

Yelitza Andreina Jesus Gelvez

Probióticos orais

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Yelitza Andreina Jesus Gelvez

Probióticos orais

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Yelitza Andreina Jesus Gelvez

Probióticos orais

Atesto a originalidade deste trabalho:

(Yelitza Andreina Jesus Gelvez)

Projeto de pós-graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa

como parte dos requisitos para obtenção

do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Resumo

Os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Neste sentido, o uso de probióticos tem sido recomendado pelos clínicos.

Entre os diferentes locais do organismo que têm sido descritos como benéficos para a aplicação de probióticos está a cavidade oral. Estão publicados diversos estudos clínicos que demonstram a diminuição da prevalência de inflamações gengivais (periodontites), halitose e candidíases orais em adultos que frequentemente mastigaram gomas contendo probióticos. Por outro lado, a diminuição das cáries dentárias em crianças que consomem regularmente gomas à base de probióticos também tem sido referida.

A caracterização das espécies probióticas é fundamental para a obtenção de produtos contendo estes microrganismos. Nesse sentido, a análise de alguns parâmetros é de extrema importância, tais como a segurança, eficácia e a viabilidade das estirpes probióticas. Entre os microrganismos mais utilizados em probióticos destacam-se as bactérias dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Os probióticos utilizados na terapêutica são incorporados em alimentos e formas de dosagem adequadas. Produtos lácteos e formas farmacêuticas orais são exemplos de veículos utilizados para a dispensa de probióticos, tendo as últimas demonstrado uma maior eficácia.

Este trabalho tem como objetivo efetuar uma revisão bibliográfica relativa ao estado da arte das diferentes formas farmacêuticas orais à base de probióticos, dando exemplos de produtos comercializados.

Palavras-chave: probióticos; cavidade oral; *Bifidobacterium*; *Lactobacillus*; probióticos recombinantes; periodontite; cárie dentária; halitose; candidíase oral; produtos lácteos; formas farmacêuticas orais

Abstract

Probiotics are defined as “live microorganisms that when administrated in adequate amounts confer health benefits to the host”. In this sense, the use of probiotics has been recommended by physicians.

Among the different parts of the body that have been described as beneficial for the application of probiotics is the oral cavity. There are published several clinical studies demonstrating a decrease in the prevalence of gingival inflammation (periodontitis), halitosis and oral candidiasis in adults who often chewed gum containing probiotics. On the other hand, the reduction of dental caries in children who regularly consume chewing gum based on probiotics have also been reported.

The characterization of probiotic species is essential to obtain products containing these microorganisms. For this, the analysis of some parameters is very important, such as, safety, effectiveness and viability of probiotic strains. The most widely used probiotic microorganisms include the bacteria *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

Probiotics used in therapy are incorporated into suitable dosage forms. Dairy food products and oral dosage forms are examples of vehicles for dispensing probiotics. The latter have shown greater efficacy.

This work purpose to make a literature review of the different oral dosage forms based on probiotics, giving examples of products in the market.

Keywords: probiotics; oral cavity; *Bifidobacterium*; *Lactobacillus*; recombinant probiotics; periodontitis; dental cavity; halitosis; oral candidiasis; dairy products; oral dosage forms

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus Pais por todo o amor, apoio, confiança e empenho durante todo o meu percurso académico.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Ana Catarina da Silva pela sua dedicação, disponibilidade, paciência e simpatia demonstradas para a elaboração deste trabalho. Também queria prestar o meu agradecimento à Professora Doutora Cristina Abreu pela sua coorientação.

À minha família agradeço todo o apoio e carinho tanto a nível pessoal como académico.

Agradeço igualmente às minhas amigas de curso pela amizade criada durante este percurso.

Índice

I. Introdução	1
II. Doenças infecciosas orais	3
2.1. Cárie dentária	6
2.1.1. <i>Streptococcus mutans</i>	7
2.1.2. <i>Lactobacillus spp.</i>	8
2.2. Periodontite	11
2.3. Halitose	15
2.4. Candidíase oral	17
III. Estirpes probióticas usadas para fins terapêuticos	20
3.1. <i>Bifidobacterium</i>	22
3.2. <i>Lactobacillus</i>	23
3.3. Probióticos Recombinantes.....	24
IV. Sistemas de dispensa de probióticos orais	27
4.1. Sistemas convencionais	27
4.2. Formas farmacêuticas contendo probióticos.....	29
4.2.1 Póis	30
4.2.2. Cápsulas	31
4.2.3. Comprimidos.....	33
4.2.4. Gomas para mascar medicamentosas	35
V. Conclusões	37
VI. Perspetivas futuras	39
VII. Bibliografia	41

Índice de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de probióticos e os seus efeitos na saúde oral.....	5
Tabela 2. Exemplos de estirpes probióticas pertencentes aos géneros <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacillus</i>	21
Tabela 3. Exemplos de formas farmacêuticas comercializadas à base de pós contendo probióticos	31
Tabela 4. Exemplos de cápsulas comercializadas contendo probióticos.....	33
Tabela 5. Exemplos de comprimidos mastigáveis comercializados contendo probióticos	35

Índice de Figuras

Figura 1. Possíveis mecanismos de ação dos probióticos na cavidade oral	4
Figura 2. Esquematização de um biofilme oral.	6
Figura 3. Possíveis mecanismos através dos quais a produção de bacteriocinas pode contribuir para a funcionalidade dos probióticos	12
Figura 4. Imagem de microscopia eletrônica de um biofilme de “Candida”	18
Figura 5. Imagem de microscopia eletrônica de bactérias probióticas do género <i>Bifidobacterium</i>	22
Figura 6. Imagem de microscopia eletrônica de bactérias probióticas do género <i>Lactobacillus</i>	23
Figura 7. Esquematização simples da técnica de DNA recombinante	25
Figura 8. Exemplos de sistemas convencionais de dispensa de probióticos	28
Figura 9. Formas farmacêuticas orais: Imagem ilustrativa do modo de administração de um pó oral.....	30
Figura 10. Formas farmacêuticas orais: Imagem ilustrativa de cápsulas duras de gelatina	32
Figura 11. Formas farmacêuticas orais: Exemplos de comprimidos.....	34
Figura 12. Formas farmacêuticas orais: Imagem ilustrativa de gomas de mascar à base de gelatina.....	35

Lista de Abreviaturas

BAL - Bactérias do Ácido Lático

C.albicans - *Candida albicans*

CVS - Compostos Voláteis Sulfurados

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

FP 9 - Farmacopeia Portuguesa 9

GRAS - *Generally Recognized As Safe*

HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose

LGG - *Lactobacillus rhamnosus GG*

L.salivarius WB 21 - *Lactobacillus salivarius WB 21*

P.gingivalis - *Porphyromonas gingivalis*

RAR - Raspagem e Alisamento Radicular

S.mutans - *Streptococcus mutans*

UFC - Unidade Formadora de Colónias

W.cibaria - *Weissela cibaria*

I. Introdução

As doenças infecciosas representam uma das dez principais causas de morte em Portugal (Bordalo *et al.*, 2015). Para este fator contribuem o incremento da resistência aos antibióticos por parte dos microrganismos, juntamente com o aumento de estirpes multirresistentes, que continuam a ser um problema global de saúde pública. Deste modo, têm sido usadas diferentes estratégias para solucionar este problema (Salas e Palacios, 2010).

O conceito de terapia bacteriana, que envolve o uso de microrganismos benéficos para a saúde na cura de doenças ou de forma a favorecer o sistema imunológico, foi introduzido, pela primeira vez, no início do século XX (Amaral *et al.*, 2014). Neste sentido, surge o conceito de probióticos, que de acordo com a *Food and Agriculture Organization of United Nations/ World Health Organization* (FAO/WHO) podem ser definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Morelli e Capurso, 2012).

Considerados como agentes terapêuticos alternativos, os probióticos têm sido amplamente estudados pelos seus efeitos de promoção da saúde (Meurman e Stamatova, 2007). Estes microrganismos podem atuar de diversas formas, tais como (Vieira *et al.*, 2013): através do fornecimento de nutrientes e de cofatores, de forma a competirem diretamente com os agentes patogénicos; através da interação com os fatores de virulência dos organismos nocivos; pela estimulação da resposta imunitária do hospedeiro.

Tradicionalmente o campo principal de investigação dos probióticos está associado ao trato gastrointestinal, com o objetivo de prevenir e/ou tratar doenças. No entanto, durante a última década, vários investigadores sugerem a utilização benéfica dos probióticos na cavidade oral (Meurman e Stamatova, 2007).

Vários estudos têm sido realizados no sentido de desenvolver produtos contendo probióticos de estirpes específicas, tendo sido preparados em diferentes formas farmacêuticas, tais como, pós, cápsulas, comprimidos e gomas para mascar medicamentosas (Amaral *et al.*, 2014).

Através da preparação de formas farmacêuticas orais contendo probióticos foram publicados diversos estudos clínicos, que demonstram a diminuição da prevalência de afeções orais mais frequentes, como a cárie dentária e a periodontite. Além disso, novas investigações têm surgido indicando que os probióticos podem também beneficiar condições orais, tais como, halitose e infecções fúngicas por *Candida albicans* (Salas e Palacios, 2010).

As estirpes bacterianas contendo propriedades probióticas pertencem, principalmente, aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Meurman e Stamatova, 2007). As bactérias pertencentes a estes gêneros são, geralmente, consideradas como seguras (*generally recognized as safe, GRAS*), visto que podem residir no organismo sem causar qualquer malefício e, por outro lado, são consideradas como parte da microbiota humana normal (Stamatova e Meurman, 2009).

O presente trabalho tem como objetivo, numa primeira fase, fazer uma breve abordagem às infecções orais mais prevalentes, salientando o uso de probióticos como sistemas eficazes para o tratamento de patologias da cavidade oral. Numa segunda fase, é efetuada uma revisão bibliográfica relativa ao estado da arte das diferentes formas de administração de probióticos, em particular das formas farmacêuticas orais, dando exemplos de produtos comercializados.

Para elaborar este trabalho, recorreu-se à pesquisa e análise de artigos científicos publicados no Google académico, entre outros motores de busca, como Pubmed, b-on e ScienceDirect. Além disso, foram realizadas pesquisas e análises de livros impressos e no Google livros. Algumas das palavras-chave usadas na pesquisa foram: probióticos; cavidade oral; cárie dentária; periodontite; mau hálito; candidíase oral; produtos láteos e formas farmacêuticas orais. A pesquisa realizou-se no espaço temporal compreendido entre os anos 2003 e 2016.

II. Doenças infecciosas orais

A cavidade oral é um ecossistema complexo no qual se desenvolve uma microbiota diversa (Haukioja, 2010). A presença de nutrientes, resíduos alimentares e secreções faz com que a boca seja um habitat favorável para uma grande variedade de microrganismos, principalmente por bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Veillonella* e *Lactobacillus* e, em parte, por algumas leveduras. Para além disso, podem predominar na microbiota oral, bactérias anaeróbias dos gêneros *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Fusobacterium*, dadas as condições anaeróbias existentes a nível gengival (Sukkarwalla *et al.*, 2013).

As infeções da cavidade oral são uma das mais prevalentes formas de infeção nos humanos, das quais a cárie dentária e a periodontite têm um impacto social bastante significativo (Koduganti *et al.*, 2011).

Apesar das diferenças na composição e na atividade metabólica entre as comunidades microbianas e o hospedeiro, diversos fatores contribuem para que se verifique um estado de homeostasia entre ambos (Salas e Palacios, 2010). Desta forma, na microflora da cavidade oral podem residir espécies com propriedades nutricionais (por exemplo, estirpes sacarolíticas ou proteolíticas), atmosféricas (tais como a presença de microrganismos aeróbios, anaeróbios, microaerofílicos ou capnofílicos), e físico-químicas (pH, temperatura, cofatores) distintas, sendo capazes de estabelecer um estado de equilíbrio no organismo do hospedeiro (Bonifait *et al.*, 2009).

No entanto, se o ambiente local for perturbado, por consequência da alteração de alguma das propriedades favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos, os agentes patogénicos potenciais podem ganhar uma vantagem competitiva, levando ao surgimento de infeções orais (Stamatova e Meurman, 2009). Neste sentido, o uso de probióticos demonstrou ser eficaz para a prevenção e/ou tratamento de afeções desta etiologia, de forma a prevenir o crescimento da microbiota nociva ou através da modulação da resposta imunitária da mucosa da cavidade oral (Vieira *et al.*, 2013).

A Figura 1 demonstra os possíveis mecanismos de ação dos microrganismos com propriedades probióticas na cavidade oral.

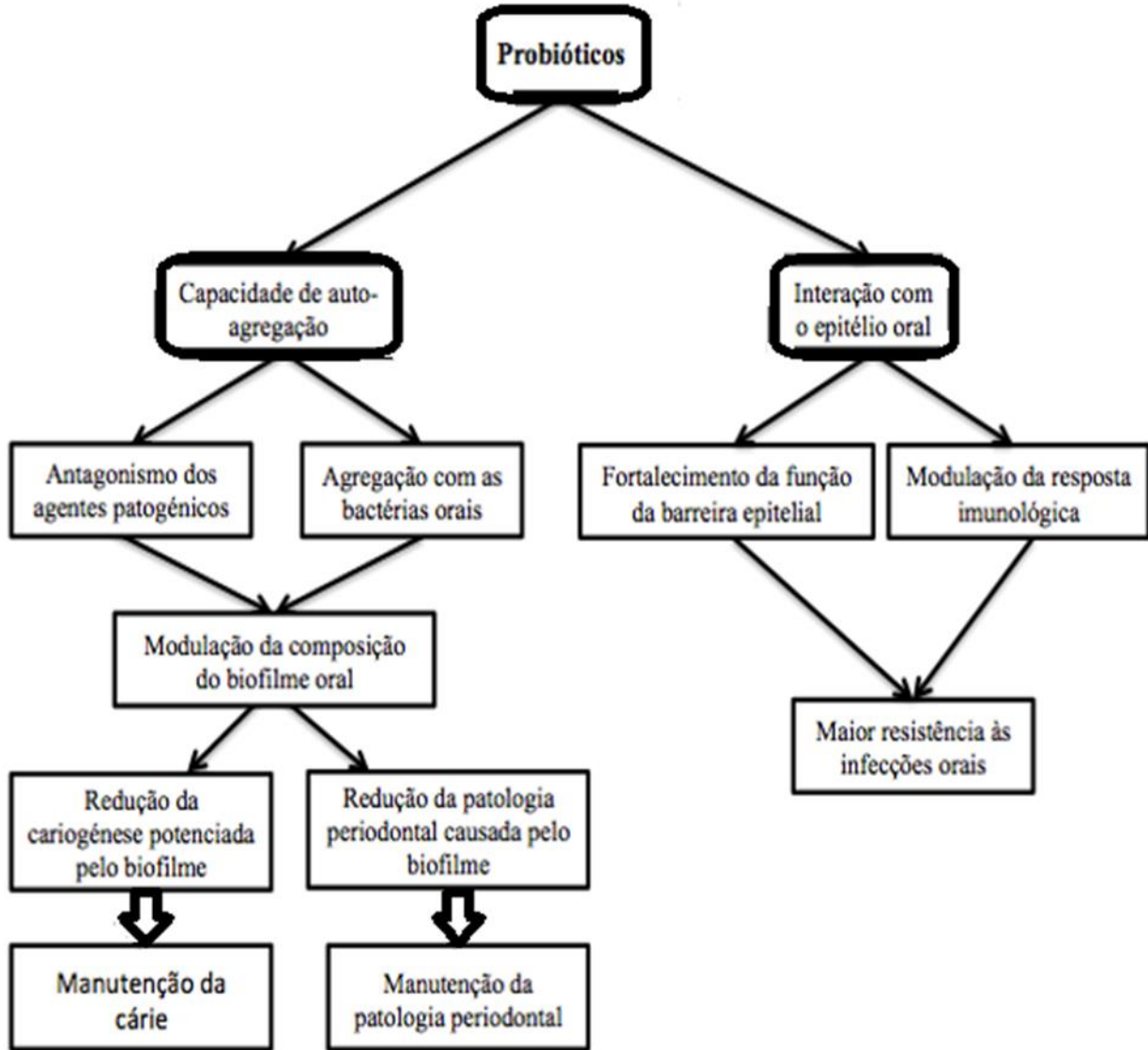


Figura 1. Possíveis mecanismos de ação dos probióticos na cavidade oral (adaptada de Stamatova e Meurman, 2009).

A Tabela 1 apresenta exemplos de microrganismos com propriedades probióticas e os seus principais efeitos na saúde oral.

Tabela 1. Exemplos de probióticos e os seus efeitos na saúde oral (adaptada de Deogade, 2015).

Espécies de Probióticos	Efeito	Meios de veiculação
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730 <i>L. reuteri</i> ATCC PTA 5289	Redução dos níveis salivares de <i>S. mutans</i>	Pastilhas elásticas
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Redução dos níveis salivares de <i>S. mutans</i>	Comprimidos
<i>L. rhamnosus</i> GG, ATCC 53103	Redução do risco de colonização elevada por <i>S. mutans</i>	Queijo
<i>L. rhamnosus</i> GG, ATCC 53103	Redução dos níveis salivares de <i>S. mutans</i>	Leite
<i>Bifidobacterium</i> DN – 173 010	Supressão do surgimento de pigmentos escuros de bactérias presentes em amostras de saliva associadas à halitose	Iogurtes
<i>S. salivarius</i> K12	Redução da placa bacteriana e da periodontite	Elixires
<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC53103) <i>L. rhamnosus</i> LC705	Melhoria dos sinais e sintomas da inflamação periodontal	Queijo

2.1. Cárie dentária

A cárie dentária é uma das infecções mais frequentes no ser humano (Petersen e Ogawa, 2012). Trata-se de um processo patológico complexo, podendo ser transmissível e de origem infecciosa, que se caracteriza por um desequilíbrio bioquímico (Saha *et al.*, 2012).

Apesar de ter origem multifatorial, existem várias bactérias cariogênicas, como por exemplo, *Streptococcus mutans* e várias espécies do género *Lactobacillus* (Jindal *et al.*, 2012). O efeito prejudicial manifesta-se através da produção de ácido por parte destas bactérias que desmineralizam o dente. Estas bactérias são parte integrante de um biofilme designado por placa bacteriana (Anderson e Shi, 2006). A formação do biofilme inicia-se pela aderência e proliferação de bactérias, nomeadamente cariogênicas produtoras de ácidos, os quais interagindo com o esmalte e a dentina, podem provocar a sua desmineralização. Diferentes tipos de bactérias encontram-se em interação no biofilme (Figura 2), formando-se um ecossistema, predisponente ao desenvolvimento da cárie (Nishihara *et al.*, 2014).

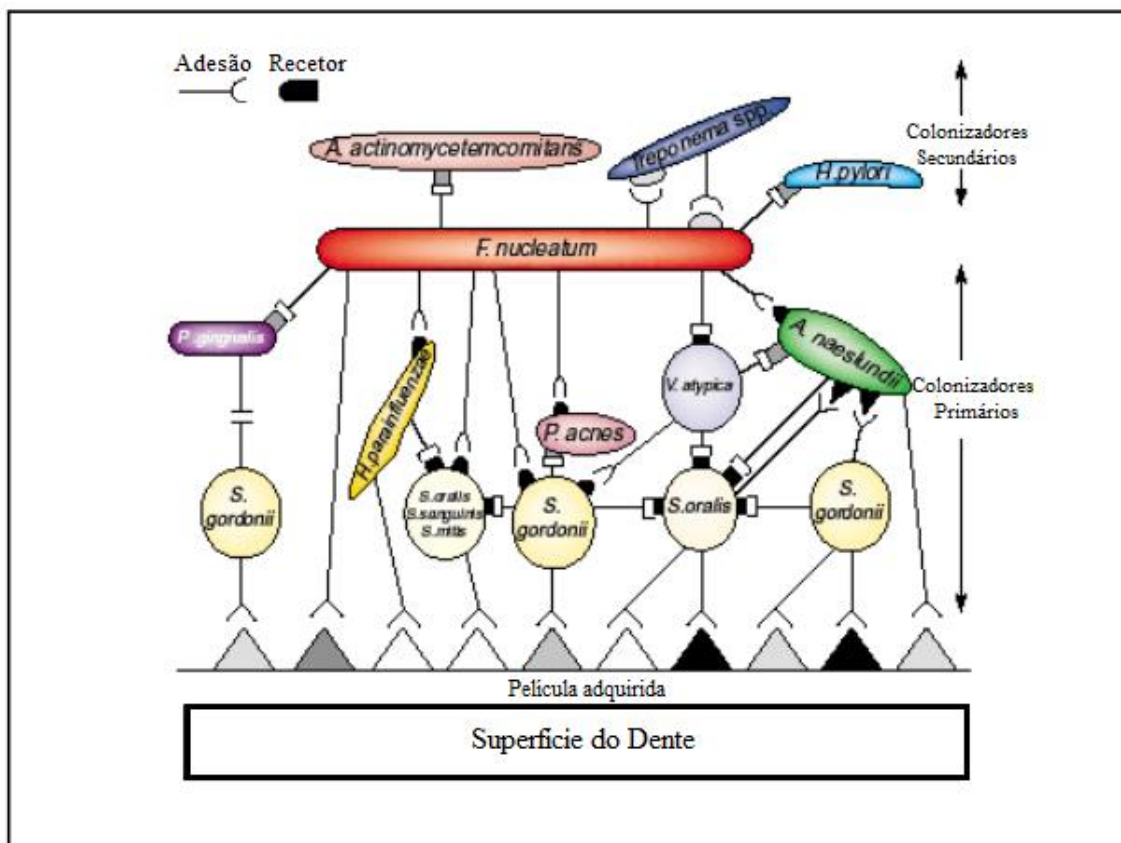


Figura 2. Esquemática de um biofilme oral (adaptada de Darby e Walsh, 2014).

O desenvolvimento deste meio ambiente é caracterizado pelo aumento de bactérias cariogênicas residentes, que são capazes de alterar a homeostasia da comunidade bacteriana, mediante a alteração de condições ambientais. O consumo excessivo de alimentos açucarados e algumas variações nos parâmetros fisiológicos, tais como, a diminuição do pH da cavidade oral e a presença de alterações no fluxo e na qualidade da saliva são exemplos de alguns dos fatores que levam à alteração do ambiente da cavidade oral (Jindal *et al.*, 2012). Por outro lado, a síntese de polissacarídeos extracelulares nomeadamente, de glucanos produzidos por bactérias cariogênicas, permite a sua aderência à superfície do dente. Deste modo, a atividade das glucosiltransferases, enzimas que sintetizam os glucanos, constitui um fator de virulência para o desenvolvimento de cáries (Marsh, 2006).

Considerando o grupo *mutans*, representado pelo *S. sobrinus* e *S. mutans*, como o principal agente causador de cárie dentária, a presença de contagens salivares elevadas destes agentes cariogênicos está associada ao aumento do risco de cárie, assim como, ao incremento na progressão da infeção (Koduganti *et al.*, 2011). Deste modo, vários estudos têm sido realizados, tendo em conta a administração de probióticos como forma de reduzir os níveis de *S. mutans* na cavidade oral.

2.1.1. *Streptococcus mutans*

O *S. mutans* foi descoberto por Clarke em 1924, mas poucas investigações relativamente às suas propriedades foram realizadas durante esse período. Em 1960 surgiu um interesse por parte de Fitzgerald e Keyes no estudo deste microrganismo, tendo sido observada uma correlação positiva entre os níveis elevados de *S. mutans* e o desenvolvimento de cárie dentária (Berkowitz, 2006). São estreptococos do tipo Gram positivo, anaeróbios facultativos, microaerofílicos, acidogênicos e acidúricos, capazes de formar polissacarídeos extracelulares (Kamiya *et al.*, 2011).

Este microrganismo é considerado como o principal agente cariogênico devido às seguintes propriedades particulares (Cheon *et al.*, 2013):

1. Capacidade de colonização da superfície dentária através da adesão a superfícies não descamativas, como por exemplo, os dentes;
2. Produção de polissacarídeos extracelulares bacterianos, como os glucanos, a partir da sacarose, o que permite a formação de um biofilme espesso;
3. Capacidade acidogénica onde a produção de ácido láctico pode provocar a desmineralização da superfície dos dentes, levando a um maior risco no desenvolvimento da cárie dentária;
4. Capacidade acidúrica que permite a sobrevivência deste microrganismo em pH ácido, podendo desenvolver as suas atividades metabólicas, sem que ocorram alterações nas suas propriedades;
5. Capacidade de acumulação de polissacarídeos intracelulares de glicose a partir de hidratos de carbono provenientes da dieta do hospedeiro. Estes polímeros são metabolizados quando há uma escassa produção de açúcares exógenos, resultando na formação de ácido láctico;
6. Capacidade elevada de fermentação de hidratos de carbono, incluindo manitol e sorbitol.

2.1.2. *Lactobacillus spp.*

As estirpes de *Lactobacillus* mais comuns da cavidade oral são: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. jensenii*, *L. brevis*, *L. salivarius* e *L. gasseri*. Os lactobacilos são divididos em dois grupos principais: homofermentativo, que no processo de fermentação da glucose produzem principalmente ácido láctico, por exemplo *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*; heterofermentativo, que em adição ao ácido láctico produzem acetato, etanol e dióxido de carbono, por exemplo *Lactobacillus fermentum* (Karpiński e Szkaradkiewicz, 2013).

Os lactobacilos são normalmente isolados de lesões de cárie profundas. Estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre a colonização por *Lactobacillus* e a quantidade de hidratos de carbono presentes na cavidade oral. São considerados microrganismos pioneiros na progressão de cáries, especialmente a nível da dentina. Recentemente, é conhecido que os lactobacilos também demonstram ação antagonista contra agentes patogénicos periodontais, tais como, *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*, inibindo o seu crescimento. Esta ação consiste na produção de ácidos, principalmente do ácido láctico, na redução do pH do meio ambiente, na libertação de peróxido de hidrogénio e na presença de bacteriocinas. Assim, *Lactobacillus spp.* apesar de apresentarem uma atividade cariogénica, também desempenham um papel fundamental na manutenção do equilíbrio da microbiota oral (Karpiński e Szkaradkiewicz, 2013).

Os probióticos podem aderir à mucosa oral, estabelecendo um efeito cariostático, através da integração no biofilme, do qual fazem parte as bactérias cariogénicas (Anderson e Shi, 2006).

Diversos estudos clínicos foram realizados após as experiências *in vitro* terem demonstrado que determinadas estirpes probióticas têm a capacidade de suprimir o crescimento de *S. mutans*, mas também de outros estreptococos orais com potencial cariogénico (Stamatova e Meurman, 2009).

O primeiro estudo randomizado, duplo cego e controlado por placebo ocorreu na Finlândia. Teve como principal objetivo avaliar se o consumo de leite contendo a estirpe probiótica *Lactobacillus rhamnosus GG* seria benéfico para reduzir a contagem salivar do principal agente cariogénico, *S. mutans*. Para este efeito, quinhentas e noventa e quatro crianças de um aos seis anos de idade foram testadas, tendo consumido leite contendo *L. rhamnosus GG* durante um período de sete meses. Após a análise dos resultados do estudo, foi concluído que o consumo de leite contendo a bactéria probiótica *L. rhamnosus GG* foi benéfico na redução da contagem salivar de *S. mutans*, tendo sido observado, por consequência, uma redução significativa do risco ao desenvolvimento de cárie dentária. Este efeito benéfico pode dever-se à incapacidade de *L. rhamnosus GG* em fermentar hidratos de carbono presentes no leite, como a sacarose e a lactose, que servem de substrato para *S. mutans* (Saraf *et al.*, 2010).

Num outro estudo foi avaliada a capacidade profilática de diferentes espécies probióticas, através da ingestão diária de queijo contendo *L. rhamnosus GG* e *L. rhamnosus LC705*. Apesar da curta duração e do número relativamente pequeno de participantes no estudo,

verificou-se uma redução significativa na contagem salivar de *S. mutans*, após o consumo de queijo probiótico (Haukioja, 2010).

A estirpe probiótica *Bifidobacterium DN-173 010*, ingerida uma vez por dia, veiculada em iogurtes, demonstrou uma redução significativa de *S. mutans* salivar. A administração simultânea das estirpes probióticas, *LGG* e *Bifidobacterium DN-173 010*, demonstrou um efeito sinérgico na contagem salivar de *S. mutans* (Jindal *et al.*, 2012).

Bifidobacterium Bb.12 quando veiculada em gelados, ingeridos num período máximo de dez dias, também revelou ser eficaz na diminuição do desenvolvimento de cárie dentária, pela redução dos níveis de *S. mutans* na cavidade oral (Marsh, 2006).

A redução de *S. mutans* nestes estudos pode ser explicada pela capacidade das estirpes probióticas inibirem a aderência bacteriana e/ou pelo seu efeito bactericida com atividade seletiva contra *Streptococcus mutans* que estão presentes nos produtos lácteos.

Em suma, as estirpes bacterianas probióticas com características divergentes, quando inseridas em veículos adequados às suas propriedades, demonstraram ser benéficas na prevenção do risco de desenvolvimento de cárie, principalmente através da redução do principal agente cariogénico, *S. mutans*.

2.2. Periodontite

A infecção periodontal ou periodontite representa uma das afeções orais mais comuns, sendo o resultado final da resposta do hospedeiro à ação complexa de um grupo de bactérias periodontais, predominantemente, bactérias anaeróbias, Gram negativas, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, entre outras (Deepa e Mehta, 2009). A periodontite é uma patologia que envolve os tecidos de suporte dos dentes, que resulta numa migração apical progressiva do ligamento periodontal e osso de suporte (Lindhe *et al.*, 2003).

Esta condição, quando severa, pode levar ao desenvolvimento de várias patologias sistêmicas, como por exemplo, a diabetes *mellitus* (Salas e Palacios, 2010).

O fator etiológico primário para a maioria das doenças infecciosas orais está relacionado com a formação de um biofilme nos tecidos duros e moles na cavidade oral (Marsh, 2006). Uma incorreta saúde oral conduz a alterações na comunidade microbiana, levando à acumulação de bactérias no biofilme, podendo desencadear inflamações periodontais (Yanine *et al.*, 2013). Deste modo, a prevenção e/ou tratamento da periodontite tem por objetivo a redução dos agentes patogénicos responsáveis pelo desenvolvimento desta afeção, assim como o fortalecimento da barreira epitelial, contribuindo para uma menor suscetibilidade à infecção (Petersen e Ogawa, 2012).

As bactérias probióticas que geralmente são consideradas como seguras (*generally recognized as safe, GRAS*) podem ser úteis contra o desenvolvimento da periodontite, favorecendo a saúde oral (Stamatova e Meurman, 2009).

Uma das principais formas de atuação dos probióticos orais consiste na competição contra os agentes patogénicos, de forma a impedir o seu crescimento, bem como na produção de substâncias antimicrobianas, como por exemplo, bacteriocinas (Koduganti *et al.*, 2011). Correspondem a um grupo de péptidos antimicrobianos produzidos por bactérias e *archaea*. Tradicionalmente, a produção de bacteriocinas foi considerada uma característica importante na seleção de estirpes probióticas, mas recentemente, estudos têm demonstrado o impacto da produção destes péptidos sobre a capacidade de uma

estirpe probiótica competir contra as comunidades microbianas complexas e/ou influenciar benéficamente a saúde do hospedeiro. As bacteriocinas podem facilitar a introdução de probióticos na microbiota (Figura 3 - (A)), inibir diretamente a invasão de agentes patogênicos (Figura 3 - (B)) ou modular a composição da microbiota e influenciar o sistema imunitário do hospedeiro (Figura 3 - (C)).

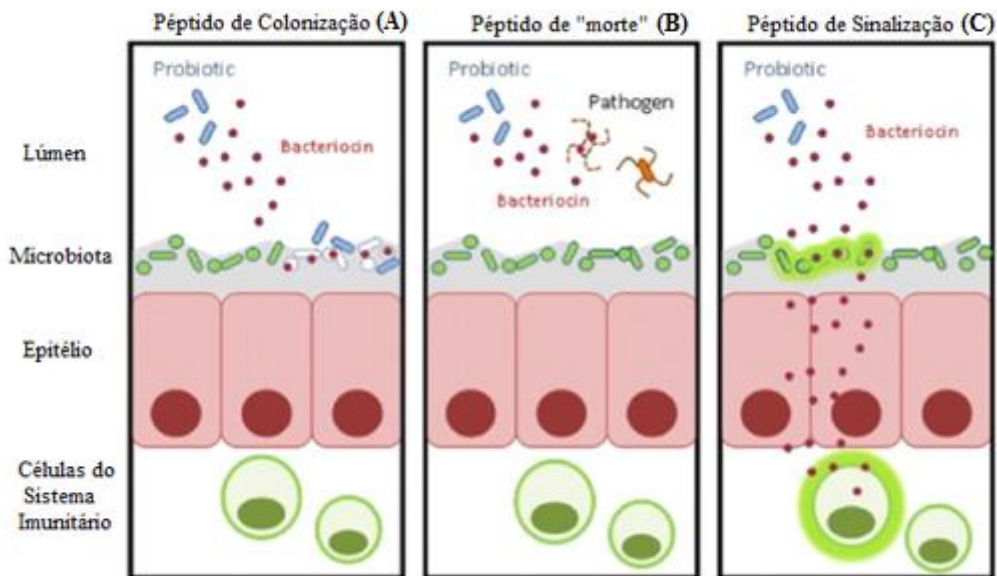


Figura 3. Possíveis mecanismos através dos quais a produção de bacteriocinas pode contribuir para a funcionalidade dos probióticos: (A) - As bacteriocinas podem atuar como péptidos de colonização, facilitando a competição de probióticos com a microbiota residente; (B) - Podem atuar como péptidos “de morte” aderindo aos agentes patogênicos, eliminando-os diretamente; (C) - Também podem servir como péptidos de sinalização de bactérias e componentes do sistema imunitário (adaptado de Dobson *et al.*, 2012).

Yao e Fine (Yao e Fine, 2014) realizaram um estudo em que foram analisados comprimidos contendo *Bifidobacterium spp.*, que demonstraram apresentar propriedades probióticas para o tratamento da infecção periodontal. O estudo envolveu pacientes, os quais foram divididos em dois grupos distintos, um de teste e um de controle. No grupo de teste foram administrados aos pacientes, via oral, comprimidos contendo *Bifidobacterium spp.* Ao grupo controle foi administrado, também por via oral, Tantum Verde™, uma solução de lavagem oral que contém benzidamina, uma substância com

propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. Foi possível demonstrar que a periodontite foi tratada com os comprimidos contendo probióticos. Para além disso, verificou-se um maior efeito na regularização da microflora oral, através do uso de probióticos, relativamente ao grupo controlo (Salas e Palacios, 2010).

Um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, permitiu avaliar o efeito de gomas de mascar contendo *Lactobacillus reuteri* como tratamento adjuvante da técnica de Raspagem e Alisamento Radicular (RAR) na periodontite crónica. Por raspagem entende-se a remoção de cálculos (tártaro) depositados à superfície dentária, e por alisamento radicular a completa remoção de cálculos mais fortemente aderidos em continuidade com o cimento radicular, bem como as camadas mais superficiais de cimento alterado de modo a deixar a superfície radicular lisa e limpa. O estudo envolveu trinta pacientes com idade a partir dos trinta e cinco anos, que apresentavam periodontite em estado severo. Os pacientes foram distribuídos aleatoriamente pelo grupo de teste (RAR + probióticos) e pelo grupo controlo (RAR + placebo). As gomas de mascar probióticas foram ingeridas duas vezes por dia, durante um período de doze semanas. O ensaio clínico foi monitorizado no início do estudo e três, seis, nove e doze semanas após o tratamento. Após a análise dos resultados foi possível observar, em ambos os grupos, uma redução significativa de todos os parâmetros clínicos associados à periodontite crónica. Assim, conclui-se que a administração oral de gomas de mascar contendo *L. reuteri* demonstrou ser uma terapia complementar à técnica de RAR em pacientes com infeção periodontal crónica. Os agentes periodonto-patogénicos podem ser reduzidos numa fase inicial pela técnica de RAR. Porém, estes microrganismos podem facilmente recolonizar a superfície dentária, causando periodontite severa. A utilização de bactérias benéficas (probióticos) como adjuvantes à RAR, de forma a reduzir a colonização por parte de bactérias patogénicas, que sejam capazes de possuir atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, torna-os microrganismos promissores na prevenção e tratamento de patologias periodontais (Teughels *et al.*, 2013).

Devido à capacidade para diminuir *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria anaeróbia Gram negativa presente na cavidade oral e capaz de originar colónias escuras em agar-sangue, estando associada a diferentes tipos de periodontite, a administração oral de comprimidos contendo *Lactobacillus salivarius* TI 2711 demonstrou ser eficaz na

redução do número de bacilos pigmentados na saliva e na placa subgengival por *P. gingivalis*. Para além disso, também apresentaram um efeito benéfico na redução da inflamação periodontal (Stamatova e Meurman, 2009).

Um ensaio clínico duplamente cego foi realizado em pacientes fumadores e não fumadores, que não apresentavam periodontite em estado severo, tendo-lhes sido administrados comprimidos contendo *Lactobacillus salivarius* WB 21 e/ou xilitol. Os pacientes foram divididos em dois grupos em que, de forma aleatória o grupo um pertencia aos pacientes que ingeriram, via oral, comprimidos contendo a estirpe probiótica *L. salivarius* WB 21 e xilitol e o grupo dois representava o grupo placebo, aos quais apenas foi administrado xilitol. Após a análise dos resultados, concluiu-se que a administração oral de *L. salivarius* WB21 diminuiu significativamente o índice de placa bacteriana, verificando-se, de igual modo, uma redução da profundidade da bolsa periodontal, principalmente nos pacientes fumadores. Foi também possível observar uma diferença significativa nos níveis salivares de lactoferrina, a qual está correlacionada com os parâmetros clínicos de periodontite (Saha *et al.*, 2012).

A lactoferrina é uma proteína presente nas secreções salivares, sendo também componente dos grânulos específicos dos neutrófilos que se libertam quando estas células são ativadas por agentes periodonto-patogénicos, no caso de processos inflamatórios, como a periodontite. Os granulócitos neutrófilos na periodontite têm um papel importante na manutenção da homeostasia entre o hospedeiro e os agentes patogénicos. Os neutrófilos e outras células podem migrar para o tecido gengival inflamado depois da invasão por parte de microrganismos e predominar no tecido conectivo adjacente da bolsa periodontal. Os fatores quimiotáticos são sintetizados e libertados na área da inflamação, os quais podem derivar tanto dos agentes patogénicos periodontais como do hospedeiro. A interação da lactoferrina com os organismos periodonto-patogénicos pode ser um elemento importante para a defesa do hospedeiro contra a periodontite e por esta razão tem sido estudada a sua capacidade citotóxica sobre alguns microrganismos, em que demonstrou atividade sobre, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermediae* e *Prevotella nigrescens*, em concentrações fisiológicas no ambiente secretor da cavidade oral (Rivera *et al.*, 2011).

Apesar do campo de investigação dos probióticos para melhorar a condição periodontal ser recente, vários estudos têm demonstrado o uso benéfico dos probióticos na redução desta prevalente infecção (Matsubara *et al.*, 2016b).

2.3. Halitose

Halitose ou mau hálito é uma condição que afeta grande parte da população. Caracteriza-se por um desconforto provocado pela exalação de odores desagradáveis provenientes da cavidade oral, através da respiração (Yanine *et al.*, 2013).

A maior parte dos casos de halitose, cerca de noventa por cento, tem origem oral (Haukioja, 2010). As diversas bactérias presentes na cavidade oral, responsáveis pela degradação das proteínas alimentares, podem produzir Compostos Voláteis Sulfurados (CVS) com odor desagradável, contribuindo para a ocorrência do mau hálito. Estes compostos são produzidos principalmente por bactérias Gram negativas anaeróbias, que residem predominantemente no dorso da língua (Scully e Greenman, 2012). Estas bactérias incluem *Prevotella (Bacteroides) melaninogenica*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides loescheii*, Enterobacteriaceae, *Tannerella forsythensis (Bacteroides forsythus)*, *Centipeda periodontii*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum vincentii*, *Fusobacterium nucleatum nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum* e *Fusobacterium periodonticum* (Porter e Scully, 2006).

A substituição das bactérias causadoras de halitose por estirpes bacterianas probióticas provenientes da microbiota oral de indivíduos saudáveis apresenta um efeito benéfico na prevenção e/ou tratamento da halitose (Scully e Greenman, 2012). Vários probióticos têm sido investigados, sendo que alguns já são comercializados, com vista a melhorar esta condição (Meurman e Stamatova, 2007).

Kang *et al.* realizaram um estudo em que foi isolado, de indivíduos saudáveis, *Streptococcus salivarius*, o qual é considerado como uma das principais estirpes bacterianas colonizadoras da microbiota da língua, tendo sido verificado a presença desta estirpe em apenas um indivíduo contendo halitose. Uma possível resposta para a escassa

presença de *S. salivarius* pode estar associada à sua capacidade limitada de produção de compostos voláteis sulfurados (Kang *et al.*, 2011).

Outras espécies com propriedades probióticas têm sido documentadas em diversos estudos clínicos com o objetivo de melhorar a halitose. Um exemplo é a estirpe bacteriana *S. salivarius K12* que, ao ser administrada via oral juntamente com um antisséptico, apresentou eficácia na redução dos níveis de compostos voláteis sulfurados (Burton *et al.*, 2006).

A *Weissella cibaria* corresponde a uma estirpe bacteriana que é igualmente capaz de minimizar a produção de compostos voláteis sulfurados (Kang *et al.*, 2011). Burton *et al.* realizaram um estudo onde isolaram esta estirpe de crianças saudáveis, entre os quatro e os sete anos de idade. Os resultados demonstraram que a *W. cibaria* tinha a capacidade de inibir a produção de CVS responsáveis pelo desenvolvimento de halitose (Burton *et al.*, 2006). Uma razão para este acontecimento pode dever-se à capacidade de adesão desta espécie probiótica com as espécies responsáveis pela produção de compostos voláteis sulfurados, como por exemplo o *Fusobacterium nucleatum*, de modo a facilitar a sua eliminação (Kang *et al.*, 2011).

De acordo com os resultados dos estudos acima referidos, pode-se concluir que o principal modo de atuação das espécies probióticas na cavidade oral para a prevenção do mau hálito consiste, principalmente, na redução da fonte de produção de compostos com odor desagradável, ou seja, das bactérias responsáveis pela produção de compostos voláteis sulfurados (Scully e Greenman, 2012).

2.4. Candidíase oral

Candida albicans é um fungo residente no corpo humano sendo considerado como um dos principais agentes infecciosos da cavidade oral (Stamatova e Meurman, 2009). Em condições normais, *C. albicans* não afeta a saúde, no entanto, em situações favoráveis para a sua proliferação pode mudar a sua forma de levedura para filamentos e conseguir invadir os tecidos, causando infecções nas mucosas, sendo a causa mais comum de infecção fúngica oral, habitualmente designada por candidíase oral. Outros fatores, tais como idade, genética, alterações hormonais, e causas iatrogênicas, podem conduzir, indiretamente, a manifestações clínicas desta afeção (Elahi *et al.*, 2005).

A administração oral de probióticos pode reduzir o potencial patogénico provocado por *C. albicans*. Hatakka *et al.* realizaram um estudo em ratinhos, onde foi analisado o padrão de colonização de duas estirpes probióticas, a *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus fermentum*. Os resultados demonstraram um rápido declínio na contagem de *C. albicans* da cavidade oral dos ratinhos, tendo-se concluído que a ingestão oral destas estirpes probióticas pode ter influência na prevenção da ocorrência de infecções fúngicas orais provocadas por *C. albicans*. Uma razão para este acontecimento pode dever-se ao mecanismo de competição das estirpes probióticas contra o fungo *C. albicans*, impedindo assim a sua proliferação, bem como, o seu modo de atuação (Hatakka *et al.*, 2007).

A incidência de infecções fúngicas orais é superior na idade avançada e sob condições imunitárias comprometidas (Johnson *et al.*, 2012). O consumo de queijo contendo as estirpes probióticas *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705 e *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* JS por idosos, durante um período de dezasseis semanas, demonstrou uma redução significativa (setenta e cinco por cento) dos níveis de contagem de *C. albicans*. Uma possível explicação para este acontecimento deve-se a um dos mecanismos de ação dos probióticos estar relacionado com a estimulação de células do sistema imunitário, que favoreçam a libertação de componentes antimicrobianos, sendo úteis na prevenção de infecções (Vieira *et al.*, 2013). Os resultados deste estudo permitiram concluir que a ingestão diária de “queijo probiótico” pode impulsionar o sistema imunitário de indivíduos mais vulneráveis a infecções (por exemplo, os idosos), de forma a melhorar a resposta imunitária a desafios externos (Vieira *et al.*, 2013).

A capacidade das diferentes bactérias do género *Lactobacillus* para estimular fatores celulares e humorais, de forma a proteger a mucosa oral da patogenicidade de agentes infecciosos como a *C. albicans* está associada, principalmente, aos níveis de óxido nítrico presentes na saliva (Marranzino *et al.*, 2012). O principal mecanismo de defesa contra fungos é desenvolvido pelos fagócitos, que promovem a sua destruição, através da produção de óxido nítrico que é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase e de outros componentes secretados por estas células (Santamaria *et al.*, 2011). Paralelamente, o interferão-gama estimula os macrófagos a produzir óxido nítrico. Devido à sua toxicidade, o óxido nítrico é libertado dos macrófagos destruindo os microrganismos patogénicos (Marranzino *et al.*, 2012). Deste modo, os *Lactobacillus* podem atuar aderindo ao epitélio da mucosa oral, competindo com os mesmos locais de ação do óxido nítrico, nomeadamente através da adesão aos macrófagos (Marranzino *et al.*, 2012).

Investigadores da Universidade de Queensland, na Austrália, analisaram a ação direta dos probióticos na formação do biofilme de *Candida albicans* (Figura 4). Para o efeito, foram cultivadas bactérias do género *Lactobacillus*. O objetivo deste estudo foi verificar se a ação das bactérias contra o crescimento de *Candida* estava relacionada com essas substâncias ou se era devida à interação direta entre a bactéria e o fungo (Matsubara *et al.*, 2016a).

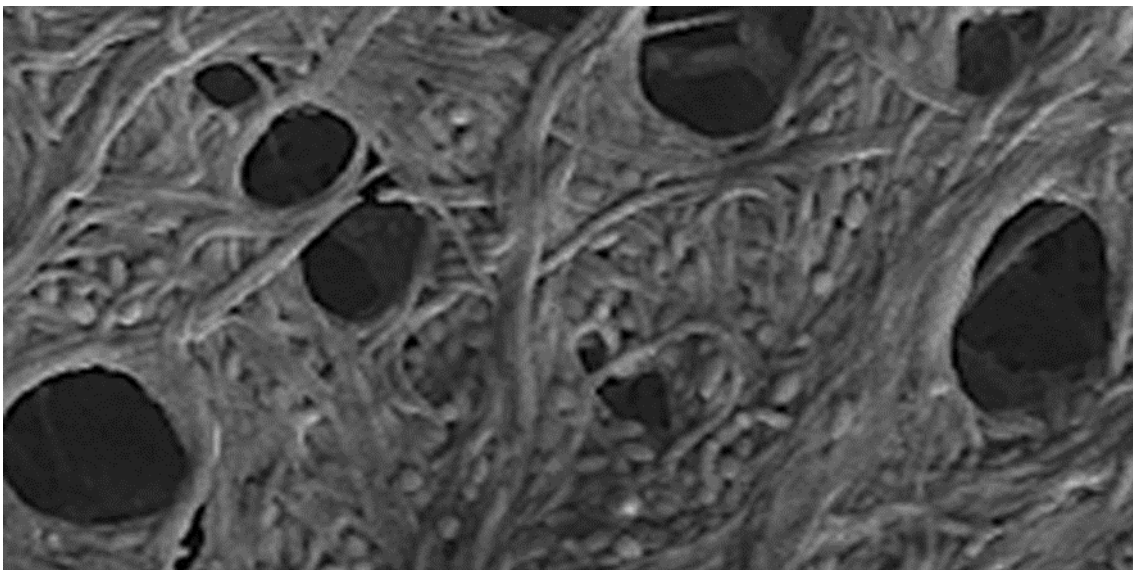


Figura 4. Imagem de microscopia eletrónica de um biofilme de “Candida” (adaptado de Matsubara *et al.*, 2016a).

A formação do biofilme de *Candida* dispõe de várias fases. Na primeira fase ocorre a adesão das células; posteriormente verifica-se a sua multiplicação e, na última fase, ocorre a maturação do biofilme. Os resultados deste estudo demonstraram que as substâncias produzidas pelos probióticos no meio de cultura tiveram ação no início da fase de formação do biofilme. Porém, se o biofilme se encontrar na última fase de formação, isto é, na fase de maturação é necessário utilizar as bactérias probióticas diretamente, para se ter ação contra o fungo (Matsubara et al., 2016a).

O consumo contínuo de probióticos permitiu alcançar contagens quase indetetáveis de fungos na cavidade oral, em particular, de *C. albicans*. Este efeito pode ser observado durante um período de tempo prolongado, mesmo após a cessação da ingestão oral das estirpes probióticas (Elahi *et al.*, 2005).

Atualmente, o tratamento da candidíase oral inclui a administração de antifúngicos orais quando a doença já está estabelecida. Vários investigadores defendem que o uso de probióticos orais não deve ser o único agente terapêutico usado contra a candidíase oral, servindo como uma terapia complementar aos antifúngicos orais, atuando também na prevenção da doença.

III. Estirpes probióticas usadas para fins terapêuticos

A comercialização de probióticos para fins terapêuticos necessita de uma avaliação prévia de alguns parâmetros de extrema importância, dos quais se destacam a segurança e a eficácia dos produtos finais. Para isso, são realizados testes laboratoriais (*in vitro* e *ex vivo*), em modelos animais e em humanos (Amaral *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de formulações contendo probióticos requer uma seleção e caracterização de estirpes com propriedades terapêuticas comprovadas. Uma correta seleção dos excipientes, assim como, dos processos adequados para a produção em larga escala é igualmente importante na produção da forma de dosagem final (Amaral *et al.*, 2014).

Os microrganismos utilizados para a obtenção de formulações probióticas devem possuir a capacidade de sobreviver durante todo o processo tecnológico, mantendo as suas propriedades inalteradas, de forma a serem considerados como produtos viáveis (Andrews, 2007). Neste sentido, várias técnicas podem ser utilizadas para a conservação de amostras biológicas, entre as quais se destaca a liofilização, que é usada em larga escala (Govender *et al.*, 2014).

Entre os diversos géneros que integram as culturas probióticas mais comuns, que na sua maioria têm origem no intestino, os géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os mais utilizados (Meurman e Stamatova, 2007). Uma das principais vantagens destes géneros bacterianos deve-se à sua origem na microbiota humana natural, o que permite uma maior compatibilidade com as características fisiológicas do organismo (Saraf *et al.*, 2010).

Em qualquer um dos dois géneros, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, as espécies correntemente utilizadas a nível tecnológico não são patogénicas, sendo consideradas como espécies seguras (*generally recognized as safe, GRAS*) (Haukioja, 2010). Um aspeto a ter em consideração antes do uso de microrganismos como probióticos é saber que nem todas as estirpes probióticas possuem a mesma eficácia, sendo importante identificar com o máximo rigor quais as estirpes probióticas com características potenciais para serem usadas como probióticos.

Na tabela 2 estão referidos exemplos de estirpes pertencentes aos géneros probióticos mais comuns.

Tabela 2. Exemplos de estirpes probióticas pertencentes aos géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (adaptada de Zuccotti et al., 2008).

<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>
<i>Bifidobacterium lactis</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
	<i>Lactobacillus brevis</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>

3.1. *Bifidobacterium*

As bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez no final do século XIX, pelo francês Henry Tissier. São caracterizadas como bactérias Gram positivas, não formadoras de esporos, desprovidas de flagelos e anaeróbias. Quanto à sua morfologia, podem ter várias formas incluindo bacilos curtos, curvados ou bifurcados (Stamatova e Meurman, 2009).

Atualmente, o gênero *Bifidobacterium* (Figura 5) compreende trinta espécies, sendo dez de origem humana (presentes na boca, fezes e vagina), dezassete de origem animal, duas de águas residuais e uma proveniente de leite fermentado. São organismos heterofermentativos capazes de produzir ácido lático e acético, sem produzirem dióxido de carbono. 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. A gama de temperaturas para a qual se regista um crescimento ótimo destas estirpes varia entre 37 e 41°C e os valores de pH variam entre 6 e 7, com ausência de crescimento a pH ácido (4,5-5,0) e a pH alcalino (8,0-8,5) (Zinedine e Faid, 2007).

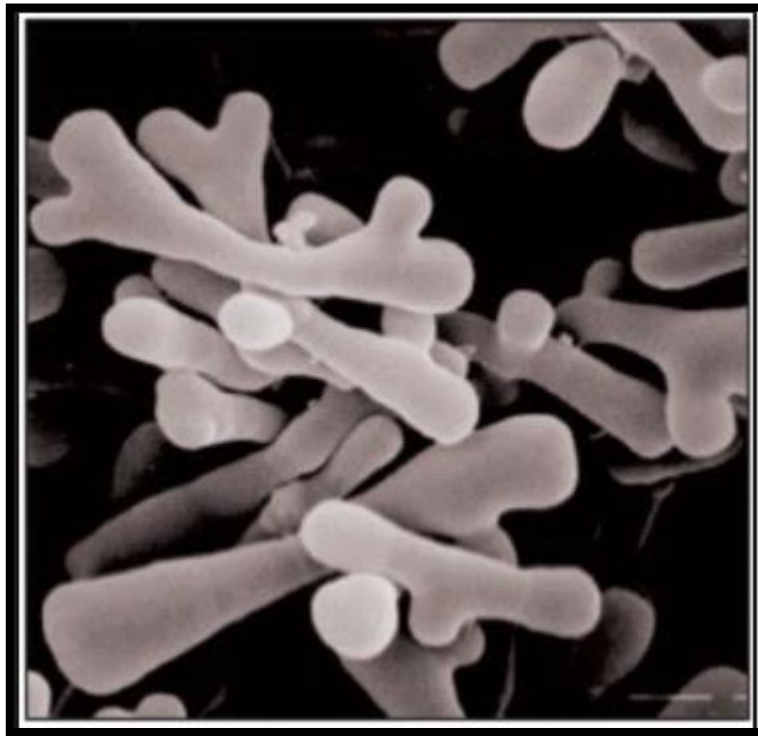


Figura 5. Imagem de microscopia eletrônica de bactérias probióticas do gênero *Bifidobacterium* (adaptado de Inturri et al., 2014).

3.2. *Lactobacillus*

Os lactobacilos foram isolados pela primeira vez pelo pediatra alemão Ernst Moro, a partir de fezes de lactentes amamentados com leite materno. As bactérias do gênero *Lactobacillus* estão amplamente distribuídas no meio ambiente, especialmente nos vegetais e no trato gastrointestinal e genital. Estes microrganismos caracterizam-se por serem Gram positivo, não formadores de esporos, não flagelados e geralmente anaeróbicos facultativos. Têm capacidade fermentativa e são caracterizados por produzirem ácido láctico a partir de hidratos de carbono (Stamatova e Meurman, 2009).

São conhecidas atualmente cinquenta e seis espécies pertencentes a este gênero, sendo as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* as mais utilizadas em probióticos (Figura 6). Crescem a uma temperatura que varia entre os 2 e os 53°C, com valores ótimos de crescimento entre os 30 e os 40°C e de pH entre os 5,5 e os 6,3 (Stamatova e Meurman, 2009).

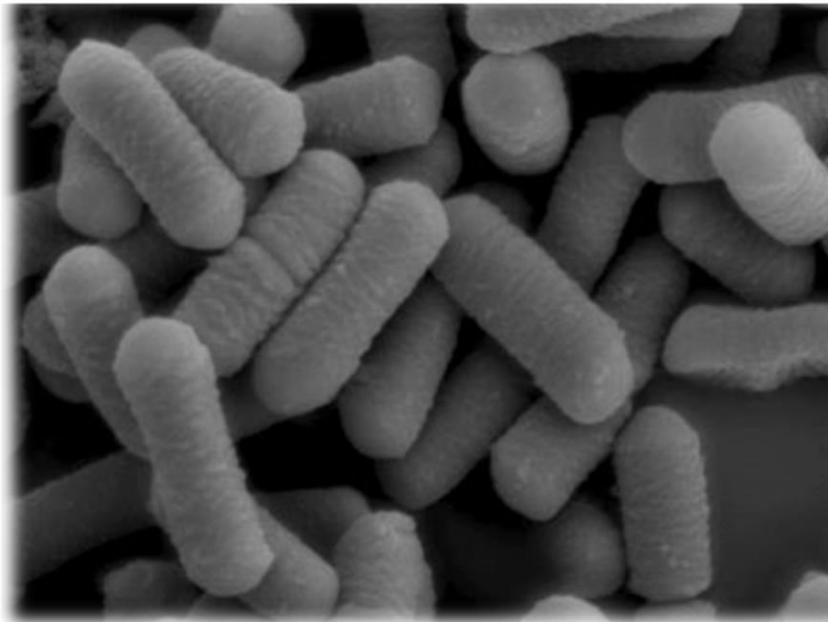


Figura 6. Imagem de microscopia eletrônica de bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus* (adaptada de Meurman e Stamatova, 2007).

3.3. Probióticos Recombinantes

Nos últimos anos, progressos consideráveis foram feitos no sentido de compreender o papel da microbiota humana na saúde e em doenças. A modulação da microbiota está a tornar-se uma estratégia eficaz e aceitável para a profilaxia e tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias, distúrbios metabólicos, condições psicóticas e também no cancro. Os probióticos são ferramentas importantes para a correção de alterações na microbiota humana e na manutenção do estado de saúde do hospedeiro (Sorokulova, 2014).

Os métodos modernos de engenharia genética abrem novas possibilidades para a criação de estirpes probióticas com as características desejadas. Tais probióticos podem ser projetados para melhorar e reforçar as suas propriedades ou para influenciar as etapas críticas na patogénese de doenças (Petrarca *et al.*, 2015).

As doenças alérgicas podem afetar até trinta por cento da população ocidental e a sua prevalência está a aumentar. As manifestações alérgicas ocorrem, geralmente, quando o sistema imune reage contra substâncias inofensivas presentes no ambiente. Estas substâncias, designadas de alérgenos podem entrar em contato com o sistema imunitário através de diversas vias, tais como inalação, ingestão e contato direto com a pele, por exemplo, através da picada de um inseto. A exposição aos alérgenos ambientais pode causar uma variedade de sintomas associados com uma gama de patologias, incluindo asma, rinite alérgica, alergias alimentares e problemas dermatológicos, tais como, eczema atópico (De Azevedo *et al.*, 2013).

Latentes que apresentavam níveis elevados de potenciais bactérias patogénicas no seu trato gastrointestinal, tais como *Clostridium difficile* e *Staphylococcus aureus* foram associados a um risco aumentado do desenvolvimento de condições alérgicas. Por outro lado, a comunidade microbiana intestinal de crianças que não manifestavam sintomas alérgicos foi colonizada por bactérias de ácido láctico, por exemplo *Lactobacillus* e outras bactérias pertencentes ao género *Bifidobacterium*, demonstrando que a presença aumentada destas bactérias no trato gastrointestinal parece correlacionar-se com a proteção contra doenças alérgicas (De Azevedo *et al.*, 2013).

Os probióticos são capazes de modular a resposta imune da mucosa humana, e os ensaios clínicos demonstraram que estirpes específicas, especialmente bactérias do ácido láctico (BAL), são capazes de reduzir os sintomas aos alergénios. Assim, surge o conceito de probióticos recombinantes em que o seu uso foi avaliado como possíveis estratégias para a imunoterapia de doenças alérgicas (Petrarca *et al.*, 2015).

As bactérias do ácido láctico são bactérias presentes em grande parte de alimentos (leite e derivados, vegetais, frutos, cereais, carne, peixe, vinho) e são consideradas como seguras (*generally recognized as safe, GRAS*). Muitas BAL são capazes de colonizar a mucosa oral, urogenital e gastrointestinal e algumas espécies são comensais da microbiota de mamíferos (Sorokulova, 2014).

Os probióticos recombinantes consistem na obtenção de microrganismos geneticamente modificados, através da técnica de DNA recombinante (Figura 7), de forma a promover a expressão de estirpes probióticas com propriedades anti-inflamatórias e bactericidas e capazes de expressar os alergénios, com vista a reduzir as propriedades nocivas dos microrganismos patogénicos que colonizam a microbiota natural humana (De Azevedo *et al.*, 2013).

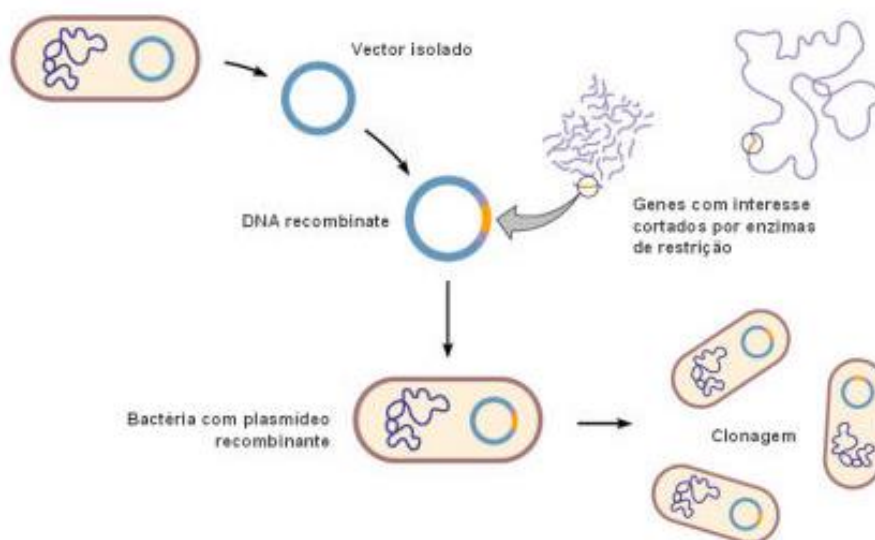


Figura 7. Esquematização simples da técnica de DNA recombinante (adaptado de Vashishth e Tehri, 2015).

As bactérias probióticas podem influenciar significativamente a resistência imunitária do hospedeiro pela indução da expressão de péptidos antimicrobianos no organismo. Para além disso, a criação de novas estirpes probióticas que expressem diferentes antimicrobianos pode ser uma estratégia útil para tratamento de patógenos multirresistentes (Sorokulova, 2014).

O uso de vacinas eficazes representa uma abordagem benéfica para a proteção contra agentes patogénicos. Porém, a maior parte das vacinas atualmente disponíveis no mercado são dispendiosas, na sua maioria requerem múltiplas doses, apresentam efeitos colaterais em alguns indivíduos e nem sempre são eficazes. O uso de probióticos recombinantes apresenta elevadas vantagens como vetores de vacinas vivas. Correspondem a sistemas seguros, eficazes e possuem propriedades adjuvantes contra os agentes patogénicos. Diferentes sistemas de expressão eficientes foram desenvolvidos por bactérias do ácido láctico, que permitem uma correta expressão de vários antigénios derivados de agentes patogénicos (Petrarca *et al.*, 2015).

IV. Sistemas de dispensa de probióticos orais

Os primeiros produtos comercializados contendo probióticos eram, essencialmente, formulações líquidas, as quais se caracterizavam por apresentar baixa estabilidade. Atualmente, os probióticos utilizados na terapêutica são incorporados em formas de dosagem adequadas, de forma a assegurar a sua viabilidade (Amaral *et al.*, 2014).

Por outro lado, os alimentos têm sido muito utilizados na veiculação de probióticos, destacando-se os produtos lácteos, tais como, leite, queijo, iogurtes e gelados (Govender *et al.*, 2014). No entanto, a ingestão de probióticos através de alimentos não deve ser incluída na terapêutica, uma vez que a sua regulamentação não é suficientemente controlada.

No que concerne à terapêutica, várias formas farmacêuticas das quais, os pós, as cápsulas e os comprimidos correspondem às formas orais mais utilizadas, têm demonstrado elevada eficácia na veiculação de probióticos. Para além disso, as gomas para mascar medicamentosas têm sido apresentadas como uma alternativa promissora na administração oral de probióticos, principalmente em crianças (Amaral *et al.*, 2014).

4.1. Sistemas convencionais

Por sistemas convencionais de dispensa de probióticos, podemos considerar as formas comerciais constituídas por produtos à base de alimentos (Figura 8), os quais incluem, principalmente produtos lácteos, tais como, leite, queijo, iogurtes, gelados, e outros produtos não lácteos, como por exemplo, chocolate e carne (Govender *et al.*, 2014).

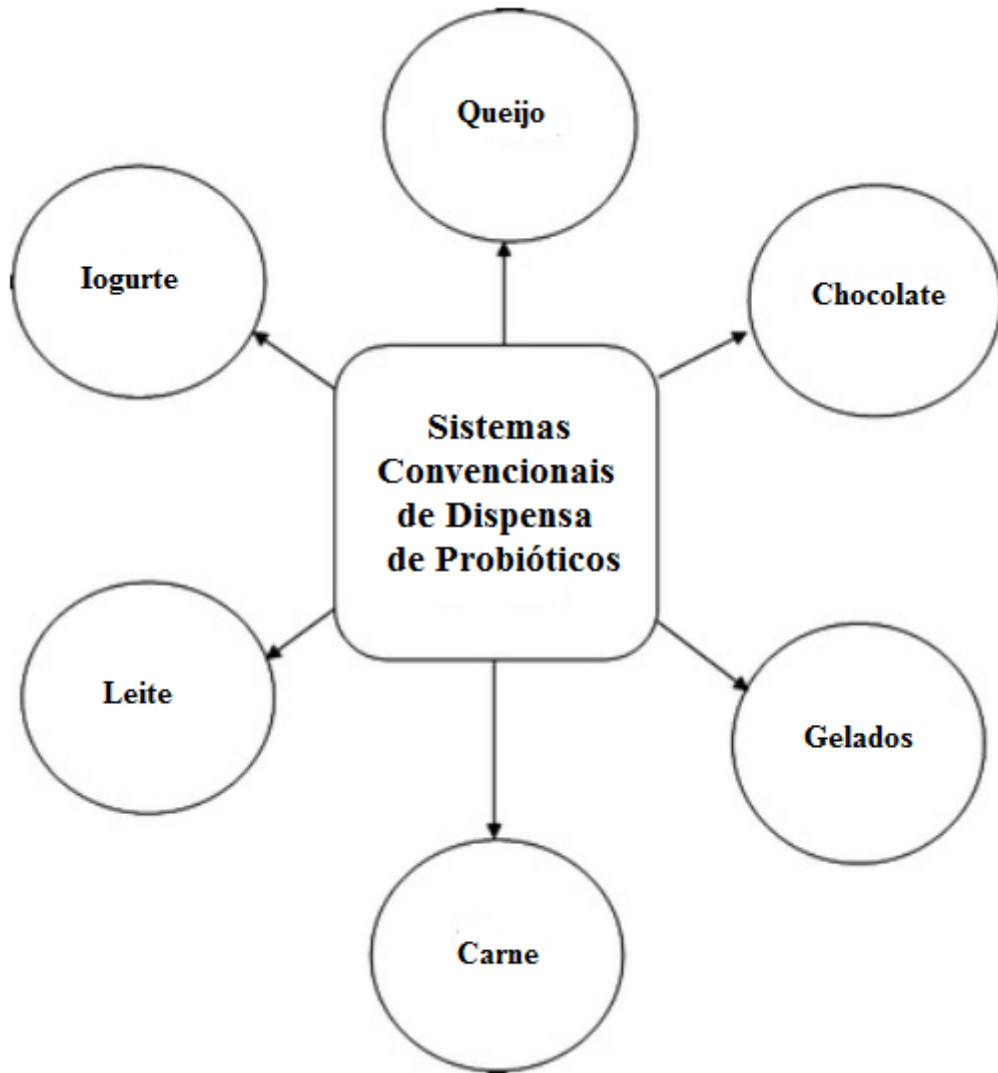


Figura 8. Exemplos de sistemas convencionais de dispensa de probióticos (adaptado de Govender et al., 2014).

Nestes sistemas, as estirpes probióticas podem ser adicionadas numa única cultura ou serem associadas a outras bactérias presentes nos produtos lácteos. O uso de culturas puras de forma obter produtos lácteos fermentados é possível, dependendo da estirpe utilizada, do nível de inoculação e da adição de determinadas substâncias que irão promover a multiplicação das bactérias (Govender *et al.*, 2014).

Um fator importante para que os probióticos sejam inseridos em sistemas convencionais está relacionado com a sua segurança. Deste modo, é fundamental que haja uma seleção adequada das culturas probióticas que obedecem a critérios específicos, tais como, a manutenção das propriedades organolépticas inalteradas (por exemplo, cor, sabor e odor). Para além disso, deve ser assegurada a sua viabilidade desde o processo tecnológico da preparação do alimento, durante o tempo de permanência no mercado e até chegar ao consumidor (Amaral *et al.*, 2014).

A sobrevivência das estirpes probióticas no produto final é de extrema importância, devendo apresentar níveis de contagem superiores a 10 UFC/porção de alimento, com o objetivo de garantir benefícios fisiológicos para o consumidor (Stamatova e Meurman, 2009).

4.2. Formas farmacêuticas contendo probióticos

As formas farmacêuticas contendo probióticos podem ser classificadas como sistemas não convencionais e incluem os pós, as cápsulas, os comprimidos e as gomas para mascar medicamentosas (Amaral *et al.*, 2014).

De forma a conferir benefícios terapêuticos, tal como acontece com os sistemas convencionais, os probióticos devem manter-se viáveis até atingirem o local de ação. Assim, o desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo probióticos deve assegurar a resistência dos microrganismos às condições fisiológicas adversas, de forma a assegurar a sua viabilidade e eficácia (Govender *et al.*, 2014).

Para melhorar a taxa de sobrevivência das bactérias probióticas por vezes é necessário efetuar algumas alterações na sua estrutura, não só durante o processo de produção mas também durante os ensaios *in vitro* e *in vivo* (Amaral *et al.*, 2014).

Um outro aspeto importante no desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo probióticos é a implementação de um processo de fabrico que assegure a produção de uma forma reprodutível dos produtos finais (Govender *et al.*, 2014).

4.2.1 Pós

De acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9 (FP 9), os pós orais podem ser definidos como “preparações farmacêuticas constituídas por partículas sólidas secas, livres e mais ou menos finas. Na sua constituição podem conter uma ou várias substâncias ativas, adicionadas ou não de excipientes e, se necessário, de corantes e aromatizantes.” (INFARMED, 2009).

Depois de submetidas às operações primárias necessárias para a sua produção, são utilizadas técnicas específicas que permitam a redução das partículas a pó. Na produção desta forma farmacêutica recorre-se essencialmente às técnicas de moagem e/ou crivagem de modo a assegurar um tamanho de partícula adequado. A pulverização por moinhos é muito utilizada na indústria, uma vez que permite produzir elevadas quantidades de pós. Esta técnica é usada no caso de substâncias cujo tamanho das partículas só deve ser ajustado no momento de emprego, de forma a evitar a sua alteração (Nogueira *et al.*, 2011).

Os pós contendo probióticos (Figura 9) formam suspensões orais, quando dispersos em água. Assim, em comparação com outras formas farmacêuticas orais a sua administração é facilitada, o que tem particular interesse nas crianças e adultos com necessidades especiais (Amaral *et al.*, 2014).



Figura 9. Formas farmacêuticas orais: Imagem ilustrativa do modo de administração de um pó oral.

Na Tabela 3 estão apresentados alguns exemplos de formas farmacêuticas à base de pós contendo probióticos que são atualmente comercializadas.

Tabela 3. Exemplos de formas farmacêuticas comercializadas à base de pós contendo probióticos (adaptada 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>
Atyflor®	<i>Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus, Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium breve, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium infantis e Bifidobacterium bulgaricus</i>
Duobiotic®	<i>Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium bifidus, Bifidobacterium lactis, Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus e Streptococcus thermophilus</i>

4.2.2. Cápsulas

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9 (FP 9), as cápsulas podem ser definidas 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.” (INFARMED, 2009).

As cápsulas duras (Figura 10) são preferíveis para a administração de probióticos. Podem ser usados liofilizados de probióticos adicionados de diluentes, aglutinantes ou desagregantes na preparação destas cápsulas (Nogueira *et al.*, 2011).



Figura 10. Formas farmacêuticas orais: Imagem ilustrativa de cápsulas duras de gelatina.

Um estudo demonstrou que a ingestão oral diária de cápsulas duras de gelatina contendo *Lactobacillus rhamnosus GR-1* e *Lactobacillus fermentum RC-14*, num período de dois meses, resultou numa diminuição significativa de fungos e coliformes com propriedades patogénicas, na flora vaginal (Amaral *et al.*, 2014).

Na Tabela 4 estão apresentados alguns exemplos de cápsulas comercializadas à base de probióticos.

Tabela 4. Exemplos de cápsulas comercializadas contendo probióticos (adaptada de *Amaral et al., 2014*).

Produto	Composição
Bactilsubtil®	<i>Bacillus subtilis</i>
Activecomplex®	<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>
Transifidus®	<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i>
Align®	<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624
Flora-L®	<i>Lactobacillus plantarum</i>

4.2.3. Comprimidos

A FP 9 define comprimidos como “preparações sólidas contendo uma dose de uma ou de várias substâncias ativas. São obtidos aglomerando por compressão um volume constante de partículas ou por um processo de fabrico apropriado como a extrusão, moldagem ou liofilização. Destinam-se à administração por via oral. Alguns são deglutidos ou mastigados, outros são dissolvidos ou desagregados em água antes da administração e outros devem permanecer na boca de forma a libertarem a substância ativa.” (INFARMED, 2009).

Os comprimidos contendo probióticos podem ser revestidos de modo a facilitar a administração, protegendo o seu conteúdo bioativo. Para além disso, o revestimento de comprimidos permite a libertação modificada das substâncias veiculadas (*Amaral et al., 2013*).

Alguns estudos demonstraram que comprimidos contendo probióticos devem ser preparados por técnicas específicas de modo a adquirirem a forma, cor e tamanho pretendidos (Figura 11). Para além disso, devem ser utilizados os excipientes adequados à sua produção e no seu processo de fabrico deve ser aplicada uma força de compressão elevada, de forma a prolongar o tempo de desagregação, mantendo a viabilidade das bactérias (Govender et al., 2014).



Figura 11. Formas farmacêuticas orais: Exemplos de comprimidos.

O uso de polímeros funcionais no processo de obtenção de comprimidos contendo probióticos melhora a estabilidade das estirpes probióticas, contribuindo para uma dosagem do produto final mais precisa. Polímeros naturais, modificados ou sintéticos podem ser utilizados como excipientes para a produção de comprimidos de libertação convencional e de libertação modificada. Atualmente, os polímeros são utilizados como moduladores, de forma a libertarem a(s) substância(s) ativa(s) em locais específicos do organismo. Para além disso, estes polímeros facilitam a administração de probióticos, proporcionando a produção das formulações em larga escala. A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) é um exemplo de um polímero bastante utilizado na produção de comprimidos de libertação modificada (Nogueira *et al.*, 2011).

Na Tabela 5 são apresentados exemplos de comprimidos mastigáveis comercializadas à base de probióticos.

Tabela 5. Exemplos de comprimidos mastigáveis comercializados contendo probióticos (adaptada de Amaral *et al.*, 2014).

Produto	Composição
Casenbiotic®	<i>Lactobacillus reuteri Protectis</i>
Biogaia protectis®	<i>Lactobacillus reuteri Protectis</i>

4.2.4. Gomas para mascar medicamentosas

As gomas para mascar medicamentosas são uma forma farmacêutica tradicional que, recentemente passou a ser usada como sistema de administração de fármacos, sobretudo em crianças (Amaral *et al.*, 2014).

Segundo a FP 9 as gomas para mascar medicamentosas (Figura 12) correspondem a “preparações sólidas, geralmente sem sabor, constituídas por uma base de gelatina. A substância ativa é libertada por mastigação, seguida da dissolução ou dispersão na saliva.” (INFARMED, 2009).



Figura 12. Formas farmacêuticas orais: Imagem ilustrativa de gomas de mascar à base de gelatina.

Estudos clínicos recentes têm demonstrado uma diminuição na prevalência da inflamação periodontal através da mastigação de gomas contendo probióticos (Amaral *et al.*, 2014).

Caglar *et al.* efetuaram um estudo onde foi avaliado o efeito de dois sistemas à base de gomas para administração oral contendo *Lactobacillus spp.* e a estirpe *Lactobacillus reuteri ATCC 55730*, sobre os níveis salivares de *S. mutans*. Foi possível concluir que a ingestão diária destas gomas reduziu significativamente o número de contagem de bactérias presentes na saliva (Caglar *et al.*, 2006).

Os mesmos autores testaram a associação das estirpes probióticas *Lactobacillus reuteri ATCC 55730*, *Lactobacillus reuteri ATCC PTA 5289* e xilitol como um possível mecanismo na diminuição da prevalência de cáries dentárias. O estudo foi realizado em voluntários humanos saudáveis, os quais mastigaram as gomas medicamentosas três vezes por dia após as refeições, tendo sido avaliado o seu efeito sobre a contagem de *S. mutans*, o principal agente causador de cáries. Os resultados deste estudo demonstraram que as gomas contendo as estirpes probióticas e xilitol diminuíram significativamente os níveis salivares de *S. mutans* (Caglar *et al.*, 2007).

V. Conclusões

As resistências bacterianas aos antibióticos têm emergido durante os últimos anos, podendo, em breve, constituir um grave problema de saúde pública.

Com vista a reduzir o uso de antibióticos, a Organização Mundial de Saúde atualmente aceita o uso de probióticos para a eliminação de agentes patogénicos, como uma terapia de interferência microbiana, apresentando benefícios para a saúde. Estudos clínicos confirmam a sua potencialidade para resolver desordens do trato gastrointestinal, geniturinário e do cólon.

Recentemente, uma nova abordagem no campo de utilização dos probióticos está direcionada com a cavidade oral. Neste sentido, estes microrganismos não patogénicos representam uma alternativa de tratamento válida em diversas afeções orais, tais como, cárie, periodontite, halitose e infeção fúngica. Vários efeitos de promoção da saúde têm sido documentados através da utilização de probióticos, sendo considerados como agentes promissores no combate a patologias de diversas etiologias.

O processo de produção de sistemas de veiculação de probióticos deve obedecer a critérios específicos, garantindo padrões de qualidade para a saúde dos consumidores.

Para que os produtos contendo probióticos sejam eficazes deve haver uma seleção adequada de estirpes probióticas, bem como dos excipientes, de forma a manterem a sua viabilidade e funcionalidade.

Os microrganismos pertencentes aos géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os mais utilizados na produção de formas de dosagem contendo probióticos, já que uma das suas principais características é fazerem parte da microbiota humana natural.

A otimização das condições de fabrico das formas farmacêuticas à base de probióticos é muito importante para manter a viabilidade dos microrganismos. Por exemplo, alguns estudos demonstraram que comprimidos contendo probióticos devem ser preparados com excipientes adequados e através da aplicação de uma força de compressão elevada, de

forma a prolongar o tempo de desintegração da(s) substância(s) ativa(s) nos comprimidos, mantendo a viabilidade das bactérias. Além disso, estes microrganismos devem ser incorporados em formas de dosagem apropriadas para que sejam produzidos de uma forma reprodutível.

Tradicionalmente, as formas probióticas eram incorporadas em produtos alimentares lácteos, tais como, leite, queijo, iogurtes e gelados. No entanto, as formas farmacêuticas sob a forma de pós, cápsulas e comprimidos representam os melhores sistemas de dispensa destes microrganismos, uma vez que proporcionam uma maior estabilidade, sendo considerados sistemas mais seguros e eficazes. Como consequência, estes sistemas têm sido amplamente estudados para o uso terapêutico de probióticos.

VI. Perspetivas futuras

O interesse na utilização de produtos contendo probióticos tem vindo a aumentar durante as últimas décadas.

É importante salientar que cada um dos benefícios para a saúde abordados deve ser estudado para cada estirpe individualmente, de forma a que os produtos finais sejam considerados seguros. Além disso, algumas investigações têm sugerido que as espécies probióticas não têm de pertencer necessariamente aos géneros mais comuns, ou seja, aos géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Neste sentido, algumas estirpes lácteas têm sido estudadas com o objetivo de identificar e caracterizar potenciais microrganismos probióticos.

A cavidade oral representa um novo campo para a utilização de probióticos, tendo-se verificado efeitos benéficos da sua utilização em diversas patologias orais. Porém, são necessários mais estudos que confirmem o mecanismo de ação destes microrganismos na prevenção e ou tratamento de doenças infecciosas orais.

Uma nova dimensão no conceito de probióticos está relacionada com a obtenção de microrganismos geneticamente modificados, designados de probióticos recombinantes para imunoterapia. Este novo conceito tem por objetivo promover a expressão de estirpes probióticas com propriedades anti-inflamatórias e bactericidas e capazes de expressar os alérgenos, com vista a reduzir as propriedades nocivas dos microrganismos patogénicos que colonizam a microbiota natural humana.

As bactérias probióticas podem ser modificadas de modo a produzir no seu interior ou através das suas secreções proteínas exógenas. A produção destas proteínas pode originar probióticos recombinantes que, quando expressam uma proteína alérgica, podem ser utilizados como vacinas inovadoras, com características específicas para aplicação em imunoterapia. Através da tecnologia de DNA recombinante, é possível produzir elevadas quantidades de proteínas puras quer na forma nativa ou mutante, usando as bactérias probióticas como agentes naturais para a sua produção.

Um aspeto muito interessante relacionado com a presente abordagem é a possibilidade de obter concentrações locais de alérgenos devido à sua acumulação no interior da célula probiótica. Neste sentido, é possível obter uma vacina mais eficaz através da possibilidade de dosear a concentração de alérgeno e, por conseguinte, obter um menor risco de efeitos secundários do tipo anafilático.

Apesar do uso de probióticos recombinantes capazes de expressar agentes alérgenos ser recente e apenas ter sido realizado um número limitado de estudos, sem ter aplicação em seres humanos, as suas propriedades inovadoras permite que sejam considerados como agentes promissores e eficazes na imunoterapia.

VII. Bibliografia

- Amaral, M. H. *et al.* (2014). Development of Probiotic Dosage Forms. In: Silva, J. P. S. E. e Freitas, A. C. (ed.)^(eds.). Probiotic Bacteria: Fundamentals, Therapy, and Technological Aspects. ed. Broken Sound Parkway NW: Pan Stanford Publishing, pp. 227-262.
- Anderson, M. H. e Shi, W. (2006). A probiotic approach to caries management. *Pediatr Dent*, 28 (2), pp. 151-3; discussion 192-8.
- Andrews, G. P. (2007). Advances in solid dosage form manufacturing technology. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 365 (1861), pp. 2935-49.
- Azevedo, M. S. *et al.* (2013). Immunotherapy of allergic diseases using probiotics or recombinant probiotics. *J Appl Microbiol*, 115 (2), pp. 319-33.
- Berkowitz, R. J. (2006). Mutans streptococci: acquisition and transmission. *Pediatr Dent*, 28 (2), pp. 106-9; discussion 192-8.
- Bonifait, L., Chandad, F. e Grenier, D. (2009). Probiotics for oral health: myth or reality? *J Can Dent Assoc*, 75 (8), pp. 585-90.
- Bordalo, A. *et al.* (2015). A Saúde dos Portugueses. Perspetiva 2015. Direção-Geral da Saúde, pp. 37-40.
- Burton, J. P. *et al.* (2006). Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Appl Environ Microbiol*, 72 (4), pp. 3050-3.
- Cabral, C. e Pita, J. R. (2015). Ciclo de Exposições: Temas de Saúde, Farmácia e Sociedade. Catálogo. **[Em linha]. Disponível em** http://www.uc.pt/ffuc/patrimonio_historico_farmaceutico/publicacoes/catalogos_deexposicoes/catalogo_2exp.pdf. **[Consultado em 14/07/2016]**.

- Caglar, E. *et al.* (2006). Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand*, 64 (5), pp. 314-8.
- Caglar, E. *et al.* (2007). Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig*, 11 (4), pp. 425-9.
- Cheon, K. *et al.* (2013). Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Eur J Oral Sci*, 121 (3 Pt 1), pp. 148-55.
- Darby, M. e Walsh, M. (2014). Oral Hygiene Assessment: Soft and Hard Deposits. In: Elsevier (ed.)^(eds.). *Dental Hygiene: Theory and Practise*. ed., pp. 397-563.
- Deepa, D. e Mehta, D. S. (2009). Is the role of probiotics friendly in the treatment of periodontal diseases. *J Indian Soc Periodontol*, 13 (1), pp. 30-1.
- Deogade, S. C. (2015). Probiotics: Contributions to Oral and Dental Health. Department of Prosthodontics, Hitkarini Dental College and Hospital, pp. 1-11.
- Dobson, A. *et al.* (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol*, 78 (1), pp. 1-6.
- Elahi, S. *et al.* (2005). Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. *Clin Exp Immunol*, 141 (1), pp. 29-36.
- Govender, M. *et al.* (2014). A review of the advancements in probiotic delivery: Conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. *AAPS PharmSciTech*, 15 (1), pp. 29-43.
- Gungor, O. E., Kirzioglu, Z. e Kivanc, M. (2015). Probiotics: can they be used to improve oral health? *Benef Microbes*, 6 (5), pp. 647-56.

- Hatakka, K. *et al.* (2007). Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly-
-a randomized controlled trial. *J Dent Res*, 86 (2), pp. 125-30.
- Haukioja, A. (2010). Probiotics and oral health. *Eur J Dent*, 4 (3), pp. 348-55.
- INFARMED. (2009). *Farmacopeia Portuguesa 9*. Lisboa.
- Inturri, R. *et al.* (2014). Scanning Electron Microscopy Observation of Adhesion
Properties of *Bifidobacterium longum* W11 and Chromatographic Analysis of Its
Exopolysaccharide. *Food and Nutrition Sciences*, pp. 1788-1792.
- Jindal, G. *et al.* (2012). Can early exposure to probiotics in children prevent dental caries?
A current perspective. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2 (2), pp. 110-5.
- Johnson, M. D. *et al.* (2012). Cytokine gene polymorphisms and the outcome of invasive
candidiasis: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*, 54 (4), pp. 502-10.
- Kamiya, R. U., Taiete, T. e Goncalves, R. B. (2011). Mutacins of *Streptococcus mutans*.
Braz J Microbiol, 42 (4), pp. 1248-58.
- Kang, M.-S. *et al.* (2011). Effect of *Weissella cibaria* on *Fusobacterium nucleatum*-induced
Interleukin-6 and Interleukin-8 Production in KB Cells. *Journal of Bacteriology
and Virology*, 41 (1), pp. 9.
- Karpiński, T. e Szkaradkiewicz, A. (2013). Microbiology of dental caries. *Journal of
Biology and Earth Sciences*, 03 (01), pp. M21-M24.
- Koduganti, R. R. *et al.* (2011). Probiotics and prebiotics in periodontal therapy. *Indian J
Dent Res*, 22 (2), pp. 324-30.
- Lindhe J. *et al.* (2003). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th edition,
Blackwell Munksgaard Publishing Company.

- Marranzino, G. *et al.* (2012). Stimulation of macrophages by immunobiotic *Lactobacillus* strains: influence beyond the intestinal tract. *Microbiol Immunol*, 56 (11), pp. 771-81.
- Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6 Suppl 1, pp. S14.
- Matsubara, H. *et al.* (2016a). Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*.
- Matsubara, V. H. *et al.* (2016b). The role of probiotic bacteria in managing periodontal disease: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 14 (7), pp. 643-55.
- Meurman, J. H. e Stamatova, I. (2007). Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis*, 13 (5), pp. 443-51.
- Morelli, L. e Capurso, L. (2012). FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *J Clin Gastroenterol*, 46 Suppl, pp. S1-2.
- Nishihara, T. *et al.* (2014). Effects of *Lactobacillus salivarius*-containing tablets on caries risk factors: a randomized open-label clinical trial. *BMC Oral Health*, 14, pp. 110.
- Nogueira, L. *et al.* (2011). Tecnologia Farmacêutica. In: Gulbenkian, F. C. (ed.)^(eds.). Tecnologia Farmacêutica. 08^a ed. Lisboa, pp. 202-583.
- Petersen, P. E. e Ogawa, H. (2012). The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*, 60 (1), pp. 15-39.
- Petrarca, C., Carpiello, F. e Di Gioacchino, M. (2015). Recombinant Probiotics for Allergen Immunotherapy. *International Journal of Vaccines & Vaccination*.

- Porter, S. R. e Scully, C. (2006). Oral malodour (halitosis). *BMJ*, 333 (7569), pp. 632-5.
- Rivera, L., Ramos, A. e Cabrera, S. (2011). Innovative study on lactoferrin in periodontal disease. *Revista Odontológica Mexicana*, 15, pp. 231-238.
- Saha, S. *et al.* (2012). Probiotics as oral health biotherapeutics. *Expert Opin Biol Ther*, 12 (9), pp. 1207-20.
- Salas, M. e Palacios, A. (2010). Efecto de los Probióticos en las Condiciones Periodontales. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 3 (3), pp. 136-139.
- Santamaria, R. *et al.* (2011). Systems biology of infectious diseases: a focus on fungal infections. *Immunobiology*, 216 (11), pp. 1212-27.
- Saraf, K. *et al.* (2010). Probiotics--do they have a role in medicine and dentistry? *J Assoc Physicians India*, 58, pp. 488-90, 495-6.
- Scully, C. e Greenman, J. (2012). Halitology (breath odour: aetiopathogenesis and management). *Oral Dis*, 18 (4), pp. 333-45.
- Sorokulova, I. (2014). Recombinant Probiotics: Future Perspectives in Disease Treatment. *Journal of Probiotics & Health*.
- Stamatova, I. e Meurman, J. H. (2009). Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent*, 22 (6), pp. 329-38.
- Sukkarwalla, A. *et al.* (2013). Efficacy of miswak on oral pathogens. *Dent Res J (Isfahan)*, 10 (3), pp. 314-20.

- Teughels, W. *et al.* (2013). Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*, 40 (11), pp. 1025-35.
- Vashishth, A. e Tehri, N. (2015). The role of recombinant DNA technology for human welfare. *International Journal of Research in Biological Sciences*, pp. 35-39.
- Vieira, A. T., Teixeira, M. M. e Martins, F. S. (2013). The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front Immunol*, 4, pp. 445.
- Ya, W., Reifer, C. e Miller, L. E. (2010). Efficacy of vaginal probiotic capsules for recurrent bacterial vaginosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Obstet Gynecol*, 203 (2), pp. 120 e1-6.
- Yanine, N. *et al.* (2013). Effects of probiotics in periodontal diseases: a systematic review. *Clin Oral Investig*, 17 (7), pp. 1627-34.
- Yao, S. G. e Fine, J. B. (2014). Probiotics for bacterial disease treatment in the oral environment. *Compend Contin Educ Dent*, 35 (9), pp. 658-63; quiz 664.
- Zinedine, A. e Faïd, M. (2007). Isolation and Characterization of Strains of Bifidobacteria with Probiotic Properties In vitro. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 02 (01), pp. 28-34.
- Zuccotti, G. V. *et al.* (2008). Probiotics in clinical practice: an overview. *J Int Med Res*, 36 Suppl 1, pp. 1A-53A.