

Diana Cláudia Pereira Reis

Aplicação das Bactérias no Ambiente, na Indústria Farmacêutica e na Saúde

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Sara Margarida Santos Domingues e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Diana Cláudia Pereira Reis

Aplicação das Bactérias no Ambiente, na Indústria Farmacêutica e na Saúde

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Sara Margarida Santos Domingues e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Declaração

Eu, Diana Cláudia Pereira dos Reis, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2008020264, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 3 de julho de 2015.

(Diana Cláudia Pereira dos Reis)

Dedicatória

Dedico a presente monografia aos meus pais e ao meu avô,
pelo esforço e sacrifício que fizeram ao longo de todos estes anos para que eu conseguisse
chegar até aqui.

A Tutora

Sara Domingues

(Professora Dra Sara Margarida Santos Domingues)

A Aluna

(Diana Cláudia Pereira Reis)

Agradecimentos

A obtenção de um grau académico é o culminar de uma longa etapa que além de envolver muito trabalho e dedicação pessoal, envolve também o sacrifício e a disponibilidade de um variado conjunto de pessoas. Pelo que se torna imprescindível agradecer a todas elas pelo contributo que foram dando, de uma forma ou de outra, para que eu conseguisse alcançar o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas com sucesso.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais e irmão, pelo enorme esforço e sacrifício durante todos estes anos, para que eu tivesse a oportunidade de ingressar e permanecer no Ensino Superior até ao fim do ciclo de estudos. Infelizmente nem todos os jovens universitários têm esta oportunidade. E mesmo com todo o seu sacrifício, não me teria sido possível estudar sem a ajuda financeira do meu avô Augusto. Obrigada Avô! Aos meus pais agradeço também o facto de terem sempre acreditado que eu seria capaz, mesmo quando até para mim era difícil acreditar.

Ao João, meu companheiro de vida, agradeço todo o carinho e paciência ao longo de todos estes anos de curso, especialmente durante as épocas de exames. Eu sei que havia dias em que realmente era preciso muita paciência para mim. Obrigada por acreditares sempre em mim mesmo quando eu não acreditava, mesmo quando eu achava que não conseguia! Obrigada por nunca te cansares de me dizer que ia correr tudo bem. De facto, no fim acabava por correr sempre bem.

Agradeço também aos meus amigos, Ângela, Margarida, Marcelo, Rita, Luís, Pedro, Salomé, Igor e Inês. Vocês são de facto amigos que levo de Coimbra e que são para a vida. Obrigada por todos os momentos que me proporcionaram ao longo destes 5 anos, por todas as boas gargalhadas, por todos os desabaços e, sobretudo, por serem um belo exemplo do que significa a palavra “Amizade”.

Deixo também o meu sincero agradecimento à Professora Dra. Sara Domingues, por toda a ajuda prestada nesta etapa final que é a elaboração de uma monografia, e por tudo o que me ensinou e transmitiu durante estes meses que trabalhamos juntas.

Por fim, mas não menos importante é o agradecimento aos professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela qualidade dos conhecimentos transmitidos.

Índice

Índice	4
Abreviaturas	5
Resumo.....	6
Abstract.....	7
1. Introdução.....	8
2. Características das Bactérias.....	9
2.1. Características Estruturais e Morfológicas	9
2.2. Características Metabólicas e Nutricionais.....	10
3. As Bactérias e suas Aplicações.....	13
3.1. As Bactérias e o Ambiente.....	13
3.1.1. Biorremediação	13
3.2. As Bactérias e a Indústria Farmacêutica.....	19
3.2.1. Produção de antibióticos.....	19
3.3. As Bactérias e a Saúde	22
3.3.1. Terapia Génica	22
3.3.2. Probióticos e Prebióticos.....	24
4. Conclusão.....	27
5. Bibliografia	28

Abreviaturas

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

μ – Taxa Específica de Crescimento

O₂ – Oxigénio

ATP – Adenosina TriFosfato

CYP450 – Citocromo P450

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADNr – ADN recombinante

CO₂ – Dióxido de Carbono

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Resumo

As bactérias, paralelamente aos seus malefícios, apresentam inúmeros benefícios e potenciais aplicações dos quais o Homem pode tirar proveito. Se até há umas décadas atrás eram vistas como agentes prejudiciais, hoje são cada vez mais alvo de estudos para tentar perceber o que de bom nos podem proporcionar. A par do seu já longo uso na indústria alimentar, quer na produção de produtos lácteos e cerveja quer como indicadores de segurança e qualidade dos alimentos, as bactérias exibem um variado leque de outras aplicações. O seu potencial tem sido usado em processos de limpeza ambiental, como a biorremediação, mas também na indústria farmacêutica na produção de, por exemplo, antibióticos. Mais recentemente, tem sido a Medicina a dar especial atenção à utilidade das bactérias. O seu potencial nesta área passa pelo seu uso como vetores em diversas terapias, e como probióticos na modelação da flora bacteriana intestinal, revelando benefícios em diversas patologias.

Sendo assim, a presente monografia pretende abordar e sintetizar as aplicações das bactérias em três áreas cruciais para a vida humana que são o Ambiente, a Indústria Farmacêutica e a Medicina. Desde as características estruturais e metabólicas das bactérias até às suas aplicações em áreas tão diversas como as acima referidas, o principal objetivo desta monografia consiste em apresentar algumas das suas potenciais e principais aplicações.

Abstract

Bacteria, in parallel with their harmful effects, have several benefits and potential applications from which man can take advantage. Until a few decades ago, bacteria were only seen as harmful agents, but today there are many studies that try to understand the benefits they can provide us. Bacteria have been used for a long time in the food industry to produce dairy products and beer. Furthermore they have also been used as indicators of safety and quality of food. But bacteria exhibit a wide range of other applications. Their potential has been used in environmental clean-up processes, such as bioremediation, but also in the pharmaceutical industry to produce antibiotics, for example. More recently, it has been the medical area that gives special attention to bacteria. Their potential in this area pass through the use as vectors in various therapies, but also as probiotics, which can model intestinal flora with benefits in various pathologies.

Thus, this monograph aims to address and summarize the applications of bacteria in three crucial areas for human life, which are the Environment, the Pharmaceutical Industry and the Medicine. The structural and metabolic characteristics of bacteria are covered, as well as their applications in these areas. Thus, the main objective of this monograph is to present some of the potential and main applications of bacteria.

I. Introdução

A Microbiologia, como o próprio nome indica, é a ciência que estuda os microrganismos, ou seja, seres de dimensões microscópicas (MADIGAN *et al.*, 2012).

O desenvolvimento das primeiras vacinas deve-se a Edward Jenner em 1788 durante uma epidemia de varíola no Japão. Mais tarde, já no século XIX, Louis Pasteur continuou o trabalho de Jenner, desenvolvendo estirpes atenuadas de bactérias, o que permitiu conhecer o princípio da imunidade.

Robert Koch estabeleceu experimentalmente, pela primeira vez, a associação direta entre uma bactéria e uma determinada doença. Descobriu também quais os agentes etiológicos de várias doenças, como por exemplo, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e o seu papel como agente etiológico da tuberculose (FERREIRA, SOUSA, DE e LIMA, 2010).

O primeiro antibiótico foi descoberto em 1928, por Alexander Fleming, que verificou que o fungo *Penicillium notatum*, produzia uma substância, a penicilina, que inibia o crescimento de colónias bacterianas.

A grande diversidade microbiana possibilita que dentro dos microrganismos se incluam seres eucariotas como os fungos, as algas e os parasitas, seres procariotas como as bactérias e ainda, seres acelulares como os vírus. Esta grande diversidade permite que os microrganismos estejam amplamente distribuídos: no solo; nos oceanos, lagos e pântanos; em regiões com temperaturas extremas, como a região gelada da Antártida, ou a orla escaldante de certos vulcões; no ar; nos alimentos; e também nos seres humanos, fazendo parte da sua flora normal (FERREIRA *et al.*, 2010).

Os microrganismos são, como já referido anteriormente, agentes etiológicos de inúmeras doenças, muitas delas de extrema gravidade, sendo estes normalmente vistos como agentes prejudiciais. No entanto, são também inúmeros os seus benefícios, tendo aplicações em áreas como a produção de alimentos, agricultura, indústria farmacêutica e ecologia ambiental (MADIGAN *et al.*, 2012).

No presente trabalho, apenas as bactérias e o seu papel no ambiente, na indústria farmacêutica e na saúde humana irão ser abordados mais aprofundadamente. No Ambiente, as bactérias podem ser usadas na biorremediação, processo que permite acelerar o

processo de limpeza dos locais contaminados, transformando compostos tóxicos para o ambiente, não comuns na natureza, em compostos não perigosos ou de menor toxicidade (MADIGAN *et al.*, 2012). Na Indústria Farmacêutica, as bactérias são usadas sobretudo na produção de antibióticos, vacinas e hormonas. Podem também ser usadas para a produção de proteínas (como por exemplo, interferão e fator de necrose tumoral), de ácidos nucleicos e de outras substâncias biológicas importantes para o Homem (TODAR, 2012a). Na Saúde, as bactérias têm diversas aplicações de grande interesse. Podem ser usadas em terapia génica como vetores, por exemplo na vacinação contra doenças infecciosas ou na imunoterapia contra o cancro (VASSAUX *et al.*, 2006). Há também substâncias fisiológicas produzidas pelas bactérias, como o ácido 5-aminolevulinico, que estão a ser aplicadas no diagnóstico e tratamento de doenças do foro oncológico (SASAKI *et al.*, 2005). Estudos recentes apontam também a aplicação de probióticos, por exemplo, no tratamento de infeções gastrointestinais, como alternativa ou complemento aos antibióticos, no sentido de minimizar os seus efeitos secundários ou até mesmo o seu uso (PATEL, SHAH e PRAJAPATI, 2013).

2. Características das Bactérias

2.1. Características Estruturais e Morfológicas

As bactérias são seres procariotas, ou seja, caracterizam-se pela ausência de membrana nuclear a envolver o seu material genético. Dentro do domínio *Bacteria*, o filo mais representativo é o *Proteobacteria*. Este inclui as bactérias do género *Pseudomonas*, quimo-heterotróficas, cuja presença nos solos e águas permite que sejam usadas em processos de limpeza do meio ambiente, como a biorremediação. Isto deve-se à sua capacidade de degradar compostos orgânicos sintéticos ou tóxicos naturais, através da respiração aeróbia ou anaeróbia. Na primeira usam o O_2 como aceitador final de eletrões e, na segunda, usam compostos inorgânicos como o nitrato (NO_3^-), reduzindo-os a dinitrogénio (N_2). Os produtos resultantes deste processo são gasosos e facilmente libertados para o meio ambiente num processo denominado de desnitrificação. Esta é uma vantagem no tratamento de esgotos porque, ao converter NO_3^- em N_2 , as bactérias diminuem a quantidade de nitrogénio fixado nos resíduos, possibilitando que as águas que vão receber estes resíduos, como rios e lagos, permitam o desenvolvimento de plantas e animais (MADIGAN *et al.*,

2012). Vários estudos referem o uso destes microrganismos nos processos de desnitrificação de águas residuais. Segundo He e colaboradores (2015), há bactérias do género *Pseudomonas*, como a *Pseudomonas aeruginosa*, que realizam a desnitrificação sob condições aeróbias, desde que lhes sejam proporcionadas as condições ótimas de crescimento.

Quando comparadas com as células eucariotas, em que o seu material genético é delimitado por uma membrana nuclear, as células procariotas exibem uma estrutura celular muito mais simples. O seu genoma encontra-se disperso no citoplasma da célula e não está associado a histonas. As bactérias são, portanto, seres unicelulares, possuidoras de uma parede celular que lhes permite manter a forma, a rigidez e a concentração de solutos no interior da célula adequada à sua sobrevivência (FERREIRA *et al.*, 2010).

A replicação das bactérias ocorre assexuadamente por divisão binária, em que ocorre o aumento do tamanho da bactéria, seguido da sua divisão em duas células (ROLLAND e ROLLAND, 1997).

2.2. Características Metabólicas e Nutricionais

A obtenção de energia e nutrientes pelas bactérias é essencial para o seu crescimento. Este define-se pelo aumento do número de bactérias de uma determinada população, o que implica a divisão da célula bacteriana (FERREIRA *et al.*, 2010).



Figura I: Curva de Crescimento Bacteriano.

O crescimento bacteriano é avaliado através da construção de uma curva de crescimento, em que se determina o número de células/massa celular ao longo do tempo (MADIGAN *et al.*, 2012). Num sistema fechado, em que não há fluxo de materiais, ocorrem essencialmente 4 fases, representadas na figura I. Na fase de latência ocorre adaptação das bactérias ao meio e preparação para a divisão, havendo intensa atividade metabólica. Segue-se a fase

exponencial, onde as bactérias crescem e se dividem à velocidade máxima, que varia, assim como a anterior, de acordo com a espécie e com as condições do meio. Esta fase permite calcular a taxa específica de crescimento (μ), que traduz a velocidade a que cada organismo se multiplica. Sendo a fase de maior atividade metabólica, a fase exponencial é a fase de eleição para aplicações industriais, porque permite garantir que o produto pretendido é produzido eficazmente. Contudo, é preciso cautela porque é também nesta fase que os microrganismos estão mais sensíveis a alterações do meio (TORTORA, FUNKE e CASE, 2000). A acumulação de produtos do metabolismo que inibem o crescimento, assim como o esgotamento de um ou mais nutrientes essenciais ao crescimento bacteriano leva à fase estacionária, em que não há crescimento da população, ou seja, o número de novas células formadas é igual ao número de mortes, mas as atividades metabólicas mantêm-se ativas. A última fase da curva de crescimento é a fase de morte, em que a quantidade de células que morre excede o número de novas células, havendo uma redução da população de forma exponencial (FERREIRA *et al.*, 2010; MADIGAN *et al.*, 2012). No meio industrial é usado um sistema aberto, que fornece continuamente nutrientes à população bacteriana e retira os resíduos do seu metabolismo, evitando, deste modo, as fases estacionária e de morte do crescimento bacteriano. Isto é possível pela adição de um novo meio com nutrientes frescos a intervalos regulares de tempo, controlando-se também a μ . Consegue-se assim que as bactérias se mantenham numa fase exponencial de crescimento contínuo por longos períodos de tempo, havendo sempre produção máxima do produto pretendido (TODAR, 2012b).

O crescimento bacteriano é influenciado por diversos fatores ambientais como a temperatura, o pH, a disponibilidade da água e o oxigénio e por fatores nutricionais como a natureza e a concentração dos nutrientes.

A temperatura é provavelmente o fator mais importante que afeta o crescimento e a sobrevivência bacteriana, havendo um intervalo de crescimento ótimo para cada espécie (MADIGAN *et al.*, 2012). De acordo com este intervalo as bactérias são classificadas em psicrófilas (5-15°C), mesófilas (25-45°C), termófilas (45-75°C) e hipertermófilas (> 70°C). As bactérias termófilas e hipertermófilas são muito usadas na indústria devido à grande estabilidade das suas enzimas, que conseguem catalisar reações bioquímicas a temperaturas elevadas (DE MIGUEL BOUZAS, BARROS-VELÁZQUEZ e VILLA, 2006).

Relativamente ao pH, a maioria das bactérias são neutrófilas (5,5 – 8,0). As bactérias halotolerantes, que toleram alguma concentração de NaCl, embora cresçam melhor na sua

ausência, são bastante usadas na indústria alimentar, quer na produção de alimentos fermentados quer na produção de suplementos, paralelamente às bactérias halófilas, que necessitam da presença de NaCl para se desenvolverem. Halotolerantes e halófilos são também usados na biodegradação de compostos orgânicos, na estabilização de biomoléculas e até mesmo na produção de energias alternativas (MARGESIN e SCHINNER, 2001).

O comportamento das bactérias em relação ao oxigénio (O_2) apresenta uma estreita relação com o seu tipo de metabolismo. As bactérias aeróbias precisam de O_2 para crescer e usam a respiração aeróbia para obter energia. As bactérias anaeróbias, pelo contrário, crescem na ausência de O_2 , podendo este ser mesmo letal para elas, e usam a fermentação ou a respiração anaeróbia para obter energia. Bactérias aeróbias e anaeróbias são usadas no tratamento de águas residuais mas em diferentes fases do processo (PROTECTION, 2012). Na degradação de compostos orgânicos, ou seja na biorremediação, as bactérias aeróbias são as mais usadas. Fritsche e Hofrichter (2001) afirmam mesmo que a degradação de poluentes ocorre mais rápida e eficazmente em condições de aerobiose. A produção de alguns antibióticos também é possível através do uso de algumas bactérias, aeróbias e anaeróbias. As bactérias anaeróbias são bastante usadas a nível industrial, sobretudo na produção de alimentos e bebidas assim como na produção de energias alternativas como o biocombustível. (MADIGAN *et al.*, 2012).

Em termos energéticos, todos os organismos vivos, procariotas e eucariotas, precisam de uma fonte de energia e as bactérias não são exceção. As fototróficas usam a luz solar como fonte de energia, enquanto as quimiotróficas recorrem à oxidação de compostos inorgânicos para obter energia. De acordo com a fonte de carbono que utilizam, as bactérias são classificadas em autotróficas quando usam o CO_2 atmosférico ou em heterotróficas quando recorrem ao carbono orgânico. Tanto as bactérias fototróficas como as quimiotróficas são essenciais à renovação e à continuidade da vida na Terra. Ambas participam em praticamente todos os ciclos que envolvem a degradação de compostos, orgânicos e inorgânicos, com a obtenção de nutrientes que são essenciais à vida de qualquer ser vivo terrestre. Além de contribuírem para a renovação do ar que respiramos, podem ser usadas a nível industrial quer no tratamento de resíduos resultantes de diversos processos industriais quer na obtenção de compostos como os polihidroxialcanoatos, polímeros biodegradáveis usados na produção de plásticos (MADIGAN *et al.*, 2012).

3. As Bactérias e suas Aplicações

O aumento da população mundial paralelamente com o aumento da poluição humana e as necessidades alimentares abriram novos campos de aplicação para as bactérias. Estas podem ser aplicadas: na agricultura, como agentes corretores do solo; no ambiente, como agentes neutralizantes de compostos tóxicos; na medicina, como probióticos ou como vetores na terapia de diversos tipos de cancro, na vacinação contra doenças infecciosas e até na administração tópica de citocinas para atrasar a progressão da doença inflamatória intestinal; na indústria alimentar, como indicadores da segurança e qualidade dos alimentos; e na indústria farmacêutica, na produção de antibióticos, vacinas ou de proteínas humanas como a insulina. E, numa altura em que cada vez mais se torna imperativo pensar e trabalhar para a sustentabilidade das gerações futuras, é imprescindível que se explore aquilo que os seres vivos que com o Homem coabitam o planeta Terra têm de melhor para oferecer.

3.1. As Bactérias e o Ambiente

Cada vez mais surgem problemas a nível ambiental. Desde a poluição de águas à criação de lixeiras sem critérios ambientais, bem como o tratamento inadequado de resíduos ou mesmo a libertação de resíduos tóxicos, são vários os desafios para encontrar novas soluções que permitam manter o equilíbrio da vida na Terra.

3.1.1. Biorremediação

A biorremediação define-se como o “uso de microrganismos para desintoxicar ou remover poluentes graças às suas diversas capacidades metabólicas” (Cit. por DAS e CHANDRAN, 2011). Este processo tira partido da capacidade dos microrganismos usarem contaminantes químicos como fonte de energia, transformando-os em compostos inofensivos ou menos tóxicos (DONLON e BAUDER, 2006). É um processo com grande potencial porque além de usar processos naturais, não requer grande equipamento nem mão-de-obra como a maioria dos processos convencionais, permitindo uma grande poupança nos recursos. Outra grande vantagem é que ao fazer o tratamento *in situ* do solo ou água contaminada, evita-se o transporte e conseqüente contaminação de outro local (STATES *et al.*, 1996).

A biorremediação tem inúmeras aplicações e, segundo DONLON e BAUDER (2006), a sua eficácia tem sido demonstrada e aplicada na remoção de hidrocarbonetos, solventes e compostos orgânicos halogenados, pesticidas e herbicidas não clorados, compostos

azotados, metais como o mercúrio e radio nucleótidos. Contudo, esta imensidão de utilizações torna impossível fazer uma abordagem transversal sobre todas elas com a atenção desejada e merecida, pelo que se tornou impreterível fazer uma seleção e direcionar o presente trabalho para o que se entendeu ser mais atual e prevalente. Assim sendo, e tendo em conta que um dos maiores problemas ambientais da sociedade atual está relacionado com a contaminação de solos e águas por hidrocarbonetos, que resultam de atividades relacionadas com a indústria petroquímica, o presente trabalho vai incidir sobre a degradação bacteriana de hidrocarbonetos de petróleo.

Os produtos derivados do petróleo são a maior fonte de energia, quer da indústria quer da vida quotidiana de qualquer cidadão. Contudo, são também a principal fonte de contaminação do solo e da água, através de derrames acidentais ou vazamentos que ocorrem durante todo o processo de manipulação do petróleo e seus derivados. Esta contaminação tem impacto quer nas plantas quer nos animais, incluindo o Homem, levando a vários efeitos carcinogénicos e neurotóxicos (Cit. por SINGH e CHANDRA, 2014), podendo mesmo causar mortes e mutações (Cit. por DAS e CHANDRAN, 2011). Vários métodos convencionais têm sido usados na tentativa de resolver este problema, incluindo tratamentos físicos e químicos como a adsorção, vaporização ou a extração, mas que se tornam bastante dispendiosos em termos de equipamento e mão-de-obra. A biorremediação surge como uma alternativa não invasiva e com uma boa relação custo/eficácia (Cit. por DAS e CHANDRAN, 2011).

A bioaugmentação e a bioestimulação são duas abordagens possíveis na biorremediação de derrames de petróleo. Na primeira abordagem, são adicionadas bactérias capazes de degradar o petróleo como suplemento à população microbiana já existente, ao passo que, na segunda abordagem, são adicionados nutrientes ou outros substratos que estimulem o crescimento dos microrganismos, incluindo as bactérias, que degradam o petróleo (Cit. por DAS e CHANDRAN, 2011). Quer numa quer noutra abordagem as espécies bacterianas mais usadas incluem as dos géneros *Pseudomonas*, *Escherichia*, e *Enterobacter*, entre outras (ATLAS, 1996). É de acordo com o tipo de local afetado e de acordo com o tipo de poluente que se escolhe a abordagem mais adequada. Mas, quer na bioaugmentação quer na bioestimulação, há aumento da população bacteriana no sentido de otimizar a taxa de degradação do agente poluente. Após a degradação do composto a população decresce naturalmente (Cit. por SINGH e CHANDRA, 2014).

Os hidrocarbonetos são moléculas químicas que apenas contêm átomos de carbono e hidrogénio e, portanto, a ausência de grupos funcionais polares leva a que tenham baixa solubilidade na água. A baixa reatividade química deve-se à grande estabilidade das ligações C-H. Estes podem ser divididos em dois grandes grupos: os alifáticos e os aromáticos. É no grupo dos alifáticos que se incluem os alcanos com muitas ligações saturadas, o que os torna bastante estáveis. Os aromáticos, que contêm um ou mais anéis, são ainda menos reativos que os alifáticos devido à grande estabilidade que a sua estrutura anelar oferece (Cit. por HEIDER E SCHUHLE, 2013). Os hidrocarbonetos apresentam, portanto, diferente suscetibilidade ao ataque microbiano e, alguns compostos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de elevado peso molecular, não são totalmente degradados. De facto, as bactérias representam o papel principal na biodegradação destes compostos, sendo mesmo consideradas os agentes mais ativos na biodegradação do petróleo (Cit. por DAS e CHANDRAN, 2011). Mas Fritsche e Hofrichter (2001) referem que “apesar de muitas bactérias serem capazes de metabolizar poluentes orgânicos, uma bactéria isolada não possui a capacidade enzimática para degradar todos ou mesmo a maioria dos compostos orgânicos presentes num solo poluído”. Os biofilmes, formados por diferentes microrganismos, permitem às diferentes espécies de bactérias, fungos e algas formarem uma espécie de comunidade em que as diferentes capacidades metabólicas levam a que tenham um maior potencial de biodegradação das misturas de hidrocarbonetos, como o petróleo bruto no solo, na água e em ambientes marinhos (DAS e CHANDRAN, 2011; FRITSCHER e HOFRICHTER, 2001). Segundo Fritsche e Hofrichter (2001), o género de bactéria *Pseudomonas* é o que apresenta maior potencial de degradação deste tipo de compostos. Das e Chandran (2011) enumeram outras espécies bacterianas que também degradam hidrocarbonetos e que incluem, entre outros, os géneros *Acinetobacter*, *Gordonia* e *Mycobacterium*. A biodegradação de hidrocarbonetos é possível quer em condições de anaerobiose quer em condições de aerobiose, mas é neste último caso que ela é mais rápida e completa (Cit. por DAS e CHANDRAN, 2011). Em condições aeróbias, como demonstrado na figura 2, ocorre a incorporação da molécula de O₂ nos hidrocarbonetos, pela ação de oxigenases e peroxidases pertencentes à família das hidroxilases do Citocromo P450 (CYP450), e é esta a reação chave que vai possibilitar o início do processo de biodegradação. O hidrocarboneto doa eletrões, ficando oxidado, ao passo que o O₂ recebe eletrões e fica reduzido (DONLON e BAUDER, 2006). As cascatas de reações subsequentes, em termos gerais, levam a produtos intermediários introduzidos no ciclo do

ácido tricarboxílico e apresentam uma função dupla.

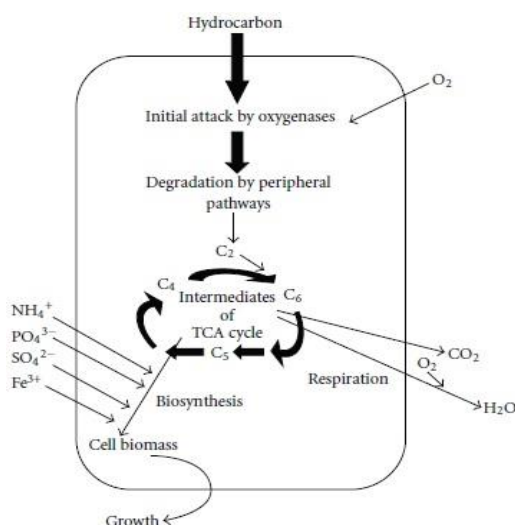


Figura 2: Via principal de degradação aeróbia de hidrocarbonetos.

Ao mesmo tempo que são substratos para o metabolismo energético da bactéria, são também elementos essenciais de crescimento e nutrição celular: quer para a síntese de aminoácidos e proteínas quer para a síntese de ácidos nucleicos e de açúcares que vão fazer parte da parede celular bacteriana (FRITSCH e HOFRICHTER, 2001). Como produtos finais do processo da biorremediação surgem moléculas simples como o CO_2 , H_2O e ácidos gordos (Cit. por SINGH e CHANDRA, 2014). Em derrames de petróleo no mar, por exemplo, a biorremediação em condições aeróbias é o processo mais usado porque é na presença de O_2 que a enzima oxigenase funciona, permitindo a obtenção de resultados mais eficazes e num menor período de tempo (MADIGAN *et al.*, 2012). Nestas situações acontece que, como o óleo é menos denso que a água, flutua à superfície formando manchas. E é às gotas de óleo que compõem essas manchas que as bactérias degradadoras de hidrocarbonetos se vão fixar e decompô-las, de modo a solubilizar o óleo e a dispersar a mancha (MADIGAN *et al.*, 2012). Este fenómeno deve-se à capacidade das bactérias produzirem umas substâncias químicas anfipáticas denominadas biossurfatantes. Além de aumentarem a solubilidade e a remoção do contaminante, os biossurfatantes aumentam também a biodisponibilidade do mesmo para a degradação bacteriana (Cit. por DAS e CHANDRAN, 2011). Os biossurfatantes, como representado na figura 3, atuam como agentes emulsificantes ao diminuir a tensão arterial e formando micelas, que ao serem encapsuladas na superfície hidrofóbica da célula bacteriana são internalizadas e degradadas (Cit. por DAS e CHANDRAN, 2011). Cameotra e Singh (2008) defendem, entre outros

autores, que as bactérias do género *Pseudomonas* são as que apresentam maior capacidade de produção de biosurfatantes, sendo os que elas produzem constituídos essencialmente por ramnolípidos e, além disso, são as que possuem também maior capacidade de utilização de hidrocarbonetos como fonte de carbono e de energia.

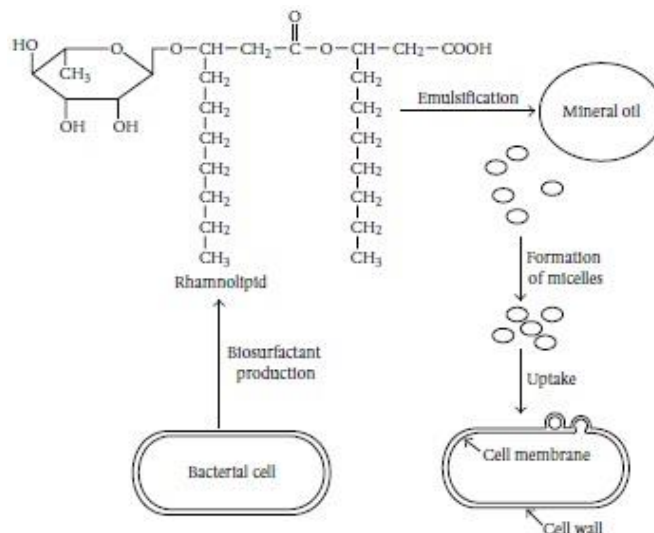


Figura 3: Envolvimento do biosurfatante (ramnolípidos) produzido por *Pseudomonas* spp. na captação de hidrocarbonetos.

Em derrames de petróleo de grandes dimensões, como é o caso do derrame de *Exxon Valdez* em 1989 e do derrame no Golfo do México em 2010, os hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos voláteis (de baixo peso molecular) evaporam-se rapidamente sem ocorrer o processo de biorremediação. Ficam os não-voláteis que, com o fornecimento dos nutrientes adequados, são degradados pelas bactérias em aproximadamente 80%, no espaço de um ano (MADIGAN *et al.*, 2012). Contudo, há sempre frações do petróleo que, não sendo os substratos alvo das bactérias, permanecem no meio ambiente durante mais tempo. É o caso daquelas que são constituídas por hidrocarbonetos com ramificações nas suas cadeias e hidrocarbonetos policíclicos (MADIGAN *et al.*, 2012).

Até aos anos 90 pensava-se que a biodegradação de hidrocarbonetos apenas seria possível em condições de aerobiose. Estudos surgiram posteriormente a confirmar a possibilidade de biodegradação destes compostos em meios anaeróbios. As bactérias responsáveis por este processo são naturalmente anaeróbias, e usam a respiração anaeróbia com nitrato, iões metálicos ou sulfato para o seu metabolismo energético. Mas há também exemplos de fototróficos anaeróbios e de microrganismos que usam processos fermentativos para degradar estes compostos. Na degradação anaeróbia de hidrocarbonetos há uma grande diversidade de reações possíveis com uma relação muito estreita com a estrutura do

composto. Mas, comum a todas elas é a elevada sensibilidade ao oxigénio das enzimas envolvidas e a lentidão das reações quando comparadas com as correspondentes reações em condições aeróbias (Cit. por HEIDER e SCHUHLE, 2013).

Para que a taxa de biorremediação seja ótima há fatores que é necessário ter em conta. Antes de mais é de extrema importância conhecer a composição e inerente degradabilidade do hidrocarboneto poluente para que a biorremediação seja uma hipótese válida. A temperatura é talvez o mais importante de todos os fatores físicos, porque além de afetar o comportamento químico do hidrocarboneto, afeta também a diversidade e fisiologia da flora microbiana. As baixas temperaturas diminuem a taxa de degradação e atrasam o seu início, uma vez que a viscosidade do óleo aumenta enquanto a volatilidade dos hidrocarbonetos de baixo peso molecular diminui. Sendo assim, o intervalo de temperaturas em que a taxa de degradação é máxima situa-se entre 30-40°C para os solos, 20-30°C para alguns meios de água doce e 15-20°C para ambientes marinhos (Cit. por DAS e CHANDRAN, 2011), o que encaminha sempre para o uso de bactérias mesófilas. No que diz respeito aos nutrientes, são eles também um fator bastante importante podendo mesmo, em alguns casos, atuar como fatores limitantes. É o caso do azoto e do fósforo em derrames de petróleo de grandes dimensões no mar ou em água doce onde, ao contrário destes, o carbono se encontra em níveis bastantes elevados. Contudo, o excesso de nutrientes pode também inibir a biodegradação. Nestes casos, que acontecem sobretudo no solo, há autores que defendem o uso de estrume de aves como fertilizador orgânico (Cit. por DAS e CHANDRAN, 2011). O pH dos solos e das águas também é bastante importante neste processo, sendo o pH ótimo de degradação dos hidrocarbonetos 7 com um intervalo de aceitação entre 6 e 8 (DONLON e BAUDER, 2006). Outros fatores como os níveis de oxigénio, a humidade do solo ou a salinidade e a pressão são igualmente importantes para o sucesso da biorremediação (Cit. por SINGH e CHANDRA, 2014).

O grande potencial da biorremediação na transformação de diversos compostos tóxicos é contrastado pelas limitações que apresenta: dificuldade em perceber como se comportam as bactérias e os outros microrganismos no ambiente real; dificuldade em garantir todas as condições ótimas para que a taxa de biodegradação seja máxima; e dificuldade em garantir o contato adequado entre as bactérias e o contaminante, entre outras. Muita pesquisa ainda deve ser feita e, embora muitas técnicas de biorremediação sejam desenvolvidas em laboratório, é necessário avaliar se a sua aplicação num local com uma mistura complexa de

contaminantes é válida e exequível. Contudo, não deixa de ser uma tecnologia do futuro que merece a devida atenção, pois pode vir a ser uma alternativa bastante válida e ecológica aos métodos convencionais existentes.

3.2. As Bactérias e a Indústria Farmacêutica

As bactérias são usadas na indústria farmacêutica de diversas formas e na produção de diversos produtos como antibióticos, vacinas e hormonas, tirando partido das suas capacidades metabólicas (TODAR, 2012a). Outra das suas aplicações é na produção de enzimas extracelulares, isto é exo enzimas que, como têm a capacidade de decompor polímeros insolúveis (celulose, proteínas, lípidos e amido), são usadas comercialmente na indústria alimentar e farmacêutica (MADIGAN *et al.*, 2012).

A obtenção destes produtos é possível graças à aplicação de técnicas biotecnológicas. A biotecnologia define-se como o uso de organismos ou moléculas biológicas na produção industrial de determinado produto. Neste termo incluem-se processos como a fermentação, usada desde há muito tempo, e processos descobertos nos últimos anos como a tecnologia de significado de ADN recombinante (ADNr) (Cit. por STRYJEWSKA, KIEPURA, LIBROWSKI, e LOCHYNSKI, 2013).

3.2.1. Produção de antibióticos

Os antibióticos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, com capacidade para inibir o crescimento bacteriano. Segundo Raaijmakers e Mazzola (2012), relativamente aos antibióticos naturais, o termo antibiótico é definido como “uma substância produzida por um microrganismo apta para, numa solução diluída, inibir ou matar outro microrganismo”. Os antibióticos naturais são metabolitos secundários produzidos pelos microrganismos, os quais não são essenciais para as suas atividades metabólicas básicas, como crescimento e reprodução (BEHAL, 2002). Há bactérias, como as do género *Streptomyces* que, além dos antibióticos naturais produzem outros metabolitos bioativos como antifúngicos, antitumorais, antivíricos, imunossuppressores e ainda anti-hipertensores. A produção da maioria dos antibióticos é específica de determinada espécie, ou produzida por um limitado número de espécies. Por exemplo, as bactérias da espécie *Streptomyces griseus* produzem o antibiótico estreptomicina, ao passo que as da espécie *Streptomyces avermitilis* produzem avermectina. Esta produção específica de antibióticos pelas espécies do género *Streptomyces*

permite-lhes competir com outros microrganismos, mesmo dentro do mesmo género, e permite-lhes também criar uma relação de simbiose com as plantas, protegendo-as de outros agentes patogénicos ao mesmo tempo que se alimentam dos exsudatos produzidos por elas (Cit. por LIMA PROCÓPIO, DE *et al.*, 2012). Filogeneticamente, o género *Streptomyces* faz parte do grupo de bactérias Gram positivo Actinobactérias. As bactérias deste grupo, aeróbias, são as que produzem os antibióticos com maior interesse comercial sendo, portanto, as de maior aplicação a nível industrial. É no final da fase exponencial e durante a fase estacionária do crescimento bacteriano que os antibióticos são produzidos, um processo bastante dependente das condições de crescimento, e sobretudo da composição do meio de cultura (CASQUEIRO, 2010). Contudo, a nível industrial, nunca se chega a atingir a fase estacionária porque o crescimento bacteriano ocorre em sistema aberto, e o objetivo é manter as bactérias em fase exponencial durante o máximo de tempo possível.

Industrialmente, a produção de antibióticos está dependente de um processo fermentativo. O primeiro antibiótico a ser produzido a uma escala industrial foi a penicilina, produzida naturalmente pelo fungo *Penicillium notatum*. É de referir, contudo, que nem todos os antibióticos produzidos a nível industrial são obtidos através de processos fermentativos: há antibióticos semissintéticos produzidos a partir dos produtos microbianos e há antibióticos produzidos de forma sintética, como é o caso do cloranfenicol e da fosfomicina, por exemplo (CASQUEIRO, 2010).

O processo de fermentação consiste numa série de reações bioquímicas através das quais uma substância é decomposta por um fermento. É durante a fermentação que as bactérias crescem e produzem o antibiótico.

Inicialmente, é feito o rastreio dos antibióticos com interesse comercial. Para tal, diferentes culturas de bactérias são isoladas e cultivadas e avalia-se se os produtos que produzem conseguem inibir o crescimento de outros microrganismos em teste. A bactéria de interesse é então isolada a partir dessa cultura e armazenada em laboratório. Na maioria das vezes, a bactéria é modificada geneticamente no sentido de maximizar a produção de antibiótico: pela introdução de mutações através de raios ultravioleta, raios-x ou certos químicos; ou pela amplificação de genes que codificam as enzimas envolvidas na produção do antibiótico. Industrialmente, antes de se iniciar o processo de fermentação, a bactéria de interesse isolada é colocada num meio de cultura adequado ao seu crescimento, para que se obtenha

a quantidade de bactérias necessárias ao processo. De seguida, esta cultura é colocada em recipientes agitadores para promover o crescimento da população e, no final, obtém-se uma suspensão bacteriana que é instalada em tanques de aço desenhados para promover, de igual forma, o crescimento bacteriano. Nestes tanques, como demonstrado na figura 4, são garantidas todas as condições que as bactérias precisam para crescer: uma fonte de carbono (ácido acético, hidrocarbonetos, álcoois); uma fonte de alimento com hidratos de carbono (lactose, glucose); uma fonte de azoto (sais de amónia); e fatores de crescimento, como vitaminas, aminoácidos ou micronutrientes (fósforo, magnésio,...).

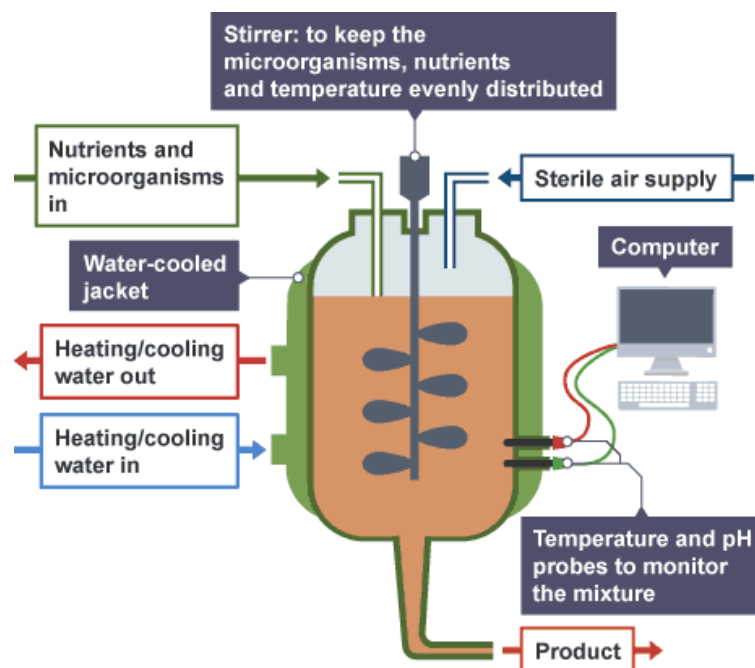


Figura 4: Constituição de um tanque de fermentação.

Além disso, estão equipados com misturadores que mantêm o meio de cultura em movimento, e com uma bomba que fornece ar filtrado e estéril. Após 24-48 horas, o material destes tanques é transferido para os tanques de fermentação. Estes são muito semelhantes aos tanques anteriores mas de maior dimensão (100 000 a 150 000 litros) e contêm o mesmo meio de cultura. É igualmente estimulado o crescimento bacteriano mantendo as condições ótimas para tal: temperatura, agitação constante; corrente de ar esterilizado e pH. É durante este processo que as bactérias excretam grandes quantidades de antibiótico para o meio de cultura. Após 4-5 dias atinge-se a produção máxima de antibiótico e inicia-se o processo de separação e purificação. Para antibióticos solúveis em água, o método de troca iónica é bastante eficaz. Para antibióticos insolúveis em água é

necessário recorrer a um solvente de extração (ROMANOWSKI, 2007).

O antibiótico, isolado, pode assumir diversas formas na sua fase final: comprimidos, cápsulas, granulados, pomadas ou até mesmo soluções para administração intravenosa. Os processos seguintes a utilizar são adequados de acordo com a forma final que se pretende para o antibiótico.

Por fim, é importante referir que o controlo de qualidade na produção de antibióticos é de extrema importância para garantir que em nenhum ponto do processo ocorre qualquer tipo de contaminação. Para tal, quer o meio de cultura quer todo o equipamento utilizado são esterilizados a vapor de forma exaustiva. Além disso, os microrganismos e todos os compostos utilizados são verificados de forma periódica recorrendo a métodos cromatográficos. No produto final, são ainda avaliadas propriedades como o pH, o ponto de fusão e o teor de humidade (ROMANOWSKI, 2007).

3.3. As Bactérias e a Saúde

A utilização das bactérias como coadjuvantes terapêuticos ou até mesmo como agentes terapêuticos não se encontra ainda bem estabelecida nos dias de hoje. Apesar de vários estudos demonstrarem a sua eficácia no tratamento de diversas patologias, há outros estudos que não o demonstram, havendo, portanto, uma grande controvérsia em torno deste tema. A aplicação das bactérias na Medicina debruça-se sobretudo sobre o seu potencial como probióticos e como vetores em terapia génica.

3.3.1. Terapia Génica

A terapia génica consiste numa técnica experimental em que se recorre à inserção de genes geneticamente modificados no interior das células. O objetivo é substituir genes defeituosos e tratar anomalias genéticas ou combater doenças de uma forma mais específica (MERRIAM-WEBSTER, 2015). O uso das bactérias como mediadoras da transferência genética tem sido investigado desde há algum tempo, sendo esta uma estratégia recente, mas para a qual estudos pré-clínicos demonstraram já o seu grande potencial. VASSAUX *et al.*, (2006) referem os benefícios terapêuticos observados na vacinação contra doenças infecciosas, na imunoterapia contra o cancro e na libertação local de citocinas imunomoduladoras na doença inflamatória intestinal. As estirpes bacterianas usadas nas investigações são estirpes atenuadas de *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Yersinia* e até mesmo uma estirpe não patogénica de

Escherichia coli. De uma forma muito geral, as bactérias entram nas células alvo, como por exemplo nos macrófagos ou nas células dendríticas, por fagocitose. Quando as células alvo são não fagocíticas, é o contacto entre a bactéria e a célula ou a ligação de uma proteína bacteriana a um recetor específico na superfície da célula alvo, que despoleta uma série de reações internas que culminam na captação da bactéria para o meio intracelular. Uma vez dentro das células, as bactérias permanecem dentro de fagossomas até a toxina listeriolisina O formar poros na membrana do fagossoma, permitindo à bactéria escapar para o citoplasma. Aqui, a bactéria, por ação de uma lisina, liberta o seu conteúdo, o qual inclui um plasmídeo com o gene de interesse. Para conseguir chegar ao núcleo, o plasmídeo mantém-se no citoplasma até ocorrer uma divisão mitótica, durante a qual há rutura da membrana plasmática, uma vez que não é possível o seu transporte ativo do citoplasma para o núcleo (VASSAUX *et al.*, 2006).

Os estudos realizados em terapia génica bacteriana são sobretudo estudos *in vitro* ou estudos pré-clínicos em animais. A proposta de vacinação contra o VIH usando estirpes atenuadas de *Shigella* e *Salmonella* baseia-se em estudos realizados em ratos, nos quais se verificou que ambas eram capazes de induzir a resposta imunitária específica das células T CD8 contra o antígeno viral. A via de administração também influencia a capacidade de activação do sistema imunitário: a estirpe de *Shigella* administrada nasalmente revelou ter maior capacidade de activar a resposta imunitária das células TCD8 quando comparada com a administração oral de estirpes atenuadas de *Salmonella*. Estas têm sido testadas sobretudo em aplicações terapêuticas na área oncológica, como agentes transportadores de vetores que codificam para um determinado antígeno tumoral. Os resultados obtidos em modelos animais revelaram-se promissores mostrando ser possível a proteção contra um antígeno tumoral através da vacinação (VASSAUX *et al.*, 2006). As células dos tecidos tumorais apresentam baixos níveis de oxigénio relativamente às células dos tecidos normais, e a presença de nutrientes bacterianos (purinas, e de outros compostos como aspartato, serina, citrato, galactose, ou ribose) produzidos por elas funcionam como agentes atrativos à quimiotaxia bacteriana. Além disso, têm a capacidade de desenvolver novos vasos sanguíneos extremamente desorganizados o que leva a uma circulação sanguínea lenta, permitindo às bactérias entrar diretamente no tumor e aí permanecer. Tudo isto, aliado às diversas estratégias que as células cancerosas desenvolvem para não ativar o sistema imunitário, fazem do tecido tumoral um ambiente ótimo para o crescimento bacteriano, sobretudo de bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas (CUMMINS *et al.*, 2014). Sendo assim, as

bactérias tornam-se potentes vetores para as estratégias de tratamento anti-tumoral.

A nível gastrointestinal, a aplicação de vetores usando estirpes bacterianas tem sido estudada como alternativa à terapêutica farmacológica tradicional, na doença inflamatória intestinal. A maioria das estratégias usadas baseia-se na imunomodulação, mas a sua falta de especificidade de órgão resulta em efeitos secundários indesejáveis. Sendo assim, na tentativa de colmatar estas limitações foram já desenvolvidos vetores recorrendo a estirpes recombinantes de bactérias, como é o caso da bactéria *Lactococcus lactis*, a qual foi projectada para produzir a citocina anti-inflamatória IL-10. Esta é produzida localmente a nível do intestino e previne o desenvolvimento de colite, o qual já foi demonstrado em diferentes modelos de ratos (VASSAUX *et al.*, 2006). Contudo, os ensaios clínicos usando estirpes bacterianas como vetores ainda são poucos, devido às preocupações relativamente à sua segurança. Dos ensaios realizados, alguns são muito antigos, outros foram interrompidos, estando a evidência da eficácia desta estratégia baseada sobretudo em ensaios pré-clínicos. De todos os ensaios clínicos realizados em terapia génica, aqueles que usaram bactérias como vetores representam uma percentagem mínima, o que revela que ainda há muito a fazer em termos de eficácia e segurança (WILEY e Ltd., 2015).

3.3.2. Probióticos e Prebióticos

Os probióticos são organismos vivos que, quando administrados em determinadas quantidades, conferem benefícios em termos de saúde ao hospedeiro (SHERIDAN *et al.*, 2013). Os prebióticos são hidratos de carbono não digestíveis, seletivamente fermentados pela flora intestinal, conduzindo a progressos nos resultados de saúde (SHERIDAN *et al.*, 2013). Probióticos e prebióticos podem estar presentes na mesma preparação, tomando esta a designação de simbiótico (KNOTT, HARDING e COX, 1999). Apesar de várias espécies bacterianas serem usadas como probióticos, as espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais vulgarmente usadas, tendo já uma história longa e segura na produção de produtos lácteos, fazendo também parte da flora intestinal (Cit. por ASHRAF e SHAH, 2014). Esta contribui para a saúde a nível gastrointestinal e a sua alteração tem sido associado a inúmeras patologias. Os ensaios clínicos existentes têm analisado os efeitos terapêuticos dos probióticos em patologias severas, incluindo na diarreia associada ao uso de antibióticos, no síndrome do cólon irritável e nas doenças inflamatórias intestinais (CIORBA, 2012). Outros benefícios em termos de saúde que têm sido associados aos probióticos incluem propriedades anticarcinogénicas e antimutagénicas, diminuição do colesterol sérico

e estimulação do sistema imunitário. Estes benefícios são específicos de cada estirpe bacteriana, ou seja, não há uma estirpe universal que os reúna todos, nem mesmo dentro da mesma espécie bacteriana (Cit. por ASHRAF e SHAH, 2014).

Uma área onde os probióticos podem ser úteis é na prevenção de episódios repetidos de diarreia. Isto acontece, por exemplo, em populações onde existem grandes carências alimentares, com grande déficit de ingestão de nutrientes, o que leva a graves casos de má nutrição. Apesar de algumas variações, a maioria dos ensaios demonstra haver uma diminuição na duração da diarreia nos grupos que seguem um tratamento probiótico relativamente aos grupos de controlo. Há evidência de que os probióticos conseguem, por diversos mecanismos, aumentar a biodisponibilidade dos micronutrientes, aumentando assim a sua absorção. Isto representa um potencial caminho para atenuar as deficiências nutricionais que fazem parte da vida de tantas crianças e até mesmo de adultos. Contudo, tendo em conta que a flora intestinal é variável de acordo com a área geográfica em questão e de acordo com a idade, os probióticos a usar têm que ser adequados a cada uma destas e de outras situações, pelo que ainda muita investigação é necessária neste campo (SHERIDAN *et al.*, 2013).

Os probióticos, no que se refere ao tratamento de infeções gastrointestinais, têm sido progressivamente documentados como uma alternativa ou complemento aos antibióticos, com potencial para reduzir o seu uso e até mesmo os seus efeitos secundários. Nas infeções por *Helicobacter pylori*, por exemplo, o tratamento de primeira linha envolve sempre a associação de antibióticos, o que traz quase sempre efeitos secundários preocupantes, como náuseas, diarreia, distensão abdominal e alteração do paladar, o que leva muitas vezes à interrupção do tratamento e ao aparecimento de resistências. Uma das potenciais terapias envolve a aplicação de probióticos, sendo que vários estudos iniciais, com várias estirpes bacterianas, demonstraram resultados bastante promissores: os probióticos conseguem modificar a resposta imunológica do hospedeiro, interagindo com as células epiteliais e modulando a produção de citocinas anti-inflamatórias, o que resulta numa diminuição da atividade gástrica e da inflamação. Alguns ensaios clínicos já foram efetuados, os quais demonstraram benefícios no uso de probióticos em infeções por *H. pylori*: conseguem reduzir ou mesmo prevenir os efeitos secundários relacionados com a toma de antibióticos e têm um efeito inibitório sobre a bactéria, o que faz dos probióticos potenciais agentes de complemento ao seu tratamento (Cit. por PATEL *et al.*, 2013).

Há estudos que também abordam os benefícios dos probióticos nas doenças alérgicas. O aumento da presença de bactérias probióticas no intestino tem sido correlacionado com um aumento na proteção contra a atopia, podendo mesmo esta composição bacteriana específica afetar o risco de desenvolver doenças alérgicas. A hipótese higiênica, em medicina, é uma hipótese que argumenta que a falta de exposição, na infância, a agentes infecciosos, microrganismos ou parasitas, ao impedir o desenvolvimento natural do sistema imunitário, aumenta a suscetibilidade a doenças alérgicas. A alergia é então uma reação de hipersensibilidade despoletada por mecanismos imunológicos. O potencial dos probióticos nestas doenças prende-se com a sua capacidade de alterar a microflora local e a produção de citocinas, modulando desta forma o sistema imunitário e a resposta imunológica. Alguns estudos feitos em humanos demonstram os efeitos benéficos dos probióticos nas doenças alérgicas como a dermatite atópica. Nesta, a evidência científica sugere que a eficácia é superior na prevenção da condição do que propriamente no tratamento. Na asma, ainda existem poucos estudos e os que existem, realizados em crianças asmáticas, não evidenciam diferença estatística entre o grupo de intervenção e o grupo de controlo (Cit. por TANG, CHANG e CHEN, 2015). Resumindo, apesar dos probióticos poderem vir a ter um papel importante na prevenção e tratamento das doenças alérgicas, os estudos existentes até à data não têm sido conclusivos.

Muitas questões estão ainda por responder sobretudo no que diz respeito à segurança dos probióticos. As preocupações gerais prendem-se com a hipótese das estirpes bacterianas usadas como probióticos se tornarem patogénicas e resistentes aos antimicrobianos. Snyderman (2008) fez uma revisão acerca da segurança dos probióticos relatando que, apesar de alguns casos reportados de bacterémia, endocardites e fungemia, existe evidência científica suficiente para suportar a hipótese de que não existe um aumento geral do risco nas populações expostas. Sendo assim, mesmo com todo o potencial dos probióticos ainda existem muitos desafios pela frente, até que o seu uso em termos terapêuticos seja aceite de forma global. Mas, numa altura em que começa a ser imperativo encontrar alternativas, este é com certeza um caminho a seguir.

4. Conclusão

As bactérias, embora seres microscópicos têm demonstrado uma enorme diversidade de aplicações e potencialidades. A evidência científica da sua utilização na biorremediação remonta já aos anos 80, quando após o derramamento de petróleo do navio *Exxon Valdez*, se recorreu ao uso de microrganismos para degradar os constituintes do petróleo. Este processo revela-se bastante promissor, com vantagens quer a nível ambiental quer a nível económico, quando comparado com outros métodos convencionais. Contudo, a biodegradação de poluentes pelas bactérias é um processo muito lento e mesmo com a adição de fertilizantes, o aumento da taxa de biodegradação não é significativo. Além disso, as condições ótimas que se conseguem estabelecer em laboratório são muito difíceis de alcançar e controlar em ambiente real, o que limita ainda mais a utilização deste processo na biodegradação de poluentes ambientais. Contudo, numa época em que a sociedade depende do petróleo mais do que nunca, mas que, ao mesmo tempo, se começa a preocupar com as questões ambientais, este é com certeza um caminho a seguir.

As evidências atualmente disponíveis no que diz respeito à utilização das bactérias a nível industrial revelam um enorme manancial de aplicações. Desde a indústria alimentar à indústria farmacêutica muitos são já os processos industriais onde as bactérias são utilizadas. Nesta última, a sua utilização começou na produção de antibióticos, estando presente em tecnologias mais recentes, de ADN_r, para a produção de, por exemplo, proteínas humanas como a insulina. Porém, se o seu uso está bem estabelecido em alguns processos industriais, noutras áreas, nomeadamente na construção de vetores em terapia génica, ainda há muitas questões por resolver. As principais questões neste campo surgem, essencialmente, em relação à segurança e eficácia da utilização das bactérias. Embora estudos *in vitro* e estudos pré-clínicos demonstrem a sua eficácia, ainda não há consenso robusto o suficiente para avançar com estudos clínicos.

Relativamente aos probióticos, já existe alguma evidência científica dos seus benefícios em diversas situações, nomeadamente em doenças alérgicas e intestinais e como coadjuvantes na quimioterapia. Contudo, as preocupações relativas à segurança do seu uso limitam o avançar de mais estudos clínicos. As apreensões prendem-se com a possibilidade de transferência de genes de resistência entre espécies probióticas, comensais e patogénicas (PATEL *et al.*, 2013). *Será isto uma possibilidade?*

5. Bibliografia

- ASHARF, R.; SHAH, N. P. - **Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 54, (2014) 938–956.
- ATLAS, R. M. - **Microbial Ecology and Environmental Microbiology**. In: ATLAS, R. M. *Principles of Microbiology*. McGraw-Hill, 1996. ISBN 0-07-114027-1, p. 738–815.
- BEHAL, V. - **Antibiotics**. *Biotechnology Annual Review*. Vol. 8, (2002) 227–265.
- CAMEOTRA, S. S.; SINGH, P. - **Bioremediation of Oil Sludge Using Crude Biosurfactants**. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 62, N° 3 (2008) 274–280.
- CASQUEIRO, J. - **Production of Antibiotics**. *Biotechnology*. Vol. 5, (2010) 1–7.
- CIORBA, M. A. - **A Gastroenterologist's Guide to Probiotics**. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. Vol. 10, N° 9 (2012) 960–968.
- CUMMINS, J. *et al.* - **Bacterial Systems for Gene Delivery to Systemic Tumors**. In: JAIN, K. K. *Drug Delivery System SE - 13 Methods in Molecular Biology*. New York: Springer, 2014. ISBN 978-1-4939-0362-7, p. 201–209.
- DAS, N.; CHANDRAN, P. - **Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: an Overview**. *Biotechnology Research International*. Vol. 2011, (2011) 1–13.
- DONLON, D. L.; BAUDER, J. W. - **A General Essay on Bioremediation of Contaminated Soil**. Montana: Montana State University-Bozeman, 2006, atualizado em 2006. [Acedido a 4 maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://waterquality.montana.edu/docs/methane/Donlan.shtml>.
- FERREIRA, W. F. C.; SOUSA, J. C. F. DE; LIMA, N. - **Microbiologia**. 1ª edição. Lisboa: Lidel-Edições Técnicas, 2010. ISBN 978-972-757-515-2.
- FRITSCHÉ, W.; HOFRICHTER, M. - **Aerobic Degradation by Microorganisms**. In: FRITSCHÉ, W.; HOFRICHTER, M. *Biotechnology Set. H. J. Rehm, G. Reed*, 2001. ISBN 9783527620999, p. 144–167.
- HE, D. *et al.* - **Interaction of Cr(VI) Reduction and Denitrification by Strain Pseudomonas aeruginosa PCN-2 Under Aerobic Conditions**. *Bioresource Technology*. Vol. 185, N° 0 (2015) 346–352.
- HEIDER, J.; SCHUHLE, K. - **Anaerobic Biodegradation of Hydrocarbons Including Methane**. In: ROSENBERG, E. *et al.* *The Prokaryotes SE - 80*. Berlin: Springer, 2013. ISBN 978-3-642-30140-7. p. 605–634.
- KNOTT, L.; HARDING, M.; COX, J. - **Probiotics and Prebiotics**. Reino Unido: Patients.info, 2014. [Acedido a 8 de junho de 2015]. Disponível na Internet:

<http://patient.info>.

LIMA PROCÓPIO, R. E. DE *et al.* - **Antibiotics Produced by Streptomyces**. Brazilian Journal of Infectious Diseases. . Vol. 16, Nº 5 (2012) 466–471.

MADIGAN, M. T. *et al.* - **Brock Biology og Microorganisms**. 13th ed. San Francisco: Pearson, 2012. ISBN 9780321649638.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. - **Potential of Halotolerant and Halophilic Microorganisms for Biotechnology**. Extremophiles. Vol. 5, Nº 2 (2001) 73–83.

MERRIAM-WEBSTER - **Gene Therapy**. Atualizado em 2015. [Acedido a 2 junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.merriam-webster.com>.

MIGUEL BOUZAS, T. DE; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; VILLA, T. G. - **Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: a Review**. Protein and Peptide Letters. Vol. 13, (2006) 645–651.

PATEL, A.; SHAH, N.; PRAJAPATI, J. B. - **Clinical Appliance of Probiotics in the Treatment of Helicobacter pylori Infection-A Brief Review**. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. Vol. 47, Nº 5 (2013) 429–437.

PROTECTION, K. D. O. E. - **Types of Bacteria Used in WasteWater Treatment**. Atualizado em 2012. [Acedido a 28 de abril de 2015]. Disponível na internet: <https://kyocp.wordpress.com>.

RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. - **Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria**. Annual Review of Phytobiology. Vol. 50, (2012) 403–424.

ROLLAND, X.; ROLLAND, L. - **Bactérias, Vírus e Fungos**. Lisboa: Instituto Piaget, 1997. ISBN 972-771-260-6.

ROMANOWSKI, P. - **Antibiotic**. Atualizado em 2007. [Acedido a 28 maio de 2015]. Disponível na internet: <http://www.madehow.com>.

SASAKI, K. *et al.* - **Applications of Photosynthetic Bacteria for Medical Fields**. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 100, Nº 5 (2005) 481–488.

SHERIDAN, P. O. *et al.* - **Can Prebiotics and Probiotics Improve Therapeutic Outcomes for Undernourished Individuals?** Gut Microbes. Vol. 5, Nº1 (2013) 74–82.

SINGH, K.; CHANDRA, S. - **Treatment of Petroleum Hydrocarbon Polluted Environment Through Bioremediation: A Review**. Pakistan Journal of Biological Sciences. Vol. 17, Nº 1 (2014) 1–8.

SNYDMAN, D. R. - **The Safety of Probiotics**. Clinical Infectious Diseases. Vol. 46, Nº 2 (2008) 104–111.

STATES, U. *et al.* - **A Citizen ' s Guide to Bioremediation**. Atualizado em 2012.

[Acedido a 19 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.epa.gov>.

STRYJEWSKA, A. *et al.* - **Biotechnology and Genetic Engineering in The New Drug Development: Part I. DNA Technology and Recombinant Proteins. Pharmacological Reports.** Pharmacological Reports: PR. Vol. 65, (2013) 1075–85.

TANG, R.-B.; CHANG, J.-K.; CHEN, H.-L. - **Can Probiotics be Used to Treat Allergic Diseases?** Journal of the Chinese Medical Association. (2015) 10–13.

TODAR, K. - **Applications of Bacteria in Industry and Biotechnology.** Atualizado em 2012a. [Acedido a 27 maio de 2015]. Disponível na internet: <http://textbookofbacteriology.net>.

TODAR, K. - **Online Textbook Of Bacteriology.** Atualizado em 2012b. [Acedido a 8 de abril de 2015]. Disponível na internet: <http://www.textbookofbacteriology.net>.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. - **Microbiologia.** Artmed, 2000. ISBN 9788573076783.

VASSAUX, G. *et al.* - **Bacterial Gene Therapy Strategies.** The Journal of Pathology. Vol. 208, (2006) 290–298.

WILEY, J.; LTD., H. A. S. - **Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials.** Atualizado em 2015. [Acedido a 4 junho de 2015]. Disponível na internet: <http://www.wiley.com>.