillus* compreende cinquenta e seis espécies oficialmente conhecidas. Entre estas, as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* são as mais usadas como aditivos dietéticos (Stamatova e Meurman, 2009).

3.3. *Bifidobacterium*

As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez, no final do século XIX, por Tissier. São caracterizadas como bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, desprovidas de flagelos, anaeróbias e com mecanismos de catalase positiva (Stamatova e Meurman, 2009; Gomes e Malcata, 1999).

Atualmente, o género *Bifidobacterium* compreende trinta espécies, sendo dez de origem humana, dezassete de origem animal, duas de águas residuais e uma de leites fermentados. As espécies de origem humana apresentam a particularidade de usarem como fonte de carbono, não só a glucose, mas também a galactose, lactose e frutose (Stefe *et al.*, 2008).

3.4. *Saccharomyces boulardii*

Apenas duas leveduras são utilizadas como probióticos, a *Saccharomyces boulardii*, em medicina humana, e a *Saccharomyces cerevisiae*, em medicina veterinária (Gomes e Malcata, 1999; Stefe *et al.*, 2008).

A *Saccharomyces boulardii* é uma levedura não patogénica, termotolerante e resistente à ação dos sucos gástricos e dos antibacterianos. Esta última característica é bastante relevante no tratamento de infeções gastrintestinais, uma vez que normalmente são utilizadas combinações de probióticos e fármacos antibacterianos. No entanto, para a sua ação ser eficaz, a sua administração deve ser efetuada de forma repetida e regular, uma vez que esta levedura não adere à mucosa (Stefe *et al.*, 2008).

IV. Mecanismos de ação dos probióticos

Os mecanismos de ação dos probióticos variam de acordo com a estirpe e/ou combinação de estirpes, a presença de prebióticos, a patologia, bem como a fase de desenvolvimento da patologia em que o probiótico é administrado (Gupta, 2011).

Os mecanismos de ação pelos quais os probióticos agem, não estão completamente esclarecidos, mas, de um modo geral, dividem-se em três categorias distintas (Gupta, 2011): a atividade antimicrobiana, o reforço da função barreira intestinal e a estimulação e modulação do sistema imunológico do hospedeiro (Figura 1).

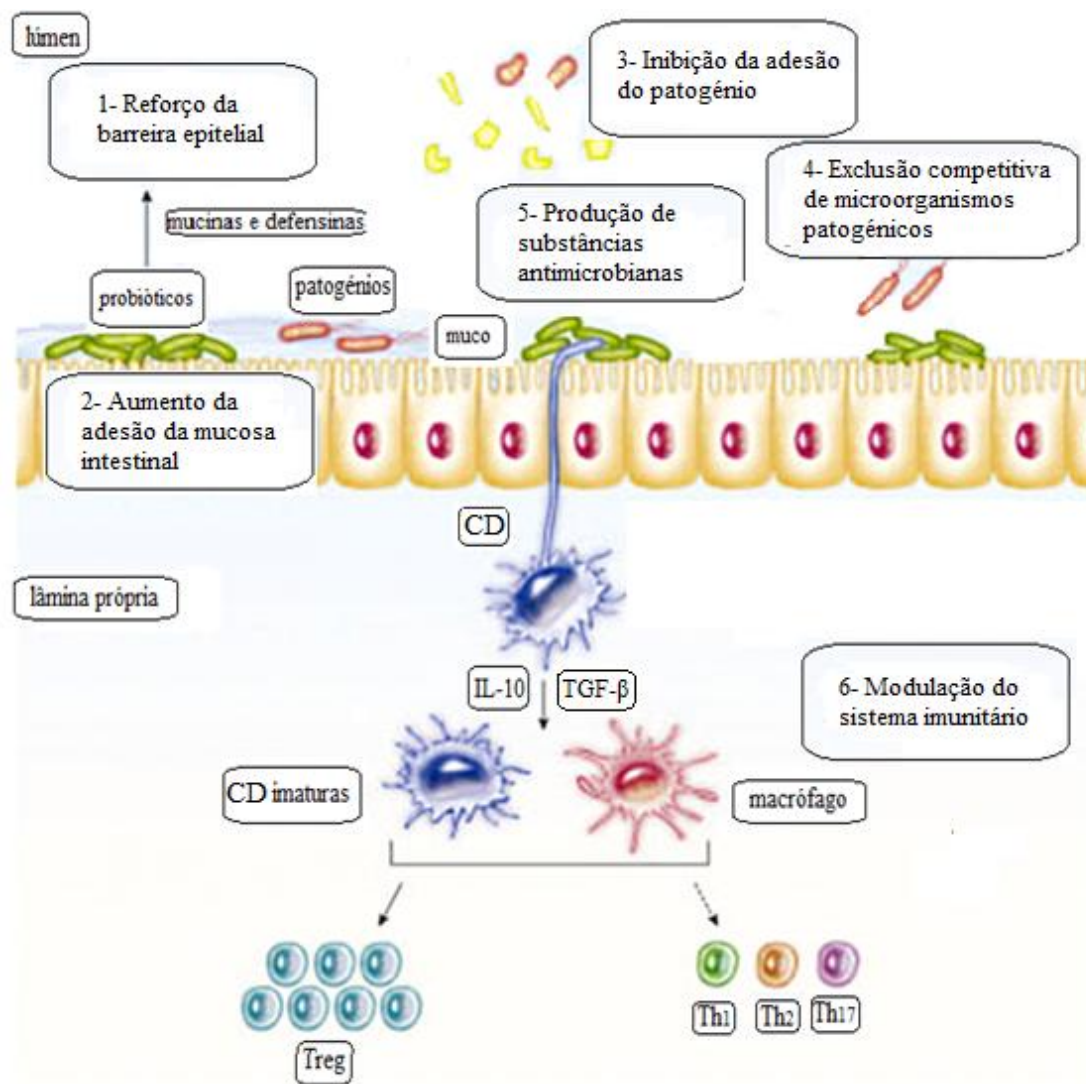


Figura 1. Mecanismos de ação dos probióticos (adaptado de Bermudez *et al.*, 2012).

4.1. Atividade antimicrobiana

Os probióticos podem eliminar e/ou diminuir microorganismos patogênicos por diferentes métodos. A modulação da microbiota intestinal pelos probióticos é feita através de um mecanismo de exclusão competitiva, que impede a colonização da mucosa por microorganismos patogênicos. A competição pelos locais de adesão, nutrientes e fontes de energia, impede a colonização e subsequente produção de toxinas e/ou invasão das células epiteliais (Rieder *et al.*, 2012; Saad, 2006).

Outro método proposto é a alteração do ambiente intestinal. Como resultado do seu metabolismo e fermentação, os probióticos produzem substâncias bacteriostáticas (bacteriocinas), peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, sobretudo ácidos gordos de cadeia curta. Como consequência da produção destes ácidos ocorre uma descida do pH intestinal, tornando-o num ambiente desfavorável ao desenvolvimento de microorganismos patogênicos (Rieder *et al.*, 2012). As bacteriocinas, são pequenos peptídeos produzidos por *Lactobacillus spp.*, com espectro de ação estreito, sendo tóxicas essencialmente para bactérias Gram-positivas, ao intervir nas vias enzimáticas e/ou na criação de poros nas membranas celulares. Algumas *Bifidobacterium spp.* produzem uma bacteriocina semelhante, mas com um espectro de ação mais alargado (ação sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas). A levedura *Saccharomyces boulardii* produz uma protease que diminui a ação das toxinas da *Clostridium difficile* (Collado *et al.*, 2005).

4.2. Reforço da função de barreira intestinal

A barreira intestinal é um importante mecanismo de defesa, que permite manter a integridade epitelial. Este mecanismo é assegurado por diversos fatores, tais como: a camada de muco, a secreção de água e cloretos, as células epiteliais e as células imunitárias (Ng *et al.*, 2009; Bermudez *et al.*, 2012).

Os mecanismos pelos quais os probióticos podem interferir na função de barreira intestinal ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, pensa-se que estejam relacionados com a produção de muco e/ou com a expressão das proteínas de junção das células epiteliais (Bermudez *et al.*, 2012).

A integridade da microbiota intestinal é mantida, em parte, pelas mucinas. As mucinas são macromoléculas glicosiladas, secretadas pelas células caliciformes. Constituem o principal componente proteico da camada de muco, que funciona como primeira barreira de proteção e como lubrificante (Phillipson *et al.*, 2008).

As toxinas luminais e alterações na microbiota intestinal podem causar alterações na função das células caliciformes e na composição química do muco. Alguns probióticos têm a capacidade de restabelecer os níveis de mucinas intestinais. Estudos *in vitro* revelaram que algumas bactérias do gênero *Lactobacillus*, aumentam a expressão de mucina em culturas células tumorais humanas intestinais, as Caco-2 e as HT29 (Howarth e Wang, 2013).

A função de barreira intestinal também é modulada pelas proteínas constituintes das junções apertadas (*tight junctions*, TJ). As proteínas das TJ (occludinas e claudinas) encontram-se na zona apical, permitindo a ligação entre duas células adjacentes e impedindo assim a passagem de substâncias (Howarth e Wang, 2013).

Quando ocorre uma disfunção da barreira da mucosa intestinal, como por exemplo, a doença inflamatória intestinal, pode ocorrer um aumento da permeabilidade intestinal, como resultado de uma anormal expressão de certas proteínas das TJ no epitélio intestinal (Howarth e Wang, 2013; Zhou *et al.*, 2012).

Vários estudos revelaram a capacidade dos probióticos para manter a função da barreira intestinal, pela modificação da expressão das proteínas das TJ. O VSL # (probiótico multiespécies, constituído por *Lactobacillus Plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgarius*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* e *Streptococcus salivarius thermofilus*), demonstrou regular a síntese das occludinas e diminuir a expressão de claudinas, em ratos com doença de Crohn induzida experimentalmente (Franco *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2012).

Os mesmos resultados foram observados num outro estudo. Após a administração oral de *Lactobacillus plantarum*, observou-se um aumento da expressão das proteínas das TJ. Neste estudo, foi descrita ainda uma relação entre a atividade da proteína quinase C e a redistribuição das occludinas e claudinas (Zhou *et al.*, 2012).

4.3. Estimulação e modulação do sistema imunológico do hospedeiro

O sistema imunológico (SI) é composto por órgãos, que se podem classificar em primários e secundários. Os primários são o timo e a medula óssea, e são os principais locais onde ocorre a linfopoiese. Os secundários são o baço, os nódulos linfáticos e o tecido linfóide associado à mucosa (MALT), e são os locais em que ocorrem as respostas imunes celulares e humorais. O baço é o órgão que responde à presença de antígenos na circulação sanguínea. Os gânglios linfáticos respondem aos antígenos circulantes na linfa e o MALT responde aos antígenos que passam através das mucosas (Willey *et al.*, 2009).

O objectivo do SI é proteger o organismo. A resposta imune envolve o reconhecimento de patógenos ou material estranho e o desencadear de uma reação para o eliminar. Esta resposta pode dividir-se em duas categorias, a imunidade inata e a imunidade adaptativa (Coppola e Turnes, 2004). A imunidade inata representa uma resposta rápida a um grande número de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas, biológicas, células especializadas e moléculas solúveis. As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (CDs) e células *Natural-Killer* (NK). A fagocitose, a libertação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento e a síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas, são os mecanismos deste tipo de imunidade (Coppola e Turnes, 2004; Souza *et al.*, 2010).

A imunidade adaptativa envolve sobretudo os linfócitos. Os antígenos, associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) aos linfócitos. Como resultado, as células auxiliares T (Th) são ativadas. As Th2 segregam citocinas que vão ativar os linfócitos B, específicos para o antígeno. As Th1 estão envolvidas sobretudo na ativação das células T citotóxicas e na resposta inflamatória. As Th3 (produzidas no MALT) suprimem a função das células efetoras, através da libertação de uma citocina inibidora, o fator de crescimento transformante- β (TGF- β) (Erickson e Hulbard, 2000).

As respostas imunitárias humorais, ao nível da mucosa resultam na maioria da imunoglobulina tipo A (IgA). Apesar da presença de outras imunoglobulinas, tais como a imunoglobulina G (IgG), a imunoglobulina M (IgM) e a imunoglobulina E (IgE), a

IgA é a mais abundante e com um maior nível de atividade. A IgA após produção é transportada para a superfície da mucosa. Dada a sua resistência à proteólise e, através de um processo de exclusão imunológica, impede a ligação e penetração de patógenos na mucosa (Erickson e Hulbard, 2000).

Quando se pretende estudar os efeitos dos probióticos sobre o SI, a via oral e o MALT devem ser o foco, uma vez que uma das principais respostas de imunidade da mucosa é uma resposta imunitária humoral e a produção de IgA (Coppola e Turnes, 2004).

Vários estudos têm descrito que os probióticos têm efeito imunoestimulador em animais e humanos. Apesar de ainda não estarem completamente esclarecidos os mecanismos, pensa-se que o efeito imunoestimulador pode estar relacionado com a capacidade dos probióticos interagirem com as placas de Payer, presentes no intestino. Desta interação resulta a estimulação dos linfócitos B, a produção de IgA, e a migração de linfócitos T do intestino (Bermudez *et al.*, 2012; Coppola e Turnes, 2004).

Por outro lado, também tem sido demonstrado, que os probióticos favorecem a atividade fagocitária inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica, por secreção de mediadores, que estimulam o SI (Souza *et al.*, 2010).

Na Figura 2, encontra-se representado o mecanismo de estimulação e modulação do SI pelos probióticos.

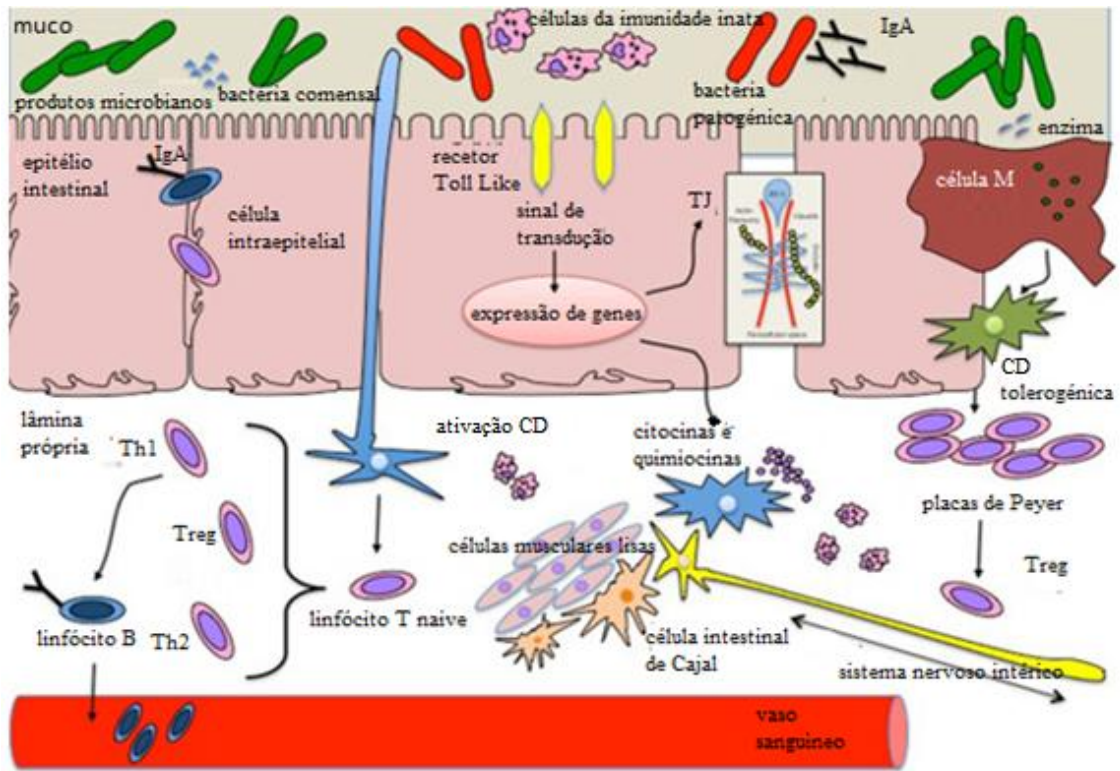


Figura 2. Estimulação e modulação do SI pelos probióticos (adaptado de Bermudez *et al.*, 2012).

V. Aplicações terapêuticas dos probióticos

Os probióticos representam uma abordagem alternativa e eficaz aos compostos sintéticos usados em nutrição e em medicina (Bomba *et al.*, 2002). Estudos clínicos têm demonstrado que alguns probióticos produzem efeitos benéficos na prevenção e/ou tratamento de determinadas situações clínicas, como a infecção por *Helicobacter pylori*, doença inflamatória intestinal, diarreia, doenças cardiovasculares, alergias, entre outras (Arribas *et al.*, 2008).

5.1. Infecção por *Helicobacter pylori*

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram-negativa, com forma espiral, microaerofílica, flagelada, oxidase e catalase positiva, associada exclusivamente a células da mucosa gástrica. A infecção gástrica causada por *Helicobacter pylori* é considerada a infecção humana mais comum, sendo uma das principais causas de gastrite e úlcera péptica e um fator de risco das neoplasias gástricas (Vítor e Vale, 2011).

Atualmente, o tratamento de erradicação da *Helicobacter pylori*, consiste numa terapêutica tripla, que consiste na utilização de dois antibióticos (por exemplo, claritromicina e amoxicilina) e um inibidor da bomba de prótons, durante um período mínimo de sete dias (Vítor e Vale, 2011).

Apesar da terapêutica tripla ter eficácia em 90% dos casos, esta apresenta algumas desvantagens, tais como: custo elevado, efeitos colaterais e resistência aos antibióticos. Face a estas desvantagens, foram desenvolvidas estratégias de tratamento de segunda linha, nas quais se pode inserir o uso de probióticos (Graham e Fischbach, 2010; Vítor e Vale, 2011).

A utilização de probióticos na erradicação da *Helicobacter pylori* tem por base dois objetivos essenciais (Wolvers *et al.*, 2010): i) aumento das taxas de erradicação. Atualmente, com os esquemas terapêuticos clássicos, estas taxas são inferiores às observadas no passado, devido à crescente resistência aos antibióticos; ii) diminuição dos efeitos secundários resultantes da terapêutica clássica.

Estudos realizados em humanos evidenciaram uma diminuição da densidade da *Helicobacter pylori* e uma melhoria da gastrite, após a administração de probióticos. As taxas de erradicação observadas foram de 81%, na combinação da terapêutica tripla com probióticos e de 71%, na terapêutica tripla isolada. Verificou-se ainda uma redução dos efeitos colaterais, de 46% (terapêutica tripla isolada) para 23% (combinação terapêutica tripla com probióticos). No entanto, em nenhum estudo foi demonstrada a erradicação da *Helicobacter pylori* apenas com probióticos (Lesbros-Pantoflickova *et al.*, 2007).

5.2. Doença inflamatória intestinal

A doença inflamatória intestinal consiste na inflamação crônica do TGI e compreende três tipos, com características clínicas e patológicas distintas, a doença de Crohn, colite ulcerosa e a bolsite (Abraham e Cho, 2009).

A etiologia da doença inflamatória intestinal é desconhecida. Contudo, fatores genéticos e ambientais, alterações da microbiota intestinal, hábitos alimentares, tabaco e contraceptivos orais, são considerados fatores condicionantes (Abraham e Cho, 2009).

A doença de Crohn é descrita por um processo inflamatório crônico, que pode afetar qualquer parte do TGI, mais frequentemente a porção distal do intestino delgado, o íleo e/ou o intestino grosso (Abraham e Cho, 2009).

Segundo estudos realizados em pacientes com doença de Crohn na forma ativa, verificou-se um aumento da espécie *Escherichia coli* aderente-invasiva na microbiota intestinal e nas fezes. Em contrapartida, ocorreu uma redução do número de microorganismos dos filos Bacteroidetes e Firmicutes (Willing *et al.*, 2009). A alteração na diversidade da microbiota, por si só, não é a causa da doença de Crohn. É necessário que o indivíduo tenha um genótipo susceptível. Por exemplo, quando ocorre uma mutação no gene que codifica a proteína NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain - 2*) em pacientes portadores desta doença, verificou-se haver uma relação na resposta imunológica inata a bactérias invasivas e o desenvolvimento da doença (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

A colite ulcerosa é uma inflamação limitada à mucosa. A localização mais frequente é o reto e pensa-se que a sua principal causa sejam alterações no muco (Abraham e Cho, 2009).

A bolsite é uma inflamação inespecífica do reservatório ileal, com características tanto da doença de Crohn como da colite ulcerosa. Esta patologia caracteriza-se pelo envolvimento transmural da parede, com distribuição intestinal segmentar com um início agudo grave. No entanto apresenta uma distribuição das lesões atípica, tendo um aspeto radiológico, endoscópico e histológico semelhante à colite ulcerosa (Abraham e Cho, 2009).

Este quadro de etiologia desconhecida, caracterizado pelo aumento da frequência de evacuações e espasmos abdominais, pode estar associado à diminuição de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* (Abraham e Cho, 2009).

O tratamento atual das doenças inflamatórias intestinais baseia-se principalmente no uso de medicamentos anti-inflamatórios, imunomoduladores, suplementos nutricionais e cirurgia. O potencial dos probióticos na prevenção/tratamento destas doenças permanece ainda pouco esclarecido. Embora os resultados clínicos sejam animadores, os dados são limitados e poucos são os estudos controlados com placebo. As Tabelas 3 e 4 resumem os resultados obtidos em estudos de intervenção com probióticos, em pacientes com doença inflamatória intestinal (Jonkers e Stockbrugger, 2003).

Tabela 3. Exemplos dos resultados obtidos em estudos realizados com probióticos na doença de Crohn (adaptado de Jonkers e Stockbrugger, 2003).

Número de pessoas analisadas	Atividade da doença	Tratamento	Duração	Efeito	Referência
14 crianças	Ativa/inativa	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	10 dias	↑ Ig A na mucosa	Malin <i>et al.</i> (1996)
28 adultos	Ativa	Prednisolona + <i>Escherichia coli</i> vs placebo	12 meses	Taxa de recidiva reduzida (64-33%)	Malchow <i>et al.</i> (1997)
10 adultos	Inativa	<i>Saccharomyces boulardii</i> + mesalazina	6 meses	Apenas uma recidiva	Guslandi <i>et al.</i> (1999)
20 adultos	ativa	<i>Lactobacillus salivarius UCC118</i>	10 dias	Sem remissão; ↑ qualidade de vida	Mattil-Sandholm <i>et al.</i> (2000)
4 crianças	Moderadamente ativa	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	6 meses	↓ Permeabilidade intestinal; atividade clínica da doença	Gupta <i>et al.</i> (2000)
32 adultos	Inativa	<i>Saccharomyces boulardii</i> + mesalazina vs mesalazina	6 meses	Taxa de recidiva reduzida (38-6%)	Guslandi <i>et al.</i> (2000)
37 adultos	Após a resseção curativa	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> vs placebo	12 meses	Endoscopia de recorrência similar	Prantera <i>et al.</i> (2002)

Tabela 4. Exemplos dos resultados obtidos em estudos realizados com probióticos na colite ulcerosa (adaptado de Jonkers e Stockbrugger, 2003).

Número de pessoas analisadas	Atividade da doença	Tratamento	Duração	Efeito	Referência
1adulto	Ativa	Antibiótico + enema fecal	Uma vez	Remissão induzida	Bennet <i>et al.</i> (1989)
108 adultos	inativa	<i>Escherichia coli</i> vs mesalazina	12 semanas	Taxa de recidiva similar	Kruis <i>et al.</i> (1997)
19adultos	ativa	<i>Lactobacillus plantarum</i> (9 ativos/10 inativos)	-	6 dos 9 pacientes com forma ativa em remissão	Kordecki <i>et al.</i> (1998)
116 adultos	ativa	<i>Escherichia coli</i> vs mesalazina	12 meses	Taxas de remissão e recidiva similares	Rembacka <i>et al.</i> (1999)
20 adultos	inativa	VSL #	12 meses	75% de remissão e flora fecal alterada	Venturi <i>et al.</i> (1999)
327 adultos	Inativa	<i>Escherichia coli</i> vs mesalazina	12 meses	Taxa de recidiva similar	Kruis <i>et al.</i> (2001)

5.3. Cancro do cólon

O cancro do cólon é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade da população mundial (Rafter, 2003).

A flora endógena e o SI desempenham um papel essencial na modulação da carcinogénese. Visto que os probióticos influenciam estes dois fatores, têm sido

realizados estudos para avaliar a sua eficácia na prevenção e tratamento de tumores, usando alguns modelos animais (Wollowski *et al.*, 2001).

O mecanismo através da qual os probióticos podem inibir o desenvolvimento do cancro do cólon ainda é uma incógnita. No entanto, o estímulo da resposta imune do hospedeiro, a degradação de compostos tumorais, as alterações qualitativas, quantitativas e metabólicas da microbiota intestinal são alguns dos mecanismos sugeridos (Rafter, 2003).

5.4. Intolerância à lactose

A lactose é um hidrato de carbono presente no leite e derivados, que necessita de uma enzima específica intestinal, a lactase, para ser hidrolisada em monossacarídeos (glucose e galactose), que são absorvidos no intestino delgado (He *et al.*, 2006).

Em indivíduos com deficiência em lactase, a lactose não é hidrolisada, sendo fermentada pela microbiota autóctone no intestino grosso, levando à produção de ácidos gordos de cadeia curta e gases (hidrogénio e/ou metano e dióxido de carbono) (Vesa *et al.*, 2000).

A ocorrência de sintomas de intolerância à lactose (flatulência, inchaço, dor abdominal e diarreia) pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: a quantidade de lactose ingerida, a atividade da lactase e o processamento da lactose no cólon. No entanto, não existe uma forte correlação entre a má absorção da lactose e a intolerância à lactose. Indivíduos com intolerância ao leite podem hidrolisar a lactose, e indivíduos que não hidrolisam a lactose, podem não desenvolver sintomas de intolerância. Deste modo, pensa-se que o uso de probióticos não melhora a digestão da lactose no intestino delgado, mas evita os sintomas de intolerância no intestino grosso. Este efeito dos probióticos é dependente da especificidade da estirpe, da concentração e preparação do probiótico, bem como da resposta individual do indivíduo aos probióticos (Vrese *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2004).

5.5. Diarreia

Há mais de um século que as pesquisas sugerem que os probióticos podem ajudar na prevenção e tratamento da diarreia. Os probióticos, sobretudo as estirpes de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*, quando administrados como suplementos medicamentosos, diminuem a duração das dejeções em cerca de 24 horas. Este efeito é particularmente evidente em crianças infetadas por rotavírus (Williams, 2010).

Para Canani *et al.*, outros tipos de probióticos, como a *Sacchromyces boulardii*, não afetavam significativamente a duração e gravidade da diarreia aguda nas crianças, embora mostrassem evidências na prevenção e recorrência de infeções por *Clostridium difficile*.

Segundo Guarner *et al.*, existem evidências que as *Lactobacillus GG* e *Sacchromyces boulardii* previnem a diarreia aguda nas crianças e em adultos. Uma meta-análise revelou que esta diminuição se verifica quando a *Sacchromyces boulardii* é administrada concomitantemente com a vancomicina, metronidazol ou outros. Esta meta-análise revelou ainda que o uso destes microorganismos reduz significativamente a diarreia após antibioterapia.

Na diarreia associada à antibioterapia existem evidências significativas da eficácia da *Sacchromyces boulardii* tanto em adultos como em crianças. Outro estudo revelou a eficácia de *Lactobacillus casei* na diarreia por *Clostridium difficile* (Guarner *et al.*, 2012).

Na prevenção da diarreia do viajante, os resultados dos estudos efetuados, sobre o uso e benefício dos probióticos são inconclusivos, possivelmente devido à variabilidade de destinos e às estirpes selecionadas para a investigação (Williams, 2010).

5.6. Hipercolesterolemia

Os probióticos exercem efeitos benéficos sobre algumas desordens, como a hipertensão arterial e o hipercolesterolemia. A síntese de colesterol ocorre principalmente no intestino e, deste modo a microbiota intestinal promove efeitos no metabolismo lipídico, diminuindo os níveis de colesterol sanguíneo e aumentando a

resistência da lipoproteína de baixa densidade (LDL) à oxidação, levando a uma redução da pressão arterial (Goel *et al.*, 2006).

Estudos realizados com microorganismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* evidenciaram a diminuição do colesterol total sérico e da LDL, e o aumento da lipoproteína da alta densidade (HDL) (Liong e Shah, 2004). Os efeitos descritos resultam da assimilação do colesterol durante o crescimento bacteriano ou da sua ligação à superfície da parede celular das bactérias. Por outro lado, alguns probióticos têm a capacidade de produzir enzimas que degradam ácidos biliares, diminuindo a sua reabsorção e aumentando a sua eliminação nas fezes. Como o colesterol é precursor na síntese dos ácidos biliares, à medida que aumenta a excreção de ácidos biliares, diminui a concentração plasmática de colesterol (Liong e Shah, 2004).

VI. Formas farmacêuticas contendo probióticos

Para conferir benefícios terapêuticos os probióticos têm de se manter viáveis até atingirem o seu local de ação. Assim sendo, o desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo probióticos, deve assegurar a sua resistência às condições fisiológicas adversas, como por exemplo, a acidez gástrica, de modo a assegurar a sua viabilidade e eficácia (Amaral *et al.*, 2014).

Um aspeto importante no desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo probióticos, é a implementação de um processo de fabrico, que assegure que o produto possa ser produzido de uma forma reprodutível. Este processo não difere do processo usado na produção de outros produtos constituídos por microorganismos vivos (por exemplo, vacinas vivas e vetores microbianos para a terapia génica (Ross e Boucher, 2012).

O desenvolvimento de produtos contendo probióticos inclui os seguintes passos (Amaral *et al.*, 2014):

- Seleção e caracterização das estirpes com propriedades terapêuticas comprovadas;
- Seleção dos excipientes adequados;
- Escolha do processo de produção que permita a produção em larga escala;
- Avaliação da segurança e eficácia dos produtos finais, através de testes laboratoriais (*in vitro* e *ex vivo*), em modelos animais e em humanos.

Os primeiros produtos à base de probióticos disponíveis no mercado eram, na sua maioria formulações líquidas, que apresentavam baixa estabilidade. Atualmente os probióticos utilizados na terapêutica são incorporados em formas de dosagem adequadas, de modo a assegurar a sua viabilidade (Amaral *et al.*, 2014). As formas mais comuns para veicular probióticos são os produtos láteos e os alimentos com probióticos. No entanto, também existem no mercado pós, cápsulas, comprimidos, óvulos e outras formas de dosagem contendo probióticos na forma liofilizada (Guarner *et al.*, 2012).

6.1. Pós

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9 (FP 9), os pós orais são “preparações constituídas por partículas sólidas secas, livres e mais ou menos finas. Os pós orais contêm uma ou várias substâncias ativas, adicionadas ou não de excipientes e, se necessário, de corantes autorizados pela autoridade competente e aromatizantes”.

Normalmente os pós contendo probióticos formam suspensões orais, quando dispersos em água. Deste modo, em comparação com outras formas orais (por exemplo, comprimidos e cápsulas), a sua administração é facilitada, o que tem particular interesse nas crianças e adultos com necessidades especiais (Amaral *et al.*, 2014).

Na Tabela 5 estão apresentados alguns exemplos de formas farmacêuticas à base de pós contendo probióticos, atualmente comercializadas.

Tabela 5. Exemplos de formas farmacêuticas à base de pós contendo probióticos (adaptado de Amaral *et al.*, 2014).

Produto	Composição
UL-250®	<i>Sacharomyces boulardii</i>
Bacilor®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Antibiophilus®	<i>Lactobacillus casei</i>
Lyobifidus®	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

6.2. Cápsulas

Segundo a FP 9, podemos definir cápsulas como “preparações sólidas constituídas por um invólucro duro ou mole, de forma e capacidade variáveis, contendo uma dose de substância ativa. Destinam-se à administração oral.”

Para a administração de probióticos as cápsulas duras são preferíveis. Podem ser usados liofilizados de probióticos adicionados de diluentes, aglutinantes ou desagregantes (Amaral *et al.*, 2014).

Na Tabela 6 são apresentados alguns exemplos de cápsulas comercializadas à base de probióticos.

Tabela 6. Exemplos de cápsulas contendo probióticos (adaptado de Amaral *et al.*, 2014).

Produto	Composição
Bactilsubtil®	<i>Bacillus subtilis</i>
Activecomplex Flora®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Infloran Berna®	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Lacteol®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Antibiophilus®	<i>Lactobacillus casei</i>
UL-250®	<i>Saccharomyces boulardii</i>

6.3. Comprimidos

A FP 9 define comprimidos como “preparações sólidas contendo uma dose de uma ou de várias substâncias ativas. São geralmente obtidos aglomerando por compressão um volume constante de partículas. Destinam-se à administração por via oral. Alguns são deglutidos ou mastigados, outros são dissolvidos ou desagregados em água antes da administração e, finalmente outros devem permanecer na boca para aí libertarem a substância ativa”.

Os comprimidos contendo probióticos são constituídos por misturas de excipientes e probióticos liofilizados. Alguns podem ser gastrorresistentes e uma grande maioria são desenhados para a administração vaginal (Amaral *et al.*, 2014).

6.4. Óvulos

De acordo com a FP 9 os óvulos são “preparações sólidas unidose. São de forma variável, mas geralmente ovoide, o volume e a consistência estão adaptados à administração por via vaginal. Contêm uma ou várias substâncias ativas dispersas ou dissolvidas numa base apropriada que é, segundo os casos, solúvel ou dispersível na água, ou funde à temperatura corporal”.

Em comparação com outras formas farmacêuticas, os óvulos apresentam algumas vantagens, tais como: fácil aplicação, não causam irritação, são seguros, eficazes e não requerem um grande volume de meio de dissolução para ocorrer a libertação do agente terapêutico (Amaral *et al.*, 2014).

Na Tabela 7, são apresentados alguns exemplos de óvulos contendo probióticos.

Tabela 7. Exemplos de óvulos contendo probióticos comercializados no mercado internacional (adaptado de Amaral *et al.*, 2014).

Produto	Composição
Vagiflor®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Lactinex®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Tropivag	<i>Lactobacillus rhamnosus Lcr35</i>
HLC Candaclear®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Intrafresh®	<i>Lactobacillus acidophilus</i>

6.5. Outras formas de dosagem contendo probióticos

Para além das formas farmacêuticas descritas anteriormente, existem outras contendo probióticos, tais como (Amaral *et al.*, 2014):

- Pastilhas elásticas – diminuem os níveis de bactérias salivares;
- Geles – os geles bioadesivos são utilizados no tratamento de infeções vaginais;
- Colírios – os colírios contendo *Lactobacillus acidophilus* são usados no controlo dos sintomas de queratoconjuntivite.

VII. Dose terapêutica e efeitos adversos

7.1. Dose terapêutica

A suplementação com probióticos é recomendada para restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal. Os microorganismos administrados devem estar presentes numa quantidade suficiente para ter efeito no local de ação. Para que um microorganismo tenha influência no ecossistema, a sua concentração deve ser igual ou superior a 10^7 UFC/g. Deste modo, a concentração de células viáveis nos probióticos deve ser ajustada na preparação inicial, tendo em conta a capacidade de sobrevivência, o fato de não se multiplicarem no TGI e o efeito da diluição intestinal (Kligger e Cohrsen, 2008; Stefe *et al.*, 2008).

7.2. Efeitos adversos

Os probióticos usados na terapêutica não apresentam efeitos secundários, uma vez que o seu efeito é semelhante ao dos microorganismos pertencentes à flora comensal do organismo. No entanto, a FAO/WHO coloca algumas dúvidas em relação a estas novas terapias, uma vez que podem propiciar o aparecimento de agentes patogénios mais agressivos e resistentes à antibioterapia de primeira linha. Mais estudos têm de ser realizados, para avaliar estes efeitos (Badaró *et al.*, 2009).

VIII. Conclusões e perspectivas futuras

As perturbações na microbiota intestinal fazem com que a homeostasia do hospedeiro esteja comprometida, podendo levar a situações de patologia. O conhecimento aprofundado da composição e atividade da microbiota intestinal deverá conduzir a novas intervenções terapêuticas, com base na possível modulação dessa microbiota, resultando numa melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Um século após ter sido considerada a possibilidade das bactérias intestinais poderem promover a saúde do homem, os probióticos começam a ser usados de forma preventiva e/ou terapêutica em determinadas patologias.

Vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar o funcionamento dos probióticos no organismo, não havendo consenso em relação ao mecanismo exato segundo o qual estes microorganismos atuam. São necessárias mais investigações nesta área, uma vez que não se podem fazer extrapolações de um probiótico para outro, ou de uma situação clínica para outra.

Respeitando determinadas características intrínsecas, necessárias para exercer benefícios no hospedeiro, os probióticos demonstraram eficácia na prevenção/tratamento de diversas patologias, tais como: infeção por *Helicobacter pylori*, doenças inflamatórias intestinais, cancro do cólon, diarreia, hipercolesterolemia, doença periodontal, infeções genito-urinárias e alergias.

Os produtos à base de probióticos estão disponíveis em diversas formas, incluindo os pós, cápsulas, comprimidos, óvulos, pastilhas elásticas, geles, colírios e suplementos dietéticos/alimentares. As formas farmacêuticas contendo probióticos, devem assegurar a resistência destes microrganismos às condições fisiológicas adversas (por exemplo, a acidez gástrica), garantindo a sua viabilidade e eficácia.

IX. Referências bibliográficas

Abraham, C. e Cho, J. H. (2009). Inflammatory Bowel Disease. *The New England Journal of Medicine*, vol. 361, pp. 2066-2078.

Amaral, M. H. *et al.* (2014). Development of probiotic dosage forms. *In: Amaral, M. H. et al. (Eds.). Probiotic bacteria: fundamentals, therapy and technological aspects*, 1ª Edição. Pan Stanford Publishing, pp. 228-259.

Amores, A. *et al.* (2004). Probióticos. *Rev. Esp. Quimioterap.* vol. 17, pp. 131-139.

Antunes, A. E. C. *et al.* (2007). Probiotics: health promoting agents. *Nutriri: J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, vol. 32, pp. 103-122.

Arribas, B. *et al.* (2008). Therapeutic applications of probiotics. *Ars Pharm*, vol. 49, pp. 5-30.

Badaró, A. C. L. *et al.* (2009). Probiotics foods: application as the promoters of the human health – part 2. *Revista Digital de Nutrição*, vol. 3, pp. 396-416.

Barbosa, F. H. F. *et al.* (2011). Probióticos – microorganismos a favor da vida. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, vol. 11, pp. 11-21.

Bermudez, B. M. *et al.* (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, vol. 61, pp. 160-174.

Bernstein, C. N. e Shanahan, F. (2008). Disorders of a modern lifestyle-reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut*, vol. 57, pp. 1185-1191.

Bomba, A. *et al.* (2002). The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 13, pp. 121-126.

Canani, R. B. *et al.* (2007). Probiotics for treatment of acute diarrhea in children: randomized clinical trial of five different preparations. *B. M. J.*, vol. 335. Pp. 340-342.

Collado, M. C., Hernández, M. e Sanz, Y. (2005). Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains. *Journal of Food Protection®*, vol. 68, pp. 1034-1040.

Coppola, M. M. e Turnes, C. G. (2004). Probiotics and immune response. *Cienc. Rural*, vol.34, pp. 1297-1303.

Costa, G. N. e Miglioranza, L. H. S. (2013). Micro-organismos probióticos: caracterização de linhagens e seus efeitos no hospedeiro. *Boletim do centro de pesquisa de processamento de alimentos*, vol. 31, pp.195-206.

Cummings, J. H. e Macfarlane, G. T. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br. J. Nutr.*, vol. 87, pp.145-151.

Darfeuille-Michaud, A. *et al.* (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, vol. 127, pp. 412-421.

Denipote, F. G., Trindade, E. B. S. de M. e Burini, R. C. (2010). Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer. *Arq. Gastroenterol.*, vol. 47, pp. 93-98.

Erickson, L. K. e Hulbark, N. C. (2000). Probiotic immunomodulation in health and disease. *The Journal of Nutrition*, vol. 130, pp. 403S- 409S.

Fiocchi, C. e Souza, H. S. P. de (2012). Microbiota Intestinal - Sua importância e função. *Jornal Brasileiro de Medicina*, vol. 100, pp. 30-38.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [Em linha]. Disponível em <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>>. [Consultado em 01/03/2015].

Franco, C. C. *et al.* (2007). The VSL #3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology*, vol. 292, pp. G315-G322.

Fuller, R. (1997). *Probiotics 2: applications and practical aspects*. Wiltshire, Springer.

Goel, A. K. *et al.* (2006). Probiotics: microbial therapy for health modulation. *Defence Science Journal*, vol. 56, pp. 513-529.

Gomes, A. M. P. e Malcata, F. X. (1999). Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e aplicações tecnológicas. *Boletim de Biotecnologia*, vol. 64, pp. 12-22.

Graham, Y. D. e Fischbach, L. (2010). *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistant. *British Society of Gastroenterology*, vol. 59, pp. 1143-1153.

Guarner, F. *et al.* (2012). World Gastroenterology Organisation global guidelines: probiotics and prebiotics. *Journal Of Clinical Gastroenterology*, vol. 46, pp. 468-481.

Gupta, G. (2011). Probiotics and periodontal health. *Journal of Medicine and Life*, vol.4, pp. 387- 394.

Hara, A. M. O. e Shanahan F. (2007). Gut microbiota: mining for therapeutic potential. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 5, pp. 274-284.

He, T. *et al.* (2006). Colonic fermentation may play a role in lactose intolerance in humans. *J. Nutr.*, vol. 136, pp. 58-63.

Howarth, G. S. e Wang, H. (2013). Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients*, vol. 5, pp. 58-81.

INFARMED. (2009). *Farmacopeia Portuguesa 9*. Lisboa.

Jonkers, D. e Stockbrugger, R. (2003). Probiotics and inflammatory bowel disease. *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 96, pp. 167-171.

Karkow, F. J. A., Faintuch, J. e Karkow, A. G. M. (2007). Probiotics: medical perspectives. *Rev. AMRIGS*, vol. 51, pp. 38-48.

Kligher, B. e Cohrssen, A. (2008). Probiotics. *American Family Physician*, vol.78, pp. 1073-1078.

Lesbros-Pantoflickova, D., Corthésy-Theulaz, I. e Blum, A. L. (2007). *Helicobacter pylori* and probiotics. *The Journal of Nutrition*, vol. 137, pp. 812S-818S.

Liong, M. T. e Shah, N. P. (2004). Acid and bile tolerance and the cholesterol removal ability of bifidobacteria strains. *Bioscience Microflora*, vol.24, pp. 1-10.

Mackowiak, P. A. (2013). Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in Public Health*, vol. 1, pp. 1-2.

Ng, S. C. *et al.* (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Basic Science Review*, vol. 15, pp. 300-310.

Phillipson, M. *et al.* (2008). The gastric mucus layers constituents and regulation of accumulation. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 295, pp. 806-816.

Rafter, J. (2003). Probiotics on colon cancer. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, vol. 17, pp. 849-859.

Rao, R. K. e Samak, G. (2013). Protection and restitution of gut barrier by probiotics: nutritional and clinical implications. *Curr Nutr Food Sci.*, vol.9, pp. 99-107.

Reig, A. L. de Las C. e Anesto, J. B. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Aliment. Nutr.*, vol.16, pp.63-80.

Rieder, F. *et al.* (2012). Results of the 2nd Scientific Workshop of the European Crohn and Colitis Organisation (III): basic mechanisms of intestinal healing. *Journal of Crohn and Colitis*, vol. 6, pp. 373-385.

Roberfroid, M. B. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *American Society for Nutrition*, vol. 137, pp. 830S-837S.

Ross, J. e Boucher, P. (2012). Considerations in the development of live biotherapeutic products for clinical use. *Current Issues Molecular Biology*, vol. 10, pp. 13-16.

Saad, S. M. I. (2006). Probiotics and prebiotics: the state of art. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 42, pp. 1-16.

Stamatova, I. e Meurman, J. H. (2009). Probiotics: health benefits in the mouth. *American Journal of Dentistry*, vol. 22, pp. 329-338.

Stefe, C. de A., Alves, M. A. R. e Ribeiro, R. L. (2008). Probióticos, prebióticos e simbióticos: artigo de revisão. *Saúde e ambiente em revista*, vol. 3, pp. 16-33.

Souza, F. S. *et al.* (2010). Prebiotics, probiotics and symbiotics on prevention and treatment of allergic diseases. *Rev. Paul. Pediatr.*, vol. 28, pp. 86-97.

Vesa, T. H., Marteau, P. e Korpela, R. (2000). Lactose intolerance. *J. Am. Coll. Nutr.*, vol.19, pp. 165S-175S.

Vítor, J. M. B. e Vale, F. F. (2011). Alternative therapies for *Helicobacter pylori*: probiotics and phytomedicine. Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology, vol. 63, pp. 153-164.

Vrese, M. de *et al.* (2001). Probiotics – compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 73, pp. 421S-429S.

Willey, J. M., Sherwood, L. M. e Woolverton, C. J. (2009). Nonspecific (innate) Host Resistance. In: Willey, J. M., Sherwood, L. M. e Woolverton, C. J. (Eds.). *Prescott's Principles of Microbiology*, 7ª Edição. McGraw-Hill Higher International Education, pp. 656-677.

Williams, N. T. (2010). Probiotics. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, vol. 67, pp. 449-458.

Willing, B. *et al.* (2009). Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 15, pp. 653-660.

Wollowski, I., Rechkemmer G. e Pool-Zobel, B. L. (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 73, pp. 451S-455S.

Wolvers, D. *et al.* (2010). Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. *The Journal of Nutrition*, vol. 140, pp. 690S-697S.

Zhong, Y. *et al.* (2004). The role of colonic microbiota in lactose intolerance. *Dig. Dis. Sci.*, vol. 49, pp. 78-83.

Zhou, Y. K. *et al.* (2012). Effects of *Lactobacillus plantarum* on gut barrier function in experimental obstructive jaundice. *World J. Gastroenterol*, vol. 18, pp. 3977-3991).

Zhu, Y. (2011). Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Letters*, vol. 309, pp. 119-127.