

Daniela Filipa Ferreira Leonardo

Probióticos com Ação Antimicrobiana

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

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Daniela Filipa Ferreira Leonardo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o N° 2008011352, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade 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, ____ de _____ 2014

A aluna:

(Daniela Filipa Ferreira Leonardo)

A Tutora:

(Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues)

A aluna:

(Daniela Filipa Ferreira Leonardo)

AGRADECIMENTOS

A realização desta monografia marca o fim de uma etapa muito importante da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização e que me acompanharam no decurso deste trabalho, com especial atenção:

- À minha orientadora, Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues, pela ajuda na escolha do tema, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade revelada ao longo deste tempo de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

- Aos meus amigos, pelo apoio e paciência demonstrada nos momentos de maior nervosismo.

- Por último, tendo consciência que sem eles não teria sido de todo possível, dirijo um agradecimento especial aos meus pais e às minhas irmãs, por serem modelos de coragem, pelo seu apoio, amizade e paciência demonstrados. A eles dedico esta dissertação.

Muito obrigada!

ABREVIATURAS

BAL	Bactérias Ácido Lácticas
DACD	Diarreia Associada a <i>Clostridium difficile</i>
DL50	Dose Letal 50
GRAS	“Generally Recognised As Safe” (Geralmente Reconhecido Como Seguro)
ICD	Infeção por <i>Clostridium difficile</i>
IgA	Imunoglobulina A
IL-10	Interleucina-10
INF-γ	Interferão-gama
OMS	Organização Mundial de Saúde
NK	Células “Natural Killer”
SI	Sistema Imune
TLR	“Toll-like receptors”
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento-beta
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
UFC	Unidade Formadora de Colónias

ÍNDICE

Resumo/Abstract	3
1. Introdução	4
2. Flora gastrointestinal	5
3. Probióticos: espécies, propriedades e características.....	6
3.1. Microrganismos usados como probióticos	6
3.2. Propriedades e características dos probióticos	8
4. Usos e benefícios dos probióticos.....	9
5. Mecanismos de ação	11
6. Ação antimicrobiana.....	14
6.1. Espécies probióticas com ação antimicrobiana	14
6.2. Uso de probióticos com ação antimicrobiana na prevenção e tratamento de doenças	15
7. Segurança	19
7.1. Efeitos adversos.....	20
7.2. Resistência/suscetibilidade aos antibióticos.....	21
8. Conclusão	23
Bibliografia	24

RESUMO/ABSTRACT

RESUMO

Probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro.” Hoje em dia, já existem muitas evidências sobre os efeitos benéficos dos probióticos para a saúde humana. O uso de microrganismos probióticos estimula o crescimento de microrganismos benéficos em vez de potencialmente patogênicos, e reforça os mecanismos naturais de defesa do organismo. Estes benefícios são conseguidos através de vários mecanismos, como a produção de substâncias antimicrobianas, a capacidade de adesão, a estimulação do sistema imune, entre outros. A atividade antimicrobiana dos probióticos permite inibir o crescimento e desenvolvimento de microrganismos patogênicos, permitindo que estes sejam usados na prevenção e tratamento de várias patologias. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para tentar demonstrar a sua atividade. Apesar de poderem estar associados a efeitos adversos em indivíduos imunocomprometidos e à disseminação de resistências aos antibióticos, os probióticos são classificados como seguros.

ABSTRACT

Probiotics are “live microorganisms that when administered in adequate amounts confer a health benefit in the host”. There are innumerable evidences on the positive effects of probiotics in the human health. The use of probiotic microorganisms stimulates the growth of beneficial microorganisms instead of potential pathogens, and reinforces the body's natural defense mechanisms. These benefits are achieved through several mechanisms, such as production of antimicrobial substances, ability of adhesion, stimulation of immune system, among others. The antimicrobial activity of probiotics inhibits the growth and development of pathogenic microorganisms, allowing them to be used in the prevention and treatment of various diseases. Several *in vitro* and *in vivo* studies have been conducted in order to demonstrate their activity. Although they may be associated with adverse effects in immunocompromised patients and with the spread of antibiotic resistance, probiotics are classified as safe, and can be used in the treatment and prevention of several diseases.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, algumas bactérias não patogênicas têm sido adicionados a produtos alimentícios devido aos seus efeitos benéficos para a saúde humana. Estas bactérias são designadas de probióticos, cujo termo deriva do grego e significa “para a vida”¹.

As primeiras observações dos seus efeitos benéficos surgem no início do século XX, quando Metchnikoff associou o consumo de iogurtes contendo bactérias ácido-lácticas (BAL), mais precisamente *Lactobacillus bulgaricus*, com a longevidade e a boa saúde dos camponeses búlgaros que os consumiam^{2,3}. Metchnikoff supunha que o consumo de grandes quantidades de alimentos ricos em bactérias lácticas eliminava as bactérias patogênicas, enquanto elevava a proporção de bactérias lácticas na flora intestinal, resultando na melhoria da qualidade de vida².

Contudo, o termo probiótico só foi usado pela primeira vez em 1965 por Lilly e Stillwell para descrever as substâncias produzidas por microrganismos que estimulam o crescimento de outros microrganismo⁴. Em 1989, Fuller redefiniu o significado de probiótico como sendo um suplemento alimentar que contém microrganismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro, favorecendo o equilíbrio da sua flora microbiana intestinal^{2,4}.

Ao longo dos anos a definição foi sofrendo algumas alterações e atualmente a definição aceite internacionalmente foi proposta por uma comissão de peritos da FAO/WHO (2001), sendo os probióticos “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”⁴. Pode-se dizer que esta definição veio restringir o uso da palavra probiótico a produtos que contém microrganismos vivos e à necessidade de fornecer continuamente uma dose adequada de microrganismos probióticos de modo a exercer os efeitos desejáveis⁴. A quantidade adequada varia de país para país, não devendo ser inferior a 10^8 - 10^9 UFC (unidades formadoras de colónias)/g de produto contendo microrganismos probióticos⁵.

Entre os benefícios para a saúde gerados pelos probióticos, a atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos tem atraído muita atenção devido à crescente preocupação com a disseminação de resistências aos antibióticos⁶. Acredita-se que a indústria farmacêutica deixe de ser capaz de desenvolver antibióticos eficazes a uma escala e rapidez suficiente para competir com o desenvolvimento de resistências microbianas aos antibióticos atualmente em uso⁷.

É neste sentido que surge a necessidade de recorrer a outras medidas de prevenção e tratamento contra patologias causadas por microrganismos patogênicos, nomeadamente

através do recurso a probióticos, tentando assim diminuir o consumo de antibióticos e consequentemente o aumento das resistências.

A utilização de culturas probióticas exclui microrganismos potencialmente patogénicos e reforça mecanismos naturais de defesa do organismo, nos quais se inclui a flora microbiana gastrointestinal⁸.

2. FLORA GASTROINTESTINAL

As bactérias são habitantes normais do Homem, crescendo em vários tecidos, nomeadamente a pele, o trato vaginal, o trato respiratório e o trato gastrointestinal (TGI)⁹. O TGI de um adulto possui mais de 1000 espécies de bactérias, sendo que mais de 400 espécies bacterianas são encontradas principalmente no cólon⁴.

Após a passagem pela cavidade oral, onde o pH é próximo do básico, o pH diminui, tornando-se ácido no estômago, onde a maioria das bactérias é destruída¹⁰. Este facto, aliado ao rápido trânsito intestinal, leva a que as bactérias se encontrem presentes em baixas quantidades no estômago (10^3 UFC/mL de fluido gástrico)^{4,9}. No duodeno, o ambiente continua ácido devido aos sucos pancreáticos e biliares e com um rápido trânsito intestinal, havendo um total de 10^2 - 10^4 UFC/mL de fluido intestinal⁹. O número de bactérias vai aumentando ao longo do intestino devido às condições mais favoráveis (pH mais alcalino, teor de oxigénio mais baixo e trânsito intestinal mais lento)¹⁰, atingindo a sua concentração máxima no cólon, com um total de 10^{11} - 10^{12} UFC/mL de fluido intestinal^{4,9}.

Os microrganismos que habitam no intestino podem ser comensais (colonizam o intestino) ou transitórios (microrganismos apenas de passagem). Além disso, estes microrganismos podem ser benéficos, potencialmente prejudiciais ou patogénicos. Os que são considerados benéficos normalmente fermentam hidratos de carbono, não produzem toxinas e podem exercer efeitos benéficos no hospedeiro, como a interação com o sistema imune (SI) e a inibição competitiva de agentes patogénicos. Neste grupo estão incluídas as espécies *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Lactobacillus*⁹. Os probióticos são microrganismos transitórios, embora alguns possam pertencer a espécies comensais. Alguns são capazes de se replicar e persistir no intestino; contudo, são eliminados alguns dias após cessação da sua administração⁹.

Antes do nascimento, os microrganismos estão ausentes do TGI do recém-nascido⁹, permanecendo estéril até ao nascimento². Imediatamente após o nascimento, os microrganismos começam a entrar no organismo humano. Apenas algumas espécies conseguem sobreviver à passagem pelo estômago, sendo estas as que vão colonizar o intestino².

Inicialmente o TGI do recém-nascido tem uma atmosfera aeróbia, pelo que os primeiros microrganismos a colonizá-lo são aeróbios, como *Escherichia coli* e *Enterococcus*. À medida que o bebé vai sendo alimentado, o oxigénio intestinal vai diminuindo e bactérias anaeróbias como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. começam a proliferar em proporções dominantes². O tipo de leite com que o bebé é alimentado também influencia a composição da flora do TGI, uma vez que o leite materno leva a um aumento da proliferação de bifidobactérias, enquanto o leite artificial leva à proliferação de bifidobactérias, bacterióides, clostrídios, enterobactérias e estreptococos⁹.

A partir dos 2-3 anos, a flora do TGI adquire uma composição semelhante à dos adultos, a qual é composta principalmente por bactérias dos géneros *Bacterioides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus*, sendo relativamente estável. No entanto, esta pode ser influenciada pela dieta, doenças, uso de medicação (antibióticos) e pelo envelhecimento⁹.

Ter uma flora estável e bem equilibrada é essencial para possuir um organismo saudável⁹. Numerosos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a flora intestinal normal é uma barreira extremamente eficaz contra microrganismos patogénicos e oportunistas, evitando a sua colonização e desenvolvimento no TGI⁷.

No entanto, quando há um desequilíbrio da flora intestinal, pode ocorrer proliferação de bactérias patogénicas, causando alterações no funcionamento do TGI, tais como diarreia ou doenças inflamatórias intestinais⁸. Nestes casos, o objetivo da terapêutica com probióticos é aumentar o número de microrganismos benéficos e melhorar as suas atividades antimicrobianas até ao momento em que a flora normal é restabelecida⁷.

3. PROBIÓTICOS: ESPÉCIES, PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS

3.1. Microrganismos usados como probióticos

Muitos microrganismos têm sido usados ou considerados para uso como probióticos⁷. Um probiótico pode ser composto por uma única estirpe ou por várias estirpes de microrganismos¹, sendo que a combinação de duas ou mais estirpes pode ter efeitos sinérgicos¹¹. Na sua grande maioria os probióticos são bactérias, mas também podem ser leveduras¹.

No que diz respeito às bactérias, as mais vulgarmente utilizadas como probióticos são as BAL, um grupo de bactérias Gram-positivas que excretam ácido láctico durante a fermentação de hidratos de carbono¹². Estas bactérias são fermentadoras de hidratos de carbono, anaeróbias obrigatórias ou facultativas, tipicamente imóveis e de morfologia variada. As suas características biológicas permitem que predominem e prevaleçam sobre os

microrganismos patogénicos no TGI humano¹³. Neste grupo incluem-se os géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. Algumas estirpes de BAL da microflora intestinal animal e humana têm sido utilizadas como probióticos¹². Para além das BAL, bactérias pertencentes ao género *Bifidobacterium* são também bastante utilizadas como probióticos¹².

Os probióticos mais utilizadas pertencem maioritariamente aos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*^{2,8,14}. A maioria das espécies de *Lactobacillus* são habitantes normais e não patogénicos da flora intestinal humana e animal, e a sua presença é importante para a manutenção do ecossistema microbiano intestinal. Os lactobacilos têm atividade inibitória sobre a multiplicação de enteropatogenos e são altamente competitivo devido, principalmente, à produção de compostos antimicrobianos¹¹. As bifidobactérias são bactérias comuns do TGI e ajudam a manter um equilíbrio adequado da flora intestinal humana, desempenhando um papel de proteção contra potenciais agentes patogénicos¹⁵. As bactérias destes dois géneros constituem os probióticos mais estudados *in vitro* e *in vivo*, apresentando muitos e variados benefícios para a saúde humana.

Para além destas, outras espécies de bactérias e leveduras não patogénicas são também utilizadas, como resumido na Tabela 1^{1,2,14}.

Tabela 1: Microrganismos usados como probióticos.

Género	Espécie
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. johnsoni</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. paracasei</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. lactis</i>
<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lc. Lactis</i>
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. thermophilus</i>
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>
<i>Propionibacterium</i> spp.	<i>P. freudenreichii</i>
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i> , <i>S. cerevisiae</i>

A levedura *Saccharomyces boulardii* possui muitas propriedades que a tornam um potencial agente probiótico, como por exemplo o facto de inibir o crescimento de vários microrganismos patogénicos *in vivo* e *in vitro*, sobreviver à passagem pelo TGI, ser

rapidamente eliminada quando a administração é descontinuada e não ser afetada pela terapêutica com antibióticos. Esta última propriedade é importante uma vez que muitos dos doentes a quem são administrados probióticos estão a fazer terapêutica antibacteriana⁷.

3.2. Propriedades e características dos probióticos

Os probióticos devem ser capazes de exercer os seus benefícios sobre o hospedeiro através do crescimento e/ou atividade no corpo humano, devendo possuir um conjunto de propriedades e características específicas, que lhes permita crescer no TGI e exercer a sua atividade⁴.

De um modo geral, para que os microrganismos exerçam os seus efeitos benéficos e sejam probióticos eficazes, as estirpes devem ser preferencialmente de origem humana¹¹; devem tolerar a acidez gástrica e a toxicidade biliar, de modo a sobreviver à passagem pelo TGI; devem aderir ao muco intestinal ou às células epiteliais de modo a persistirem no intestino; devem produzir substâncias antimicrobianas contra microrganismos potencialmente patogénicos¹⁶; devem ter atividades metabólicas benéficas para o bem-estar do hospedeiro¹¹; devem ser classificadas como seguras devido ao histórico de não patogenicidade e pelo facto de não estarem associadas a outras doenças; e, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos⁸, devem apresentar suscetibilidade aos antibióticos¹⁶.

Mais de dois litros de suco gástrico com um pH tão baixo como 1.5 é secretado das células do estômago todos os dias, fornecendo uma barreira ácida, normalmente eficaz contra a entrada de microrganismos viáveis no TGI¹⁶. A fim de sobreviver à passagem através do TGI, a resistência ao pH ácido, à biliar e às enzimas pancreáticas é essencial. A tolerância ao ácido e à biliar são consideradas propriedades intrínsecas das BAL¹¹.

A adesão e a colonização do TGI do hospedeiro pelos probióticos é umas das características essenciais para os seus efeitos benéficos¹¹. As estirpes devem aderir ao muco intestinal ou às células epiteliais de modo a que persistam no intestino. A capacidade de aderirem à superfície das mucosas previne a sua rápida remoção pela contração do intestino e pelos movimentos peristálticos subsequentes da digestão¹⁶. De facto, a adesão é um pré-requisito para a colonização, estimulação do sistema imune e para uma atividade contra os enteropatogénos¹¹. A combinação de duas estirpes com capacidade de co-adesão pode ter efeitos sinérgicos. Contudo, esta propriedade pode não se verificar em todas as estirpes de probióticos usadas¹¹.

A agregação entre microrganismos da mesma estirpe (auto-agregação) ou entre diferentes estirpes ou espécies diferentes (co-agregação) por exemplo com patógenos, assim como a sua habilidade para mobilizar agentes patogénicos, é uma propriedade significativa das estirpes de probióticos. A interação das estirpes probióticas com a flora intestinal natural é a chave para o potencial sucesso dos organismos em termos de colonização e persistência a longo prazo. A co-agregação de estirpes probióticas tem sido sugerida como uma forma de lhes permitir formar uma barreira física e química que previne a colonização por bactérias patogénicas. Tem surgido a hipótese de que a combinação de estirpes de probióticos pode melhorar os benefícios para a saúde quando comparado com a utilização de uma única estirpe¹⁶.

4. USOS E BENEFÍCIOS DOS PROBIÓTICOS

Os probióticos têm sido tradicionalmente utilizados para tratar/prevenir patologias relacionadas com o TGI, embora sejam também usados no tratamento, alívio ou prevenção de outras patologias não relacionadas com o TGI¹⁴.

No que diz respeito às patologias associadas ao TGI, são vários os benefícios demonstrados, sendo os probióticos utilizados para: prevenção e tratamento da diarreia, incluindo diarreia associada a antibióticos, diarreia do viajante, diarreia resultante de infeções agudas por rotavírus e por *Clostridium difficile*^{2,3}; diminuição da intolerância à lactose; alívio ou redução da obstipação¹⁴; prevenção ou tratamento da doença inflamatória intestinal, principalmente na colite ulcerosa e na pouchite, mas também, embora com menos eficácia, na doença de Crohn; a melhoria dos sintomas associados ao Síndrome do Cólon Irritado^{3,9}; e tratamento complementar na erradicação de *Helicobacter pylori*^{4,9}.

Os probióticos são principalmente usados para influenciar a composição ou a atividade da microflora intestinal. Contudo, qualquer parte do corpo que contenha uma microflora normal pode ser um alvo potencial para probióticos específicos¹⁴. Exemplo disso é a sua utilização na microflora da cavidade oral, para prevenção de cáries dentárias e para redução das gengivites e periodontite¹. O trato urogenital também tem uma microflora normal pelo que também pode beneficiar da utilização de probióticos, nomeadamente no que diz respeito à prevenção e tratamento de vaginoses bacterianas, candidíases vaginais e de infeções urinárias^{4,14}.

Para além de influenciar a flora microbiana, alguns estudos ilustram o potencial dos probióticos para modular as respostas do sistema imune, prevenindo o aparecimento de doenças alérgicas, como o eczema atópico^{4,14}, para atuar ao nível das doenças cardiovasculares, uma vez que parece que conseguem diminuir o colesterol LDL e aumentar

o HDL⁴, e ainda para prevenir ou retardar o aparecimento de determinados tipos de cancro, como o cancro do cólon e o cancro da bexiga^{4,14}.

A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de estirpes específicas de probióticos e quais os seus benefícios na saúde humana.

Tabela 2: Efeitos clínicos de algumas estirpes de probióticos (adaptado/retirado da referência ³⁰).

Estirpe	Efeitos clínicos em humanos
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	Diminuição da atividade de enzimas fecais; redução da diarreia associada a antibióticos em crianças; tratamento e prevenção de diarreia aguda por rotavírus em crianças; tratamento de diarreia recidivante por <i>Clostridium difficile</i> , modulação da resposta imune; alívio dos sintomas da dermatite atópica em crianças.
<i>Lactobacillus johnsonii</i> (acidophilus) LJ-1 (La1)	Modulação da flora intestinal; melhoramento da resposta imune; adjuvante no tratamento de infeções por <i>Helicobacter pylori</i> .
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Modulação da flora intestinal; diminuição da atividade de enzimas fecais.
<i>Lactobacillus reuteri</i> (BioGaia Biologics)	Diminuição da diarreia por rotavírus em crianças; tratamento da diarreia aguda em crianças.
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Prevenção da diarreia do viajante; tratamento de diarreias virais incluindo rotavírus; modulação da flora intestinal; melhoria da obstipação; modulação da resposta imune; alívio dos sintomas da dermatite atópica em crianças.
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Prevenção da diarreia associada a antibióticos; tratamento da colite por <i>Clostridium difficile</i> ; prevenção da diarreia em doentes alimentados por sondas.

As características dos probióticos são específicas de cada estirpe e todas as estirpes devem ser individualmente testadas para cada propriedade¹⁶. Quaisquer benefícios de saúde que se acreditem estar associados a uma determinada estirpe probiótica não podem ser

usados para comprovar os benefícios de outras estirpes da mesma espécie ou género sem a realização de testes¹⁷.

5. MECANISMOS DE AÇÃO

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que estirpes probióticas exercem a sua ação protetora contra a aderência, a colonização, a reprodução e a ação patogénica de agentes patogénicos específicos mediante diversos mecanismos de ação (Figura 1)².

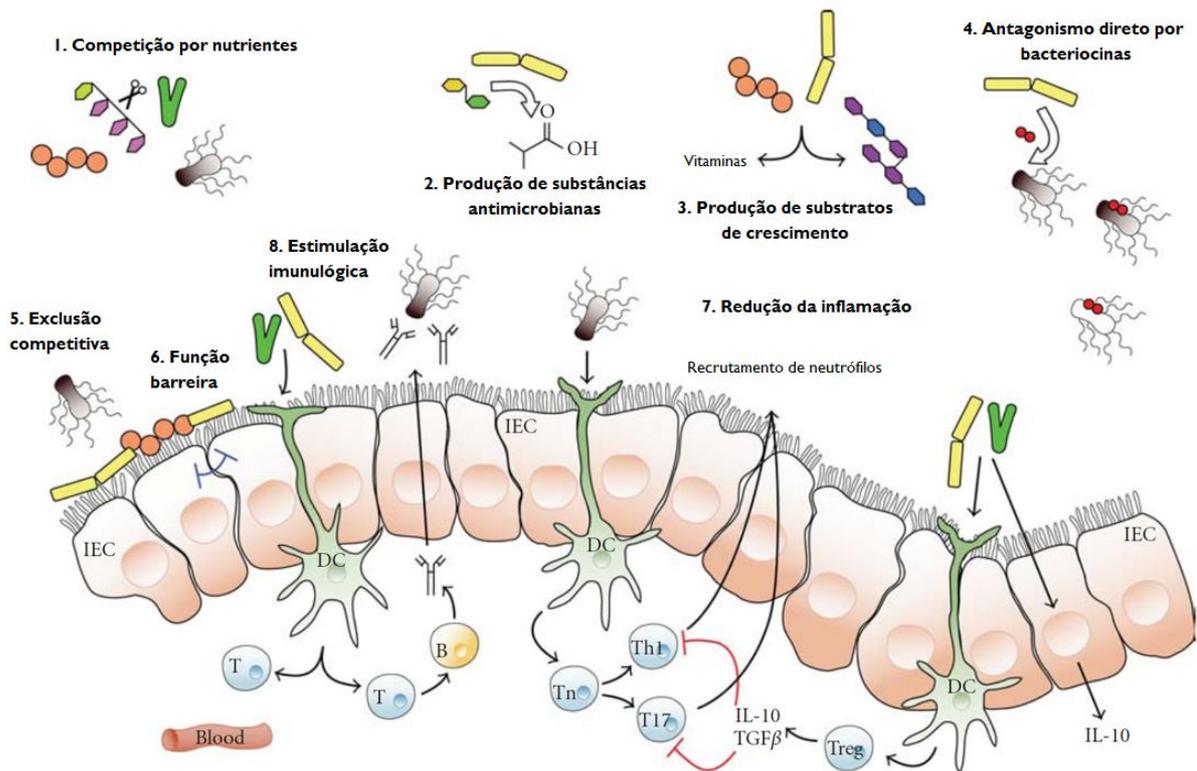


Figura 1: Mecanismos de ação dos probióticos. IEC, células epiteliais; DC, células dendríticas; T, células T (adaptado/retirado da referência 9).

a. Produção de substâncias antimicrobianas

Os microrganismos probióticos podem produzir uma variedade de substâncias antimicrobianas específicas que inibem o crescimento e o desenvolvimento de bactérias patogénicas, quer sejam Gram-positivas ou Gram-negativas. Estas substâncias inibitórias incluem ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio e bacteriocinas^{7,18}. Este é considerado o principal mecanismo pelo qual as bactérias inibem o crescimento de diferentes bactérias patogénicas como *E. coli*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Helicobacter* e *Salmonella*².

As BAL são conhecidas produtoras de grandes quantidades de ácidos orgânicos. Estes ácidos orgânicos, nomeadamente o ácido láctico e acético, difundem-se através das membranas celulares patogénicas. Os ácidos difundidos dissociam-se no interior das células

patogénicas segundo um gradiente dependente do pH intracelular. Os protões libertados durante a dissociação vão acidificar o citoplasma e causar o colapso do gradiente de protões eletroquímico, resultando numa ação bacteriostática e eventual morte do patógeno¹⁶.

Estes ácidos reduzem localmente o pH e inibem o crescimento de uma grande variedade de patógenos Gram-negativos, com o conseqüente equilíbrio da microflora intestinal. Existe um estudo que relata a sinergia de mecanismos: a diminuição do pH do meio pelo ácido láctico permeabiliza a membrana das bactérias Gram-negativas, permitindo a ação de outras substâncias antimicrobianas¹⁸.

As bacteriocinas são pequenos peptídeos produzidos por bactérias, com ação tóxica principalmente contra bactérias Gram-positivas, sendo que a bactéria produtora tem um mecanismo de imunidade específico¹⁹. Quanto à sua atividade, as bacteriocinas podem variar conforme a espécie bacteriana e o ambiente em que se encontram. As bacteriocinas ligam-se a um intermediário da biossíntese do peptidoglicano e inibem a sua síntese, impedindo a formação da parede celular bacteriana. As bacteriocinas podem também ligar-se a esse mesmo intermediário para facilitar a formação de poros na membrana celular, resultando na perda de potencial de membrana e, em última análise, em morte celular¹⁹.

b. Competição por nutrientes

Outro mecanismo que se destaca é a privação dos agentes patogénicos aos nutrientes específicos. Uma vez que estes nutrientes estão presentes em quantidade limitada no intestino, se os microrganismos probióticos os consumirem, os agentes patogénicos deixam de ter disponíveis os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, limitando assim a sua proliferação no hospedeiro^{2,7}.

c. Exclusão competitiva

Os probióticos competem com os microrganismos patogénicos não só pelos nutrientes mas também pelo espaço físico². A exclusão competitiva é um dos mecanismos mais usados pelos probióticos, consistindo na competição com os patógenos pelos sítios de aderência à membrana das células da mucosa do TGI. Esta inibição pode ocorrer por secreção de substâncias antimicrobianas que provocam um bloqueio não específico do recetor, ou por bloqueio específico do recetor por competição direta com o patógeno, o que promove uma barreira física na mucosa, impedindo os agentes patogénicos de se fixarem e de colonizarem o intestino^{2,18}. Em contraste, outros probióticos podem ligar-se

diretamente aos patógenos devido há capacidade de co-agregação que algumas estirpes apresentam, reduzindo assim a sua capacidade para colonizar o intestino⁹.

d. Função barreira

Alguns probióticos podem melhorar a função barreira do intestino⁹. Os probióticos fazem-no ao elevarem a produção de citocinas, que por sua vez, induzem a secreção de Imunoglobulina A (IgA) na mucosa intestinal, resultando na libertação de mucinas. As mucinas são glicoproteínas que, quando em contato com a água, formam uma película que lubrifica e protege o epitélio intestinal contra os patógenos, formando uma barreira física entre o epitélio e o conteúdo do lúmen intestinal¹⁸.

Os probióticos podem também aumentar a capacidade das células de Paneth, existentes no intestino delgado, de produzir os peptídeos antibacterianos conhecidos como defensinas, que previnem a aderência e a invasão bacteriana. Esta hipótese é suportada por estudos *in vitro*, usando células epiteliais intestinais (por exemplo Caco-2) em culturas de tecidos, tendo demonstrado que certos probióticos podem estimular a expressão de mRNA de β -defensinas e a secreção de peptídeos⁹.

e. Estimulação imunológica

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não-específica (inata) quanto a específica (adaptativa)⁸. A interação entre os microrganismos probióticos e as células do SI do hospedeiro é mediada pela interação com recetores específicos, como os TLR (“Toll-like receptors”) no TGI. A ativação destes recetores inicia uma cascata de sinais imunes que conduzem a diferentes respostas. Exemplo disso é a maturação de células T, as quais permitem uma resposta apropriada a potenciais patógenos, e ainda a diferenciação de células B e produção de anticorpos, tais como IgA, secretados para o lúmen intestinal⁹.

A atividade de células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e de células NK (“Natural Killer”), as quais fazem parte da resposta imune inata, é também modulada em animais e humanos por vários probióticos. Diferentes estirpes probióticas podem gerar diferentes respostas imunológicas⁹.

f. Redução da inflamação

A administração de estirpes probióticas específicas em estudos em humanos e em animais tem demonstrado estimular um aumento das citocinas anti-inflamatórias, tais como

IL-10 e TGF- β , e uma diminuição na expressão de citocinas pro-inflamatórias, tais como TNF- α e INF- γ . Pensa-se que estas alterações no equilíbrio das citocinas possa ser o mecanismo pelo qual os probióticos podem ser capazes de reduzir a inflamação⁹.

Qualquer que seja o mecanismo, para que os efeitos benéficos ocorram e persistam é necessário a administração regular de microrganismos probióticos vivos, uma vez que eles são apenas transitórios no TGI e não se tornam parte da microflora intestinal do hospedeiro²⁰.

6. AÇÃO ANTIMICROBIANA

A ação antimicrobiana dos probióticos tem especial interesse para uso tanto na indústria alimentar como na prevenção e/ou tratamento de doenças em humanos. O efeito antimicrobiano pode ocorrer através de uma grande variedade de mecanismos, como por exemplo a alteração do pH ou a produção de substâncias que inibem o crescimento de microrganismos patogénicos. A avaliação deste efeito pode ser realizada em estudos *in vitro*, *in vivo* ou em ensaios clínicos.

6.1. Espécies probióticas com ação antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de *Lactibacillus acidophilus* La-5 contra *Staphylococcus aureus* e *E. coli* veiculados através dos alimentos foi avaliada num estudo *in vitro*. De acordo com os resultados pode considerar-se que *L. acidophilus* La-5 tem efeito inibidor tanto sobre *S. aureus* como sobre *E. coli*. Este efeito antimicrobiano parece ser devido à produção de ácido láctico, o que leva a uma diminuição do pH do meio, e à consequente inibição do crescimento dos microrganismos patogénicos. No entanto, é ainda necessário realizar ensaios clínicos para se poder tirar conclusões quanto à recomendação da sua utilização em humanos²¹.

Guerreiro *et al* (2014) avaliaram a atividade do *Lactobacillus pentosus* B231, presente em vários queijos portugueses, contra várias estirpes de *Lysteria monocytogenes*. Foi possível verificar que praticamente todas as estirpes de *L. monocytogenes* testadas eram sensíveis à bacteriocina B231 produzida por *L. pentosus* B231. Segundo os resultados, esta inibição do crescimento das bactérias patogénicas é momentânea, pelo que podemos concluir que o *L. pentosus* B231 tem atividade bacteriostática. Esta bacteriocina poderá ter uma potencial aplicação na indústria alimentar²².

Algumas estirpes de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paraplantarum* demonstraram atividade antimicrobiana contra duas estirpes patogénicas, *E. coli* O157:H7

ATCC35150 e *S. aureus* ATCC 25923. A atividade antimicrobiana contra estes dois agentes patogénicos é devida à produção de compostos antimicrobianos, à competição pelos sítios de aderência, assim como por nutrientes e fatores de crescimento¹⁶.

Um estudo realizado por Verdenelli *et al* (2009) demonstrou a atividade antimicrobiana de duas estirpes de lactobacilos, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*, contra vários microrganismos patogénicos, nomeadamente *E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *Clostridium perfringens* e *Streptococcus mutans*. A sua atividade deve-se principalmente à capacidade de aderência e colonização. Ambas as estirpes de lactobacilos exibiram uma atividade antimicrobiana particularmente reforçada contra *C. albicans*, sendo por isso considerados como probióticos promissores na resposta à infeção por este microrganismo¹¹.

Vários estudos foram realizados para avaliar a atividade antifúngica de várias estirpes probióticas. Por exemplo, *L. plantarum* demonstrou ter atividade antifúngica contra vários fungos patogénicos devido à produção de ácidos orgânicos e outros metabolitos de baixo peso molecular. Vários isolados de lactobacilos exibiram uma forte atividade inibitória contra bolores, nomeadamente *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus nidulans*²³.

6.2. Uso de probióticos com ação antimicrobiana na prevenção e tratamento de doenças

➤ Infeção por *Helicobacter pylori*

H. pylori é um patógeno altamente prevalente, responsável por uma infeção estomacal crónica grave¹³. Este patógeno coloniza o estômago, induzindo gastrite crónica, uma inflamação de longa duração do estômago, bem como úlcera péptica²⁴. A infeção é geralmente adquirida durante a infância e pode persistir indefinidamente, se não for tratada sistematicamente²⁴. A primeira linha de tratamento para a erradicação de *H. pylori* consiste na combinação de um inibidor da bomba de prótons com dois antibióticos (claritromicina e amoxicilina ou metronidazole). No entanto, nos últimos anos, o sucesso das terapias de erradicação de *H. pylori* tem diminuído, em grande parte devido ao desenvolvimento de resistências aos antibióticos¹³.

É devido à diminuição da eficácia dos regimes terapêuticos triplos que se têm desenvolvido novas opções de tratamento. Uma das potenciais terapias inclui a utilização de probióticos, sendo que se têm obtido resultados promissores em estudos com várias estirpes de probióticos¹³.

Várias espécies de *Lactobacillus* são comensais do trato digestivo humano e estão normalmente presentes no estômago em concentrações que variam entre 0 e 10^3 UFC/mL de fluido gástrico. Estas são resistentes ao ácido e persistem no estômago por períodos de duas horas, um período de tempo muito mais elevado que o verificado com outras bactérias^{13,25}. A ingestão de BAL com propriedades probióticas pode reforçar e manter a homeostase microbiológica local, interferindo com *H. pylori* e/ou diminuindo os processos inflamatórios¹³.

Os probióticos podem inibir o crescimento de *H. pylori* tanto por mecanismos imunológicos como não imunológicos²⁴. Os principais mecanismos não imunológicos consistem na produção de substâncias antimicrobianas, nomeadamente ácido láctico e bacteriocinas, por parte de lactobacilos com capacidade para inibirem *H. pylori*¹³. Algumas estirpes de *Bifidobacterium* libertam *in vitro* compostos antimicrobianos proteicos termoestáveis contra *H. pylori*²⁴. Outro possível mecanismo é a inibição da aderência de *H. pylori* à mucosa gástrica, promovida por *Lactobacillus reuteri*, que inibe o crescimento do *H. pylori* através da competição pelos recetores de aderência à mucosa¹³. Os probióticos podem também interferir com as ações do *H. pylori* através da produção de mucinas, fortalecendo a barreira mucosa, uma vez que certas estirpes como *L. plantarum* 299V e *L. rhamnosus* GG demonstraram induzir a expressão de genes de mucinas²⁴. Os probióticos podem também modelar a resposta imunológica a *H. pylori* através do aumento da secreção de citocinas anti-inflamatórias, resultando na redução da atividade gástrica e da inflamação¹³.

Foram realizados estudos em humanos que investigaram a eficácia da combinação de antibióticos e probióticos e estudos usando apenas probióticos como alternativa aos antibióticos para o tratamento da infeção por *H. pylori*. De acordo com os resultados dos vários estudos, a adição de *Lactobacillus casei* DN-114001 à terapêutica tripla melhora a taxa de erradicação de *H. pylori*, assim como de *L. acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *L. rhamnosus* GG e *L. reuteri* ATCC 55730. Para além disso, estas estirpes reduzem também os efeitos adversos decorrentes da terapia com antibióticos, nomeadamente dor epigástrica, náuseas, vômitos e diarreia^{13,24}. A ingestão regular de *Lactobacillus johnsonii* La1 pode interferir com a colonização do *H. pylori* em crianças assintomáticas e pode ser uma alternativa eficaz na modulação da infeção e na gastrite associada¹³.

A maioria dos estudos demonstrou um aumento da taxa de erradicação, uma melhoria dos efeitos adversos associados à terapêutica tripla, uma melhoria da gastrite provocada por *H. pylori* e uma diminuição da sua colonização após a administração dos probióticos. Contudo, nenhum estudo foi capaz de demonstrar a completa erradicação da

infecção por *H. pylori* usando apenas o tratamento com probióticos^{13,24}. No geral, os estudos clínicos demonstraram que a utilização só de probióticos não erradica o *H. pylori*, mas pode manter níveis baixos deste patógeno no estômago, e em associação com os antibióticos aumenta a sua eficácia^{13,25}.

Assim, o consumo regular de certas estirpes de probióticos pode ser útil como um complemento à terapêutica de erradicação de primeira ou segunda linha na infecção por *H. pylori*, melhorando a adesão à terapêutica por parte do doente, uma vez que reduz os efeitos adversos associados aos antibióticos e melhora as taxas de erradicação^{13,24}.

➤ Infeção por *Clostridium difficile* e diarreia associada

C. difficile é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia, formadora de esporos e produtora de uma toxina capaz de causar desde distúrbios gastrointestinais leves, como a diarreia, a graves, como a colite^{6,26}. A infecção por *C. difficile* (ICD) tem vindo a aumentar, tendo um impacto significativo na sociedade⁶.

Sabe-se hoje que o uso de antibióticos de largo espectro é responsável pelo desenvolvimento de ICD⁶, uma vez que os antibióticos perturbam a microflora normal intestinal, levando a uma depleção da barreira epitelial e subsequente colonização por bactérias patogénicas, nomeadamente *C. difficile*^{6,26}. Esta colonização resulta em lesões na mucosa e inflamação, ocorrendo assim diarreia associada a *C. difficile* (DACD)²⁶.

Os probióticos apresentam-se como uma opção válida para prevenir a diarreia e tratar a ICD. Entre os vários estudos *in vitro* e *in vivo*, e mais recentemente, ensaios clínicos realizados, as estirpes probióticas que se apresentam como as mais promissoras nesta patologia são *S. boulardii*, *L. rhamnosus* GG e *Lactococcus lactis*²⁶.

É sugerida a utilização dos probióticos tanto para prevenção da infecção e consequente diarreia, como para tratamento e prevenção de recidivas. De um modo geral, isso é conseguido através da manutenção da flora normal intestinal e da inibição da colonização e crescimento de *C. difficile*. A levedura *S. boulardii* pode atuar através da estimulação do SI do hospedeiro ou através da produção de uma protease que se vai ligar aos recetores da toxina, reduzindo os efeitos enterotoxigénicos^{26,27}. *L. rhamnosus* GG aumenta a produção de mucina, o que melhora a função barreira do epitélio intestinal e aumenta a absorção de água no cólon, reduzindo diretamente a diarreia²⁶. *Lc. Lactis* atua através da produção de uma bacteriocina⁶.

Os resultados de ensaios clínicos em que é avaliada a eficácia dos probióticos na prevenção da DACD em pessoas a tomar antibióticos referem que quando os probióticos

são tomados com os antibióticos, o risco de desenvolver DACD é reduzido em 64%. O uso de probióticos a curto prazo parece ser seguro e eficaz quando usados em conjunto com os antibióticos em indivíduos que não estão imunocomprometidos ou severamente debilitados²⁷.

No que diz respeito ao tratamento da DACD, as evidências não são suficientes para recomendar a sua utilização como adjuvante da terapêutica antibiótica. Também não há evidências para recomendar apenas o uso de probióticos no tratamento da colite por *C. difficile*²⁴.

➤ Gastroenterite Aguda

A gastroenterite aguda pode ser de origem bacteriana ou viral, sendo o rotavírus a causa mais comum de diarreia aguda em crianças nos países desenvolvidos. O rotavírus invade o intestino delgado e replica-se nas células epiteliais intestinais, resultando na disrupção parcial da mucosa intestinal com perda de microvilosidades e aumento da permeabilidade intestinal¹⁴.

Vários estudos demonstraram que determinadas estirpes probióticas, nomeadamente *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. casei* DN-114 001, *L. casei* Shirota e *B. lactis* Bb12, podem diminuir a severidade e a duração da diarreia por rotavírus para aproximadamente 1 dia. Vários mecanismos podem estar na base deste efeito benéfico, sendo específicos para cada estirpe. Foi observado que a produção de IgA específicas contra rotavírus é aumentada em resposta ao tratamento com certos probióticos^{4,14}.

Outro estudo observou que a administração simultânea de uma solução hipotónica de rehidratação oral e *L. rhamnosus* GG em crianças com diarreia aguda, reduziu a duração da diarreia e o tempo de permanência no hospital².

A utilização de probióticos nestas situações é segura e eficaz e é cada vez mais comum na prática clínica.

➤ Cárie dentária

Para além de atuarem na flora intestinal, os probióticos podem também atuar ao nível da flora da cavidade oral. A cárie dentária é uma das doenças orais mais comuns e necessita de prevenção e intervenção precoce. O *S. mutans* é um dos principais microrganismos causadores da cárie dentária, sendo que a sua presença em quantidades muito elevadas é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento desta patologia¹.

Alguns estudos demonstraram que *L. rhamnosus* GG, *L. casei* e *Bifidobacterium* DN-173 010 diminuíram significativamente o crescimento dos estreptococos orais e o risco de cáries dentárias. A fermentação da glucose, frutose e manitol por *L. rhamnosus* originou um pH entre 5.2 e 6.8 após 24h de incubação, resultando assim numa diminuição da descalcificação pelo *S. mutans*¹.

Algumas condições são necessárias para o probiótico promover a remoção das bactérias cariogénicas da superfície do dente para combater a cárie dentária: a bactéria probiótica tem de ser capaz de aderir à superfície do dente onde a bactéria cariogénica reside; os probióticos têm de se tornar parte do biofilme que se desenvolve no dente; e devem competir com a bactéria cariogénica. Todos estes efeitos dos probióticos ajudam a diminuir drasticamente o crescimento das bactérias cariogénicas¹.

7. SEGURANÇA

Historicamente, os lactobacilos e as bifidobactérias têm sido considerados como seguros. A sua ocorrência como microrganismos comensais normais da flora humana e animal e o seu uso seguro numa diversidade de alimentos e suplementos ao longo de vários anos suporta esta conclusão. Contudo, os aspetos de segurança devem ser sempre considerados e possíveis efeitos adversos devem ser continuamente avaliados. Membros do género *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são geralmente classificados como seguros enquanto membros dos géneros *Streptococcus* e *Enterococcus* contêm algumas espécies que poderão ser consideradas patogénicas oportunistas²⁸.

Embora as BAL tenham sido reconhecidas no geral como seguras (GRAS) pela Organização Mundial de Saúde (OMG), cada estirpe probiótica requer uma avaliação da sua segurança. Diferentes estirpes de probióticos têm diferentes perfis de segurança e generalizações relativas a todos os probióticos devem ser evitadas²⁴.

Para grupos de bactérias para os quais não são conhecidos membros patogénicos, é difícil avaliar quais os potenciais fatores de virulência que possam existir. Quando uma estirpe probiótica sob investigação pertence a um género de bactérias onde são conhecidas espécies patogénicas, é importante demonstrar a ausência de fatores de virulência associados²⁹.

Para um probiótico ser seguro deve respeitar as seguintes especificações: as estirpes para uso humano devem ser de origem humana, devendo ser isoladas de um TGI humano saudável; devem ter uma história de não-patogenicidade; não devem estar associadas a doenças, como endocardites infecciosas ou problemas gastrointestinais; e não devem transportar genes de resistência aos antibióticos^{15,29,30}.

7.1. Efeitos adversos

Correlações documentadas entre efeitos adversos e o consumo de probióticos são poucas, considerando a sua utilização generalizada. Com poucas exceções, os efeitos adversos foram reportados primeiramente em doentes com condições médicas subjacentes²⁹.

Não foram identificados genes associados com patogenicidade nas espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* usadas como probióticos, embora alguns relatos de sépsis em indivíduos de risco tenham sido relacionados com os lactobacilos, a análise dos isolados não revelou evidências conclusivas que indiquem que estes possuam propriedades que favoreçam a infecção em indivíduos de risco²⁹.

As bactérias probióticas podem causar episódios infecciosos se houver translocação do TGI para outros locais extraintestinais, como os nódulos linfáticos, medula, fígado, corrente sanguínea, válvulas cardíacas ou outros tecidos²⁶. A translocação bacteriana ocorre como resultado de uma barreira intestinal debilitada, imunossupressão ou intestino prematuro, podendo resultar em bacteriemia, sépsis ou falência de múltiplos órgãos. Contudo, os casos de administração de probióticos que levaram a bacteriemia ou fungemia são raros²⁶.

Em 2003, um painel de especialistas concluiu que “as evidências correntes sugerem que o risco de infecção com probióticos dos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* é similar ao risco de infecção com estirpes comensais, e que o consumo destes produtos apresenta um risco negligenciável para os consumidores, incluindo os hospedeiros imunocomprometidos”²⁶.

Estudos clínicos nos quais determinados probióticos foram administrados com segurança em indivíduos imunocomprometidos (por exemplo, indivíduos com infecção por HIV), bebés prematuros, idosos e doentes com doença de Crohn não apresentaram quaisquer efeitos adversos, fornecendo evidência da baixa patogenicidade oportunista destes microrganismos²⁹. Contudo, antes de se considerar o uso de um probiótico em doentes imunocomprometidos, deve ser realizada uma avaliação cuidadosa da relação risco-benefício.

L. rhamnosus GG, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* são identificadas como espécies que poderão causar bacteriemia, enquanto *S. boulardii* poderá causar fungemia. Os grupos de risco incluem os adultos imunocomprometidos e prematuros, e a presença de um cateter venoso central, uma barreira intestinal debilitada e doença valvular cardíaca são considerados fatores de risco. Contudo, as infeções por probióticos são muito raras²⁶.

Não havendo nenhum caso de septicemia associado às bifidobactérias, estas são consideradas seguras. O mesmo se aplica às propionobactérias, principalmente devido à sua longa história de uso seguro na produção de queijo Emmental²⁴.

Dados sobre a segurança dos probióticos sugerem que a terapêutica com probióticos é geralmente considerada segura. Por exemplo, tendo em conta a dose que deve ser administrada, 10^8 - 10^9 UFC/g de produto, a dose letal (DL50) de BAL, medida em ratos quando administrada oralmente, foi considerada $> 10^{11}$ UFC/kg, dependendo da estirpe²⁴.

7.2. Resistência/suscetibilidade aos antibióticos

Devido ao uso indiscriminado de antibióticos na medicina humana e veterinária e como promotores de crescimento animal, a resistência aos antibióticos tem-se tornado uma característica comum dos microrganismos, causando sérios problemas no tratamento de infeções microbianas³⁰.

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ocorre naturalmente e pode ser considerada uma característica da espécie, enquanto a resistência adquirida pode decorrer de mutações genéticas (por exemplo, resistência às quinolonas e à rifampicina) ou da aquisição de genes de outra bactéria através de elementos genéticos móveis (por exemplo, resistência à vancomicina e às tetraciclina)^{29,30}. A resistência intrínseca e a adquirida por mutações genéticas apresentam um baixo risco de transmissão horizontal, enquanto o risco de transferência é máximo se a resistência adquirida for mediada por genes localizados em elementos genéticos móveis³¹.

A transferência de genes pode ocorrer *in vivo* entre bactérias comensais do TGI e entre estas e bactérias patogénicas¹². As bactérias probióticas não são exceção, podendo ocorrer transferência de genes de resistências tanto dos probióticos para as bactérias patogénicas como das bactérias comensais para os probióticos²⁴.

As estirpes probióticas são geralmente suscetíveis à maioria dos antibióticos, embora vários estudos tenham indicado que eles podem sobreviver razoavelmente bem no trânsito gastrointestinal durante um tratamento com antibióticos²⁴.

A resistência aos antibióticos por parte de algumas estirpes probióticas pode ser benéfica, principalmente para indivíduos cuja microflora intestinal está desequilibrada, de modo a ser restabelecido o seu equilíbrio durante a terapêutica antibiótica. Ao mesmo tempo, a presença de plasmídeos com genes de resistência aos antibióticos é considerada um fator de exclusão para a utilização da estirpe como probióticos devido ao risco de transferir a resistência a patógenos presentes no intestino^{11,16}.

Os plasmídeos de resistência aos antibióticos têm um especial interesse do ponto de vista da segurança, uma vez que eles podem ser transferidos, essencialmente por conjugação, para outras estirpes, espécies e até mesmo gêneros, incluindo potenciais patógenos humanos e animais²⁸. Embora a resistência a antibióticos mediada por plasmídeos em probióticos não seja muito comum, pode ocorrer e a suas implicações para a segurança devem ser tidas em consideração. Estirpes que contenham plasmídeos que transportem genes de resistência não devem ser usadas como probióticos humanos ou animais³⁰.

Os lactobacilos exibem uma vasta gama de resistências intrínsecas a antibióticos, mas na maioria dos casos essas resistências não são transmissíveis, não sendo consideradas um problema de segurança³⁰.

Entre as resistências aos antibióticos, a resistência à vancomicina é a de maior interesse, uma vez que a vancomicina é um dos últimos antibióticos amplamente eficazes contra infecções clínicas causadas por alguns patógenos multi-resistentes¹¹. Várias espécies de lactobacilos, incluindo *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarium* e *L. casei*, bem como espécies de bifidobactérias, como *B. lactis* e *B. longum*, são intrinsecamente resistentes à vancomicina. Estas espécies têm precursores do peptidoglicano que terminam em D-lactato em vez do precursor normal com D-alanina sobre o qual a vancomicina tem atividade³⁰. Esta resistência é usualmente intrínseca, cromossomal e não transmissível¹¹.

Os *Enterococcus*, membros das BAL, possuem algumas características de virulência, pelo que na maioria dos casos não devem ser considerados como probióticos. Elementos deste gênero podem alcançar elevados níveis de resistência à vancomicina, e se essa resistência estiver presente em plasmídeos, pode ser transmitida a outros microrganismos. Certas estirpes resistentes à vancomicina são comumente associadas a infecções nosocomiais⁴. Recentemente, o gene de resistência à vancomicina, *vanA*, foi transferido num modelo animal de uma estirpe de *Enterococcus* para *L. acidophilus*, fornecendo a evidência de que a transferência de genes pode ocorrer *in vivo*²⁹.

As BAL (com exceção dos enterococos) e outros microrganismos utilizados como probióticos raramente são associados a infecções, e mesmo nesses casos, há muitos antibióticos disponíveis para os quais eles são sensíveis²⁸.

Por causa do possível impacto na saúde humana, não deve ser permitido que bactérias probióticas tenham a capacidade de transferir resistência aos antibióticos. A capacidade de transferir genes de resistência aos antibióticos deve ser considerado um parâmetro importante para a seleção de estirpes probióticas¹⁵.

Deve-se ter em consideração que o problema da transferência de resistências aos antibióticos é o resultado de um problema maior relacionado com o abuso de antibióticos²⁸.

8. CONCLUSÃO

Os probióticos são um assunto atual, em expansão, com muito ainda por descobrir e com dúvidas por esclarecer. É necessário que se continue a investir nesta área, para que os probióticos venham a ser no futuro uma opção viável para a prevenção e tratamento de várias patologias.

É atribuído aos probióticos uma grande quantidade de efeitos benéficos para a saúde, sendo que grande parte desses benefícios se devem à sua atividade antimicrobiana. Devido à grande diversidade de mecanismos pelos quais eles podem atuar, os probióticos podem ser uma alternativa valiosa às opções terapêuticas atualmente em uso, como os antibióticos, ou servirem como complemento às terapêuticas já existentes.

Apesar de todos os seus efeitos benéficos, existe alguma controvérsia na sua utilização, principalmente devido aos possíveis efeitos adversos que alguns microrganismos podem provocar em indivíduos com o SI debilitado. É neste sentido que surge a necessidade da realização de mais ensaios clínicos, principalmente em populações de risco como imunodeprimidos, idade avançada, grávidas, entre outros, para se poder recomendar o seu uso com segurança. Até ao momento, os probióticos são considerados seguros.

A importância que os probióticos têm para a saúde humana tem que ser tida em conta pela comunidade farmacêutica. É necessário que a indústria farmacêutica invista nesta área, de modo a que utilização de probióticos para a prevenção e tratamento de determinadas patologias seja uma realidade cada vez mais presente.

A disponibilidade de medicamentos com probióticos em farmácia comunitária é uma mais-valia, podendo estes ser aconselhados como complemento à terapêutica que o utente está a realizar, como por exemplo na diminuição da duração da diarreia em gastroenterites agudas. É necessário que os farmacêuticos tenham conhecimento dos seus efeitos benéficos para a saúde e que os aconselhem com segurança.

BIBLIOGRAFIA

1. BABAJI, P.; KESWANI, K.; LAU, H.; LAU, M.; SHARMA, N.; PUNGA, R. **Role of probiotics in oral health: a review of the literature.** Journal of Education and Ethics in Dentistry. 2 (2012) 52-55.
2. AMORES, R.; CALVO, A.; MAESTRE, J. R.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, D. **Probióticos.** Revista Espanhola de Quimioterapia. 17 (2004) 131-139.
3. MICHAIL, S.; SYLVESTER, F.; FUCHS, G.; ISSENMAN, R. **Clinical Efficacy of Probiotics: Review of the Evidence with Focus on Children.** Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 43 (2006) 550-557.
4. FAO/WHO. **Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk Live Lactic Acid Bacteria.** Córdoba, Argentina. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2001.
5. **Which are more importante: Prebiotics or probiotics?** Nutrition. 28 (2012) 1196-1197.
6. LEE, J.; CHUNG, M.; SEO, J. **In vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Lactid Acid Bacteria against *Clostridium difficile*.** Toxicology Research. 29 (2013) 99-106.
7. ROLFE, D. **The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health.** The Journal of Nutrition. 130 (2000) 396-402.
8. SAAD, S. **Probióticos e prebióticos: o estado de arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 42 (2006)1-16.
9. BINNS, N. **Probiotics, Prebiotics and the gut microbiota.** ILSI Europe. (2013) ISBN: 9789078637394.
10. MANZONI, M.; CAVALLINI, D.; ROSSI, E. **Efeitos do consumo de probióticos nos lípidos sanguíneos.** Alimentos e Nutrição, Araraquara. 19 (2008) 351-360.
11. VARDENELLI, M.; GHELDI, F.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; CECCHINI, C.; CRESCI, A. **Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces.** European Journal of Nutrition. 48 (2009) 355-363.
12. MATHUR, S.; SINGH, R. **Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review.** International Journal of Food Microbiology. 105 (2005) 281-295.
13. PACIFICO, L.; OSBORN, J.; BONCI, E.; ROMAGGIOLI, S.; BALDINI, R.; CHIESA, C. **Probiotics for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in children.** World Journal of Gastroenterology. 20 (2014) 673-683.

14. OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. **Probiotics: an overview of beneficial effects.** *Antonie van Leeuwenhoek.* 82 (2002) 279-289.
15. D'AIMMO, M.; MODESTO, M.; BIAVATI, B. **Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products.** *International Journal of Food Microbiology.* 115 (2007) 35-42.
16. HASHEMI, S. SHAHIDI, F.; MORTAZAVI, S.; MILANI, E.; ESHAGHI, Z. **Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains from Traditional Kurdish Cheese.** *Probiotics & Antimicrobial Proteins.* 6 (2014) 22-31.
17. US Pharmacopeial Convention. **Appendix XV: Microbial food cultures including probiotics.** *General Tests and Assays.* Appendix XV. (2012) 1709-1715.
18. OTUTUMI, L.; GÓIS, M.; GARCIA, E.; LODDI, M. **Variations on the Efficacy of Probiotics in Poultry.** In: RIGOBELLO, C. *Probiotics in animals.* InTech, 2012, ISBN: 978-953-51-0777-4. p. 203-230.
19. COTTER, P.; ROSS, R.; HILL, C.; **Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics?** *Nature reviews. Microbiology.* 11 (2013) 95-105.
20. MISHRA, S.; MISHRA, P.; SAXENA, M. **Probiotics: An Approach for Better Treatment.** *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 3 (2012) 1042-1061.
21. PEREIRA, V.; GÓMEZ, R. **Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogénicos veiculados por alimentos.** *Ciências Agrárias, Londrina.* 28 (2007) 229-240.
22. GUERREIRO, J.; MONTEIRO, V.; RAMOS, C.; FRANCO, B.; MARTINEZ, R.; TODOROV, S.; FERNANDES, P. ***Lactobacillus pentosus* B231 Isolated from a Portuguese PDO Cheese: Production and Partial Characterization of Its Bacteriocin.** *Probiotics & Antimicrobial Proteins.* 6 (2014) 95-104.
23. ALI, F.; SAAD, O.; HUSSEIN, A. **Antimicrobial activity of probiotic bacteria.** *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences.* 5 (2013) 21-34.
24. PATEL, A.; SHAH, N.; PRAJAPATI, J. **Clinical appliance of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection – A brief review.** *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* (2013) 1-9.
25. BOIRIVANT, M.; STROBER, W. **The Mechanism of Action of Probiotics.** *Current Opinion in Gastroenterology.* 23 (2007) 679-692.

26. HICKSON, M. **Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infection.** Therapeutic Advances in Gastroenterology. 4 (2011) 185-197.
27. GOLDENBERG, J.; MA, S.; SAXTON, J.; MARTZEN, M.; **Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile* – associated diarrhea in adults and children.** The Cochrane Collaboration. The Cochrane Library. 2013.
28. SALMINEM, S.; WRIRHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; VOS, W. MATILLA-SANDHOLM, T. **Demonstration of safety of probiotics – a review.** International Journal of Food Microbiology. 44 (1998) 93-106.
29. SANDERS, M.; AKKERMANS, L.; HALLER, D.; HAMMERMAN, C. **Safety assessment of probiotics for human use.** Gut Microbes. 1 (2010) 164-185.
30. SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. **Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties.** Journal of Biotechnology. 84 (2000) 197-215.
31. AMMOR, M.; FLORÉZ, A.; MAYO, B. **Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria.** Food Microbiology. 24 (2007) 559-570.