



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Margarida Gomes Constâncio

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Probióticos como estimulantes do Sistema Imunitário”, sob a orientação do Dr. Paulo Monteiro, da Dra. Sandra Almeida e da Professora Doutora Maria Eduarda Silveira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Margarida Gomes Constâncio

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Probióticos como estimulantes do Sistema Imunitário”, sob a orientação do Dr. Paulo Monteiro, da Dra. Sandra Almeida e da Professora Doutora Maria Eduarda Silveira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020

Declaração de autoria

Eu, Inês Margarida Gomes Constâncio, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015229489, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Probióticos como estimulantes do Sistema Imunitário”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da Unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 27 de outubro de 2020.

Inês Margarida Gomes Constâncio

(Inês Margarida Gomes Constâncio)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, a base desta conquista, pelo apoio incondicional e pela constante que são na
minha vida.

À minha irmã, de sangue e de coração, pelas gargalhadas partilhadas, pelas confidências e por
me lembrar todos os dias daquilo que sou capaz.

Ao meu Pilar.

Aos meus amigos e colegas de casa, por terem estado ao meu lado nesta aventura. Levo
comigo todas as conversas, risos e histórias. Acima de tudo, levo-vos para a vida.

À Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra, pelos saltos, guitarradas e emoções. Por me ter
permitido ser aquilo que não sabia ser capaz. Que Coimbra guarde as nossas peripécias por
entre as suas ruas, e que as nossas capas negras cantem, eternamente, para o luar.

À Professora Doutora Eduarda Silveira, pela disponibilidade, apoio e orientação na escrita
desta monografia.

Ao Dr. Paulo Monteiro e à restante equipa da Farmácia São José, pelo exemplo de
profissionalismo, por todos os conhecimentos transmitidos e por me ter acolhido e
ensinado da melhor maneira possível.

À Dra. Sandra Almeida, Dra. Alexandra Gonçalves e Dra. Marta Rolo, pela confiança que
depositaram em mim e por todo o apoio.

A Coimbra, Cidade dos estudantes, dos amores e dos poetas, por dar significado à palavra
Saudade. Quem te não viu anda, realmente, cego.

O meu mais profundo obrigada.

“Surround yourself with people who challenge you, teach you,
and push you to be your best self.”

- **Bill Gates**

ÍNDICE

CAPÍTULO I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

ABREVIATURAS	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. ANÁLISE SWOT	10
2.1. FORÇAS (STRENGTHS)	10
2.1.1. Localização, Utentes e Horário.....	10
2.1.2. Equipa Técnica	11
2.1.3. Formações Contínuas	12
2.1.4. Execução de diversas funções	12
2.1.5. Medicamentos Manipulados	13
2.1.6. Tecnologias auxiliares	13
2.2. FRAQUEZAS (WEAKNESSES)	14
2.2.1. Novo Módulo de Atendimento.....	14
2.2.2. Obras internas	15
2.3. OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)	15
2.3.1. Cartão Saúde	15
2.3.2. Serviços disponibilizados pela farmácia.....	16
2.4. AMEAÇAS (THREATS)	16
2.4.1. Medidas de Contingência ao abrigo da COVID-19.....	16
2.4.2. Entrada em vigor da Portaria 284-A/2016	17
3. CONCLUSÕES FINAIS	18
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

CAPÍTULO II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

ABREVIATURAS	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. BLUEPHARMA – INDÚSTRIA FARMACÊUTICA, S.A.	23
3. ANÁLISE SWOT	24
3.1. FORÇAS (STRENGTHS)	25
3.1.1. Fornecimento de material e equipamento de trabalho.....	25
3.1.2. Formação interna contínua	25
3.1.3. Metodologia <i>Kaizen</i>	26
3.1.4. Aquisição de conhecimentos sobre métodos analíticos	27
3.1.5. Aprofundamento de conhecimentos em HPLC.....	28
3.1.6. Apresentação final	29
3.2. FRAQUEZAS (WEAKNESSES)	29
3.2.1. Inexistência de componente laboratorial	29
3.2.2. Duração do estágio.....	30
3.3. OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)	30
3.3.1. Contacto com documentos oficiais.....	30
3.3.2. Experiência noutros departamentos	31

3.4. AMEAÇAS (THREATS)	31
3.4.1. Medidas de Contingência aliadas à COVID-19	31
4. CONCLUSÕES FINAIS	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO III - MONOGRAFIA	
RESUMO	35
ABSTRACT	36
ABREVIATURAS	37
1. INTRODUÇÃO	39
2. PROBIÓTICOS	40
2.1. CONCEITO E EVOLUÇÃO HISTÓRICA	40
2.1.1. Probióticos versus Prebióticos	41
2.2. PROBIÓTICOS MAIS UTILIZADOS	42
2.2.1. <i>Lactobacillus spp.</i>	43
2.2.2. <i>Bifidobacterium spp.</i>	43
2.2.3. <i>Bacillus spp.</i>	43
2.2.4. Leveduras	44
2.3. MECANISMOS DE AÇÃO	45
2.3.1. Reforço da barreira epitelial	46
2.3.2. Modificação da microbiota intestinal	47
2.3.3. Interferência no <i>quorum sensing</i>	48
2.3.4. Imunomodulação	48
2.4. CRITÉRIOS DE ESCOLHA E SEGURANÇA	50
2.4.1. Tolerância ao <i>stress</i> e resistência a sais biliares e ácidos	52
2.4.2. Capacidade de adesão	53
2.4.3. Atividade anti-patogénica	53
2.4.4. Atividade antioxidante e efeito citotóxico	53
2.4.5. Avaliação de segurança e resistência antimicrobiana	54
3. USO DE PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO E CONTROLO DE DOENÇAS	55
3.1. DOENÇAS INTESTINAIS	55
3.1.1. Infecções associadas a <i>Clostridium difficile</i>	55
3.2. DOENÇAS EXTRA-INTESTINAIS	57
3.2.1. Reações alérgicas	57
3.2.1.1. Dermatite atópica	58
3.2.1.2. Alergias alimentares	58
4. PERSPECTIVAS FUTURAS E CONCLUSÕES	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ÍNDICE DE FIGURAS - Monografia

Figura 1 - Ilustração das diferentes morfologias aliadas a espécies com potencial probiótico.....	42
Figura 2 - Principais mecanismos de acção de microrganismos probióticos.....	46
Figura 3 - Critérios de seleção de uma estirpe com potencial probiótico no organismo humano....	52

CAPÍTULO I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

FARMÁCIA SÃO JOSÉ

ABREVIATURAS

CHUC – Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

COVID-19 – Doença por Coronavírus (do inglês, *Coronavirus Disease*)

FC – Farmácia Comunitária

FFUC – Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra

FSJ – Farmácia São José

IF – Indústria Farmacêutica

IPOCFG, E.P.E. – Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E.

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

NMA – Novo Módulo de Atendimento

OMS – Organização Mundial de Saúde

PNV – Plano Nacional de Vacinação

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. INTRODUÇÃO

O plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) contempla a realização de um estágio curricular, de carácter obrigatório, em Farmácia Comunitária (FC), de forma que os estudantes tenham a possibilidade de aplicar e consolidar os conhecimentos e aprendizagens leccionadas no decorrer dos 5 anos de curso, antes de enveredarem para o mercado de trabalho.

A FC não se trata apenas de um sítio restringido à cedência de medicamentos, mas sim de um centro de prestação de cuidados de saúde onde existe uma interacção próxima entre o profissional de saúde e a população. Assim, o farmacêutico tem um papel fulcral no que toca a aconselhamento terapêutico, manutenção do bem-estar e da saúde do utente, mas também a uma correta consciencialização para o uso racional de medicamentos, evitando a sua toma abusiva e/ou inadequada.

A realização de um estágio em FC é um passo determinante para a evolução pessoal e profissional do estudante, permitindo-lhe a aplicação de conhecimentos teóricos num contexto real, mas acima de tudo dando-lhe a experiência profissional que, mais tarde, será um fator chave para a entrada e integração no mercado de trabalho.

Posto isto, serve o presente relatório para fazer uma exposição clara e concisa de alguns fatores que achei determinantes durante o meu estágio curricular na Farmácia São José (FSJ), com início a 13 de janeiro e término a 16 de setembro de 2020, face às medidas de contingência ao abrigo da COVID-19 (Doença por Coronavírus, do inglês *Coronavirus Disease*). De maneira a facilitar a reunião de ideias e de apresentar, de forma organizada, todos os pontos fulcrais, procedi à realização de uma análise SWOT, onde listo e fundamento devidamente os critérios internos – Forças (*Strenghts*) e Fraquezas (*Weaknesses*) – e externos – Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) – dos quais o meu estágio foi constituído.

2. ANÁLISE SWOT

Tabela 1 - Análise SWOT

FORÇAS	<ul style="list-style-type: none">- Localização, Utentes e Horário;- Equipa Técnica;- Formações contínuas;- Execução de diversas funções;- Medicamentos Manipulados;- Tecnologias Auxiliares.	FRAQUEZAS	<ul style="list-style-type: none">- Novo Módulo de Atendimento;- Obras internas.
OPORTUNIDADES	<ul style="list-style-type: none">- Cartão Saúde;- Serviços disponibilizados pela farmácia.	AMEAÇAS	<ul style="list-style-type: none">- Medidas de contingência ao abrigo da COVID-19;- Entrada em vigor da Portaria 284-A/2016

2.1. FORÇAS (STRENGTHS)

2.1.1. Localização, Utentes e Horário

A FSJ está localizada na Avenida Calouste Gulbenkian, em Celas, estando relativamente próxima de locais como: Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC), Centro de Saúde de Celas, Maternidade Bissaya Barreto, Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. (IPOCFG, E.P.E.), e ainda de diversos consultórios médicos e clínicas privadas integradas na mesma zona. Este facto, por si só, apresenta-se como um ponto bastante forte pois, para além da enorme afluência de pessoas da qual a FSJ é alvo, existe também uma grande variedade de utentes, possibilitando-me um contacto com diversas faixas etárias, mas também com diferentes situações socioeconómicas. Para além disso, a grande afluência de utentes leva a uma maior

multiplicidade de situações e de casos clínicos, fomentando um melhor nível de aprendizagem e uma maior abrangência de temas.

A grande disponibilidade para o atendimento ao utente está espelhada no horário praticado pela FSJ, estando aberta de segunda a sexta, entre as 8:30h e as 21h, e todos os sábados das 9h às 20h. Este horário alargado faz com que seja a preferência local, no final do dia, já que as farmácias mais próximas terminam o serviço de atendimento mais cedo.

2.1.2. Equipa Técnica

Como mencionado anteriormente, a FSJ está em contacto diário com um elevado volume de utentes e, conseqüentemente, com uma grande variedade de problemas e de situações. Assim, torna-se imprescindível a cooperação entre todos os membros da equipa técnica de forma a providenciar o melhor atendimento possível e a estabelecer um correto nível de organização na farmácia.

As diversas tarefas a realizar estão distribuídas por todos os membros da equipa, possibilitando uma melhor rentabilização do tempo e do trabalho. Tarefas como: encomendas a fornecedores e laboratórios, gestão de stocks, atendimento ao público, correta organização de produtos, gestão de psicotrópicos, preparação de medicamentos manipulados e verificação de receituário. Esta delegação obriga a que haja uma correta coordenação e comunicação contínua entre todos os elementos, fomentando também a autonomia e a responsabilidade individualizada de cada um. A direcção técnica é assumida pelo Dr. Paulo Monteiro que, através da sua presença constante na farmácia, é uma fonte inegável de conhecimento e está sempre ao corrente de todas as tarefas a realizar, constituindo assim um apoio permanente a toda a equipa. Realço também a sua notória experiência no ato farmacêutico, que permite o estabelecimento de um maior nível de confiança com os utentes, mas também a transmissão de conhecimentos vitais a todos os elementos da farmácia.

A integração dos estagiários é bastante facilitada pelo facto de existirem diversos pontos de trabalho e de estarem incluídos, desde o início, na realização de todas as tarefas aliadas ao funcionamento da farmácia. É incutida a premissa de que a melhor maneira de aprender é através da prática, potenciando-lhes uma constante evolução e aprimoramento de capacidades vitais para o seu futuro profissional. A prontidão da equipa para esclarecer todo o tipo de dúvidas que pudessem surgir foi também crucial para incutir no estagiário a procura constante de conhecimento, mas, acima de tudo, aprender a não ter medo de errar.

2.1.3. Formações Contínuas

A constante aquisição de conhecimento é um dos motes principais aliados à formação de um bom farmacêutico. Sendo ele o especialista do medicamento, é fundamental que exista uma constante actualização do mercado e dos produtos que o rodeia, para que exerça a sua actividade da maneira mais completa e personalizada possível.

Tendo isto em mente, na FSJ são disponibilizadas regularmente, a todos os elementos da equipa, formações relacionadas com novos produtos introduzidos no mercado ou, por vezes, com produtos já existentes. Estas formações eram levadas a cabo pelos respectivos delegados da marca em questão, que forneciam uma explicação do produto e do seu correto aconselhamento ao utente. Destaco produtos relacionados com suplementação alimentar, dermocosmética e dispositivos médicos.

Como estagiária, considerei estas formações um ponto bastante forte, na medida em que me transmitiram todos os conhecimentos necessários ao aconselhamento de produtos com os quais, maior parte das vezes, nunca tinha estado em contacto. Para além de tornarem este aconselhamento o mais seguro e completo possíveis, permitiram também o desenvolvimento da capacidade de clarificação de dúvidas dos utentes, mas também de conseguir adaptar a potencialidade de um produto a um utente ou situação em particular.

2.1.4. Execução de diversas funções

Não podia deixar de referir, como ponto forte, a quantidade e diversidade de tarefas que pude aprender e desempenhar no decorrer do meu estágio na FSJ. Numa farmácia, como em qualquer local de trabalho, existe uma dinâmica constante aliada à realização de funções por todos os elementos da equipa. Na FSJ, foi-me dada, desde início, a oportunidade de colaborar em todo o tipo de trabalhos, desde recepção e gestão de encomendas, gestão de stocks, arrumação de produtos, devoluções e gestão de medicamentos esgotados, até atendimento ao balcão.

Consegui perceber, logo no princípio do meu estágio, que a FSJ valoriza imenso o total envolvimento do estagiário naquele que é o seu ambiente de trabalho. Este facto, por si só, possibilitou-me uma total compreensão da dinâmica da farmácia e facultou-me a confiança e o conhecimento necessários para a execução de qualquer tarefa que me fosse atribuída. Para além disso, consegui conceber o circuito do medicamento e a maneira como este chega à farmácia e é, posteriormente, disponibilizado ao utente.

2.1.5. Medicamentos Manipulados

Em âmbito de FC, um dos fatores de distinção entre os farmacêuticos e os restantes profissionais de saúde, prende-se com a preparação de medicamentos manipulados. Tendo em conta que a Indústria Farmacêutica (IF) apresenta avanços constantes na área de preparação de medicamentos, esta manipulação galénica tem-se tornado cada vez menos frequente. No entanto, a FSJ pauta-se pela existência de um atendimento completo e de excelência, disponibilizando este serviço aos utentes que o necessitem.

Muitas vezes, torna-se necessária a preparação de uma medicação individualizada, de forma a colmatar necessidades especiais de certos utentes, como é o caso de ajustes de dose na pediatria, ou até mesmo de certos medicamentos que não estejam ainda introduzidos no mercado, por razões económicas ou até mesmo de instabilidade química.

Como estagiária, tive oportunidade de acompanhar e participar no processo de manipulação galénica de medicamentos, sempre com a supervisão de um farmacêutico responsável. O sistema informático SoftGaleno[®] facilita a gestão dos medicamentos manipulados, e contém informações actualizadas sobre gestão de *stock* de matérias-primas e acesso aos respectivos boletins de segurança, registo de quebras, prazos de validade, cálculo do preço do medicamento manipulado e ainda contactos de clientes e fornecedores.

A título de exemplo, destaco a preparação de álcool 70° boricado à saturação, uma solução usada no tratamento tópico de otites externas e, pontualmente, em otites médias crónicas e no ouvido já operado.

A possibilidade de estar em contacto com esta vertente é, incontestavelmente, um ponto forte no meu estágio curricular, já que me permitiu consolidar conhecimentos leccionados no decorrer do MICEF, em especial na Unidade Curricular de Farmácia Galénica, mas também proceder à sua correta aplicação em contexto profissional.

2.1.6. Tecnologias auxiliares

De forma a rentabilizar o tempo e a promover a eficiência no trabalho de todos os elementos da equipa, a FSJ possui alguns elementos tecnológicos que auxiliam na execução de certas funções na farmácia.

A existência de um *robot* de arrumação possibilita o armazenamento de uma grande quantidade de medicamentos, seguindo a regra do “*first in, first out*” que permite um controlo eficiente dos prazos de validade. Para além disso, esta ferramenta pode ser accionada através

de um simples controlo no Sifarma 2000[®], dispensando o medicamento ou produto requerido num curto espaço de tempo, num local perto do balcão de atendimento. Esta dispensa automatizada permite ao farmacêutico estabelecer um maior contacto com o utente, proporcionando um aconselhamento mais atento. Existe também uma clara vantagem relacionada com a diminuição de lapsos humanos aliados à cedência de medicamentos, desde erros de doses até mesmo troca de substâncias ativas.

Outra tecnologia auxiliar existente na FSJ é o *CashGuard*. Este aparelho permite guardar o dinheiro proveniente das vendas da farmácia, calculando simultaneamente o troco exato referente a cada pagamento. Uma clara vantagem prende-se também com o registo completo de todos os pagamentos realizados na farmácia, associando-os ao elemento da farmácia que realizou a venda e a hora da mesma. Desta maneira, consegue-se uma melhor gestão financeira da farmácia, mas também um maior controlo do valor de caixa de final de dia. Para além disso, possíveis erros humanos são evitados, potenciando o serviço de excelência.

No decorrer do meu estágio, considerei estes dois apoios tecnológicos bastante vantajosos, já que me permitiram um maior foco no aperfeiçoamento do atendimento ao balcão e do aconselhamento ao utente, sem ter de estar a pensar em tarefas secundárias, como contagem do troco, ou perder tempo a tentar encontrar medicamentos.

2.2. FRAQUEZAS (WEAKNESSES)

2.2.1. Novo Módulo de Atendimento

Como é sabido, cerca de 90% das farmácias portuguesas funcionam com o auxílio do sistema informático Sifarma 2000[®], que para além do módulo de atendimento, dispõe de ferramentas auxiliares à recepção e gestão de encomendas, gestão de devoluções, controlo de stocks, preços e prazos de validade, etc.

O Novo Módulo de Atendimento (NMA) surge para simplificar alguns processos aliados ao atendimento, tornando-os mais intuitivos e rápidos. Esta ferramenta tem sido aperfeiçoada nos últimos anos de forma a abranger todas as situações possíveis em contexto de FC e a tornar-se o mais completa possível. Assim, num futuro próximo, todas as farmácias comunitárias irão recorrer apenas ao NMA, e o Sifarma 2000[®] acabará por entrar em desuso.

A FSJ apenas possui o Sifarma 2000® nos computadores do estabelecimento e, apesar de ter adquirido bastantes conhecimentos no manuseamento deste sistema informático, apresento como ponto fraco o facto de não ter estado em contacto com o NMA. Futuramente, e se decidir enveredar pela área da FC, irei deparar-me com um sistema informático no qual não tenho bases. No entanto, tenho plena noção de que a aprendizagem contínua, independentemente do seu foco, deve estar sempre bem demarcada em todos os profissionais de saúde.

2.2.2. Obras internas

A FSJ pauta-se pela melhoria contínua, não só dos serviços que disponibiliza à comunidade, mas também das suas instalações. Tendo isto em mente, no início do mês de setembro, a farmácia começou a sofrer uma reestruturação completa da sua imagem. Estas obras passaram pelo aumento do espaço disponível para a circulação de utentes, embelezamento da farmácia, e aumento do espaço para armazenamento e exposição de produtos. Devido à dimensão do projecto, foi necessário o encerramento alternado das duas metades do espaço da farmácia, de forma que o atendimento ao utente fosse assegurado.

A redução do espaço para atendimento, aliado às medidas de contingência aliadas à pandemia por COVID-19 praticadas na altura, apenas possibilitavam o atendimento simultâneo de três utentes. Esta situação ocasionou um menor número de atendimentos por parte dos estagiários, já que não existiam balcões disponíveis para o efeito. Além disso, foi necessária a criação de sítios de arrumação provisórios para a maioria do stock, criando alguma desorganização e aumento do tempo de espera dos utentes. Apesar de estar ciente das claras vantagens aliadas à renovação estrutural da FSJ, não a posso deixar de referenciar como um ponto fraco no decorrer do meu estágio, já que criou alguma entropia na equipa e diminuiu as tarefas dos estagiários.

2.3. OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)

2.3.1. Cartão Saúde

O Cartão Saúde surgiu de uma iniciativa por parte da Farmainveste – Investimentos, Participações e Gestão, S.A. com o intuito de oferecer mais benefícios e vantagens aos utentes. Este cartão permite a acumulação de pontos através da compra de produtos e/ou serviços na farmácia que podem, mais tarde, ser rebatidos em novas compras. O sistema em

si é bastante atractivo, já que permite aos utentes adquirirem novos produtos a preços mais baixos, através de um processo bastante simples. Como não se trata de um serviço de carácter obrigatório, acrescenta, evidentemente, valor às farmácias aderentes. Além disso, o sistema informático Sifarma 2000® permite a associação do Cartão Saúde à ficha do utente, tornando o processo ainda mais rápido, sem a necessidade de passar sempre o cartão. Destaco assim, a oportunidade de estar em contacto com esta iniciativa e de poder pô-la em prática nos diversos atendimentos e aconselhamentos que efectuei.

2.3.2. Serviços disponibilizados pela farmácia

A FSJ, tratando-se de um espaço de promoção de saúde, disponibiliza aos seus utentes vários tipos de serviços farmacêuticos, potenciando uma maior proximidade à população. Estes serviços têm vários objectivos, desde maximizar as terapêuticas instituídas aos utentes e fornecer um acompanhamento diário adicional, até apresentar novas tecnologias relacionadas com a saúde.

Assim, ao longo do meu estágio, tive oportunidade de contactar com alguns destes serviços que incluíam, consultas de nutrição, administração de injectáveis e de vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação (PNV), determinação de parâmetros bioquímicos – glicémia, colesterol e tensão arterial – e ainda consultas de audição. Para além disso, algumas vezes por ano, a FSJ realiza o “Dia das Mamãs e dos Bebés” em que, para além de poderem usufruir de campanhas promocionais em produtos de bebé, as mulheres grávidas têm a oportunidade de realizar uma ecografia 4D, de forma completamente gratuita.

O contacto com este tipo de serviços alargou a minha visão acerca do papel do farmacêutico em farmácia comunitária e forneceu-me experiências e aprendizagens adicionais que, estou certa, irão ser uma mais-valia na execução da minha profissão futura.

2.4. AMEAÇAS (THREATS)

2.4.1. Medidas de Contingência ao abrigo da COVID-19

A COVID-19, decretada como pandemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no dia 16 de março de 2020, e a posterior declaração de Estado de Emergência em Portugal, obrigou à implementação de medidas de contingência e ao encerramento de alguns serviços. Com isto, houve a necessidade de suspender todos os estágios curriculares da Faculdade de

Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), durante um período de, aproximadamente, 2 meses.

Posto isto, o meu estágio na FSJ foi interrompido em meados do mês de março e foi apenas retomado no mês de agosto, já que me foi dada a oportunidade de, apesar da pandemia, poder usufruir do meu outro estágio curricular, em IF. Assim, houve uma interrupção do meu ciclo de aprendizagem e de melhoria contínua em FC, que acabou por afetar o meu desempenho total já que, quando retomei o estágio, foi necessário relembrar muitos conceitos e procedimentos. Além disso, houve também a necessidade de implementar turnos de trabalho e de controlar o número de utentes atendidos em simultâneo no interior da farmácia. Isto trouxe algumas desvantagens, já que o número de atendimentos foi reduzido e, conseqüentemente, os estagiários viram as suas oportunidades de aprendizagem reduzidas.

No entanto, não posso deixar de valorizar a oportunidade de retomar o meu estágio, independentemente das medidas de contingência aliadas, e de ter estado em contacto com uma nova realidade no papel de um profissional de saúde. Apesar de tudo, constituiu um desafio e uma experiência que me permitiu um crescimento pessoal e profissional.

2.4.2. Entrada em vigor da Portaria n.º 284-A/2016

A Portaria n.º 284-A/2016, publicada em novembro de 2016, apenas entrou em vigor em agosto de 2020, devido a alguns atrasos na implementação de receitas sem papel e de sistemas informáticos, mas também ao surgimento da pandemia da COVID-19. A lei menciona, no artigo 17º, que “as farmácias apenas podem dispensar um máximo de 2 embalagens, por linha de prescrição, ou de 4 embalagens, no caso das embalagens em dose unitária, por mês”.^{1,2} No entanto, há alguns casos que podem ser apresentados como justificação para a dispensa de uma quantidade superior de embalagens:

- a) A quantidade de embalagens necessária para cumprir a posologia é superior a 2 embalagens por mês;
- b) Extravio, perda ou roubo de medicamentos;
- c) Dificuldade de deslocação à farmácia;
- d) Ausência prolongada do país.¹

Apesar desta medida ter sido criada com o objectivo de minimizar a ocorrência de fraude de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) e de permitir um maior

controlo e distribuição da dispensa de medicamentos do Serviço Nacional de Saúde (SNS), potenciando também o combate ao desperdício de medicamentos devido a prazos de validade expirados, alguns utentes não se mostraram muito receptivos à mudança.

Como estagiária, foram vários os episódios de não-aceitação desta medida por parte de alguns utentes, mesmo depois da devida explicação das razões pela qual a mesma foi implementada. Apesar de me permitir o desenvolvimento de capacidades de resolução de conflitos e de comunicação, considero a entrada em vigor desta portaria uma ameaça ao meu estágio porque, para além de gerar conflitos com a população, fomentou a descredibilização do papel do estagiário por parte de alguns utentes.

3. CONCLUSÕES FINAIS

O estágio curricular na FSJ foi, sem dúvida, um ponto fulcral para a minha evolução como futura profissional de saúde e agente de saúde pública, sendo que também me possibilitou um crescimento pessoal ligado ao primeiro contacto com o contexto real do mercado de trabalho farmacêutico, mas também com tudo o que dele advém. Para além de ter a oportunidade de colocar em prática conhecimentos teóricos que ganhei ao longo do MICEF, vi-me também em contacto com novas áreas de aprendizagem que me possibilitaram a aquisição de valências e de capacidades fundamentais para a minha formação.

É importante perceber que a FC é, na maioria das vezes, o sítio primário ao qual a população se dirige para esclarecer problemas ou para pedir ajuda e aconselhamento para uma vasta gama de situações. A interacção entre o farmacêutico e o utente é crucial para o desencadeamento de um aconselhamento completo e personalizado, e é através deste contacto que é possível a criação de relações de confiança com a população.

Valorizo imenso todas as oportunidades de aprendizagem que tive na FSJ. Para além de estar em contacto com as diferentes vertentes de um farmacêutico em FC, foi-me possível aprofundá-las e ganhar experiência na execução das mesmas. Resta-me agradecer a toda a equipa que me acolheu durante o meu período de estágio, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência e ajuda constantes, e por me terem permitido evoluir e crescer como futura farmacêutica. Foi um privilégio poder integrar esta equipa e participar ativamente na sua rotina diária de prestação de ajuda e aconselhamento ao utente.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DRE - **Portaria n.º 284-A/2016, 2016-II-04**. [Acedido a 29 de setembro de 2020]. Disponível em: <https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/75660778/details/normal>
2. NETFARMA - **Farmácias com limite na venda de medicamentos**. [Acedido a 29 de setembro de 2020]. Disponível em: <https://www.netfarma.pt/farmacias-com-limite-na-venda-de-medicamentos/>

CAPÍTULO II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

BLUEPHARMA, INDÚSTRIA FARMACÊUTICA, S.A.

ABREVIATURAS

BPF – Boas Práticas de Fabrico

COVID-19 – Doença por Coronavírus (do inglês, *Coronavirus Disease*)

CQ – Controlo de Qualidade

DAG – Desenvolvimento Analítico e Galénico

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, *High Profile Liquid Chromatography*)

IF – Indústria Farmacêutica

LD – Laboratório de Dissoluções

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Ph. Eur – Farmacopeia Europeia

SA – Substância Ativa

SOPs – *Standard Operation Procedures*

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos (do inglês, *United States Pharmacopeia*)

I. INTRODUÇÃO

O presente relatório foi desenvolvido no âmbito da componente de estágio curricular, integrado no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF). Nele, concretiza-se uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*) relativa à frequência do mesmo, destacando alguns pontos fulcrais. O estágio teve início no dia 18 de maio, e término no dia 31 de julho de 2020, sob orientação da Dra. Sandra Almeida, no Departamento de Desenvolvimento Analítico e Galénico (DAG).

Esta unidade curricular permite um contacto inicial com algumas áreas profissionais nas quais nós, estudantes do MICF, poderemos enveredar no futuro. Fomenta ainda uma melhor consolidação dos conhecimentos teóricos e práticos leccionados ao longo do curso e a sua correta aplicação no quotidiano farmacêutico. É este conjunto de experiências e de conhecimentos adquiridos que permitem formar e distinguir um bom profissional.

Optei por realizar um estágio em Indústria Farmacêutica (IF), para além do estágio realizado em Farmácia Comunitária, por acreditar que esta é uma excelente área e com uma capacidade de evolução inclassificável. Além do mais, nunca antes tinha estado em contacto com esta vertente, daí considerar ainda mais benéfica a sua inclusão no meu plano de estágios curriculares.

No decorrer do meu percurso no MICF, estive em contacto com diversas unidades curriculares que me despertaram interesse e nas quais sempre tive vontade de adquirir conhecimentos mais aprofundados. Unidades curriculares como Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica. Foi com isto em mente que optei por colocar como opção primária o Departamento DAG, onde acabei por realizar todo o meu período de estágio.

2. BLUEPHARMA – INDÚSTRIA FARMACÊUTICA, S.A.

A Bluepharma é uma empresa Farmacêutica, de capitais portuguesas, sediada em Coimbra. Fundada em fevereiro de 2001, após a compra de uma unidade industrial pertencente à multinacional alemã Bayer, a mesma nasce da vontade de um conjunto de jovens empreendedores.¹

A missão principal da Bluepharma centra-se na contínua melhoria da qualidade e inovação dos seus processos de fabrico e de comercialização, e também da investigação e desenvolvimento de medicamentos de elevado valor acrescentado.² Assim, a sua actividade distingue-se na comercialização de medicamentos genéricos, na investigação, desenvolvimento, registo e produção de medicamentos próprios e para terceiros.³ A experiência adquirida ao longo do tempo, permite à Bluepharma a garantia dos mais elevados padrões de qualidade, baseados nos conhecimentos técnicos e práticos, visão e dinamismo de toda a sua equipa.³ A sua certificação cumpre os requerimentos referentes às Boas Práticas de Fabrico (BPF) e às diferentes Normas ISO, nomeadamente, ISO 9001, ISO 18001 e OHSAS 18001.⁴

O DAG é responsável pelo desenvolvimento e validação de métodos analíticos adequados, assegurando assim uma melhor integração e eficiência em termos de custos.⁵ No decorrer do meu estágio, tive oportunidade de acompanhar de perto os procedimentos laboratoriais referentes à validação e ao desenvolvimento de novos métodos analíticos. Quando finalizados, estes processos necessitam de ser acompanhados de um relatório detalhado, onde estão incluídos os diferentes materiais, reagentes e equipamentos usados, assim como os diferentes testes realizados e todos os resultados obtidos. Tendo em conta que a Bluepharma é responsável pela validação e desenvolvimento de métodos analíticos para produtos farmacêuticos próprios, mas também para terceiros, é necessária uma uniformização de todos os documentos informativos por ela redigidos. Posto isto, ao longo do período de estágio, o meu trabalho focou-se principalmente na criação de modelos que pudessem ser utilizados na escrita de relatórios referentes aos diferentes procedimentos realizados pelos analistas do DAG.

3. ANÁLISE SWOT

De seguida, apresento uma reunião e avaliação de pensamentos críticos referentes ao período do meu estágio. Esta avaliação alberga uma auto-avaliação da minha prestação, bem como de todos os conhecimentos, teóricos e práticos, que adquiri e/ou aprofundei no desenrolar do estágio. Para tal, procedi à realização de uma análise SWOT, uma ferramenta de gestão amplamente conhecida, que permite a inclusão e análise de critérios internos e externos. A análise interna contempla Forças e Fraquezas (*Strengths* e *Weaknesses*) e a análise externa envolve Oportunidades e Ameaças (*Opportunities* e *Threats*). Na Tabela I está presente um resumo da análise em questão, sendo a mesma devidamente aprofundada e fundamentada de seguida.

Tabela I – Análise SWOT

FORÇAS	<ul style="list-style-type: none">- Fornecimento de material e equipamento de trabalho;- Formação interna contínua;- Metodologia <i>Kaizen</i>;- Aquisição de conhecimentos sobre métodos analíticos;- Aprofundamento de conhecimentos em HPLC;- Apresentação final.	FRAQUEZAS	<ul style="list-style-type: none">- Inexistência de componente laboratorial;- Duração do estágio.
OPORTUNIDADES	<ul style="list-style-type: none">- Experiência noutros departamentos;- Contacto com documentos oficiais.	AMEAÇAS	<ul style="list-style-type: none">- Medidas de contingência aliadas à COVID-19.

3.1. FORÇAS (STRENGTHS)

3.1.1. Fornecimento de material e equipamento de trabalho

No primeiro dia de estágio, fui recebida por um membro dos Recursos Humanos que fez uma breve introdução histórica acerca da Bluepharma, assim como da divisão e método de trabalho dos diversos departamentos nela contidos. Após a apresentação, foram fornecidos a cada estagiário materiais e equipamentos necessários, consoante o departamento em que cada um estava inserido. No meu caso, destaco: cartão de identificação, computador pessoal e todos os acessórios a ele aliados, bata de laboratório e equipamentos de protecção individual a usar em contexto laboratorial.

O facto de cada membro possuir um computador para uso exclusivo dentro da empresa – a não ser que teletrabalho fosse uma opção – permitia o acesso a todos os documentos e plataformas oficiais, assim como uma melhor rentabilização do trabalho.

3.1.2. Formação interna contínua

No decorrer do meu período de estágio, foram-me disponibilizados diversos tipos de formações complementares. As formações iniciais eram de carácter obrigatório para todos os novos estagiários e continham informações detalhadas acerca do modo de funcionamento da empresa e das suas ferramentas complementares, entre as quais “Plataforma *SuccessFactors*”, “Sistema Documental – Ennov”, “Boas Práticas de Fabrico”, “Contacto com o Departamento de Informática”, “Ambiente, Segurança e Saúde no trabalho”, “Farmacovigilância” e “Melhoria contínua”. Tendo em conta a situação de pandemia mundial que se vive actualmente, estas formações foram ministradas em formato digital, de forma a diminuir o contacto pessoal e a formação de ajuntamentos. Ainda assim, as formações mostraram-se bastante elucidativas e permitiram um melhor entendimento das ferramentas e do ambiente de trabalho com os quais iríamos estar em contacto nas semanas seguintes.

Através da plataforma *SuccessFactors*, eram-nos fornecidos testes de avaliação relativos a cada uma das formações. Desta forma, era possível consolidar conhecimentos adquiridos e perceber se as informações tinham sido compreendidas.

3.1.3. Metodologia *Kaizen*

Kaizen (do japonês “mudar para melhor”) refere-se à filosofia de melhoria contínua que pode ser aplicada à vida pessoal, social e profissional. Esta metodologia, quando aplicada no local de trabalho, baseia-se na premissa de que todos os indivíduos devem estar devidamente comprometidos com a redução de custos e de desperdício, e com o aumento da produtividade.

Sendo a Bluepharma uma indústria em crescimento constante, este tipo de ideais estão na base de uma boa metodologia de trabalho, que leva a uma posterior otimização de processos, redução de erros e aumento da qualidade dos produtos. A metodologia *Kaizen* é transversal a todos os departamentos, estando devidamente ajustada a cada um deles.

No caso do DAG, eram realizadas reuniões diárias com uma duração máxima de 15 minutos, nas quais cada analista elucidava a restante equipa acerca das tarefas que havia realizado ou que planeava realizar, assim como esclarecia dúvidas junto dos chefes de departamento. Em contexto normal, estas reuniões realizar-se-iam presencialmente e com a presença de todos os membros envolventes. No entanto, face às restrições aliadas à pandemia da COVID-19 (Doença por Coronavírus - do inglês, *Coronavirus Disease*), tornou-se necessária a transferência para um contexto *online*. Além do mais, a Bluepharma optou pela implementação de turnos de trabalho, de maneira a reduzir o número de pessoas presentes na empresa em simultâneo. Tendo em conta que não havia contacto direto com certos membros da equipa, pois estavam incluídos em turnos opostos, estas reuniões revelaram-se ainda mais imprescindíveis para que houvesse uma comunicação contínua entre todos os analistas e, posteriormente, um melhor acompanhamento de todas as tarefas realizadas no departamento. Para além das reuniões diárias, existiam também materiais de suporte ao planeamento de tarefas e ao funcionamento do laboratório. A presença de um quadro personalizável em cada um dos departamentos possibilitava uma correta organização de todas as informações necessárias e um acompanhamento constante do trabalho laboratorial.

A participação nas reuniões diárias e o conhecimento adquirido relativo à melhoria contínua do local de trabalho possibilitou-me uma melhor integração na equipa e um melhor entendimento de todos os processos que se realizavam no DAG. Além disso, como nunca tinha estado em contacto com este tipo de metodologia, reuni conhecimentos e métodos de trabalho que se vão revelar extremamente importantes e profícuos na minha vida profissional.

3.1.4. Aquisição de conhecimentos sobre métodos analíticos

A validação de métodos analíticos tem como objectivo demonstrar e comprovar, através de diferentes testes laboratoriais, que um determinado método é adequado para a análise do produto em questão, e que cumpre os requisitos e os limites estipulados pelas autoridades competentes. Estes métodos podem, naturalmente, ter objectivos diferentes e, conseqüentemente, premissas diferentes. No meu caso, estive em contacto com dois processos distintos: validação do método de dissolução de substância ativa (SA) com quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC - do inglês, *High Profile Liquid Chromatography*) e validação do método de quantificação de impurezas derivadas da SA em HPLC.

Esta validação é imprescindível para que se determine, com certeza, se o método analítico utilizado é de facto o mais adequado e o menos susceptível a erros, mas também se os resultados que dele advêm são válidos. Para tal, devem ser avaliados e cumpridos diversos parâmetros, entre os quais:

- **Selectividade:** Diz respeito à capacidade do método identificar, inequivocamente, a SA na presença de outros componentes (excipientes e/ou impurezas);
- **Linearidade:** Demonstra a capacidade do método obter resultados directamente proporcionais à concentração de SA no meio de dissolução utilizado;
- **Exactidão:** Expressa a proximidade entre o valor de referência (teórico) e o valor obtido no decorrer do método analítico;
- **Repetibilidade:** Diz respeito à precisão do método analítico quando submetido às mesmas condições durante um curto espaço de tempo;
- **Precisão intermédia:** Precisão do método quando submetido a diversas variações laboratoriais – ensaios realizados em dias diferentes, por analistas diferentes, em equipamentos diferentes e em laboratórios diferentes;
- **Robustez:** Capacidade do método analítico não ser afectado por pequenas, mas deliberadas, variações nos seus parâmetros.

No caso da Bluepharma, os diferentes métodos analíticos, sujeitos a validação por parte do DAG, podem surgir de diferentes fontes. Podem ser métodos desenvolvidos internamente, podem ser transferidos de outros laboratórios, ou podem estar descritos na Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.) ou na Farmacopeia dos Estados Unidos (USP). Em certos

casos, os métodos propostos não são validados porque não cumprem todos os parâmetros, sendo considerados inadequados. Assim, torna-se necessário dar um passo atrás e proceder ao desenvolvimento de um método analítico. Este processo é muito mais demorado e implica um estudo aprofundado de todas as variantes e de como estas afectam os diferentes parâmetros a cumprir, conseguindo-se assim a construção de um método analítico adequado para o produto e instrumentos em questão.

Apesar de estes conceitos me serem familiares, tendo em conta que foram abordados em Unidades Curriculares como Métodos Instrumentais de Análise I e II, tornou-se bastante importante ter um contacto mais próximo com os mesmos, fomentando uma melhor aprendizagem acerca de como estes processos se realizam em âmbito de IF. Para além disso, e tendo em conta que estes foram temas constantemente presentes no meu dia-a-dia durante o estágio, e que a sua compreensão era vital para a realização das minhas tarefas, consegui enraizá-los no meu trabalho e familiarizar-me com eles.

3.1.5. Aprofundamento de conhecimentos em HPLC

A HPLC é uma técnica de separação que, quando acoplada a um detector permite também a identificação e quantificação de compostos químicos presentes numa mistura. Esta técnica baseia-se na interacção entre a molécula em questão, e duas fases: fase móvel e fase estacionária (coluna). No final da coluna, existe um detetor responsável pela identificação dos analitos presentes na mistura e pela sua representação gráfica (cromatograma). A fase móvel passa, de forma contínua, pela coluna, a uma pressão e fluxo controlados. Nesta técnica, são normalmente utilizadas colunas de aço inoxidável, constituídas por um material de empacotamento específico. Este material, designado por fase estacionária, é constituído por partículas esféricas porosas de pequenas dimensões ou por um líquido específico para separação de componentes presentes numa mistura. Dependendo dos analitos a serem identificados e quantificados, estas colunas podem ser caracterizadas em função da sua polaridade ou da composição das partículas.

Designa-se por tempo de retenção, o tempo que a substância, em conjunto com a fase móvel, demora a percorrer a coluna e a atingir o detetor, após a injeção da mistura. Variações no fluxo, diâmetro e comprimento da coluna utilizada podem influenciar este parâmetro.

Entende-se por cromatografia líquida de fase normal a utilização de uma fase estacionária mais polar que a fase móvel. Desta forma, os compostos mais polares presentes

numa mistura terão mais afinidade para a fase estacionária, demorando mais tempo a percorrer a coluna e, conseqüentemente a atingir o detector, criando assim tempos de retenção mais elevados. Por outro lado, quando a fase estacionária é menos polar que a fase móvel – designando-se por cromatografia líquida de fase reversa –, os compostos polares terão mais afinidade para a fase móvel e, conseqüentemente, apresentarão tempos de retenção mais curtos.

Todo o trabalho realizado no DAG tem como base a manipulação e o conhecimento aprofundado da técnica de HPLC. Focando-me agora no processo aliado ao desenvolvimento de um método analítico, é importante perceber como as diferentes variações desta técnica podem influenciar a obtenção de um método analítico adequado, ou não.

Apesar de esta técnica ter sido abordada em diferentes Unidades Curriculares, poder trabalhar com ela em diferentes formatos foi, sem dúvida, benéfico para o aprofundamento de conhecimentos que talvez não tenham ficado bem consolidados no decorrer do curso.

3.1.6. Apresentação final

Para finalizar o meu período de aprendizagem, e de maneira a demonstrar qual foi o meu papel durante o tempo em que estive integrada na Bluepharma, a Dra. Sandra Almeida sugeriu-me a criação de um resumo, em formato de apresentação, onde elucidasse todas as tarefas que me foram atribuídas, assim como procedi à resolução das mesmas. Com isto, houve a necessidade de rever e estudar todos os conhecimentos adquiridos para que a apresentação fosse o mais completa e correta possível. Valorizei imenso este último teste, já que possibilitou a consolidação de diversos temas e a exposição dos mesmos.

3.2. FRAQUEZAS (WEAKNESSES)

3.2.1. Inexistência de componente laboratorial

Tendo em conta que as minhas tarefas eram, na sua totalidade, de cariz teórico, a experiência inerente a uma componente laboratorial foi reduzida. No entanto, durante alguns dias, tive oportunidade de acompanhar uma analista do DAG e o seu trabalho laboratorial no que dizia respeito à validação e ao desenvolvimento de métodos analíticos. Neste acompanhamento, foram-me ensinados e demonstrados diversos processos laboratoriais e o devido registo dos mesmos nos *lab books*. Destaco: calibração de medidores de pH e de balanças, correta pesagem de pós, introdução ao manuseamento do

software informático usado no controlo da HPLC e acompanhamento de métodos de dissolução.

Apesar do pouco tempo passado em contexto laboratorial, não posso deixar de referir a sua devida importância. Para além de ter construído bases e conhecimentos para o meu futuro profissional, foi também uma mais-valia no que diz respeito à construção e desenvolvimento de modelos, já que permitiu uma melhor compreensão dos métodos e ensaios realizados pelos analistas e, conseqüentemente, uma melhor transposição dos mesmos para formato de relatório.

3.2.2. Duração do estágio

O meu estágio na Bluepharma teve início no dia 18 de maio e foi concluído no dia 31 de julho de 2020, albergando um total de 55 dias úteis. Este período de tempo limita a possibilidade dos estagiários poderem evoluir dentro do departamento no qual estão inseridos ou, até mesmo, de integrarem outros departamentos e diferentes equipas de trabalho. Tendo em conta que, numa IF, um farmacêutico pode seguir diversas vertentes profissionais, creio ser benéfico este tipo de rotação entre departamentos, de forma que o indivíduo possa alargar o seu conhecimento em diferentes temas e, quem sabe, descobrir aquele em que gostaria que a sua vida profissional futura incidisse.

No meu caso, foi-me dito desde o começo que, devido ao curto espaço de tempo que eu iria estar na empresa, tornar-se-ia difícil adquirir experiência e autonomia em termos laboratoriais, já que o tipo de processos envolvidos era de elevada importância e havia a necessidade de formação prévia.

3.3. OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)

3.3.1. Contacto com documentos oficiais

De forma a elaborar os modelos para os relatórios referentes à validação e desenvolvimento de métodos analíticos, foi necessário estar em contacto constante com documento e diretrizes redigidas para o efeito. A Bluepharma possui documentos internos, designados por *Standard Operation Procedures (SOPs)*, onde estão descritos os diferentes procedimentos a serem realizados nos vários departamentos. Para alguns relatórios, a leitura na íntegra destes documentos foi suficiente para a correta compressão de todos os processos envolvidos e a definição de limites consoante os testes realizados. No entanto, destaco a elaboração do modelo do relatório relativo ao Desenvolvimento de Métodos de

Dissolução. Neste caso em específico, ainda não existia uma SOP oficial redigida para o efeito, tornando-se necessária a consulta de alguns documentos redigidos por entidades ligadas a diversas autoridades, mas também a leitura de diretrizes presentes na USP. Assim, e depois de estudar e avaliar todos os critérios que deveriam constar no documento referente ao procedimento em questão, foi-me possível criar o modelo mais indicado para o efeito.

Apesar de ter estado em contacto com textos de Farmacopeias em algumas Unidades Curriculares, penso que nunca se formou a familiarização necessária com os mesmos. Assim, aliada à necessidade de ter de procurar adquirir conhecimentos nestes documentos, surgiu uma maior confiança e conforto na sua leitura e interpretação.

3.3.2. Experiência noutros departamentos

Após a conclusão das minhas tarefas no DAG, e da devida revisão e correcção das mesmas pela Dra. Alexandra Gonçalves e pela Dra. Marta Rolo, foi-me possível integrar a equipa do Departamento de Controlo de Qualidade (CQ), mais especificamente, a do Laboratório de Dissoluções (LD).

Como todos os conhecimentos teóricos aliados ao trabalho desenvolvido no LD já tinham sido abordados em contexto de formações internas, a minha experiência, mesmo que curta, incidiu no desenvolvimento de capacidades práticas de laboratório. Assim, estive em contacto com todo o processo inerente a ensaios de dissolução, assim como o registo dos valores obtidos e a sua posterior avaliação. Com esta aprendizagem, foi-me possível interligar todos os conhecimentos adquiridos até ao momento, assim como acompanhar e perceber processos e testes aos quais um produto farmacêutico tem de ser submetido de forma a ser correctamente avaliado e, posteriormente, aprovado para distribuição e venda ao público.

3.4. AMEAÇAS (THREATS)

3.4.1. Medidas de Contingência aliadas à COVID-19

A pandemia global que vivemos nos tempos atuais tem vindo a afetar a vida social e profissional à qual estávamos habituados. Com ela, surge também a obrigação de criar medidas de contingência para protecção de todos os indivíduos, de forma que a vida retorne o mais rápido possível à normalidade. Assim, a Bluepharma, como tantos outros postos de trabalho, procedeu à construção de regras e medidas para que o trabalho dos seus

colaboradores não fosse afectado e a empresa pudesse continuar a funcionar. Medidas estas que envolveram o estabelecimento de um distanciamento de segurança entre os trabalhadores, implementação de um sistema de turnos de trabalho e criação de diferentes horários para frequentar a cantina. Naturalmente, e apesar de estas medidas serem necessárias, apresentaram, de certa forma, uma ameaça ao meu estágio. Dou o exemplo da implementação de turnos de trabalho que impossibilitou o contacto com metade da equipa onde eu estava integrada. Realço também o facto de não me ter sido possível fazer uma visita à empresa, actividade que é sempre realizada com todos os novos colaboradores e estagiários que ingressam na Bluepharma. Para além disso, devido à incerteza vivida durante o tempo de estado de emergência nacional, o meu estágio iniciou-se com duas semanas de atraso, mantendo-se a data de término.

Apesar de todas as adversidades, sei que a Bluepharma não deixou que os seus estagiários deixassem de ter a oportunidade de integrar a empresa e, por isso, deixo o meu agradecimento a todos os profissionais que tornaram esta experiência enriquecedora e me proporcionaram uma aprendizagem única, independentemente das circunstâncias.

4. CONCLUSÕES FINAIS

O estágio curricular realizado na Bluepharma – Indústria Farmacêutica S.A. permitiu-me estar em contacto com uma das muitas saídas profissionais aliadas ao MICF. A IF sempre foi algo que me cativou, e considerei esta experiência benéfica em diferentes aspectos.

Primeiramente, poder integrar um departamento no qual não tinha muitos conhecimentos foi muito gratificante, já que pude experienciar uma evolução e crescimento, tanto pessoal como profissional, durante o tempo decorrido na empresa. Esta experiência, permitiu-me ainda a consolidação de termos e conhecimentos teóricos relacionados com a vertente analítica, mas também o enriquecimento formativo em alguns temas novos.

Acredito que a boa formação de um futuro farmacêutico reside nas experiências que advêm do contacto com diferentes áreas profissionais. Tendo isto em mente, valorizo imenso o tempo que passei na Bluepharma, e levo comigo conhecimentos e práticas que, decerto, farão de mim uma profissional de eleição. Resta-me agradecer a toda a equipa que me acolheu no decorrer do meu estágio pelas aprendizagens transmitidas, e por se mostrarem constantemente disponíveis para o esclarecimento de dúvidas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLUEPHARMA - **História**. [Acedido a 15 de setembro de 2020]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-history.php>
2. BLUEPHARMA - **Missão, Visão e Valores**. [Acedido a 15 de setembro de 2020]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-mvv.php>
3. BLUEPHARMA - **Quem somos**. [Acedido a 15 de setembro de 2020]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-us.php>
4. BLUEPHARMA - **Cultura de Qualidade**. [Acedido a 15 de setembro de 2020]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-quality.php>
5. BLUEPHARMA - **Desenvolvimento Galénico & Analítico**. [Acedido a 15 de setembro de 2020]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/innovation/development.php>

CAPÍTULO III

MONOGRAFIA

“PROBIÓTICOS COMO ESTIMULANTES DO SISTEMA
IMUNITÁRIO”

RESUMO

Atualmente, os probióticos são definidos pela *Food and Agriculture Organization* e pela *World Health Organization*, como sendo “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde do hospedeiro”. Os benefícios aliados ao seu consumo estão directamente dependentes da espécie e estirpe em questão, mas também do indivíduo.

Sendo o sistema imunitário um dos principais mecanismos de defesa contra agentes patogénicos, uma correta manutenção das respostas aliadas a este sistema traz vantagens no tratamento e prevenção de diversas doenças e na manutenção de uma boa qualidade de vida. Assim, as aplicações destes microrganismos são vastas, indo desde o controlo e tratamento de infecções associadas a *Clostridium difficile*, até à prevenção do desenvolvimento de reacções alérgicas.

Esta monografia teve como objectivos, através de uma revisão bibliográfica, transmitir uma perspectiva global sobre o benefício da utilização de probióticos para a saúde, assim como analisar os possíveis mecanismos de acção, particularmente, no que respeita à modulação do sistema imunitário, através do reforço das respostas inata e adaptativa. Pretendeu-se ainda abordar os critérios de eficácia e segurança dos microrganismos utilizados como probióticos.

Palavras-chave: probióticos, microbiota intestinal, sistema imunitário, infecções, alergias.

ABSTRACT

Probiotics are currently defined by the Food and Agriculture Organization and the World Health Organization as "living microorganisms which, when administered in appropriate quantities, confer a benefit to the health of the host. The benefits allied to their consumption are directly dependent on the species and strains in question, but also on the individual.

Since the immune system is one of the main mechanisms of defense against pathogens, a correct maintenance of the responses allied to this system brings advantages in the treatment and prevention of various diseases and in maintaining a good quality of life. Thus, the applications of these microorganisms are vast, ranging from the control and treatment of infections associated with *Clostridium difficile*, to the prevention of the development of allergic reactions.

This monograph aimed, through a literature review, to provide a global perspective on the health benefit of probiotics, as well as to analyze the possible mechanisms of action, particularly regarding the modulation of the immune system, by strengthening the innate and adaptive responses. It was also intended to address the efficacy and safety criteria of microorganisms used as probiotics.

Keywords: probiotics, intestinal microbiota, immune system, infections, allergies.

ABREVIATURAS

BAL – Bactérias produtoras de ácido láctico

CDs – Células dendríticas

CLRs – Receptores de lectina tipo C

DA – Dermatite Atópica

EFSA – European Food Safety Authority

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

FAO – Food and Agriculture Organization

FCEH – Fórmula de Caseína Extensamente Hidrolisada

GRAS – Generally recognized as safe

ICD – Infecções associadas a *Clostridium difficile*

IFN- γ – Interferão-gama

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IL-10 – Interleucina - 10

IL-12 – Interleucina-12

IL-1 β – Interleucina - 1 β

IL-6 – Interleucina - 6

IL-8 – Interleucina-8

IOA – Imunoterapia Oral de Amendoim

LGG – *Lactobacillus rhamnosus GG*

NK – Natural *killer*

PMAP – Padrão molecular associado a patógenos

QPS – Qualified Presumption of Safety

RRP – Receptores de reconhecimento de padrões

RTLs – Receptores *Toll-Like*

SI – Sistema Imunitário

TGI – Trato Gastrointestinal

Th – *T helper*

TLAI – Tecido linfático associado ao intestino

TNF- α – Factor de necrose tumoral – alfa

Treg – T regulador

WGO – *World Gastroenterology Organization* (Organização Mundial de Gastroenterologia)

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

I. INTRODUÇÃO

Os seres humanos convivem, diariamente, com um vasto número de microrganismos, presentes na pele, mucosas e trato gastrointestinal (TGI).¹ Apesar de estarem extensamente distribuídos pelo corpo humano, é no TGI que existe uma maior diversidade populacional, podendo atingir as 1000 espécies.^{2,3} No recém-nascido, a colonização bacteriana do TGI inicia-se quando este é exposto a um ambiente não estéril, a partir desse momento evolui ao longo da vida, estando constantemente dependente de uma complexa e dinâmica relação entre a dieta, estilo de vida e uso, ou não, de agentes antibacterianos.³ A interação entre esta comunidade microbiana, à qual se dá o nome de microbiota, e o seu hospedeiro, resulta no surgimento e, posterior, evolução de um sistema imunitário intestinal único, que influencia, positiva ou negativamente, o estado de saúde do mesmo.^{1,2} Este novo sistema permite discriminar agentes patogênicos de organismos benéficos, incentivando o surgimento de uma resposta imunitária adequada e regulando o volume de resposta inflamatória.¹ A exposição a terapêuticas com antibióticos, fármacos imunossupressores e radiação, entre outros, podem causar desequilíbrios na flora bacteriana intestinal - disbiose.^{1,2} De forma a restabelecer a microbiota intestinal assim como a resposta imunitária, têm surgido estratégias dirigidas para a modulação da microbiota intestinal.³

Passados mais de 50 anos desde a primeira definição de microrganismo probiótico, e tendo em conta inúmeros estudos realizados até então, foi demonstrada a sua eficácia em diversos contextos, principalmente no que toca à imunomodulação. Apesar de existirem diversos estudos direccionados para a correta seleção e caracterização de estirpes probióticas específicas para determinados efeitos desejados, os principais mecanismos de acção envolvidos ainda não são totalmente compreendidos pela comunidade científica, sendo ainda necessários mais estudos para que se possa chegar a uma relação concreta entre a presença destes microrganismos e a sua influência no surgimento e controlo de doenças, assim como na manutenção do bem-estar.^{1,2,3}

2. PROBIÓTICOS

2.1. CONCEITO E EVOLUÇÃO HISTÓRICA

O uso de probióticos encontra-se documentado desde a Antiguidade Egípcia através de representações de leite fermentado em hieróglifos, até ao uso tradicional de leite fermentado proveniente de iagues, por comunidades nómadas do Tibete, de maneira a aumentar o seu tempo de conservação. Os efeitos associados ao consumo de leite fermentado começaram a levantar curiosidade na comunidade científica a partir do início do Séc. XIX, quando Louis Pasteur identificou quais as bactérias e leveduras responsáveis pelos processos de fermentação. No entanto, nunca relacionou estes microrganismos com algum tipo de benefício para a saúde humana.⁴ Foi apenas em 1907 que Ilya Ilyich Metchnikoff, um microbiologista que tinha acompanhado Pasteur nos seus estudos, descobriu os efeitos dos chamados probióticos.⁵ Ao invés de associar a longevidade da comunidade da Bulgária com os iogurtes fermentados, que consumiam diariamente, o cientista estabeleceu a relação entre as bactérias da espécie *Lactobacilli* usadas na fermentação deste alimento, e a presença das mesmas no cólon.^{4,5}

O termo “probiótico” foi usado pela primeira vez em 1965 por Lilley e Stillwell para descrever substâncias secretadas por um microrganismo, que estimulassem o crescimento de outro. No entanto, a definição em vigor, descrita pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) e pela *World Health Organization* (WHO), caracteriza os probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício para a saúde do hospedeiro”.^{6,7} Estes microrganismos são capazes de regenerar o sistema digestivo e de o colonizar, contribuindo para neutralizar e/ou eliminar efeitos nefastos provocados por outros microrganismos, que, conseqüentemente, comprometeriam o bom funcionamento do organismo.⁴ No decorrer da vida, o ser humano está exposto a inúmeros e diferentes tipos de factores externos, que podem ser potenciais riscos para a sua saúde – tais como, stress, consumo excessivo de bebidas alcoólicas, dietas ricas em lípidos, proteína e hidratos de carbono, factores genéticos, consumo de água com níveis elevados de cloro e flúor, exposição a toxinas ambientais, entre muitos outros.⁴ A terapia antimicrobiana é um dos maiores factores responsável pela destruição da microbiota e, nestes casos, a administração de probióticos pode ser usada com o objetivo de a regenerar.⁴

Em 2013, a *World Gastroenterology Organization* (WGO) publicou *guidelines* gerais acerca de probióticos, sendo que em 2014, após uma revisão, foram definidas 3 categorias:

- 1) Probióticos sem efeitos benéficos e/ou prejudiciais para a saúde humana - geralmente considerados seguros, não necessitando de serem submetidos a testes de eficácia;
- 2) Probióticos usados como suplementos alimentares, no que toca a reforço das defesas naturais do organismo e redução de sintomas associados a condições específicas - estirpes microbianas definidas, testes de eficácia e segurança comprovados;
- 3) Medicamentos probióticos - baseados em ensaios clínicos onde seja definida a estirpe microbiana específica a ser utilizada para cada doença/condição. Deve também ser apresentada uma justificação válida para o seu uso, assim como um esclarecimento do *ratio* risco/benefício ao utente em causa.⁸

De todos os benefícios estudados até ao momento, destacam-se: supressão de diarreia, controlo da intolerância à lactose e de complicações adjacentes, actividade antimicrobiana e alívio dos sintomas ligados à síndrome do intestino irritável. No entanto, algo que preocupa a comunidade científica é a generalização que possa ser feita em relação às vantagens aliadas ao consumo de probióticos, já que as mesmas advêm do consumo de estirpes específicas, testadas e comprovadas clinicamente.⁹

2.1.1. Probióticos versus Prebióticos

Em 1995, Gibson e Roberfroid introduziram, pela primeira vez, o termo “prebiótico”, definindo-o como um “componente alimentar não-digerível, capaz de provocar um efeito benéfico no seu hospedeiro, através de uma estimulação selectiva do crescimento e/ou actividade de um dado grupo de bactérias residentes no cólon.” No entanto, em 2007, esta definição foi actualizada pela FAO/WHO: “componente alimentar não-viável, capaz de conferir efeitos benéficos no seu hospedeiro, associados à modulação da microbiota intestinal”.

Estes compostos são, na sua maioria, formados por hidratos de carbonos de cadeia curta e não são absorvidos no intestino delgado. Aqui, para além de estimularem o crescimento e o metabolismo de microrganismos como *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, potenciam também a função intestinal através de processos de fermentação, apresentando um ligeiro efeito laxante. Como se tratam de compostos não-viáveis, apresentam taxas de sobrevivência superiores às dos probióticos, principalmente na parte inicial do TGI. Posto isto, os prebióticos podem ser usados como uma alternativa aos probióticos, ou como um apoio adicional aos mesmos.^{10;11}

Tendo isto em mente, Gibson e Roberfroid introduzem na comunidade científica o termo “simbiótico”, de forma a descrever a combinação sinérgica entre prebióticos e probióticos. Esta designação é específica para produtos nos quais um componente com capacidade prebiótica favorece um microrganismo probiótico. A principal vantagem relacionada com o uso deste tipo de combinações é o aumento da sobrevivência dos microrganismos probióticos em toda a extensão do TGI, assegurando assim um efeito superior, em comparação com o seu uso individual.^{10;11;12}

2.2. PROBIÓTICOS MAIS UTILIZADOS

O grupo de agentes probióticos inclui bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) como os géneros *Bifidobacterium*, *Bacillus*, e algumas leveduras (Figura 1).

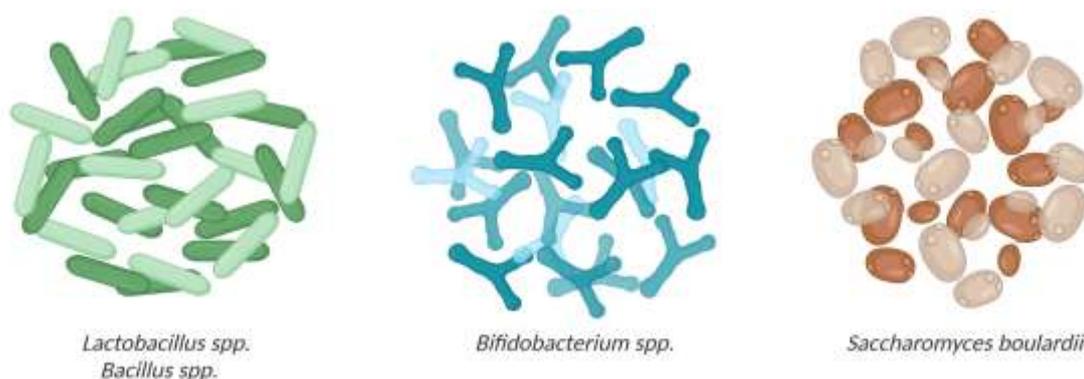


Figura 1 - Ilustração das diferentes morfologias aliadas a espécies com potencial probiótico (Fonte própria).

As BAL dizem respeito a um grupo bastante diversificado de microrganismos gram-positivos, não esporulados e catalase-negativos, que estão presentes em diferentes *habitats*. Metabolicamente, estas bactérias são conhecidas pela sua capacidade de produzir grandes quantidades de ácido láctico, entre outros metabolitos orgânicos: glucose, frutose, lactose e galactose. No que diz respeito ao processo metabólico da glucose, podem ser classificadas como homofermentativas – se converterem este composto unicamente em ácido láctico – ou heterofermentativas – se, para além de ácido láctico, produzirem outros metabolitos, incluindo etanol, ácido acético e dióxido de carbono. Estes microrganismos estão também presentes no TGI e em vários produtos comercializados: laticínios, carne, vegetais e produtos fermentados. Tal facto deve-se à sua habilidade de produzir metabolitos secundários, como bacteriocinas, exopolissacarídeos e enzimas, capazes de aumentar o tempo de prazo de validade destes produtos, assim como a sua textura, sabor e qualidade.^{13;14;15}

2.2.1. *Lactobacillus spp.*

O género *Lactobacillus* é o mais extenso dentro do grupo de BAL, contando com mais de 180 espécies e 17 subespécies estudadas e validadas cientificamente. As suas colónias exibem frequentemente colorações acinzentadas e alfa-hemólise quando isoladas em ágar-sangue. No organismo humano, estas bactérias são ocasionalmente patógenos oportunistas, estando presentes no TGI, como é o caso de *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei* e *L. rhamnosus* – sendo estas duas últimas as encontradas mais frequentemente - e na mucosa intestinal, tais como *L. antri*, *L. gastricus*, *L. kalixensis*, *L. reuteri* e *L. ultunensis*. Espécies como *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. vaginalis* e *L. iners* podem também ser encontradas na mucosa vaginal.^{16;17} *Lactobacillus* possui uma grande resistência a condições de pH ácido, principalmente as espécies usadas para fermentação de alguns produtos comestíveis, como mostarda, couve e azeitonas. Esta característica permite-lhes uma passagem mais estável pelo estômago. No intestino, a adesão deste tipo de bactérias à camada mucosa é mediada por proteínas presentes na camada S, situada no envelope celular. Diversas espécies de *Lactobacillus* apresentam elevada resistência intrínseca a alguns antibióticos, como é o caso da vancomicina e do metronidazol, melhorando assim as suas taxas de sobrevivência, em situações de antibioterapia.¹⁶

2.2.2. *Bifidobacterium spp.*

As bactérias do género *Bifidobacterium* são as mais abundantes na microflora intestinal, desempenhando um papel de grande relevância no que toca à prevenção de infecções intestinais, diminuição dos níveis do colesterol e estimulação do Sistema Imunitário (SI). Este género é constituído por 45 espécies de bactérias anaeróbias, heterofermentativas, gram-positivas, não esporuladas, catálase negativas e capazes de produzir ácido acético e láctico a partir de hidratos de carbono, sem formação de dióxido de carbono.¹⁸ Assim como *Lactobacillus spp.*, também estas bactérias têm a capacidade de inibir o crescimento de organismos prejudiciais, melhorar a função barreira do TGI e suprimir citocinas pró-inflamatórias.¹⁵ Espécies como *B. adolescentes*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* e *B. longum* são usadas regularmente em iogurtes, leite, queijo, e outros lacticínios.¹³

2.2.3. *Bacillus spp.*

O género *Bacillus* é igualmente usado como probiótico, tanto na indústria alimentar como na farmacêutica. As bactérias deste género são gram-positivas, aeróbias e produtoras

de endósporos - estruturas que permitem uma melhor manutenção das características dos alimentos, aumentando o seu prazo de validade. No entanto, algumas espécies, como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides* e *B. weihenstephanesis* – pertencentes ao chamado grupo *B. cereus* – são produtoras de enterotoxinas, podendo levantar diversas questões de segurança.^{13:19;20}

Pegando no exemplo de *B. cereus*, este trata-se de um agente patogénico oportunista envolvido em diversas ocorrências de intoxicação alimentar. Apesar da evolução da doença ser, na sua maioria, autolimitada, podem surgir episódios mais severos e, por vezes, letais. Entre outras, esta bactéria pode provocar duas formas de distúrbios gastrointestinais – a síndrome emética e a síndrome diarreica. Enquanto a síndrome emética se manifesta através de vómitos e náuseas e é causada pela toxina pré-formada cereulida, a síndrome diarreica tem a sua origem em enterotoxinas produzidas por esta espécie no intestino.²¹ No entanto, e apesar de se saber que *B. cereus* é um dos maiores causadores destes distúrbios, os casos de intoxicação alimentar por esta bactéria são raramente reportados. A explicação para este facto pode prender-se com a sua curta evolução, que não motiva o paciente a procurar ajuda médica e, por outro lado, pode ser sub-diagnosticada em virtude de apresentar uma elevada similaridade com outras infeções provocadas por *Staphylococcus aureus*, ou *Clostridium perfringens*.²²

É ainda de referir, *B. anthracis* agente etiológico do carabúnculo. Esta infeção manifesta-se através de febre alta, lesões escuras na pele e fadiga, podendo muitas vezes ser confundida com uma gripe normal. No entanto, após alguns dias a função pulmonar fica comprometida e, posteriormente, pode ocorrer choque tóxico. A fácil e rápida disseminação dos seus esporos favorece o potencial uso desta bactéria em bioterrorismo, levantando assim problemas e questões de segurança internacionais.²³

2.2.4. Leveduras

As leveduras constituem um grande grupo de microrganismos eucariotas, com distribuição ubiquitária, podendo ser encontradas também no TGI animal e em vários produtos comestíveis. O seu alto conteúdo em proteínas, vitamina B e diversos compostos estimuladores do SI, aumentou o interesse em usar estes microrganismos como probióticos. As leveduras têm a grande vantagem de possuírem um elevado grau de tolerância a condições associadas a processamento industrial como sejam a liofilização e temperaturas elevadas. No entanto, de acordo com a *European Food Safety Authority* (EFSA), apenas *Saccharomyces boulardii* possui a condição de *Qualified Presumption of Safety* (QPS), sendo a

única levedura não patogénica a ser usada na produção de produtos probióticos.^{24;25;15} Esta levedura possui elevados níveis de crescimento a temperaturas elevadas, é resistente ao ácido gástrico e não altera de forma negativa a microbiota do TGI. Adicionalmente, auxilia no aumento de colónias de *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, ao mesmo tempo que promove a eliminação de agentes patogénicos.²⁶

2.3. MECANISMOS DE AÇÃO

O potencial terapêutico associado ao consumo de probióticos está claramente documentado, no entanto, os mecanismos de acção responsáveis pelos seus efeitos benéficos não são ainda compreendidos na sua totalidade. Existem estirpes probióticas que nem sempre necessitam de colonizar o TGI para exercer os seus efeitos. Alguns probióticos como *Bifidobacterium longum* tornam-se parte integrante da microflora intestinal humana, enquanto *Lactobacillus casei* exerce a sua atividade de forma indireta ao remodelar e/ou influenciar a microbiota residente.⁷

Assim, diferentes espécies e/ou estirpes probióticas estão igualmente associadas a mecanismos de acção distintos, podendo envolver o reforço da barreira epitelial, modificação da microbiota intestinal, interferência no *quorum sensing* e imunomodulação (Figura 2). Um entendimento diferenciado de todos os mecanismos envolvidos permitirá uma seleção mais rigorosa e apropriada de estirpes probióticas, consoante as suas finalidades terapêuticas.^{7;9} Os microrganismos probióticos, dependendo da sua estirpe e quando usados corretamente, podem ajudar na prevenção e tratamento de doenças como, diarreia associada ao uso de antibióticos, infeções por *Clostridium difficile*, doença de Crohn, síndrome do intestino irritável, entre outras.⁷

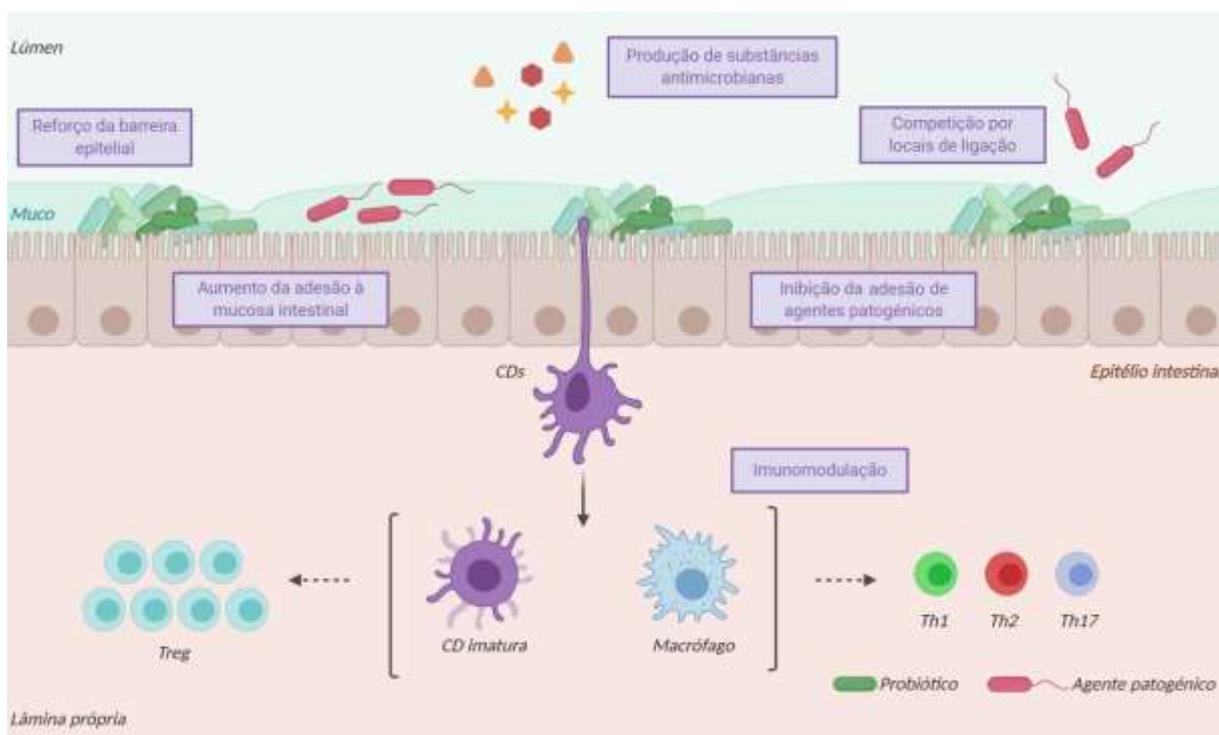


Figura 4 - Principais mecanismos de acção de microrganismos probióticos (Adaptado de ⁷).

2.3.1. Reforço da barreira epitelial

Os probióticos são capazes de influenciar muitos dos componentes responsáveis pelo funcionamento da barreira epitelial, quer seja através da diminuição do processo de apoptose celular, ou através do aumento da produção de mucina. Esta barreira constitui um importante mecanismo de defesa no que toca à manutenção da integridade epitelial e à protecção do organismo contra factores externos. A capacidade da função barreira está relacionada com a presença de uma camada de muco, peptídeos antimicrobianos, Imunoglobulina A (IgA) e, principalmente, com a qualidade das *tight junctions* entre as células do epitélio intestinal. Caso ocorra uma ruptura desta barreira, várias bactérias e diversos tipos de antígenos podem atingir a submucosa e desencadear um processo inflamatório, resultando em distúrbios intestinais.⁹

O consumo de microrganismos probióticos tem demonstrado vantagens na manutenção de uma boa função de barreira, no entanto, os mecanismos envolvidos não se encontram compreendidos na sua totalidade. Diversos estudos concluíram que a espécie *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) é capaz de interagir directamente com as células epiteliais intestinais e de manter a sua integridade. Este efeito, assim como a capacidade desta bactéria persistir no TGI, está relacionado com a expressão *in vivo* de pili contendo um domínio de

ligação ao muco. Complementarmente, os factores de solubilidade da LGG (p75 e p40) mostraram-se também eficazes no que diz respeito à prevenção de apoptose celular, através da activação da proteína quinase B e da supressão de factor nuclear kappa B (NF-kB). Estão também presentes efeitos como: aumento de secreção de mucina das células epiteliais e regulação da resposta inflamatória.^{7,9;27;28}

2.3.2. Modificação da microbiota intestinal

A microbiota intestinal está envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos, desde o controlo de energia a mecanismos cognitivos, até à neutralização de toxinas e combate de agentes patogénicos. Alterações na composição da microbiota podem levar ao aparecimento de diversas doenças, tais como, obesidade, esteatose hepática, infecções pulmonares, doenças neurodegenerativas e cancro.^{29;30}

As diferentes espécies de probióticos são capazes de competir com agentes patogénicos pelos locais de ligação situados nas células epiteliais e na camada de muco. Proteínas de superfície extraídas de *Lactobacillus helveticus* R0052 demonstraram inibir a capacidade de adesão de *Escherichia coli* O157:H7, aumentando subsequentemente a sua permeabilidade.³¹

Comparativamente, *Saccharomyces boulardii* secreta um factor termolábil responsável pela diminuição da capacidade de adesão bacteriana. Por outro lado, os probióticos são também capazes de interferir no crescimento de agentes patogénicos através da libertação de diversos factores antimicrobianos, como defensinas, bacteriocinas, peróxido de hidrogénio, óxido nítrico e ácidos gordos de cadeia curta, capazes de reduzir os níveis de pH no lúmen intestinal e de romper membranas de bactérias gram-negativas, interrompendo o seu crescimento. Comparativamente, as bacteriocinas são toxinas com a capacidade de permeabilização destas mesmas membranas, levando à formação de poros.²⁷

A microbiota pode também sofrer alguns desequilíbrios, muitas vezes provocados por doenças ligadas a descontrolos imunológicos. Uma adequada administração de probióticos pode ajudar no reequilíbrio da comunidade bacteriana, já que estes microrganismos são capazes de modelar a microbiota, através da repressão de certos patobiontes – microrganismos que em determinadas condições causam doença – e da estimulação de grupos endógenos benéficos.²⁸

2.3.3. Interferência no *quorum sensing*

Quorum sensing é um mecanismo de comunicação entre bactérias que envolve a produção, detecção e resposta a moléculas extracelulares, denominadas moléculas auto-indutoras. Estas moléculas acumulam-se à medida que a densidade populacional bacteriana vai aumentando. As bactérias conseguem detectar concentrações-limite destas substâncias, modificando assim a sua expressão genética. Ao usarem este meio de comunicação, as bactérias atuam como uma entidade multicelular, cada uma delas exercendo diferentes funções, facilitando a colonização do TGI e, conseqüentemente, o desenvolvimento de um processo inflamatório.³² *Quorum sensing* está na base da execução de diversos mecanismos já conhecidos: bioluminescência, esporulação, produção antimicrobiana, formação de biofilmes e secreção de factores de virulência.^{33;34}

Estudos demonstraram que bactérias da espécie *Lactobacillus acidophilus* secretam uma molécula capaz de inibir o processo de *quorum sensing* e de interagir directamente com o processo de transcrição do gene *E. coli* O157, reduzindo assim a sua toxicidade.⁷

2.3.4. Imunomodulação

Mais de 70% das células imunológicas estão localizadas a nível intestinal, principalmente ao longo do intestino delgado, formando o tecido linfático associado ao intestino (TLAI). O SI possui dois tipos de resposta imunitária: imunidade inata (natural) e imunidade adquirida (adaptativa ou específica). A imunidade adquirida é dependente de linfócitos B e T, que possuem receptores específicos para certos tipos de antigénios. Contrariamente, a imunidade inata responde a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na superfície de maior parte dos agentes patogénicos. A primeira resposta à invasão do organismo por parte de agentes exteriores é activada através de receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), sendo os mais estudados os receptores *Toll-Like* (RTLs). Conseqüentemente, receptores extracelulares de lectina tipo C (CLRs) e domínios de oligomerização de ligação de nucleóticos intracelulares provocam uma cadeia de transmissão de sinais aquando do reconhecimento do agente invasor. Este reconhecimento provoca a activação de células T reguladoras e a diferenciação de linfócitos T *helper* (LTh) em vários tipos, cada um deles secretor de um conjunto particular de citocinas. Os efeitos deste processo podem ser locais, e limitados ao sistema imunitário intestinal, ou sistémicos.^{9;28}

Um dos efeitos mais importantes dos microrganismos probióticos é a sua capacidade de modulação do SI, através de um reforço das respostas inata e adaptativa. Este reforço surge através de um *crosstalk* entre o organismo bacteriano, a barreira epitelial presente no TGI e o SI.³⁵ As BAL exercem a sua actividade imunomodulatória através da inibição de certas respostas inflamatórias, regulação da expressão de RTLs, activação de células dendríticas (CDs) e de células *natural killer* (NK), proliferação de linfócitos, regulação das reacções por parte de linfócitos Th (Th1/Th2) e secreção de IgA específica.^{27;36}

Via de sinalização de RTLs – Os probióticos atuam como ligandos em receptores envolvidos na resposta imunitária inata, tais como os RTLs, expressos em células do epitélio intestinal e em células imunitárias presentes na mucosa. Esta capacidade de actuação influencia várias vias de sinalização: transcrição de NF-kB, cascata de proteína quinase activada por mitógeno e activação dos receptores activados por proliferadores de peroxissoma tipo gama.³⁵ Estudos demonstraram que *L. reuteri* DSM 17938 aumentou significativamente a taxa de sobrevivência em doentes com enterocolite necrosante, através da inibição das vias de sinalização de RTL4 e de NF-kB. Este efeito deveu-se principalmente à diminuição da secreção de certas citocinas pró-inflamatórias, tais como, factor de necrose tumoral – alfa (TNF- α) e interleucina – 1 β (IL-1 β).^{35;37} Adicionalmente, existem ainda estirpes de *Lactobacillus* capazes de regular a secreção de interferão-gama (IFN- γ) e de interleucina-12 (IL-12).³⁶

Os efeitos exercidos no hospedeiro são sempre dependentes da estirpe probiótica em estudo. Algumas estirpes, como é o caso de *Bifidobacterium lactis* BBI2, provocam a activação do NF-kB e um aumento dos níveis da citocina pró-inflamatória interleucina-6 (IL-6). Estes efeitos podem também apresentar os seus benefícios já que, de acordo com algumas evidências recentes, um baixo nível de inflamação pode apresentar vantagens fisiológicas, vantagens estas que passam por uma boa manutenção da barreira epitelial e *priming* da resposta imunitária.³⁵

Células imunitárias – As CDs são células apresentadoras de antígenos e situam-se no epitélio intestinal, no entanto têm a capacidade de se deslocar para outros locais do organismo. A maturação destas células e a maneira como regulam a diferenciação de linfócitos T *naive* em linfócitos Th1, Th2, Th17 ou em Linfócitos T reguladores (Treg) é determinada pela interacção com diferentes factores microbianos. As CDs intestinais têm um papel importante na manutenção da imunotolerância no TGI, através da regulação de respostas inflamatórias contra antígenos alimentares e contra a própria microbiota humana, prevenindo reacções de hipersensibilidade.³⁵

Assim, os probióticos interagem com as CDs, facilitando a sua maturação e a indução de células Treg. As células Treg têm um papel crítico no que toca ao estabelecimento de um equilíbrio correto do SI. Uma deficiência neste tipo de células provoca uma condição rara denominada desregulação imunitária, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao cromossoma X, ou síndrome de IPEX. Esta síndrome é muitas vezes associada a outras condições como eczema, enteropatia severa, Diabetes *mellitus* Tipo I e inflamação em diversos órgãos.³⁸

Diferentes estirpes de probióticos influenciam o desenvolvimento e a sobrevivência de diferentes tipos de linfócitos Treg, como linfócitos T CD4+, CD8+ e CD25+, que, por sua vez, vão desempenhar um papel de auxílio aos linfócitos Th. Os probióticos podem também promover a secreção de citocinas imunomoduladoras, como é o caso da interleucina-10 (IL-10).^{35;39} Adicionalmente, algumas estirpes probióticas promovem a diferenciação de células B em células plasmáticas, aumentando a produção de IgA. Esta imunoglobulina diminui a ligação entre o agente patogénico e a barreira epitelial do TGI, e a sua penetração no organismo.^{35;40} Por exemplo, *Lactobacillus casei* possui a capacidade de aumentar os níveis de IgA específica para agentes patogénicos. Por outro lado, não são produzidos anticorpos para o combate ao probiótico em questão, indicando assim que não existe uma resposta imune ao seu uso. Coelhos tratados com *L. casei* apresentaram uma redução acentuada da taxa de morbilidade causada por infeções provocadas por *Escherichia coli* EnteroHemorrágica (EHEC). Este efeito surge associado a um aumento dos níveis de anticorpos IgA anti-EHEC e anti-Shiga toxina, comparativamente com o grupo de controlo.⁷

2.4. CRITÉRIOS DE ESCOLHA E SEGURANÇA

Apesar de existirem muitas BAL aplicadas a diversos tipos de alimentos fermentados, o mercado de produtos biofuncionais encontra-se em evolução constante no que toca à implementação e diversificação de novos produtos.¹³ Neste contexto, surge um número crescente de estudos relacionados com a selecção de novas estirpes com diferentes propriedades e efeitos terapêuticos. Cada estirpe necessita de propriedades e critérios específicos para que seja considerada uma potencial candidata a probiótico.¹³ No entanto, antes de 2002, não existia qualquer regulamentação internacional relativa à eficácia e segurança dos mesmos. Assim, a FAO/WHO procedeu à elaboração e publicação de *guidelines* específicas intituladas “*Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food*”, onde são estabelecidos critérios de segurança e eficácia na selecção de probióticos. De acordo com este documento, cada estirpe deve ser devidamente identificada e submetida a diversos testes *in vitro* de forma a averiguar e estudar as suas propriedades funcionais. Esta exigência

deve-se ao facto de estes mesmos efeitos serem relacionados com a estirpe em questão, as condições de uso e também a dose administrada. Adicionalmente aos critérios gerais de selecção, e no que toca a microrganismos que possam ser potenciais candidatos a probióticos para uso em determinada condição ou doença, podem ser exigidas propriedades adicionais para o seu uso específico.⁴¹

A estratégia de selecção de um probiótico segue um esquema similar ao representado na Figura 3. Na maioria dos casos, a elevada quantidade de estirpes isoladas leva à necessidade de uma abordagem *step-by-step*. Ou seja, no final do procedimento, ficam apenas presentes as estirpes que tenham atingido um maior número de propriedades funcionais e, simultaneamente, ausência de traços negativos.^{13;42}

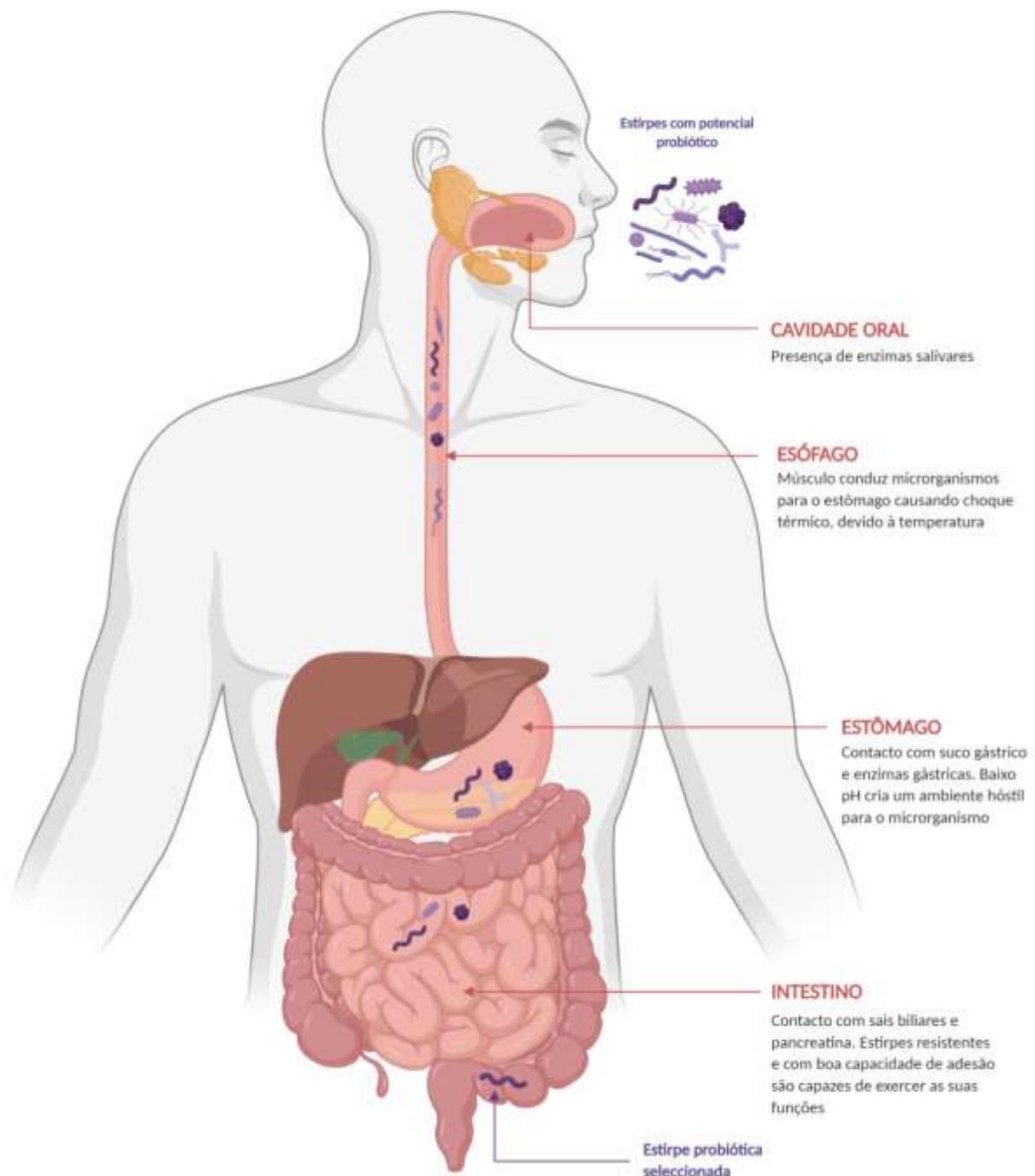


Figura 5 - Critérios de seleção de uma estirpe com potencial probiótico no organismo humano

(Adaptado de ¹³).

2.4.1. Tolerância ao stress e resistência a sais biliares e ácidos

Primeiramente, as estirpes candidatas a probióticos são avaliadas relativamente à sua capacidade de lidar com as condições hostis que o organismo humano apresenta. Aquando da sua administração, um probiótico deve ser resistente às enzimas e proteínas presentes na cavidade oral, tais como a amílase e a lisozima. Após a ingestão, as células probióticas deparam-se com um conjunto de factores antimicrobianos: no estômago, onde, para além da

presença de pepsina, o pH pode chegar a valores de 1.5, e na porção superior do intestino, onde existe pancreatina e bÍlis em concentrações imprevisÍveis e variÁveis ao longo do tempo. A tolerÁncia a estas condiçÓes é fundamental, nÁo sÓ para a sobrevivÊncia destes microrganismos, mas tambÊm para que ocorra uma colonizaçÓo adequada do TGI. De ressaltar que estes critÉrios de escolha aplicam-se apenas a probióticos administrados oralmente.^{13;42}

2.4.2. Capacidade de adesão

O prÓximo passo é o estudo do potencial de adesão do probiótico e a sua capacidade de colonizar o TGI. A adesão de microrganismos a células epiteliais depende directamente da composiçÓo físico-química da superfície membranar da estirpe em questÓo e da sua capacidade de autoagregaçÓo, processo pelo qual o probiótico é capaz de atingir concentraçÓes celulares elevadas. O processo de adesão revela-se especialmente importante no que diz respeito à estimulaçÓo do SI, já que parece haver uma relaçÓo direta entre a ligaçÓo à mucosa intestinal e a quantidade de anticorpos afectados pelos microrganismos.^{9;13;42;43}

2.4.3. Atividade anti-patogénica

Os probióticos, através da conversão de hidratos de carbono, proteÍnas e outros compostos, sÁo capazes de produzir substÁncias com atividade antimicrobiana. No entanto, existem tambÊm outros mecanismos com igual importÁncia no que diz respeito ao combate de agentes patogénicos, tais como: competiçÓo por nutrientes, adesão a células epiteliais e estimulaçÓo do SI. Geralmente, as substÁncias produzidas por BAL podem ser divididas em dois grupos principais: nÁo bacteriocinas e bacteriocinas, sendo que as mais relevantes e mais bem estudadas sÁo os ácidos orgÁnicos, em especial o ácido láctico e o ácido acético. Para além da sua capacidade de eliminaçÓo de microrganismos patogénicos, estes compostos ajudam tambÊm na reduçÓo dos nÍveis de pH do TGI.^{13;42}

2.4.4. Atividade antioxidante e efeito citotóxico

A actividade citotóxica é um critÉrio obrigatÓrio para a escolha de probióticos. A actividade antioxidante mostra-se muito benéfica devido à grande variedade de espÉcies reactivas de oxigénio, radicais livres e produtos tÓxicos capazes de provocar danos em moléculas biológicas e, conseqüentemente, em órgÁos vitais. Os radicais livres sÁo dos factores que mais contribuem para o desenvolvimento de doençAs degenerativas, como

arteriosclerose, cancro, doenças cardiovasculares, demência relacionada com a idade, artrite, doenças inflamatórias intestinais, envelhecimento da pele, entre outras.⁴² Vários estudos afirmam que os antioxidantes têm um papel fundamental na prevenção destas doenças, já que têm a capacidade de funcionar como removedores de espécies reactivas de oxigénio e de metais quelantes, protegendo assim as células humanas e reduzindo os danos oxidativos. Apesar dos mecanismos antioxidativos das BAL não estarem ainda bem descritos e compreendidos, recomenda-se que as estirpes utilizadas tenham a capacidade de melhorar as defesas celulares, reduzir as espécies ativas de oxigénio, aumentar a superóxido dismutase e reduzir a peroxidação de lípidos.^{44;45}

Um efeito citotóxico pode ser igualmente relevante, já que, de acordo com a WHO, o cancro é considerado a maior causa de morbilidade mundialmente. Foi já descrito pela comunidade científica o facto de os probióticos exibirem efeitos inibitórios na proliferação de várias linhas de células cancerígenas. Apesar de estes mecanismos ainda não estarem completamente estudados e compreendidos, tal atividade tem sido relacionada com a actividade antioxidante, produção de metabolitos anticancerígenos, estimulação do SI, regulação da apoptose e redução directa ou indirecta de agentes cancerígenos.⁴²

2.4.5. Avaliação de segurança e resistência antimicrobiana

O risco de infecção ligado à introdução de microrganismos na dieta deve ser devidamente avaliado e a determinação da segurança de um probiótico nunca deve ser dada na sua totalidade. Algumas iniciativas estão a ser tomadas por parte da comunidade europeia com o intuito de definir critérios para a avaliação da segurança de probióticos para uso humano. Algumas das recomendações incluem histórico de isolamento, identificação taxonómica e ausência de virulência, infecciosidade, toxicidade e transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos.¹³

Grande parte dos probióticos existentes no mercado foi isolada a partir de indivíduos saudáveis, de forma a aumentar a sua compatibilidade e resistência no TGI. No entanto, surgem cada vez mais novas fontes de obtenção de probióticos. A identificação destas novas estirpes é feita o mais cedo possível, de forma a garantir que haja um conhecimento inicial do seu potencial patogénico.¹³

Em 2007, a *European Food Safety Authority* (EFSA) introduziu, pela primeira vez, a resistência antimicrobiana como sendo uma preocupação associada à segurança no consumo de probióticos. Este facto foi baseado na possibilidade de ocorrer transferência horizontal de

genes de uma bactéria benéfica para uma patogénica, no TGI. Consequentemente, em 2012, o programa QPS inclui este critério na definição de *Generally Recognized as Safe* (GRAS) para probióticos.^{13,46}

A resistência a antibióticos associada a probióticos é considerada uma séria preocupação quando o risco de transferência horizontal de genes está presente. Quando esta resistência é intrínseca devido a uma mutação genética, a bactéria probiótica não é considerada um risco por si só, pois esse mesmo gene só é passado de geração em geração. Por outro lado, é a capacidade de transferência horizontal de genes, que permite a disseminação da resistência antimicrobiana. Assim, um dos aspectos mais críticos e urgentes é a avaliação da existência ou não de resistência intrínseca ou adquirida.^{47,48}

3. USO DE PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO E CONTROLO DE DOENÇAS

3.1. DOENÇAS INTESTINAIS

3.1.1. Infecções associadas a *Clostridium difficile*

Clostridium difficile é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia e formadora de esporos, associada a infecções gastrointestinais com um quadro clínico de diarreia e colite.⁷ As infecções associadas a *Clostridium difficile* (ICD) têm apresentado vários desafios e dificuldades a nível clínico, nos últimos quarenta anos. Por ano, são reportados cerca de 453.000 casos, tornando-a na infecção mais amplamente documentada.⁴⁹ Os sintomas variam entre diarreia e colite severa, e as complicações incluem septicemia, perfuração do cólon e possível colectomia.⁵⁰

A microbiota gastrointestinal é uma comunidade microbiana complexa e diversificada que tem acompanhado a evolução do Homem ao longo do tempo.⁵¹ Quando em equilíbrio, este conjunto de microrganismos protege o hospedeiro inibindo o crescimento e colonização de agentes patogénicos prejudiciais à saúde humana. *Clostridium difficile* pode ser encontrada no TGI de indivíduos saudáveis, sendo mais predominante em crianças (70%) do que em adultos (17%). Nestes indivíduos, a presença desta bactéria não causa nenhum tipo de doença. No entanto, a exposição a antimicrobianos perturba o equilíbrio da microbiota, diminuindo a diversidade de espécies bacterianas presentes no TGI e provocando uma supressão na resposta imunitária inata do organismo. Assim, o tratamento com agentes antimicrobianos e a vulnerabilidade intestinal a ele associada, permite que haja uma colonização excessiva de *Clostridium difficile*.⁵⁰ A patogenicidade desta bactéria é atribuída à

produção de dois tipos de toxinas – toxina A e toxina B.^{52:53} Estas toxinas conseguem romper as *tight junctions* presentes nas células epiteliais intestinais, comprometendo a sua função barreira e aumentando a permeabilidade. Consequentemente, inicia-se um processo inflamatório com infiltração de neutrófilos, produção de citocinas pró-inflamatórias e activação de linfócitos.⁵⁰

O tratamento mais comum de ICD passa pela administração de antibióticos, como metronidazol e vancomicina. No entanto, algumas subpopulações de *Clostridium difficile* têm apresentado uma baixa susceptibilidade ao metronidazol, dificultando assim o seu controlo.⁵⁰ Adicionalmente, o tratamento antimicrobiano apresenta algumas falhas na irradicação total dos esporos produzidos pela bactéria, levando a casos de reincidência da doença (cerca de 20-30% das infecções reaparecem após 3 meses).^{7:49} Todos estes factos incentivaram diversos investigadores no estudo e/ou revisão de novas formas complementares de tratamento.⁵⁰

Num estudo realizado por Castagliuolo *et al.*⁵⁴ foi demonstrado o papel de *Saccharomyces boulardii* no tratamento de ICD, ficando provado que, para além de esta levedura produzir uma protease sérica capaz de degradar directamente as toxinas produzidas por *C. difficile*, provoca também um aumento dos níveis de IgA, ajudando no combate à infecção.⁷ Comparativamente, num outro estudo, a pacientes com ICD recorrente foi prescrito um antibiótico (vancomicina ou metronidazol) e uma dose de *S. boulardii* ou de placebo. O grupo de indivíduos que tomou vancomicina e, complementarmente, *S. boulardii*, apresentou taxas de reincidência da infecção muito mais baixas em comparação com o grupo placebo.^{7:55}

Relativamente a bactérias probióticas, foi demonstrado que estirpes como *L. rhamnosus* L34 e *L. casei* L39 são capazes de modular a inflamação causada por *C. difficile*. Estas estirpes apresentam também um perfil de resistência a vancomicina, aumentando o interesse da sua utilização no tratamento de ICD.⁵⁶ Adicionalmente, várias estirpes de *Lactobacillus* são capazes de aumentar a síntese de interleucina-8 (IL-8), ajudando no reforço da reposta imunitária inata do organismo.^{50:57}

3.2. DOENÇAS EXTRA-INTESTINAIS

3.2.1. Reações alérgicas

O aumento exponencial do número de casos de distúrbios mediados pelo SI, como reacções alérgicas, está fortemente relacionado com a falta de uma exposição precoce a agentes microbianos.⁵⁸ As doenças alérgicas são cada vez mais prevalentes em todo o mundo, e representam uma dificuldade significativa a nível social, económico e psicológico.⁵⁹ Alguns autores defendem que a falta de exposição precoce durante a infância a um largo espectro de agentes infecciosos, microrganismos ou parasitas, resulta num aumento da susceptibilidade a doenças alérgicas, ao impedir o desenvolvimento natural do SI.⁶⁰ A exposição precoce a diversos agentes microbianos permite que ocorra uma alteração no *ratio* entre linfócitos Th2 e Th1, havendo um favorecimento destes últimos. O fenótipo Th2 estimula a produção de imunoglobulina E (IgE), aumentando assim o risco de ocorrência de reacções alérgicas. Uma estimulação microbiana durante os primeiros anos de vida aumenta a prevalência de células Th1 e Th3 que, por sua vez, secretam citocinas que reduzem o processo inflamatório e estimulam uma melhor tolerância a alérgenos comuns e IgA, respectivamente.^{58;59}

Uma reacção alérgica é uma reacção de hipersensibilidade, provocada por um mecanismo imunológico quando este entra em contacto com um alérgeno. Os alérgenos podem entrar em contacto com o SI de diversas formas: inalação, ingestão, contacto directo com a pele e, por vezes, entrada directa através da picada de um insecto. Atopia diz respeito à predisposição de um indivíduo, geralmente durante a infância e adolescência, para produzir anticorpos IgE, em resposta a uma exposição a quantidades normais de alérgenos. Após esta exposição, surgem vários sinais e/ou sintomas, como asma, rinite, conjuntivite e dermatite atópica. No entanto, nem todos os mecanismos que levam ao desenvolvimento de uma reacção alérgica estão relacionados com este anticorpo, sendo que factores genéticos, estímulos ambientais e agentes infecciosos também podem estar envolvidos.^{58;61}

Como abordado anteriormente, o consumo de probióticos altera drasticamente a microflora intestinal, assim como influencia a secreção de citocinas através da modulação de células do SI. Este mecanismo de acção despertou a curiosidade da comunidade científica, já que, através destas alterações, estes microrganismos ajudam na redução de atopia e, posteriormente, numa resposta mais atenuada por parte do SI a alérgenos.^{58;59}

3.2.1.1. Dermatite atópica

Recentemente, a prevalência de dermatite atópica (DA) tem vindo a aumentar à escala global, sendo de 10 – 20% em crianças e de 1-3% em adultos. Normalmente, surge no início da infância e pode ter como causas diversos factores: dieta, alergénios e exposição ao ambiente externo. Surge assim um interesse crescente na suplementação com probióticos numa fase precoce da vida, de forma a prevenir o aparecimento desta doença.⁶²

O primeiro estudo de revisão feito neste âmbito, elaborado por Zuccotti *et al.*⁶³, inclui vários ensaios onde foi avaliada a administração de probióticos em mulheres em início de gestação e/ou na primeira semana de vida de recém-nascidos. Os indivíduos que tivessem um ou mais familiares com DA, asma, urticária ou algum tipo de manifestação alérgica foram considerados pacientes de alto risco, e com grande probabilidade de desenvolver algum tipo destas condições nos primeiros anos de vida. Foi demonstrado que, no grupo de 2381 crianças, cujas mães consumiram probióticos durante o tempo de gestação, apenas 13 desenvolveram DA.⁵⁹ No entanto, as estirpes probióticas não foram consistentes em todos os ensaios. Quatro ensaios usaram uma mistura de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, três optaram por *Lactobacillus rhamnosus* HN001 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019, e dez recorreram a diferentes estirpes de *Lactobacillus*.⁶³

Cuello-Garcia *et al.*⁶⁴ publicou um estudo de revisão à volta deste tema, onde foram avaliados os efeitos da administração de probióticos em mulheres grávidas, a amamentar, recém-nascidos e crianças. Dos 29 ensaios realizados em mulheres grávidas, houve uma clara redução do risco de desenvolvimento de DA nos seus recém-nascidos. Foram tiradas as mesmas conclusões de ensaios realizados em mulheres a amamentar, recém-nascidos e lactentes até 6 meses de vida.⁵⁹ Em lactentes com mais de 12 meses de vida, o consumo de probióticos não apresentou qualquer atividade na prevenção do desenvolvimento de DA.⁶² No entanto, o uso ou não de microrganismos probióticos em mulheres grávidas e crianças com alto risco de desenvolverem DA, permanece controverso. São necessários estudos que aprofundem a seleção das estirpes a serem utilizadas, assim como a dose correta e o período de administração.^{64;65}

3.2.1.2. Alergias alimentares

A alergia alimentar é descrita como uma reacção adversa a alergénios alimentares desencadeada pelo SI. A prevalência deste tipo de alergias tem vindo a aumentar nos últimos 20 anos e estima-se que 240-550 milhões de pessoas sofram desta condição.⁵⁹ Enquanto alergias a ovos, leite, soja e trigo vão desaparecendo no decorrer da infância, alergias a

frutos de casca dura e marisco permanecem até ao final da vida.⁶⁶ Crianças com alergias alimentares têm 2-4 vezes mais probabilidade de desenvolver asma. Além disso, crianças com asma e alergias alimentares, em simultâneo, possuem um risco elevado de sofrerem anafilaxia.⁶⁷ Apesar de maior parte destas reacções estar bem controlada e vigiada, um tratamento adequado das mesmas poderia proporcionar uma melhor qualidade de vida.⁶⁶

Foi realizado um estudo em crianças com alergia a amendoins, onde se pretendeu avaliar o efeito de probióticos como adjuvantes no tratamento de imunoterapia oral de amendoim (IOA). No decorrer do estudo, a 31 crianças foi administrada uma colónia de *L. rhamnosus* CGMCCI.3724 e, seguidamente, IOA, diariamente (Grupo A). Adicionalmente, outro grupo de 31 crianças recebeu placebo de probiótico (maltodextrina) e de IOA (maltodextrina com corante castanho e essência de amendoim), também diariamente (Grupo B).⁶⁶ No final do ensaio, os investigadores reportaram que 82,1% das crianças do Grupo A já não apresentavam sinais e/ou sintomas aquando da ingestão de amendoins, comparativamente com os 3,6% do Grupo B. Foi ainda realizada uma sessão de acompanhamento, quatro anos após o cessamento do tratamento, onde foi reportado que os pacientes do Grupo A tinham demonstrado um consumo contínuo de amendoins. Posto isto, foi concluído que a administração complementar de probióticos promoveu um benefício clínico duradouro, assim como permitiu uma melhor supressão da resposta imunitária do organismo contra o alergénio em questão.⁵⁹

Em crianças com alergia a leite de vaca, foi levado a cabo um diferente tipo de ensaio, onde se avaliou o consumo de fórmula de caseína extensamente hidrolisada (FCEH) com ou sem a presença de LGG. Foi realizado um sorteio entre o grupo de 220 participantes para definir quais receberiam apenas FCEH e quais receberiam FCEH e LGG. Depois da primeira dose, as manifestações do consumo de leite incluíam eczema, asma e conjuntivite e/ou rinite alérgica.⁶⁸ No final do estudo, foi concluído que o uso de FCEH em combinação com LGG diminuiu a incidência de manifestações alérgicas provocadas pelo consumo de leite de vaca, num período superior a 3 anos.^{59,69}

4. PERSPECTIVAS FUTURAS E CONCLUSÕES

A utilização de probióticos tem evoluído e crescido significativamente nos últimos anos. Tendo em conta que a microbiota intestinal possui uma relação estreita com a saúde humana, torna-se importante perceber e desenvolver novos métodos com o objectivo de manter e/ou melhorar o estado de saúde. Aqui, os microrganismos probióticos apresentam

um grande potencial no que toca à prevenção de infecções esporádicas, mas também no tratamento de doenças crónicas.

Têm sido orientados diversos estudos *in vivo* e *in vitro* usando uma grande diversidade de probióticos, no entanto, o maior problema prende-se essencialmente com os conceitos de segurança e eficácia. Apesar do consumo de probióticos incorporados em produtos alimentares ter sido considerado seguro por diversas entidades a nível global – já que estes microrganismos apresentam uma baixa capacidade para provocar efeitos adversos – foram poucos os estudos realizados em torno de incidentes relacionados com inchaço abdominal, flatulência e elevada pressão osmótica, factores estes que podem levar a desconforto gastrointestinal. Estes efeitos podem variar em função do indivíduo em causa, do tipo de produto alimentar no qual está contido o microrganismo probiótico, e da própria estirpe utilizada, assim como do respectivo mecanismo de acção.^{70:71} A selecção de uma estirpe específica de um microrganismo probiótico deve ser feita tendo em conta os efeitos desejados, e deve ser suportada com os devidos testes *in vitro* e *in vivo*, sozinha ou incorporada num determinado produto alimentar ou preparação farmacêutica. O progresso aliado à utilização deste tipo de microrganismos assenta numa melhor compreensão dos seus mecanismos de acção e na identificação de biomarcadores específicos para certos tipos de doenças, potenciando assim um aprimoramento do modelo dos ensaios clínicos utilizados. A longo prazo, esta melhoria permitirá a obtenção de resultados mais confiáveis e com bases mais robustas.⁷¹ A realização de mais estudos pode permitir uma aplicação e utilização mais segura e eficaz destes produtos.

As interacções genéticas entre os microrganismos probióticos ingeridos e os microrganismos residentes no TGI constituem também um problema de segurança nesta área, pois a transferência de genes de resistência a antimicrobianos entre microrganismos bacterianos benéficos e agentes patogénicos pode levar ao surgimento, e posterior evolução, de microrganismos probióticos com elevada resistência antibacteriana e de agentes patogénicos multirresistentes, constituindo um elevado risco para a saúde pública.⁷⁰

Considerando a adição de probióticos a produtos alimentares, e tendo em conta que esta prática tem vindo a aumentar exponencialmente nos últimos anos, a indústria alimentar depara-se ainda com alguns obstáculos que necessitam ser avaliados e ultrapassados. Um dos factores-chave prende-se com a diminuição dos custos de produção associada a estes produtos, pois uma das dificuldades prende-se com o crescimento destes microrganismos, que é dificultado pelo facto de não possuírem capacidade de sintetizar certas vitaminas e aminoácidos, sendo necessária uma correcta suplementação dos meios de cultura. A

diminuição dos custos de produção a nível industrial pode começar com o uso de efluentes agro-industriais como meios de cultura, já que resíduos derivados do processamento de frutas e vegetais demonstraram ser ricos em proteínas, hidratos de carbono, lípidos e vitaminas.⁷³ Assim, deve ser avaliada a viabilidade destes substratos no cultivo de microrganismos probióticos, já que podem ser usados para uma produção mais rentável e sustentável.

É também importante ter em conta a viabilidade dos microrganismos probióticos, já que a mesma influencia directamente a capacidade de colonização do TGI e, conseqüentemente, o surgimento dos efeitos desejados. Assim, estes devem manter as suas características durante três fases consideradas críticas: armazenamento, processo de fabrico e passagem pelo TGI. Até ao momento, já foram realizados diversos estudos que comprovaram que o armazenamento pode contribuir para a diminuição da viabilidade dos produtos probióticos. Foram ainda estudadas alternativas, como a utilização de processos de liofilização, com o intuito de manter a estabilidade do produto durante todo o tempo de armazenamento.⁷⁴ Por outro lado, uma técnica bastante promissora é a microencapsulação que, para além de poder ser aplicada a partículas de baixas dimensões, possibilita também uma libertação controlada em função de condições específicas.⁷⁵ Entre as técnicas utilizadas para encapsulação de probióticos são referidas: secagem por aspersão, refrigeração por aspersão, revestimento em leite fluidizado, extrusão, coacervação - ou técnica de separação de fases - e métodos electrostáticos.^{75;76} Porém, são necessários mais estudos em volta do método de encapsulação mais adequado a cada produto, assim como da seleção dos materiais encapsulantes que devem ter utilizados.⁷⁶ É também necessária uma correta avaliação da forma como as técnicas mencionadas anteriormente podem, eventualmente, provocar alterações na tolerância a níveis de pH baixos predominantes no TGI por parte dos microrganismos.^{72;74}

É de notar o forte papel que os microrganismos probióticos têm demonstrado na manutenção e melhoria da saúde do hospedeiro. Até ao momento, existem fortes bases que nos levem a concluir que estes microrganismos são, de facto, parte do futuro de um melhor entendimento da microbiota humana e do seu equilíbrio. Apesar de já terem sido realizados diversos estudos quanto às suas diferentes aplicações, ainda falta percorrer um longo caminho até existir um total conhecimento sobre os mecanismos de acção envolvidos, principalmente no que toca à imunomodulação. Com uma correta e forte compreensão de como os diferentes mecanismos se processam, as aplicações de microrganismos probióticos em contexto de combate a infecções esporádicas, mas também no tratamento e prevenção

de doenças crónicas tornar-se-ão cada vez mais adequadas e viáveis. Contudo, é importante ressaltar a necessidade de estudos e ensaios clínicos mais aprimorados com uma amostragem representativa, de forma a garantir a segurança e eficácia terapêutica destes produtos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GUPTA, V.; GARG, R. - **Probiotics**. Indian Journal of Medical Microbiology. 27:3 (2009) 202–209.
2. SALES-CAMPOS, HELIOSWILTON; SOARES, SIOMAR CASTRO; OLIVEIRA, CARLO JOSÉ FREIRE - **An introduction of the role of probiotics in human infections and autoimmune diseases**. Critical Reviews in Microbiology. 45:4 (2019) 413–432.
3. GEORGE KERRY, ROUT; PATRA, JAYANTA KUMAR; GOUDA, SUSHANTO; PARK, YOOHEON; SHIN, HAN SEUNG; DAS, GITISHREE - **Benefaction of probiotics for human health: A review**. Journal of Food and Drug Analysis. 26:3 (2018) 927–939.
4. MCFARLAND, LYNNE V. - **From yaks to yogurt: The history, development, and current use of probiotics**. Clinical Infectious Diseases. 60:2 (2015) S85–S90.
5. AMARA, A. A.; SHIBL, A. - **Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management**. Saudi Pharmaceutical Journal. 23:2 (2015) 107–114.
6. NUÑEZ, IVANNA N.; PERDIGÓN, GABRIELA; GALDEANO, CAROLINA M. - **Immune System in Undernourished Host: Probiotics as Strategy to Improve Immunity**. Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease. (2017) 77–86.
7. GOGINENI, VIJAYA K.; MORROW, LEE E.; MALESKER, MARK A - **Probiotics & Health Probiotics: Mechanisms of Action and Clinical Applications Immune modulation**. Journal of Probiotic and Health. 1:1 (2013) 1–11.
8. GUARNER, FRANCISCO; KHAN, AAMIR; GARISCH, JAMES - **Probiotics and Prebiotics: World Gastroenterology Organisation Global Guidelines**. October (2011).
9. BERMUDEZ-BRITO, MIRIAM; PLAZA-DÍAZ, JULIO; MUÑOZ-QUEZADA, SERGIO; GÓMEZ-LLORENTE, CAROLINA; GIL, ANGEL - **Probiotic mechanisms of action**. Annals of Nutrition and Metabolism. 61:2 (2012) 160–174.
10. MARKOWIAK, PAULINA; ŚLIZEWSKA, KATARZYNA - **Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health**. Nutrients. 9:9 (2017).
11. QUIGLEY, EAMONN M. M. - **Prebiotics and Probiotics in Digestive Health**. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 17:2 (2019) 333–344.

12. SARAO, LOVELEEN KAUR; ARORA, M. - **Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57:2 (2017) 344–371.
13. MELO PEREIRA, GILBERTO VINÍCIUS DE; OLIVEIRA COELHO, BRUNA DE; MAGALHÃES JÚNIOR, ANTONIO IRINEUDO; THOMAZ-SOCCOL, VANETE; SOCCOL, CARLOS RICARDO - **How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria**. *Biotechnology Advances*. 36:8 (2018) 2060–2076.
14. TURRONI, FRANCESCA; VENTURA, MARCO; BUTTÓ, LUDOVICA F. - **Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host : A Lactobacillus and Bifidobacterium perspective** **Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host : a Lactobacillus and Bifidobacterium perspective**. March (2013).
15. AZAD, ABUL KALAM; SARKER, MANOBENDRO; LI, TIEJUN; YIN, JIE - **Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota : An Overview**. (2018).
16. GOLDSTEIN, ELLIE J. C.; TYRRELL, KERIN L.; CITRON, DIANE M. - **Lactobacillus Species : Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities**. 60:2 (2015) 98–107.
17. BULL, MATTHEW; PLUMMER, SUE; MARCHESI, JULIAN; MAHENTHIRALINGAM, ESHWAR - **success**. 349 (2013) 77–87.
18. YAKOOB, RAHILA; PRADEEP, B. V. - **Bifidobacterium sp as probiotic agent - Roles and applications**. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 13:3 (2019) 1407–1417.
19. RIPERT, GABRIELLE; RACEDO, SILVIA M.; ELIE, ANNE MARIE; JACQUOT, CLAUDINE; BRESSOLLIER, PHILIPPE; URDACI, MARIA C. - **Secreted compounds of the probiotic Bacillus clausii strain O/C inhibit the cytotoxic effects induced by Clostridium difficile and Bacillus cereus toxins**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60:6 (2016) 3445–3454.
20. LIU, CHUN HUNG; WU, KUANCHIH; CHU, TAH WEI; WU, TSUNG MENG - **Dietary supplementation of probiotic, Bacillus subtilis E20, enhances the growth performance and disease resistance against Vibrio alginolyticus in parrot fish (Oplegnathus fasciatus)**. *Aquaculture International*. 26:1 (2018) 63–74.

21. JESSBERGER, N.; KRANZLER, MARKUS; RIOL, CLAUDIA DA; SCHWENK, VALERIE; BUCHACHER, T.; DIETRICH, RICHARD; EHLING-SCHULZ, MONIKA; MÄRTLBAUER, E. - **Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus***. Food Microbiology. 84:July (2019) 103276.
22. STENFORS ARNESEN, LOTTE P.; FAGERLUND, ANNETTE; GRANUM, PER EINAR - **From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins**. FEMS Microbiology Reviews. 32:4 (2008) 579–606.
23. CARDOSO, DORA RAMBAUSKE; CARDOSO, TELMA ABDALLA DE OLIVEIRA - **[Bioterrorism: data of a recent history of risks and uncertainties]**. Ciencia & saude coletiva. 16 Suppl 1: (2011) 821–30.
24. ARÉVALO-VILLENA, MARÍA; FERNANDEZ-PACHECO, PILAR; CASTILLO, NOELIA; BEVILACQUA, ANTONIO; BRIONES PÉREZ, ANA - **Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method**. LWT - Food Science and Technology. 89:March 2017 (2018) 657–665.
25. FADDA, MARIA ELISABETTA; MOSSA, VALENTINA; DEPLANO, MAURA; PISANO, MARIA BARBARA; COSENTINO, SOFIA - **In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics**. LWT - Food Science and Technology. 75: (2017) 100–106.
26. TOMICIC, ZORICA; COLOVIC, RADMILO; CABARKAPA, IVANA; VUKMIROVIC, DJURO; DJURAGIC, OLIVERA; TOMICIC, RUZICA - **Beneficial properties of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii***. Food and Feed Research. 43:2 (2016) 103–110.
27. BAJAJ, BIJENDER KUMAR; CLAES, INGMAR J. J.; LEBEER, SARAH - **Functional mechanisms of probiotics**. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 04:04 (2015) 321–327.
28. BUTEL, M. J. - **Probiotics, gut microbiota and health**. Medecine et Maladies Infectieuses. 44:1 (2014) 1–8.
29. MARTEL, JAN; OJCIUS, DAVID M.; YOUNG, JOHN D. - **Impact of the Gut Microbiota, Prebiotics, and Probiotics on Human Health and Disease**. (2014).
30. MARIZZONI, MOIRA; PROVASI, STEFANIA; CATTANEO, ANNAMARIA; FRISONI, GIOVANNI B. - **Microbiota and neurodegenerative diseases**. Current Opinion in Neurology. 30:6 (2017) 630–638.

31. CEAPA, CORINA - **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Influence of fermented milk products , prebiotics and probiotics on microbiota composition and health** Jan Knol , Professor Special Chair , Director Gut Biology. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 27:1 (2013) 139–155.
32. YUN, B.; OH, S.; GRIFFITHS, M. W. - **Lactobacillus acidophilus modulates the virulence of Clostridium difficile**. *Journal of Dairy Science*. 97:8 (2014) 4745–4758.
33. RUTHERFORD, STEVEN T.; BASSLER, BONNIE L. - **Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2:11 (2012).
34. BAI, A. JAMUNA; RAI, V. RAVISHANKAR - **Bacterial Quorum Sensing and Food Industry**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10:3 (2011) 183–193.
35. LIU, YUYING; TRAN, DAT Q.; RHOADS, J. MARC - **Probiotics in Disease Prevention and Treatment**. *Journal of Clinical Pharmacology*. 58:Suppl 10 (2018) S164–S179.
36. TSAI, YUEH TING; CHENG, PO CHING; PAN, TZU MING - **The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits**. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96:4 (2012) 853–862.
37. LIU, YUYING; FATHEREE, NICOLE Y.; MANGALAT, NISHA; RHOADS, JON MARC - **Lactobacillus reuteri strains reduce incidence and severity of experimental necrotizing enterocolitis via modulation of TLR4 and NF-κB signaling in the intestine**. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 302:6 (2012) 608–617.
38. SAKAGUCHI, SHIMON; MIYARA, MAKOTO; COSTANTINO, CRISTINA M.; HAFNER, DAVID A. - **FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system**. *Nature Reviews Immunology*. 10:7 (2010) 490–500.
39. THOMAS, CARISSA M.; VERSALOVIC, JAMES - **Probiotics-host communication modulation of signaling pathways in the intestine**. *Gut Microbes*. 1:3 (2010) 1–16.
40. HOOPER, LORA V.; MACPHERSON, ANDREW J. - **Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota**. *Nature Reviews Immunology*. 10:3 (2010) 159–169.

41. FAO, JOINT; WORKING, W. H. O.; REPORT, GROUP; GUIDELINES, DRAFTING; LONDON, FOOD - **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.**(2002) 1–11.
42. SHOKRYAZDAN, PARISA; FASELEH JAHROMI, MOHAMMAD; LIANG, JUAN BOO; HO, YIN WAN - **Probiotics: From Isolation to Application.** Journal of the American College of Nutrition. 36:8 (2017) 666–676.
43. DUARY, RAJ KUMAR; RAJPUT, YUDHISHHIR SINGH; BATISH, VIRENDER KUMAR; GROVER, SUNITA - **Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells.** Indian Journal of Medical Research. 134:11 (2011) 664–671.
44. DAS, DEEPLINA; GOYAL, ARUN - **Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic Lactobacillus plantarum DM5 isolated from Marcha of Sikkim.** LWT - Food Science and Technology. 61:1 (2015) 263–268.
45. KUMAR, MANOJ; KUMAR, ASHOK; NAGPAL, RAVINDER; MOHANIA, DHEERAJ; BEHARE, PRADIP; VERMA, VINOD; KUMAR, PRAMOD; PODDAR, DEV; AGGARWAL, P. K.; HENRY, C. J. K.; JAIN, SHALINI; YADAV, HARIOM - **Cancer-preventing attributes of probiotics: An update.** International Journal of Food Sciences and Nutrition. 61:5 (2010) 473–496.
46. BARLOW, SUE; CHESSON, ANDREW; COLLINS, JOHN D.; DYBING, ERIK; FLYNN, ALBERT; FRUIJTIER-, CLAUDIA; HARDY, ANTHONY; KNAAP, ADA; KUIPER, HARRY; NEINDRE, PIERRE LE; SCHANS, JAN; SILANO, VITTORIO; SKERFVING, STAFFAN; VANNIER, PHILIPPE - **Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee.** EFSA Journal. 5:12 (2007) 1–16.
47. YADAV, RUBY; SHUKLA, PRATYOOSH - **An overview of advanced technologies for selection of probiotics and their expediency: A review.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 57:15 (2017) 3233–3242.
48. GUEIMONDE, MIGUEL; SÁNCHEZ, BORJA; LOS REYES-GAVILÁN, CLARA G. DE; MARGOLLES, ABELARDO - **Antibiotic resistance in probiotic bacteria.** Frontiers in Microbiology. 4:JUL (2013) 1–6.
49. MCFARLAND, L. V.; SHIP, N.; AUCLAIR, J.; MILLETTE, M. - **Primary prevention of Clostridium difficile infections with a specific probiotic combining Lactobacillus acidophilus, L. casei, and L. rhamnosus strains: assessing the evidence.** Journal of

Hospital Infection. 99:4 (2018) 443–452.

50. VALDÉS-VARELA, LORENA; GUEIMONDE, MIGUEL; RUAS-MADIEDO, PATRICIA - **Probiotics for prevention and treatment of Clostridium difficile infection.** Advances in Experimental Medicine and Biology. 1050:(2018) 161–176.

51. DONALDSON, GREGORY P.; LEE, S. MELANIE; MAZMANIAN, SARKIS K. - **Gut biogeography of the bacterial microbiota.** Nature Reviews Microbiology. 14:1 (2015) 20–32.

52. CARTER, GLEN P.; ROOD, JULIAN I.; LYRAS, DENA - **The role of toxin A and toxin B in the virulence of Clostridium difficile.** Trends in Microbiology. 20:1 (2012) 21–29.

53. OLLECH, JACOB E.; SHEN, NICOLE T.; CRAWFORD, CARL V.; RINGEL, YEHUDA - **Use of probiotics in prevention and treatment of patients with Clostridium difficile infection.** Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology. 30:1 (2016) 111–118.

54. CASTAGLIUOLO, IGNAZIO; MONT, J. THOMAS L. A.; NIKULASSON, SIGFUS T. - **Toxin A Effects in the Rat Ileum.** Microbiology. 64:12 (1996) 5225–5232.

55. SURAWICZ, CHRISTINA M.; MCFARLAND, LYNNE V.; GREENBERG, RICHARD N.; RUBIN, MOSHE; FEKETY, ROBERT; MULLIGAN, MAURY E.; GARCIA, REUBEN J.; BRANDMARKER, SALLY; BOWEN, KAREN; BORJAL, DELIA; ELMER, GARY W. - **The Search for a Better Treatment for Recurrent Clostridium difficile Disease: Use of High-Dose Vancomycin Combined with Saccharomyces boulardii .** Clinical Infectious Diseases. 31:4 (2000) 1012–1017.

56. MODESTO, MONICA *et al.* - **Characterization of Bifidobacterium species in faeces of the Egyptian fruit bat: Description of B. vespertilionis sp. nov. and B. roussetti sp. nov.** Systematic and Applied Microbiology. 42:6 (2019) 126017.

57. ZIVKOVIC, MILICA; HIDALGO-CANTABRANA, CLAUDIO; KOJIC, MILAN; GUEIMONDE, MIGUEL; GOLIC, NATASA; RUAS-MADIEDO, PATRICIA - **Capability of exopolysaccharide-producing Lactobacillus paraplantarum BGCG11 and its non-producing isogenic strain NBI, to counteract the effect of enteropathogens upon the epithelial cell line HT29-MTX.** Food Research International. 74:(2015) 199–207.

58. TANG, REN BIN; CHANG, JIA KAN; CHEN, HUI LAN - **Can probiotics be used**

to treat allergic diseases?. *Journal of the Chinese Medical Association*. 78:3 (2015) 154–157.

59. WANG, HELEN T.; ANVARI, SARA; ANAGNOSTOU, KATHERINE - **The Role of Probiotics in Preventing Allergic Disease**. *Children*. 6:2 (2019) 24.

60. MAGUIRE, MIA; MAGUIRE, GREG - **The role of microbiota, and probiotics and prebiotics in skin health**. *Archives of Dermatological Research*. 309:6 (2017) 411–421.

61. CHIANG, CHI HUEI; LIN, MING WEI; CHUNG, MING YI; YANG, UENG CHENG - **The association between the IL-4, ADR β 2 and ADAM 33 gene polymorphisms and asthma in the Taiwanese population**. *Journal of the Chinese Medical Association*. 75:12 (2012) 635–643.

62. LI, LIN; HAN, ZHEN; NIU, XIAOPING; ZHANG, GUOZHENG; JIA, YULIANG; ZHANG, SHUNGUO; HE, CHIYI - **Probiotic Supplementation for Prevention of Atopic Dermatitis in Infants and Children: A Systematic Review and Meta-analysis**. *American Journal of Clinical Dermatology*. 20:3 (2019) 367–377.

63. ZUCCOTTI, G.; MENEGHIN, F.; ACETI, A.; BARONE, G.; CALLEGARI, M. L.; MAURO, A. DI; FANTINI, M. P.; GORI, D.; INDRIO, F.; MAGGIO, L.; MORELLI, L.; CORVAGLIA, L. - **Probiotics for prevention of atopic diseases in infants: Systematic review and meta-analysis**. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 70:11 (2015) 1356–1371.

64. CUELLO-GARCIA, CARLOS A.; BROZEK, JAN L.; FIOCCHI, ALESSANDRO; PAWANKAR, RUBY; YEPES-NUÑEZ, JUAN JOSÉ; TERRACCIANO, LUIGI; GANDHI, SHREYAS; AGARWAL, ARNAV; ZHANG, YUAN; SCHÜNEMANN, HOLGER J. - **Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials**. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 136:4 (2015) 952–961.

65. YANG, WENHAO; TU, RENYUAN; HU, YANAN; HE, TAO; ZHANG, WEIJIAN; GU, LI; LIU, HANMIN - **Probiotics supplement for the prevention of eczema in children**. *Medicine*. 98:34 (2019) e16957.

66. HSIAO, KUANG CHIH; PONSONBY, ANNE LOUISE; AXELRAD, CHRISTINE; PITKIN, SIGRID; TANG, MIMI L. K.; BURKS, WESLEY; DONATH, SUSAN; ORSINI, FRANCESCA; TEY, DEAN; ROBINSON, MARNIE; SU, EE LYN - **Long-term clinical and immunological effects of probiotic and peanut oral immunotherapy after**

treatment cessation: 4-year follow-up of a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Child and Adolescent Health.* 1:2 (2017) 97–105.

67. SOH, SHU E.; SHEK, LYNETTE PEI CHI - **Prebiotics and Probiotics for the Prevention and Treatment of Food Allergy** *17* (2016) 839-848

68. BERNI CANANI, ROBERTO; COSTANZO, MARGHERITA DI; BEDOGNI, GIORGIO; AMOROSO, ANTONIO; COSENZA, LINDA; SCALA, CARMEN DI; GRANATA, VIVIANA; NOCERINO, RITA - **Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 139:6 (2017) 1906-1913

69. VANDERHOOF, JON A.; YOUNG, ROSEMARY J. - **Role of probiotics in the management of patients with food allergy.** *Annals of Allergy, Asthma and Immunology.* 90:SUPPL. (2003) 99–103.

70. YOO, JI YOUN; KIM, SUNG SOO - **Probiotics and prebiotics: Present status and future perspectives on metabolic disorders.** *Nutrients.* 8:3 (2016) 1–20.

71. MARTINEZ, RAFAEL CHACON RUIZ; BEDANI, RAQUEL; SAAD, SUSANA MARTA ISAY - **Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: An update for current perspectives and future challenges.** *British Journal of Nutrition.* 114:12 (2015) 1993–2015.

72. FIGUEROA-GONZÁLEZ, IVONNE; QUIJANO, GUILLERMO; RAMÍREZ, GERARDO; CRUZ-GUERRERO, ALMA - **Probiotics and prebiotics-perspectives and challenges.** *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 91:8 (2011) 1341–1348.

73. FEDERICI, FEDERICO; FAVA, FABIO; KALOGERAKIS, NICOLAS; MANTZAVINOS, DIONISSIOS - **Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: Concept, opportunities and the case of olive mill waste waters.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 84:6 (2009) 895–900.

74. SAARELA, MARIA; VIRKAJÄRVI, ILKKA; ALAKOMI, HANNA LEENA; SIGVART-MATTILA, PIA; MÄTTÖ, JAANA - **Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk.** *International Dairy Journal.* 16:12 (2006) 1477–1482.

75. ANAL, ANIL KUMAR; SINGH, HARJINDER - **Recent advances in**

microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science and Technology. 18:5 (2007) 240–251.

76. MENEZES, CRISTIANO RAGAGNIN DE; BARIN, JULIANO SMANIOTTO; CHICOSKI, ALEXANDRE JOSÉ; ZEPKA, LEILA QUEIROZ; JACOB-LOPES, EDUARDO; FRIES, LEADIR LUCY MARTINS; TERRA, NELCINDO NASCIMENTO - **Microencapsulação de probióticos: Avanços e perspectivas.** Ciencia Rural. 43:7 (2013) 1309–1316.