



**GUIA PARA INSTRUÇÃO PROCESSUAL DE PETIÇÃO  
DE AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICOS PARA USO EM  
ALIMENTOS**

**VIGENTE A PARTIR DE 27/03/2019**

**Início do período de contribuições: 28/03/2019**

**Fim do período de contribuições: 26/03/2020**



## **GUIA PARA INSTRUÇÃO PROCESSUAL DE PETIÇÃO DE AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICOS PARA USO EM ALIMENTOS**

Este Guia expressa o entendimento da Anvisa sobre as melhores práticas com relação a procedimentos, rotinas e métodos considerados adequados ao cumprimento de requisitos técnicos ou administrativos exigidos pela legislação. Não confere ou cria novas obrigações, devendo ser utilizado por agentes públicos e privados como referência para cumprimento legislativo. Abordagens alternativas são possíveis, de modo que sua inobservância não caracteriza infração sanitária, nem constitui motivo para indeferimento de petições, desde que atendidos os requisitos exigidos pela legislação, ainda que por meio diverso daquele previsto nesta recomendação.

As recomendações contidas neste Guia produzem efeitos a partir da data de sua publicação no Portal da Anvisa e ficam sujeitas ao recebimento de sugestões da sociedade por meio de formulário eletrônico, disponível em <https://pesquisa.anvisa.gov.br/index.php/355846?lang=pt-BR>.

As contribuições\* recebidas serão avaliadas e poderão subsidiar a revisão do Guia e a consequente publicação de uma nova versão. Independente da decisão da área, será publicada análise geral das contribuições e racional que justifique a revisão ou não do Guia.

\*A fim de garantir maior transparência ao processo de elaboração dos instrumentos regulatórios editados pela Anvisa, esclarecemos que os nomes dos responsáveis pelas contribuições (pessoas físicas e jurídicas) são considerados informações públicas e serão disponibilizados de forma irrestrita nos relatórios e outros documentos gerados a partir dos resultados deste Guia. Já o e-mail e o CPF dos participantes, considerados informações sigilosas, terão seu acesso restrito aos agentes públicos legalmente autorizados e às pessoas a que se referem tais informações, conforme preconiza o artigo 31, §1º, inciso I da Lei nº 12.527, de 18 de novembro de 2011. Outras informações que venham a ser consideradas sigilosas pelos participantes poderão ser apensadas em campo específico no formulário eletrônico.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>2. BASE LEGAL.....</b>	<b>6</b>
<b>3. TÓPICOS ESPECÍFICOS DO GUIA .....</b>	<b>6</b>
3.1. COMPONENTES DA INSTRUÇÃO PROCESSUAL .....	6
3.2. APRESENTAÇÃO DO DOSSIÊ TÉCNICO-CIENTÍFICO .....	7
3.3. COMPROVAÇÃO DA IDENTIDADE .....	7
3.3.1. Nomenclatura.....	8
3.3.2. Depósito em Coleção de Cultura.....	9
3.3.3. Origem da Linhagem .....	9
3.3.4. Identificação .....	9
<b>4. COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA .....</b>	<b>13</b>
4.1. Identificação do grupo ou classe de risco do micro-organismo.....	13
4.2. Histórico de Uso .....	14
4.3. Revisão de literatura .....	14
4.4. Ensaio <i>in vitro</i> .....	15
4.4.1. Testes mínimos.....	15
4.4.2. Testes complementares .....	19
4.5. Ensaio em animais .....	21
4.6. Ensaio em humanos.....	22
4.7. Vigilância pós-mercado .....	23
<b>5. COMPROVAÇÃO DO BENEFÍCIO .....</b>	<b>23</b>
5.1. Alegações de propriedade funcional ou saúde.....	23
5.2. Estudos para caracterização da linhagem probiótica .....	24
5.3. Estudos para comprovação do benefício de uma alegação.....	25
5.3.1. Tipos de estudos.....	26
5.4. Busca da Totalidade de Evidências.....	29
5.5. Avaliação da qualidade dos estudos .....	31
5.6. Avaliação da totalidade das evidências.....	32



## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

5.6.1.	Estudos primários.....	33
5.6.2.	Revisão Sistemática.....	36
5.7.	Comprovação de uma alegação em mistura de probióticos.....	36
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>36</b>
<b>7.</b>	<b>GLOSSÁRIO .....</b>	<b>38</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>44</b>



## **1. INTRODUÇÃO**

Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício para a saúde (FAO/WHO, 2002; HILL et al, 2014). Esses micro-organismos pertencem a diferentes gêneros e espécies, tanto de bactérias como leveduras, e têm sido associados a diversos efeitos benéficos.

No Brasil, o uso de probióticos em alimentos requer prévia avaliação da Anvisa, segundo requisitos da Resolução RDC Anvisa nº 241, de 27 de julho de 2018. A avaliação efetuada contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico.

O presente Guia não abarca os micro-organismos não viáveis, mesmo quando houver evidências de seu benefício para a saúde, pois os mesmos não estão abrangidos na definição de probióticos.

Este Guia destina-se a orientar os interessados na instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos.

Este Guia procura indicar a relevância de cada informação para a condução da comprovação da segurança e do benefício de probióticos, considerando os requisitos estabelecidos na legislação. Entretanto, este documento não pretende ser exaustivo na exploração do tema, uma vez que as informações necessárias para avaliação de segurança podem variar dependendo das características do micro-organismo, da população-alvo, do tipo de alimento e do tipo de benefício atribuído. Assim, podem existir circunstâncias em que sejam necessários dados ou ensaios adicionais para a avaliação, além de procedimentos suplementares.

Caso o requerente adote caminhos alternativos, os motivos que levaram a adoção de metodologia distinta devem ser devidamente fundamentados, incluindo suas respectivas referências.

Este Guia deve ser aplicado em conjunto ao regulamento técnico específico, atos normativos subsidiários e outros documentos de orientação. Ressalta-se que as informações e interpretações deste guia estão sujeitas a mudanças, em virtude de alterações na legislação sanitária e da evolução do conhecimento técnico e científico.



## 2. BASE LEGAL

Resolução RDC nº 241, de 26 de julho de 2018, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.

Resolução RDC nº 243, de 26 de julho de 2018, que dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares.

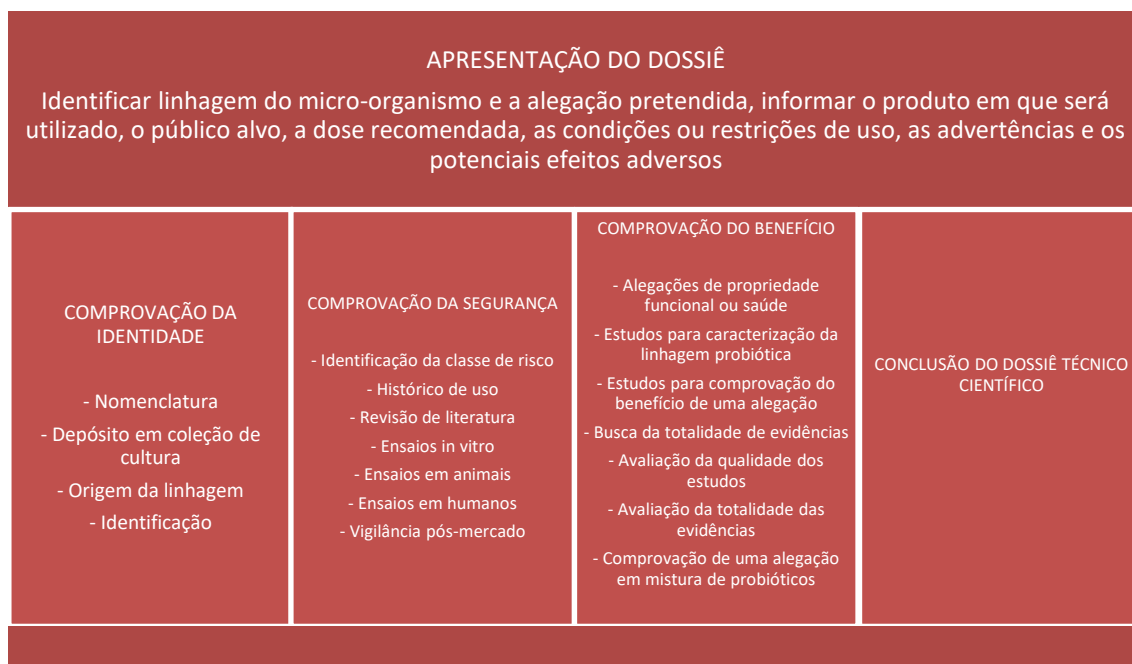
Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, que aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.

## 3. TÓPICOS ESPECÍFICOS DO GUIA

### 3.1. COMPONENTES DA INSTRUÇÃO PROCESSUAL

Para avaliação de uma linhagem de micro-organismo recomenda-se estruturar um dossiê técnico-científico, cujos principais elementos estão apresentados na **Figura 1**.

Figura 1 – Componentes do dossiê técnico-científico para avaliação de uma linhagem de probiótico.





### **3.2. APRESENTAÇÃO DO DOSSIÊ TÉCNICO-CIENTÍFICO**

O conceito de probióticos traz nas suas premissas o reconhecimento de um efeito benéfico para quem o utiliza. Apesar de alguns especialistas defenderem que esses efeitos benéficos podem ser atribuídos genericamente a grupos de micro-organismos (HILL et al., 2014), a abordagem regulatória adotada pela Anvisa requer a sua demonstração para a linhagem específica (FAO/WHO, 2002).

Para introduzir o dossiê técnico científico, foi estruturado um documento de apresentação (**Anexo I**) que reúne as informações essenciais para o processo de avaliação, incluindo: a linhagem do micro-organismo; os desfechos avaliados; a alegação que se pretende utilizar; a população alvo; tipos de alimentos indicados para adição da(s) linhagem(ns); a quantidade mínima sugerida para obtenção do benefício alegado; e as condições de uso.

Eventuais advertências ou restrições de uso também devem constar dessa apresentação inicial, assim como potenciais eventos adversos.

Todo o dossiê técnico-científico deve ser apresentado na língua portuguesa. As publicações técnico-científicas e dos pareceres de autoridades ou instituições estrangeiras, poderão ser aceitos em língua inglesa ou espanhola, desde que essas sejam as línguas dos textos originais.

Considerando a Lei de Acesso à Informação (LAI) (Lei nº 12.527, de 18 de novembro de 2011), deve ser indicada que partes das informações e documentação constantes no dossiê técnico científico devem ser tratadas como confidenciais. A indicação deve ser fundamentada com base no disposto na LAI, para análise da Agência.

### **3.3. COMPROVAÇÃO DA IDENTIDADE**

A classificação, identificação e nomenclatura adequadas dos micro-organismos constituem o ponto de partida para a avaliação de suas propriedades, sendo elementos primordiais do dossiê técnico-científico.



A identificação atribui o micro-organismo a um grupo taxonômico conhecido, de acordo com sua similaridade com esse grupo. Esta classificação permite a previsão das propriedades gerais do micro-organismo com base no que já se sabe sobre o grupo taxonômico (gênero/espécie), sendo importante para a identificação de perigos porque fornece uma referência que pode ser utilizada para prever as suas características relevantes. Essas propriedades gerais incluem a capacidade de produção de toxinas específicas, alérgenos ou fatores de virulência que são tipicamente expressos no gênero/espécie. A identificação de um micro-organismo, portanto, é etapa fundamental na avaliação de segurança, sem a qual a avaliação não pode ocorrer. A identificação deve ser baseada em metodologias atualizadas e conhecimento atual sobre o gênero e espécie.

A identificação da linhagem do micro-organismo probiótico é de importância crítica na avaliação de segurança, uma vez que os efeitos observados assim como determinados fatores de virulência são linhagem-específicos. A identidade da linhagem é importante também para relacioná-la a uma alegação de propriedade funcional ou de saúde, bem como para avaliar a estabilidade da linhagem ao longo do processo de fabricação, caracterizar adequadamente o micro-organismo durante estudos em humanos e estabelecer uma vigilância pós-comercialização eficiente. Portanto, a identificação completa (gênero, espécie e linhagem) dos micro-organismos probióticos deve ser claramente indicada.

### **3.3.1. Nomenclatura**

A nomenclatura apresentada no dossiê deve estar em conformidade com a nomenclatura atual e cientificamente reconhecida. Para as bactérias, os nomes utilizados devem estar de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de procariotos, conforme estabelecido pelo Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos<sup>1</sup>. Novas unidades taxonômicas ou reatribuições à taxonomia e à

---

<sup>1</sup> <http://www.the-icsp.org/>





nomenclatura são publicadas no *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM<sup>2</sup>). A nomenclatura e a taxonomia dos fungos são

estabelecidas pelo Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas<sup>3</sup>. A nomenclatura atualmente aprovada para fungos pode ser encontrada no banco de dados *Mycobank*.<sup>4</sup>

### **3.3.2. Depósito em Coleção de Cultura**

O dossiê técnico-científico deve identificar e comprovar a coleção de cultura internacionalmente reconhecida na qual a linhagem está depositada. O número/código da linhagem na respectiva coleção deve ser fornecido. Os nomes comerciais de uma linhagem podem ser usados, mas somente em adição a designação correta da espécie e sua respectiva identificação de depósito.

### **3.3.3. Origem da Linhagem**

Devem ser fornecidos dados sobre a origem da linhagem, especificando se foi isolada inicialmente de alimento, da microbiota humana ou de outros animais, dentre outras fontes possíveis. Para micro-organismos longamente aplicados na produção de alimentos, dados sobre sua origem podem ser imprecisos, de toda forma, é importante relatar a forma de obtenção da linhagem.

### **3.3.4. Identificação**

A maioria dos micro-organismos probióticos disponíveis atualmente para uso humano pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) e ao gênero *Bifidobacterium*. Para diferenciação entre as espécies destes grupos, os testes fenotípicos não devem ser utilizados como abordagem única.

---

<sup>2</sup> <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/about>

<sup>3</sup> <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>

<sup>4</sup> <http://www.mycobank.org>



Para identificação da espécie, um grupo de especialistas da Organização Mundial da Saúde (OMS) (FAO/WHO, 2002; 2006) recomenda que primordialmente sejam feitos os testes fenotípicos, seguidos de testes genotípicos. A especificação do micro-organismo constante do dossiê deve ser estabelecida usando a metodologia mais atual e válida, por meio da combinação de testes fenotípicos (morfológicos e bioquímicos) e genotípicos (ex. sequenciamento genético). A tipagem da linhagem deve ser realizada por métodos de tipagem molecular, de alto poder discriminatório.

#### **3.3.4.1. Testes Fenotípicos**

Abrangem técnicas que, direta ou indiretamente, medem ou detectam características que são o resultado observável da constituição genética daquele micro-organismo. Estes métodos foram, durante muito tempo, empregados para identificar micro-organismos e apesar do advento da biologia molecular, ainda têm utilidade para determinadas designações taxonômicas. Isto porque as características fenotípicas são básicas e críticas para agrupar micro-organismos dentro de grandes classes de micro-organismos similares.

Características fenotípicas de bactérias incluem características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, e requerem a multiplicação do organismo em cultura pura, sob condições adequadas. Já suas características morfológicas são diretamente observáveis a olho nu (ex. forma, cor e textura de colônias) ou por microscopia (ex. forma da célula, tipo de agrupamento celular e coloração de Gram).

As características fisiológicas se referem às condições nas quais os micro-organismos multiplicam, sobrevivem e perpetuam sua população. Quando um micro-organismo possui habilidade em crescer em condições específicas ou extremas, estas características são consideradas robustas e podem ser usadas para a identificação de micro-organismos (ex. faixa de pH, crescimento em determinadas concentrações de sal, tolerância ao oxigênio, suscetibilidade/resistência a antimicrobianos).



As características metabólicas, em sua maior parte, são indiretamente observadas porque se baseiam em reações bioquímicas ou atividades metabólicas dos micro-organismos. Os métodos bioquímicos geralmente envolvem crescimento em vários substratos, ensaios para avaliação de atividade enzimática ou ensaios para detecção de subprodutos metabólicos resultantes da atividade enzimática (ex. teste de catalase, oxidase, utilização de carboidratos e produção de ácidos). Para avaliação das características metabólicas, também podem ser usados sistemas de identificação miniaturizados e automatizados, compostos por múltiplos ensaios em uma única placa/dispositivo.

Na instrução do dossiê, pode-se apresentar uma síntese das características fenotípicas da linhagem do micro-organismos.

#### **3.3.4.2. Testes Genotípicos**

Testes genotípicos comparam diretamente sequências, em vez de considerar a expressão do gene e, muitas vezes são necessários para a discriminação correta entre espécies e linhagens. Atualmente, o uso inadequado de métodos de identificação é considerado a principal causa do erro de rotulagem de produtos probióticos em todo o mundo e estas inconsistências podem afetar tanto a eficácia quanto a segurança de um produto. Portanto, somente quando a identificação da espécie e a tipagem da linhagem é realizada com métodos internacionalmente aceitos, a linhagem é considerada suficientemente caracterizada (EFSA, 2016).

Para identificação de espécies bacterianas, são indicados os métodos de hibridização DNA-DNA ou a análise de sequência de genes 16S rRNA (FAO/WHO, 2006). No entanto, é importante ressaltar que, a técnica de hibridização DNA-DNA é difícil de ser utilizada na rotina e, em alguns casos, o sequenciamento do gene do 16S rRNA tem uma resolução limitada e pode não ser suficiente para discriminar espécies estreitamente relacionadas, tais como aquelas pertencentes ao grupo do *Lactobacillus delbrueckii*, grupo do *Lactobacillus plantarum* ou ao grupo do *Lactobacillus casei*; além de *Bifidobacterium animalis* e *Bifidobacterium longum*. Para esses casos, deve-se usar



## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

técnicas moleculares complementares como *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) ou Repetitive DNA Element-PCR (rep-PCR). São recomendadas também, técnicas de avaliação de sequências de marcadores taxonômicos robustos, como outros genes ribossomais (por exemplo, 23S rRNA e Internal Transcribed Spacers Elements - ITS), além de genes de cópia única (pheS, atpA, rpoA) (VANKERCKHOVEN et al., 2008), ou outras técnicas de identificação de espécie internacionalmente aceitas.

Para identificação da linhagem são utilizados métodos de tipagem. É importante ressaltar que os métodos de tipagem não são adequados para a identificação de espécies. Para identificação de linhagens bacterianas, recomenda-se o uso de algum das seguintes técnicas: a) macrorrestrição de DNA seguida por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), técnica que usa eletroforese em gel de campo pulsado para separar grandes fragmentos de DNA cromossômico gerados por digestão com enzimas de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP); b) análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (*Random Amplification of Polymorphic DNA* - RAPD); e c) outros métodos moleculares de tipagem genética internacionalmente aceitos como, por exemplo, polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - AFLP).

Para leveduras, a identificação da espécie pode ser realizada pelas seguintes técnicas: *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP (RFLP de produtos de PCR da região de transcrição interna (ITS) do 5.8S rDNA) ou pela análise de sequenciamento de marcadores taxonômicos de DNA (por exemplo, os domínios D1 e D2 do rDNA 26S ou suas regiões). Para a identificação da linhagem, recomenda-se: a) análise do polimorfismo do comprimento cromossômico seguida por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE); b) análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (*Random Amplification of Polymorphic DNA* - RAPD); c) análises de polimorfismo de DNA de microssatélites (*Short Tandem Repeats* - STR) ou outras técnicas moleculares de tipagem genética internacionalmente aceitas.

Embora todos os métodos listados para bactérias e leveduras sejam relevantes, eles podem ser substituídos, quando possível, pelo sequenciamento completo do



genoma do micro-organismo. Além de identificar a linhagem, a sequência genômica pode revelar o potencial patogênico da linhagem pela identificação de genes de virulência, informações relevantes para a avaliação de segurança, principalmente, de novas linhagens.

#### **4. COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA**

A linhagem probiótica deve ser segura para o uso pretendido, ou seja, para a população-alvo e nas condições de uso recomendadas. Para tanto, a segurança da linhagem deve ser demonstrada por meio de testes *in vivo* e *in vitro*, objetivando obter aprovação científica para garantir a segurança da cepa.

Para assegurar a segurança, o dossiê deverá ser composto por identificação do grupo ou classe de risco, histórico de uso, revisão de literatura, ensaios *in vitro*, ensaios em animais, ensaios clínicos, e, quando disponível, vigilância pós mercado.

A análise computacional ou análise *in silico*, ou seja, comparação da sequência genética do micro-organismo probiótico com bancos de dados de genes associados a virulência pode ser realizada de forma a complementar os ensaios de segurança.

##### **4.1. Identificação do grupo ou classe de risco do micro-organismo**

O primeiro elemento de instrução relacionado à segurança da linhagem é a identificação do grupo ou classe de risco a que o micro-organismo pertence com sua respectiva referência (ex. Ministério da Saúde/Brasil, *Center for Disease Control/USA*, *European Food Safety Authority - EFSA*, *World Health Organization - WHO*), pois o grupo de risco orientará sobre possíveis problemas de segurança relacionados ao micro-organismo. Além disso, podem ser providas informações sobre a existência de *status GRAS (Generally Recognized as Safe)* para a linhagem ou *QPS (Qualified Presumption of Safe)* para a espécie do micro-organismo.



## **4.2. Histórico de Uso**

Evidências que caracterizem o histórico de uso do produto contendo a linhagem/espécie microbiana, também podem contribuir para sua comprovação da segurança. A segurança baseada em histórico de uso seguro implica na comprovação do consumo da linhagem por gerações, em larga escala e por um grupo de pessoas com heterogeneidade genética, sem registro de eventos adversos. Tais evidências são especialmente relevantes para aqueles produtos que possuem uma tradição de uso bem relatada em outros países e cuja finalidade e condições de uso, atualmente propostas, sejam compatíveis com aquelas historicamente descritas.

O histórico de uso pode ser demonstrado a partir da combinação de evidências científicas, registros históricos, informações comerciais de produção e vendas durante determinado período, dados de pesquisas sobre aquisição ou consumo alimentar e documentos publicados por autoridades internacionais, que atestem o consumo do produto, por determinada população.

Ressalta-se que os dados sobre histórico de uso devem ser condizentes com as condições de uso sugeridas para o probiótico (ex. com a mesma quantidade de micro-organismos e condições de preparo que não prejudiquem sua viabilidade).

## **4.3. Revisão de literatura**

O objetivo deste item é agregar ao dossiê literatura disponível acerca da inocuidade ou patogenicidade do micro-organismo. Para tanto, deve ser fornecida revisão de literatura abrangente que compreenda aspectos de segurança sobre a linhagem ou unidade taxonômica a qual o micro-organismo pertence. Devem ser descritos a metodologia e o resultado de estudos publicados sobre fatores de virulência e capacidade patogênica da espécie e/ou linhagem. Estes estudos podem compreender



ensaios *in vitro*, em animais ou em seres humanos. Para estes casos a descrição dos métodos e resultados obtidos deve ser fornecida nos itens abaixo relacionados.

#### **4.4. Ensaios *in vitro***

A relação de ensaios *in vitro* necessários para comprovação de segurança de uma linhagem depende de diversas variáveis. A necessidade de realização de um ensaio *in vitro* será determinada pela disponibilidade de informações acerca de características ou propriedades da unidade taxonômica a qual pertence a linhagem, seu histórico de uso, público-alvo a que se destina e, quando disponíveis, resultados de ensaios em animais e seres humanos.

Os testes mínimos requeridos devem demonstrar que os microrganismos não possuem genes específicos de resistência a antibióticos capazes de serem transferíveis horizontalmente ou qualquer fator de virulência que possa causar danos à saúde do consumidor. De forma complementar, outros testes podem ser requeridos, tais como, produção de substâncias antimicrobianas, lactato, mucinase, desconjugação de sais biliares, entre outros.

O objetivo desta seção não é trazer uma lista exaustiva de ensaios que devem ser realizados, mas fazer considerações sobre os principais ensaios realizados para comprovação de segurança de uma linhagem probiótica.

Os ensaios *in vitro* devem ser devidamente descritos no dossiê, assim como os resultados obtidos. A comprovação do resultado de um ensaio *in vitro* pode ser realizada por meio de apresentação de certificado de análise ou estudos publicados.

##### **4.4.1. Testes mínimos**

###### **4.4.1.1. Perfil de resistência a antimicrobianos de importância clínica**

Este ensaio é obrigatório para qualquer linhagem probiótica. O desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos entre bactérias é uma preocupação crescente em saúde. Supondo que o probiótico em questão não apresenta características patogênicas,



## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

a principal preocupação com a presença de genes de resistência a antibióticos é a capacidade de transferência desses genes da linhagem para outros micro-organismos presentes na microbiota intestinal humana. A possibilidade de transferência de genes de resistência está relacionada à localização desses genes.

Presume-se que a resistência intrínseca apresenta um potencial mínimo para a disseminação horizontal, enquanto a resistência mediada por genes encontrados em elementos móveis do genoma é considerada como tendo um alto potencial de disseminação horizontal (EFSA, 2012). Portanto, todas as linhagens microbianas candidatas a probióticos devem ser avaliadas quanto à susceptibilidade a um número relevante de antimicrobianos de importância humana e veterinária. Essa avaliação é um componente relevante do dossiê técnico-científico.

Para a avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos devem ser utilizados procedimentos de diluição seriada em ágar ou caldo e linhagens-controle devem ser incluídas nos testes. Estes devem ser realizados de acordo com padrões internacionalmente reconhecidos, como o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), padrão ISO, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test* (EUCAST) ou similar.

Como requisito básico, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antimicrobianos expressos em mg/L ou µg/mL devem ser determinados para antimicrobianos clinicamente importantes. Métodos qualitativos ou semi-qualitativos que determinam a Concentração Inibitória Mínima (CIM) indiretamente, como os métodos de difusão, geralmente não são aceitáveis (EFSA, 2012).

Com o objetivo de distinguir as linhagens resistentes e suscetíveis, pode-se utilizar os valores de corte estabelecidos pelo painel de especialistas no documento *Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms*, da comunidade europeia (EFSA, 2018).

Os valores de corte microbiológico são estabelecidos estudando a distribuição de CIM dos antimicrobianos escolhidos em populações bacterianas pertencentes a uma





## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

única unidade taxonômica (espécie ou gênero). Assim, a linhagem será classificada como sensível, se o seu crescimento for inibido em uma concentração de antimicrobiano igual ou inferior ao valor de corte estabelecido ( $CIM \leq$  valor de corte), ou resistente, se o seu crescimento não for inibido em uma concentração de antimicrobiano superior ao valor de corte estabelecido ( $CIM >$  valor de corte).

Em caso de resistência a algum antibiótico, deve-se determinar sua natureza, se intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características naturais do micro-organismo, transmitida verticalmente à prole. A resistência ainda pode ser não natural ou adquirida e ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível à droga em questão. Para esta avaliação, quando houver informações limitadas sobre a distribuição da CIM dentro da unidade taxonômica considerada, a natureza estrutural e a base genética da resistência devem ser demonstradas analisando uma seleção representativa de linhagens pertencentes a essa unidade taxonômica.

Quando uma linhagem bacteriana demonstra maior resistência a um antimicrobiano específico do que outras linhagens da mesma unidade taxonômica, há indício de resistência adquirida, sendo necessária informação sobre a base genética da resistência antimicrobiana (EFSA, 2012). Assim, é muito importante distinguir se a resistência foi causada por alterações genéticas aleatórias em cromossomos ou por adição de elementos genéticos móveis. Qualquer associação possível entre elementos genéticos móveis e genes de resistência antimicrobiana deve ser relatada. Dados sobre a presença de DNA extra cromossômico, como plasmídeos e outros elementos genéticos móveis, incluindo sequências de inserção (SI), integrons e transposons devem ser fornecidos. A decisão sobre a segurança de uso da linhagem será realizada conforme árvore decisória (**Anexo II**).

Outro requisito é que os probióticos para uso humano sejam susceptíveis a pelo menos dois antibióticos clinicamente relevantes, para que em caso de infecções haja tratamento disponível e eficaz.



#### 4.4.1.2. Pesquisa de fatores de virulência

O dossiê deve ser suficiente para demonstrar a ausência de fatores de virulência, tais como, toxinas, enzimas (ex.: hemolisinas), metabólitos tóxicos (ex.: aminas biogênicas) ou outras moléculas relacionadas à patogenicidade do micro-organismo probiótico (ex.: invasinas, adesinas, proteínas de superfície).

Caso a revisão de literatura não comprove a ausência de fatores de virulência, ou ainda, indique a presença de fatores de virulência no gênero/espécie do micro-organismo probiótico, ensaios *in vitro* que avaliem a presença destes determinantes na linhagem probiótica devem ser obrigatoriamente realizados.

Especificamente para o gênero *Bacillus*, a principal preocupação de segurança é a produção de toxinas. No entanto, a capacidade de produção de toxinas e a natureza das toxinas produzidas estão distribuídas de forma desigual no gênero, ocorrendo frequentemente em algumas espécies e mais raramente em outras. Na ausência de evidências sobre a capacidade para a produção de toxinas, qualquer linhagem de *Bacillus* ou de outros gêneros relacionados deve ser avaliada quanto ao potencial toxigênico. A determinação *in vitro* de toxinas deve ser realizada pelo protocolo de citotoxicidade em células, conforme estabelecido em Guia da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, 2014).

Se a linhagem em avaliação pertence a uma espécie/gênero que possua hemolisinas ou potencial hemolítico conhecido, a determinação da atividade hemolítica em ágar sangue é necessária para a linhagem. Para confirmação da atividade hemolítica, devem ser realizados testes *in vitro*, pela observação da hemólise em ágar sangue. Outras enzimas com capacidade deletéria, tais como a gelatinase, que possui capacidade de degradar a mucosa, devem ser testadas quando houver indicação para tanto.



Algumas bactérias do ácido láctico, quando presentes em determinados alimentos fermentados e sob algumas condições ambientais, podem produzir histamina e/ou tiramina, aminas biogênicas consideradas tóxicas para humanos. Assim, para adição em alimentos fermentados, caso a espécie probiótica seja reconhecidamente capaz de produzir aminas biogênicas, deve-se conhecer o potencial da linhagem para a produção destes metabólitos. Para tanto, devem ser realizados testes genotípicos que indiquem a presença de genes relacionados a produção destes metabólitos, ou ainda, sempre que houver a possibilidade de geração destas aminas no alimento, imunoensaios, métodos fluorimétricos, colorimétricos e cromatográficos, reconhecidos e validados, devem ser utilizados para determinar a ausência das aminas biogênicas nos alimentos (EFSA, 2011).

#### **4.4.2. Testes complementares**

##### **4.4.2.1. Produção de substâncias antimicrobianas**

Um requisito de segurança primordial é que o probiótico não pode afetar negativamente os micro-organismos comensais da microbiota humana, ou seja, a microbiota indígena de modo a trazer malefícios à saúde do hospedeiro. Por esse motivo, é desejável incluir ao dossiê estudos *in vitro* ou descrição de estudos publicados relacionados à produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas, antibióticos, ácidos orgânicos) e ao efeito antagonista do probiótico contra os principais grupos de bactérias comensais humanas. Havendo impacto nesses grupos, uma análise complementar de efeitos adversos indesejáveis, possivelmente advindos dessa alteração, deve ser apresentada.

##### **4.4.2.2. Produção de mucinase**

A capacidade de degradar muco, pela produção de mucinase, parece ser um critério controverso para estimar proteção ou efeito deletério de uma bactéria, portanto, será solicitado somente quando estritamente necessário. O raciocínio geral é que as bactérias que degradam o muco enfraquecem a barreira intestinal, pois



desestabilizam a proteção do epitélio. No entanto, algumas bactérias comensais usam mucinas, os principais constituintes do muco, como uma fonte de energia e podem estimular a produção de muco hospedeiro. Assim, tal mecanismo não prejudicaria necessariamente os mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, o teste *in vitro* de degradação da mucina (cultura em meios líquidos ou sólidos) costuma usar mucinas sintéticas do muco gástrico de porco, de forma que este experimento não representa com precisão a mucosa intestinal humana e, além disso, a diversidade de substratos energéticos disponíveis *in vivo* é muito maior que *in vitro*. Assim, bactérias que degradam muco *in vitro* (onde o muco é a única fonte de energia em meio de cultura) podem não necessariamente usar este substrato *in vivo*.

#### 4.4.2.3. Produção de D-lactato

O metabolismo humano produz somente o isômero L-lactato. A presença de D-lactato em seres humanos é consequência direta da sua produção por bactérias ou indiretamente da ação de uma enzima bacteriana que converte L-lactato em D-lactato. Nem todas as espécies probióticas possuem a capacidade de produzir D-lactato, mas algumas espécies do gênero *Lactobacillus* possuem a enzima racemase e, assim, podem converter L-lactato para D-lactato. A produção de D-lactato por bactérias pode ser prejudicial porque pode levar ao acúmulo deste metabólito no sangue e, conseqüentemente, à acidose metabólica, cujos efeitos clínicos iniciais são de difícil detecção.

Células humanas metabolizam e excretam pouco o D-lactato e a presença deste coloca em risco populações mais sensíveis como os recém-nascidos de alto risco, devido à excreção renal parcial e ausência de função de barreira do trato gastrointestinal, assim como os indivíduos com síndrome do intestino curto. Portanto, para os probióticos pertencentes a espécies sabidamente capazes de produzir D-lactato e destinados a estes grupos populacionais mais sensíveis será necessário apresentar ensaio de D-lactato.



#### **4.5. Ensaio em animais**

Caso estejam disponíveis estudos sobre avaliação da translocação bacteriana da linhagem em modelos animais (ex. modelos animais convencionais imunocomprometidos e isentos de germes), estes devem ser descritos. Estes estudos são úteis para comprovar a ausência de translocação bacteriana nas concentrações probióticas destinadas a serem usadas nos alimentos.

Para linhagens não isoladas de alimentos ou da microbiota indígena humana e sem segurança estabelecida em nível de gênero ou espécie, os possíveis efeitos nocivos de um micro-organismo devem ser examinados, avaliados e interpretados testando-se em modelos animais. Estudos de genotoxicidade/mutagenicidade, toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, toxicidade à longo prazo e toxicidade reprodutiva/desenvolvimento devem ser conduzidos conforme as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). O modo de administração deve ser por via oral.

O teste de toxicidade reprodutiva/desenvolvimento é uma parte rotineira da avaliação da maioria dos produtos desenvolvidos para uso como alimento ou medicamento, mas raramente discutido para probióticos. Avanços recentes na compreensão do papel da microbiota no desenvolvimento do trato digestivo sugerem que a manipulação da população microbiana poderia ter efeitos sobre o desenvolvimento quando administrado a mulheres grávidas ou a crianças, especialmente antes do desmame.

Como estratégias mais sofisticadas para a manipulação da saúde humana com micro-organismos está aumentando, especialmente, o uso de linhagens além das encontradas tradicionalmente em fermentações lácticas e em quantidades elevadas, torna-se importante desenvolver ferramentas para avaliar os efeitos dessas novas exposições. Esses testes são capazes de detectar interrupções na função digestiva pelo uso da linhagem probiótica que pode ser monitorada por sinais genéricos de estado de saúde, como baixa sobrevivência ou baixo peso ao nascer de filhotes, crescimento ou



desenvolvimento mais lento de filhotes ou defeitos histológicos em órgãos específicos, como as paredes intestinais. Além dos parâmetros finais usuais de teste de toxicidade no desenvolvimento, é relevante que seja investigado se um organismo probiótico se torna um residente permanente da microbiota adulta da prole. Isso seria particularmente relevante para linhagens isoladas de espécies que indicam probabilidade de translocação (GUEIMONDE, 2006; SANDERS, 2010; ISA, K. et al., 2016).

#### **4.6. Ensaio em humanos**

A segurança clássica medida pela determinação de toxicidade ou patogenicidade de bactérias probióticas sempre será prejudicada pelo fato de que modelos animais simplificados ou ensaios de células não representam adequadamente a complexa interação entre micro-organismos, ambiente e populações humanas. Estudos clínicos que avaliem a segurança para linhagem probiótica são essenciais para conclusão do dossiê, pois ajudam na interpretação dos resultados obtidos a partir de estudos *in vitro* ou ensaios em animais, particularmente quando há muitas incertezas.

Portanto, estudos de tolerância e ensaios clínicos de curto prazo em voluntários saudáveis (fase 1) são obrigatórios para qualquer linhagem (FAO/WHO, 2002). Caso existam estudos clínicos de fase 2 ou 3, em voluntários saudáveis ou em populações não doentes, com acompanhamento de efeitos adversos, estes podem substituir a apresentação dos estudos de fase 1. Estudos epidemiológicos observacionais de coorte (retrospectivos ou prospectivos) ou transversais, quando disponíveis, também devem ser incluídos, pois, além de relevantes para as conclusões, podem abarcar a avaliação de efeitos colaterais à longo prazo e em subpopulações, tais como, grávidas, crianças, idosos, pacientes criticamente doentes.

Para avaliação de linhagens probióticas, cuja indicação de uso seja para lactentes e crianças de primeira infância, os estudos clínicos devem ser conduzidos com esta população, avaliando-se parâmetros de crescimento, desenvolvimento e ausência de eventos adversos, entre outros que possam ser relevantes de acordo com o mecanismo de ação da linhagem e a população a que se destina. Semelhantemente, quando os



## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

produtos forem indicados a gestantes, é necessário avaliar os parâmetros de crescimento, desenvolvimento e ausência de eventos adversos para o feto.

O ensaio clínico deve ser registrado em referência internacionalmente aceita, como por exemplo, *International Standard Randomized Controlled Trial* ([www.isrctn.com](http://www.isrctn.com)). Resultados de ensaios clínicos não publicados também podem ser incluídos no dossiê.

### **4.7. Vigilância pós-mercado**

Quando disponível, devem ser apresentados dados sobre vigilância de eventos adversos, incluindo isolamento de bactérias probióticas de pacientes com infecções sistêmicas. Esses dados são de especial interesse quando a linhagem a ser usada tem sua segurança amparada em um histórico de uso seguro.

## **5. COMPROVAÇÃO DO BENEFÍCIO**

### **5.1. Alegações de propriedade funcional ou saúde**

O efeito benéfico de um probiótico deve necessariamente ser traduzido por uma alegação de propriedade funcional ou de saúde, relacionada ao benefício comprovado para a linhagem.

Em princípio, uma alegação de propriedade funcional pode ter caráter geral ou específico. Uma alegação de propriedade funcional de caráter geral é aquela cujo benefício está relacionado a uma função geral do probiótico em algum sistema do organismo (ex. contribui com a saúde do trato gastrointestinal).

Caso a alegação de propriedade funcional esteja relacionada a um papel fisiológico ou metabólico específico no organismo (ex. contribui para aumentar o tempo de trânsito intestinal; contribui para a digestão da lactose), o benefício alegado é considerado como de caráter específico.



## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

Por outro lado, uma alegação de saúde terá sempre caráter específico, pois está relacionada à redução de risco de doenças ou à condição relacionada à saúde (ex. redução do risco de infecções do trato urinário; redução do risco de diarreia do viajante).

A legislação brasileira impede a atribuição de efeitos medicamentosos e terapêuticos a alimentos; portanto, as alegações não podem estar associadas à prevenção, ao tratamento ou à cura de doenças. Alegações específicas são desejáveis, uma vez que comunicam mais claramente ao consumidor o benefício alegado. Esse tipo de alegação também não deve ser demasiadamente genérico, sob o risco de não ser possível obter evidências capazes de comprovar o efeito e comunicar adequadamente sobre o benefício alegado (FAO/WHO, 2002; BRASIL, 1969).

Para a construção das orientações apresentadas a seguir, foram consideradas as diretrizes elaboradas por especialistas reunidos pela FAO e OMS (FAO/WHO, 2002). Os guias e as recomendações produzidas por autoridades regulatórias estrangeiras e especialistas foram outras referências relevantes, sendo utilizados documentos direcionados a probióticos (EFSA, 2016; HILL et al., 2014) e outros que orientam sobre as melhores práticas na elaboração de dossiês para a comprovação de alegações (Health Canada, 2009; FRSC, 2014; FDA, 2003; FDA, 2009).

### **5.2. Estudos para caracterização da linhagem probiótica**

Além da segurança, a seleção de uma linhagem de probióticos é determinada principalmente pelo seu potencial de gerar benefícios aos humanos. Geralmente se considera que, para aplicação em produtos alimentícios, os probióticos precisam ser capazes de sobreviver até que tenham alcançado a parte do trato gastrointestinal em que exercerão seus supostos efeitos. Por exemplo, para atuarem no cólon, os probióticos precisam resistir a enzimas salivares, ácido gástrico, secreções de bile e enzimas no intestino delgado, bem como alterações de pH que encontrarão durante sua passagem pelo trato gastrointestinal.





Assim, os estudos de caracterização da linhagem devem mostrar que a linhagem resiste à passagem pelas principais barreiras químicas e biológicas do corpo e atinge o intestino na forma viva. Essa caracterização pode ser realizada por testes *in vivo* e *in vitro*.

Os testes mínimos requeridos devem demonstrar: tolerância à temperatura corporal, quando não for isolado da microbiota de mamíferos; resistência à acidez gástrica; resistência aos ácidos biliares e resistência à lisozima.

Opcionalmente, podem ser providos testes que demonstrem a aderência ao muco, a células epiteliais ou a linhagens celulares, a atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, a capacidade de reduzir a adesão de patógenos a superfícies ou a atividade de desconjugação de sais biliares. Essas informações não são requisitos essenciais à demonstração de um efeito probiótico, entretanto, dão mais fundamentado ao dossiê ao agregar dados que ajudam a explicar os mecanismos de atuação e a plausibilidade biológica do efeito.

### **5.3. Estudos para comprovação do benefício de uma alegação**

Para comprovação de um efeito benéfico ou, em outras palavras, da eficácia de uma alegação faz-se necessário demonstrar uma casualidade entre o consumo da linhagem de probiótico e o efeito alegado. O tipo e desenho do estudo é um fator crítico para esse processo.

Nos termos da RDC 241/2018, é requisito fundamental para a comprovação do efeito dispor de estudos realizados com humanos. Estudos em animais e estudos *in vitro* podem ser utilizados de maneira complementar na sustentação de uma alegação, particularmente para o estabelecimento de mecanismos fisiológicos que justifiquem o efeito observado.



### **5.3.1. Tipos de estudos**

Em relação aos estudos em humanos, os estudos clínicos randomizados são altamente indicados na estruturação de dossiês para avaliação da eficácia de uma alegação, particularmente pela sua capacidade no estabelecimento de uma relação causal e pelo seu potencial na redução de viés ou fatores de confundimento. Entretanto, estudos observacionais de qualidade também podem ter um papel igualmente importante, sendo inclusive ideais para comprovar determinados tipos de benefícios. Essa condição aplica-se tanto às alegações gerais como àquelas específicas.

A aprovação de uma alegação geral ou específica não está condicionada à presença de um tipo específico de estudo, consideradas como determinantes a presença de estudos de qualidade e, ainda, a força da evidência apresentada. Podem ser apresentados ensaios clínicos randomizados, estudos observacionais do tipo coorte, revisões sistemáticas e metanálises. Para uma alegação específica de saúde, é necessária a apresentação de estudo observacional do tipo coorte.

#### **5.3.1.1. Critérios para seleção dos estudos**

Para a inclusão no dossiê técnico-científico, os estudos devem atender aos seguintes requisitos:

- ser conduzido com linhagem de micro-organismo relacionada ao benefício alegado;
- os desfechos devem ser bem definidos e apropriados para avaliar o benefício, utilizando métodos validados, quando necessário;
- o grupo estudado deve ser representativo da população alvo ou cientificamente plausível, quando houver a extrapolação de dados;
- a matriz utilizada não pode ser fator de confundimento; e



- as condições de uso do probiótico no estudo devem corresponder às condições propostas para o mesmo (ex. a quantidade sugerida para a obtenção do benefício é suficiente para comprovar a eficácia na dose sugerida).

A seguir, serão tratados de forma mais detalhada alguns requisitos determinantes para seleção dos estudos que devem ser instruídos na petição para avaliação de probióticos.

#### **5.3.1.2. População alvo:**

O dossiê deve ser construído para demonstrar a segurança e o efeito benéfico para a população alvo, sendo possível a extrapolação de dados em situações específicas.

Os estudos devem corresponder a trabalhos realizados em grupos de estudo representativos da população alvo e, quando houver extrapolação de dados, essa deve ser cientificamente plausível. A justificativa sobre a plausibilidade da extrapolação deve ser adicionada ao dossiê técnico-científico. Quando a linhagem for destinada para população geral, o grupo de estudo deve incluir pessoas de diferentes idades, sexos, etc.

Considerando a dificuldade de demonstrar o efeito benéfico de um probiótico em uma população saudável, uma possibilidade é o uso de grupos populacionais mais suscetíveis a condições de saúde que interessem para o desenvolvimento do estudo (as denominadas populações em risco). Um exemplo são os portadores da Síndrome do Intestino Irritável, uma vez que a síndrome está associada a uma série de disfunções gastrointestinais. Outro exemplo seriam grupos populacionais que estão mais suscetíveis a disbiose, como idosos, atletas, viajantes frequentes. Nesses casos, é necessário avaliar se a extrapolação é biologicamente plausível ou se não há variáveis intrínsecas do grupo que podem comprometer as conclusões.

Quando a alegação tiver como grupo alvo lactentes, crianças de primeira infância, gestantes e lactantes, é necessário que os estudos sejam realizados nesses grupos. Além disso, conclusões obtidas nesses grupos não devem ser extrapoladas para adultos, excetuados os casos onde é comprovada a plausibilidade da extrapolação.



### **5.3.1.3. Desfechos dos estudos clínicos**

É relevante que todo efeito alegado esteja demonstrado a partir de desfechos bem definidos ou marcadores válidos. Idealmente, os desfechos de interesse a serem considerados devem ser aqueles importantes para os grupos de estudo, ou seja, desfechos clínicos ou primários.

Para o caso das alegações gerais, que partem do reconhecimento de benefícios relacionados ao trato gastrointestinal, por exemplo, podem ser utilizados diferentes desfechos, tais como: melhora da constipação intestinal; diminuição da duração ou severidade de episódios de diarreia; e melhora global de sintomas relacionados ao desconforto intestinal (dor abdominal, cólicas, flatulências e sensação de evacuação completa).

Um problema bem caracterizado é a escolha de marcadores que demonstram alterações fisiológicas que não são consideradas suficientes para comprovação do efeito (desfechos intermediários ou substitutos). Marcadores bioquímicos ou fisiológicos são desfechos substitutos e devem ser ponderados quanto a sua relação com desfechos importantes para os pacientes.

Quando o desfecho for obtido por relato dos próprios envolvidos como forma de demonstração do efeito benéfico, é essencial que sejam utilizados questionários validados e confiáveis. É altamente recomendável que o processo de validação seja realizado anteriormente ao desenvolvimento do estudo.

### **5.3.1.4. Matriz alimentar e dose:**

Idealmente, a matriz utilizada, assim como a dose avaliada nos estudos, deve ser compatível com a dose e os alimentos nos quais serão adicionado os probióticos.

Podem ser selecionados estudos realizados em diferentes matrizes, desde que essa não seja fator de confundimento. Neste caso, o interessado deve apresentar



racional técnico e justificativas para demonstrar ausência de impacto da matriz na função exercida pelo probiótico.

#### **5.4. Busca da Totalidade de Evidências**

Os estudos em humanos apresentados devem ser o resultado de uma busca abrangente da literatura, realizada pelo interessado a partir de dados primários, adotando-se uma estratégia que seja reproduzível. Os estudos incluídos na busca devem abarcar: evidência que apoie o benefício alegado, evidência que contradiga o benefício alegado e evidências ambíguas ou inconclusivas para espécie e linhagem.

Para tanto, as evidências devem ser buscadas necessariamente na base de dados PubMed, sendo relevante a complementação por, pelo menos, outra base como EMBASE, BIREME, COCHRANE e LILACS.

A estratégia de busca deve ser descrita sinteticamente no dossiê técnico-científico. As palavras chaves e seus booleanos usados para a busca devem ser apresentados de forma estruturada, sem restrição da data inicial, mas apresentando-se a data final da busca para que essa possa ser reproduzida. No quadro abaixo, há um exemplo de forma de apresentação dessa informação.

Quadro 1 – Forma representativa de apresentação dos critérios da pesquisa

<b><u>BASE DE DADOS</u></b> <b><u>(DATA)</u></b>	<b><u>ESTRATÉGIA DE BUSCA</u></b>	<b><u>TOTALIDADE</u></b> <b><u>DE ARTIGOS</u></b> <b><u>ENCONTRADOS</u></b>
<b>MEDLINE / PubMed</b>  <b>(Busca realizada até 19/09/2017)</b>	"Infant"[Mesh] OR (Infants) OR ("Infant Formula"[Mesh] OR (Formula, Infant) OR (Formulas, Infant) OR (Infant Formulas) OR (Baby Formula) OR (Baby Formulas) OR (Formula, Baby) OR (Formulas, Baby)) AND ("Lactobacillus rhamnosus"[Mesh] OR (Culturelle) OR (Lactobacillus GG)) AND "Allergy and Immunology"[Mesh] OR (Immunology, Allergy) OR (Allergy, Immunology) OR (Immunology and Allergy) OR (Allergy Specialty) OR (Specialty, Allergy) OR	53



	(Immunology) AND "Hypersensitivity"[Mesh] OR (Hypersensitivities) OR (Allergy) OR (Allergies) OR (Allergic Reaction) OR (Allergic Reactions) OR (Reaction, Allergic) OR (Reactions, Allergic)	
--	---	--

Complementarmente, devem ser incluídas as informações quantitativas do processo de seleção dos estudos que compõem o dossiê, com base no fluxograma apresentado no **Anexo III**, adaptado do PRISMA (Moher et al., 2009).

Os estudos excluídos do dossiê devem ser listados, conforme quadro apresentado no **Anexo IV**. Nesse quadro, devem ser descritos motivos para exclusão dos estudos de maneira objetiva. Há uma série de motivos que podem fundamentar a exclusão de estudos, incluindo: não resposta à pergunta de pesquisa, desfecho diferente do desejado, população diferente da indicada ou cuja extrapolação dos dados não é plausível, tipo de publicação inadequada, tipo de desenho de estudo inapropriado para a sustentação de uma alegação e duração do estudo insuficiente.

Os estudos incluídos devem ser apresentados conforme tabela constante no **Anexo V**. Cópia da publicação das referências recuperadas na busca deve ser inserida no dossiê, observados os requisitos anteriormente mencionados sobre documentos em idioma estrangeiro.

Complementarmente, são aceitos pareceres conclusivos e bem fundamentados de autoridades de regulação e instituição especializada e independente. Para consideração da autoridade sanitária, é fundamental que estejam disponíveis os fundamentos para a avaliação, as principais referências consideradas e as conclusões, inclusive sobre a força da evidência. O **Anexo VI** traz um quadro para apresentação sintética dos pareceres incluídos ao dossiê.



### **5.5. Avaliação da qualidade dos estudos**

Um dos primeiros elementos para se determinar se a evidência é suficiente para sustentar a alegação proposta refere-se à qualidade dos estudos incluídos no dossiê técnico-científico. Não há como se obter uma evidência forte quando os estudos apresentados contêm fatores intrínsecos que limitam suas conclusões.

A qualidade metodológica de cada estudo incluído no dossiê deve ser avaliada individualmente. Há diferentes ferramentas para avaliar estudos em humanos, sendo adotadas neste Guia metodologias internacionalmente validadas, atualizadas e adaptadas de forma a facilitar sua aplicação. O objetivo da adaptação dos instrumentos foi torna-los aplicáveis ao contexto regulatório, que tem entre os seus objetivos a imposição de regras que sejam proporcionais e não imponham barreiras desnecessárias ao mercado.

As ferramentas adaptadas possuem uma escala, baseada em critério dicotômico (sim ou não), com intuito de facilitar a conclusão sobre a qualidade do estudo avaliado. Fornecem, ainda, campo “Citação do estudo” para cada item de avaliação. Este campo deve ser usado para fazer breves citações ao estudo de forma a melhor fundamentar a resposta escolhida. Para cada item de avaliação, deve ser assinalada uma das opções (sim ou não), sendo que apenas a resposta referente ao campo verde será contabilizada. Cada campo verde assinalado corresponde a 1 ponto e a pontuação final é dada pela soma desses pontos. Caso haja divergência nas respostas assinaladas, a opção escolhida deve ser justificada de forma a demonstrar que a abordagem não implica em aumento do risco de viés, baseado no racional teórico das referências utilizadas para adaptar as ferramentas.

Para estudos observacionais do tipo coorte, o instrumento de avaliação apresentado no **Anexo VII** foi adaptado da ferramenta Cochrane ROBINS-I (Sterne et al., 2016).



O ROBINS-I ("Risco de viés em estudos não randomizados - de intervenções"), avalia o risco de viés em estimativas da eficácia ou segurança (benefício ou dano) de uma intervenção de estudos que não usaram randomização para alocar intervenções (Sterne et al., 2016).

A adaptação feita na ferramenta proposta teve como objetivo pontuar os julgamentos de viés para facilitar a tomada de decisão. No total, o instrumento adaptado possui 17 pontos de avaliação, que são igualmente considerados para a avaliação final. Para efeito do Guia, consideram-se de qualidade satisfatória os estudos que obtêm uma pontuação igual ou superior a 9 pontos. Estudos com pontuação inferior são considerados de qualidade insatisfatória.

Para avaliação de estudos randomizados, o instrumento de avaliação apresentado no **Anexo VIII** foi adaptado da ferramenta Cochrane RoB 2, atualizada em outubro de 2018 (Higgins et al., 2018).

No total, são 13 itens de avaliação, sendo considerados de qualidade satisfatória os estudos que recebam uma pontuação igual ou superior a 7. Estudos com pontuação inferior são considerados de qualidade insatisfatória.

Para avaliação de revisões sistemáticas, o instrumento de avaliação apresentado no **Anexo IX** foi adaptado do método AMSTAR (*A Measurement Tool to Assess Systematic Reviews*), por ser menos complexo e considerar tanto estudos randomizados quanto observacionais (não randomizados) (Shea et al., 2017). No total, a ferramenta adaptada possui 16 pontos, sendo considerado de qualidade satisfatória as revisões que tiverem pontuação igual ou superior a 9.

## 5.6. Avaliação da totalidade das evidências

Para a comprovação da alegação de propriedade funcional ou de saúde, tanto de caráter geral como específico, será considerada a totalidade da evidência, a qualidade dos estudos, a consistência e a força da associação.





Há uma diversidade de metodologias para avaliar a qualidade ou força de um conjunto de evidências (AHRQ, 2002; GUYATT, 2008). Independente do modelo adotado é consenso que eles envolvem um certo grau de arbitrariedade e subjetividade. De toda forma, esses modelos ajudam na tomada de decisão, distinguindo a evidência de maior robustez daquela com maior grau de incerteza.

### **5.6.1. Estudos primários**

A metodologia proposta para avaliação da força da evidência foi adaptada dos modelos adotados pelo Ministério de Saúde do Canadá (HEALTH CANADA, 2009) e pela Agência Americana de Alimentos e Medicamentos (FDA, 2003), conforme descrito no **Quadro 2**.

Para qualificar a consistência são utilizados dois indicadores para avaliar o grau de convergência entre os estudos considerando a direção do efeito (positivo, neutro ou negativo). O primeiro é calculado a partir da totalidade dos estudos incluídos no dossiê. O segundo considera apenas os estudos com qualidade satisfatória.

Para qualificar a força da associação, são utilizados dois indicadores para avaliar a associação entre o probiótico e a efeito positivo, considerando a proporção dos estudos com resultado significativo ( $p < 0,05$ ). O primeiro é calculado a partir da totalidade dos estudos. O segundo considera apenas os estudos com qualidade satisfatória.

Para estudos observacionais de coorte, são utilizados quatro indicadores para avaliar a consistência do efeito em relação à redução, ausência ou aumento do risco, considerando também a qualidade do estudo. O primeiro é calculado a partir da totalidade dos estudos com redução de risco. O segundo é calculado a partir da totalidade dos estudos com aumento de risco. O terceiro é calculado a partir da totalidade dos estudos com ausência de risco. O quarto considera apenas os estudos com qualidade satisfatória e redução de risco.


**Quadro 2.** Domínios de avaliação da força da evidência

<p><b>ALEGAÇÃO FUNCIONAL (GERAL OU ESPECÍFICA)</b></p> <p><b>ESTUDOS DE INTERVENÇÃO</b></p> <p><b><u>CONSISTÊNCIA</u></b></p> <p><b>CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS COM RESULTADO FAVORÁVEL (C1)</b></p> <p><b>C1 = [Número total de estudos com resultado favorável (estudos com ou sem significância estatística) / Número total de estudos incluídos] x 100</b></p> <p>Alta consistência ≥ 75%          Consistência moderada 60% &gt; 75%          Baixa consistência &lt;60%</p> <p><b>CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS DE QUALIDADE SATISFATÓRIA COM RESULTADO FAVORÁVEL (C2)</b></p> <p><b>C2 = [Número total de estudos com qualidade satisfatória e resultado favorável (estudos com ou sem significância estatística)/Número total de estudos com qualidade satisfatória incluídos] x 100</b></p> <p>Alta consistência ≥ 75%          Consistência moderada 60% &gt; 75%          Baixa consistência &lt;60%</p> <p><b><u>ASSOCIAÇÃO</u></b></p> <p><b>ASSOCIAÇÃO DOS ESTUDOS COM RESULTADO FAVORÁVEL E SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (A1)</b></p> <p><b>A1 = [Estudos com significância estatística e efeito favorável/Número total de estudos incluídos] x 100</b></p> <p>Alta associação ≥ 75%          Associação moderada 60% &gt; 75%          Baixa associação &lt; 60%</p> <p><b>ASSOCIAÇÃO DOS ESTUDOS COM QUALIDADE SATISFATÓRIA COM RESULTADO FAVORÁVEL E SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (A2)</b></p> <p><b>A2 = [Estudos com qualidade satisfatória, significância estatística e efeito favorável/número total de estudos de qualidade] x 100</b></p> <p>Alta associação ≥ 75%          Associação moderada 60% &gt; 75%          Baixa associação &lt; 60%</p>
---



<b>ALEGAÇÃO DE SAÚDE (ESPECÍFICA)</b>
<b>ESTUDOS OBSERVACIONAIS DE COORTE PROSPECTIVO</b>
<b><u>CONSISTÊNCIA</u></b>
<b>CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS COM REDUÇÃO DE RISCO (CR 1)</b>
<b>CR1</b> = [Número total de estudos com redução de risco ( $p < 0,05$ )/Número total de estudos observacionais prospectivo incluídos] x 100
Alta consistência $\geq 75\%$ Consistência moderada $60\% > 75\%$ Baixa consistência $< 60\%$
<b>CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS COM AUMENTO RISCO (CR 2)</b>
<b>CR2</b> = [Número total de estudos com aumento de risco ( $p < 0,05$ )/Número total de estudos observacionais prospectivo incluídos] x 100
Alta consistência $\geq 75\%$ Consistência Moderada $60\% > 75\%$ Baixa consistência $< 60\%$
<b>CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS COM AUSÊNCIA DE EFEITO (CR 3)</b>
<b>CR3</b> = [Número total de estudos sem efeito observado ( $p > 0,05$ ) / Número total de estudos observacionais prospectivo incluídos] x 100
Alta consistência $\geq 75\%$ Consistência moderada $60\% > 75\%$ Baixa consistência $< 60\%$
<b>CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS COM QUALIDADE SATISFATÓRIA COM REDUÇÃO DE RISCO (CR 4)</b>
<b>CR4</b> = [Número total de estudos de qualidade satisfatória com redução de risco ( $p < 0,05$ )/ Número total de estudos observacionais prospectivo de alta qualidade] x 100
Alta consistência $\geq 75\%$ Consistência moderada $60\% > 75\%$ Baixa consistência $< 60\%$



### **5.6.2. Revisão Sistemática**

Somente serão aceitas revisões sistemáticas de qualidade satisfatória com resultados conclusivos favoráveis à intervenção. Resultados inconclusivos serão considerados evidência de recomendação fraca e não serão aceitos.

### **5.7. Comprovação de uma alegação em mistura de probióticos**

Quando o benefício a ser comprovado estiver associado a uma mistura de linhagens, os estudos em humanos devem ser realizados com a mesma mistura a que se pretende demonstrar o efeito alegado.

A comprovação do efeito benéfico é, via de regra, linhagem-específica. Misturas de probióticos formado por linhagens de micro-organismos cuja comprovação do efeito (geral ou específico) já tenha sido realizada, não requerem nova avaliação de eficácia. Nesse caso, deve-se veicular a alegação aprovada para cada uma das linhagens.

Porém, quando os micro-organismos probióticos somente apresentam efeito benéfico em conjunto ou o efeito observado na mistura seja diverso daquele demonstrado para as linhagens isoladas, será necessária a avaliação do efeito benéfico da mistura.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Após preenchimento dos documentos que compõe o dossiê técnico-científico para fundamentar a alegação e comprovar a identidade, segurança e eficácia da linhagem probiótica, deve ser apresentada uma conclusão ratificando a apresentação e análise da totalidade da evidência para sustentar a informação documentada.

A conclusão final da força da evidência requer uma ponderação sobre o resultado da avaliação de cada um dos domínios, não havendo uma fórmula simplificada para direcionar essa decisão. A importância de cada um desses domínios para a comprovação



do benefício deve ser levada em conta, assim como deve-se contrapor os resultados obtidos.

Para a sustentação de um efeito benéfico de caráter geral é imprescindível que a evidência seja consistente, e a força da associação recebe menor criticidade. Para a sustentação de um efeito benéfico de caráter específico ambos domínios são críticos para a conclusão.

No que tange à comprovação de alegação de saúde, se a consistência relacionada à redução do risco (CR 1 e CR 4) for baixa ou se a consistência relacionada ao aumento de risco ou ausência de efeito for alta ou moderada (CR 2 e CR 3), não há comprovação do benefício.



## **7. GLOSSÁRIO**

**Alegação de propriedade funcional:** é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.

**Alegação de Saúde:** é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde.

**Análise por protocolo:** refere-se a uma estratégia para analisar o conjunto de dados gerados pelo subconjunto de indivíduos que cumpriram com o protocolo de maneira a garantir que os dados exibiriam os efeitos do tratamento de acordo com o modelo científico estabelecido.

**Cegamento:** trata-se de procedimento que mantém os participantes do estudo, cuidadores, e por vezes, aqueles que coletam e analisam os dados clínicos sem conhecimento da intervenção atribuída.

**Concentração Inibitória Mínima:** consiste na concentração de agente antimicrobiano a partir da qual não se verifica crescimento do micro-organismo.

**Disseminação horizontal de genes:** é o processo pelo qual uma célula ou organismo transfere genes para outra célula ou organismo de uma forma distinta da reprodução. A transferência horizontal de genes difere da transferência vertical que se baseia na transmissão de material genético da geração parental para os seus descendentes. A disseminação horizontal de genes pode ocorrer por transformação, conjugação, transdução e agentes de transferência de genes.

**Estudo de coorte prospectivo:** trata-se de um delineamento de estudo que segue um grupo de pessoas saudáveis/livres de doenças por um período de tempo após o qual pode ser avaliada se o desenvolvimento de uma doença neste grupo está relacionado à presença de causas específicas. A incidência de um efeito de saúde naquelas pessoas que tiveram uma exposição específica (por exemplo, a um constituinte alimentar, como a cadeia longa Omega-3 ácidos graxos) é comparada com aqueles que não receberam a exposição. Estudos de coorte podem produzir estimativas relativas de risco. É o tipo de estudo observacional de maior confiança, uma vez que a entrada do alimento do interesse precede o desenvolvimento do desfecho.



## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

**Estudos da intervenção:** em um estudo da intervenção, o alimento de interesse é administrado e o desfecho é medido subsequentemente. O estudo de intervenção padrão-ouro inclui randomização, grupo controle e duplo cegamento. A composição e a quantidade do alimento devem ser controladas para o grupo de intervenção e para o grupo controle. Estudos randomizados e controlados oferecem a melhor avaliação de causa e efeito, uma vez que uma relação temporal entre o alimento e o benefício pode ser demonstrada, ou seja, a administração do alimento precede a observação do efeito.

**Estudos observacionais:** estudos observacionais medem associações entre um alimento e um desfecho. Estes estudos não têm o ajuste controlado de estudos da intervenção e são frequentemente suscetíveis a fatores de confundimento. Como os sujeitos não são randomizados no início do estudo, os fatores de confundimento precisam ser coletados e ajustados para minimizar o viés. Estudos observacionais podem ser prospectivos ou retrospectivos. Em estudos prospectivos, os investigadores recrutam sujeitos e os observam antes da ocorrência de um efeito ou desfecho. Estudos observacionais prospectivos medem a incidência de um efeito sanitário, e o risco relativo de desenvolver o efeito de saúde associado a alimentos ou outros fatores de risco de interesse. Em estudos retrospectivos, os pesquisadores entrevistam sujeitos após o efeito de saúde.

**Fator de confundimento:** situação na qual o efeito estimado da intervenção é tendencioso devido a alguma diferença entre os grupos de comparação, além das intervenções planejadas, tais como características basais ou intervenção concomitante. Um fator de confundimento é aquele que difere entre os grupos de comparação e pode afetar o desfecho observado.

**Integrans:** Elementos de DNA que incluem os genes componentes e os sítios de inserção para um sistema de recombinação específico do sítio que os capacita a capturar cassetes de genes móveis.

**Intenção para tratar:** é uma estratégia para análise de dados na qual todos os participantes são incluídos no grupo onde foram inicialmente alocados, independente se completaram ou não o estudo nesse grupo. Essa análise previne viés causado por perda de participantes que pode prejudicar a equivalência estabelecida na linha de base pela alocação randômica e não refletir adesão ao protocolo.

**Linhagem:** subpopulação de células de uma mesma espécie que apresentam as mesmas características e são identificadas por números, letras ou nomes que seguem o epíteto específico.



Marcadores bioquímicos, fisiológicos ou desfecho substituto: quando não é possível medir de forma prática, pode ser usado um desfecho substituto mais facilmente medido, ou biomarcador. É uma medida intermediária que prevê o desenvolvimento de um desfecho de saúde porque encontra-se na via causal entre a exposição ao alimento e o desenvolvimento do desfecho.

Meta-análise: uma meta-análise envolve a aplicação de métodos estatísticos que combinam os achados quantitativos da pesquisa de vários estudos, permitindo a sua análise e resumo como se fossem uma unidade.

Ocultação de alocação: processo para evitar viés de seleção, no qual a sequência de alocação é ocultada daqueles que atribuem os participantes aos grupos de intervenção e controle. O uso de um terceiro é desejável; o terceiro atribui os participantes sem conhecimento de qual atribuição é tratamento ou controle. A alocação é ocultada antes da atribuição aleatória ocorrer.

Plasmídeos: são moléculas extracromossômicas de DNA circular, que são autorreplicantes e transferíveis de um organismo a outro.

Probiótico: micro-organismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo.

Randomização: processo de atribuição de participantes a grupos de forma que cada participante tenha chance igual de ser atribuído a um determinado grupo. A atribuição aleatória de sujeitos a grupos de intervenção e controle evita viés de seleção – ou seja, a possibilidade de que os sujeitos com maior probabilidade de demonstrarem um benefício, independente da intervenção, sejam preferencialmente selecionados para receber a intervenção. A randomização também ajuda a controlar os fatores de confundimento conhecidos e potenciais.

Revisões sistemáticas: métodos sistemáticos e explícitos para identificar, selecionar, avaliar criticamente, extrair e analisar dados de pesquisas relevantes sobre uma pergunta claramente formulada.

Transposons: sequências de DNA móveis que podem se autorreplicar em um determinado genoma, mudando sua posição, tais como, sequências de inserção em bactérias.





## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AHRQ. **Systems to rate the strength of scientific evidence**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/05q0298/05q-0298-pdn0001-06-Ft-Notes-Tab-04-AHRQ-vol8.pdf>> Acessado em: 5 de novembro de 2017.

BRASIL. Decreto-Lei n. 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 out. 1969.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 jul. 2018.

EFSA. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance prepared by the EFSA Panel on Additives and Products of Substances used in Animal Feed (FEEdAP). **EFSA J**, 10:2740, 2012.

EFSA. Guidance on the assessment of the toxigenic potential of Bacillus species used in animal nutrition by the EFSA Panel on Additives and Products of Substances used in Animal Feed (FEEdAP). **EFSA J**, 12(5):3665, 2014.

EFSA. Guidance on the scientific requirements for health claims related to the immune system, the gastrointestinal tract and defence against pathogenic microorganisms. **EFSA J**, 14: 4369, 2016.

EFSA. General guidance for stakeholders on the evaluation of Article 13.1, 13.5 and 14 health claims. **EFSA J**, 9(4):2135, 2011.

EFSA. Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms. **EFSA J**, 16(3):5206, 2018.

FDA. **Guidance for industry: interim procedures for qualified health claims in the labeling of conventional human food and human dietary supplements**, 2003. Disponível



## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

em: <<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/LabelingNutrition/ucm053832.htm>> Acessado em: 29 de outubro de 2017.

FDA. **Guidance for Industry and FDA: interim evidence-based ranking system for scientific evaluation of health claims**, 2009. Disponível em: <<https://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/04q0072/04q-0072-pdn0001-05-FDA-vol5.pdf>> Acessado em: 6 de novembro de 2017.

FOOD REGULATION STANDING COMMITTEE (FRSC). **Getting your claims right: a guide to complying with the Nutrition, Health and Related Claims Standard of the Australia New Zealand Food Standards Code**, 2014. Disponível em: <http://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/FINAL%20%20ISFR%20Health%20Claims.pdf>. Acessado em 2 de novembro de 2017.

FAO/WHO. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **FAO Food and nutrition Paper** n. 85. 2006.

FAO/WHO. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, p. 1–11. 2002.

GUEIMONDE, M. et al. Probiotic intervention in neonates--will permanent colonization ensue? **J Pediatr Gastroenterol Nutrit**, 42: 604–6, 2006.

GUYATT, G. H. et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. **BMJ**; 336: 924–6, 2008.

HEALTH CANADA. **Guidance Document for Preparing a Submission for Food Health Claims**, 2009. Disponível em: <[https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/fn-an/alt\\_formats/hpfb-dgpsa/pdf/legislation/health-claims\\_guidance-orientation\\_allegations-sante-eng.pdf](https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/legislation/health-claims_guidance-orientation_allegations-sante-eng.pdf)>. Acessado em 29 de outubro de 2017.



## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

HILL et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 11: 506-514, 2014.

HIGGINS, J. et al. **Revised Cochrane risk-of-bias tool for randomized trials (RoB 2)**. 2018.

ISA, K. et al. Safety assessment of the *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588<sup>®</sup> probiotic strain including evaluation of antimicrobial sensitivity and presence of *Clostridium* toxin genes in vitro and teratogenicity in vivo. **Human Exp Toxicol**, 35: 818–832, 2016.

ISO 10932:2010 (IDF 223:2010), Milk and milk products – Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB), 2010.

MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D.G. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: **The PRISMA Statement Group**. PLoS Med. 2009 Jul; 6(7): e1000097.

SANDERS, M. E. et al. Safety assessment of probiotics for human use. **Gut Microb**, 1: 164–185, 2010.

SHEA, B. J. et al. AMSTAR 2: A critical appraisal tool for systematic reviews that include randomised or non-randomised studies of healthcare interventions, or both. **BMJ**. 358:1–9, 2017.

STERNE, J. A. C. et al. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. **BMJ**. 355: i4919, 2016.

VANKERCKHOVEN, V. et al. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. **Trend Food Sci Tech** 19:102-114, 2008.



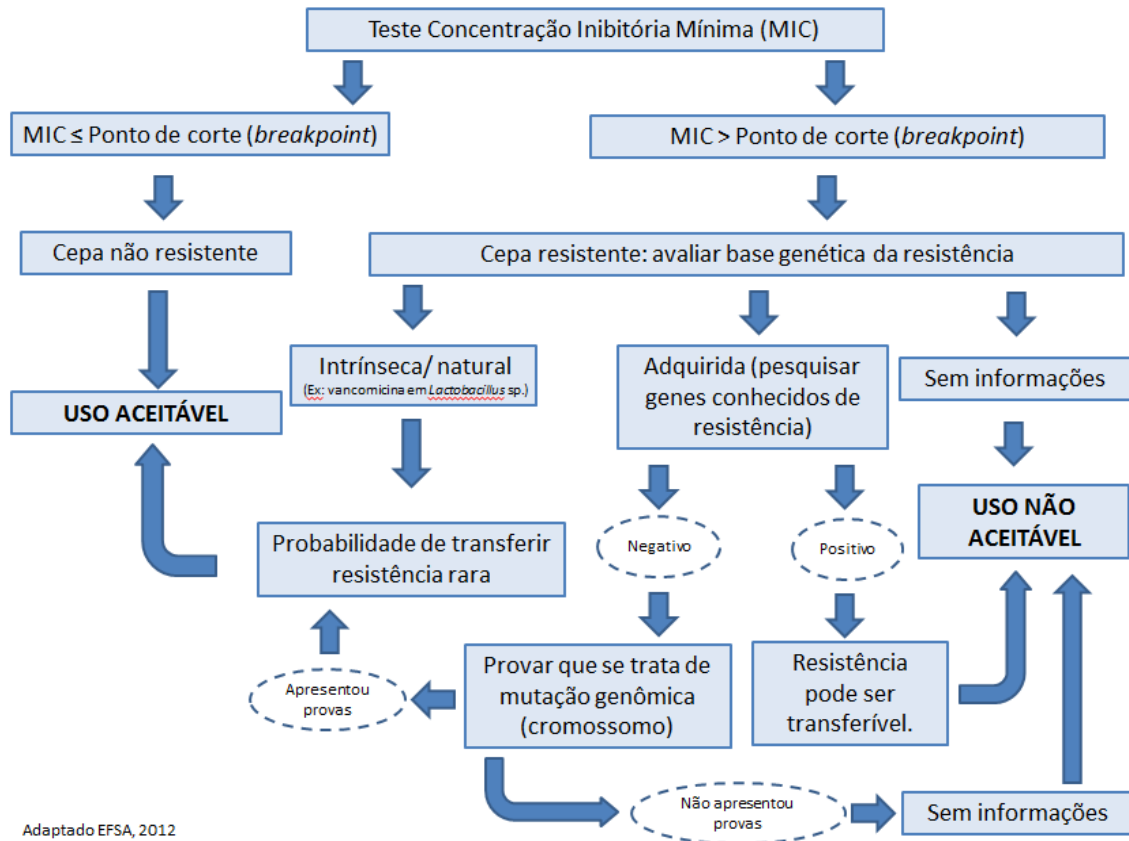
## 9. ANEXO

### Anexo I - Ficha de Apresentação do Dossiê Técnico-Científico para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para uso em Alimentos

<b>SOLICITAÇÃO DE ALEGAÇÃO DE SAÚDE OU ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE FUNCIONAL</b>	
<b>ITEM</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
Linhagem(ns)	
Desfecho(s) avaliado(s)	
Proposta de alegação funcional ou de saúde	
População alvo	
Tipos de alimentos indicados, quando se tratar de alimentos para fins especiais.	
Quantidade mínima sugerida do micro-organismo para obtenção do benefício alegado (UFC/porção diária)	
Advertências ou restrições de uso	
Potenciais efeitos adversos	



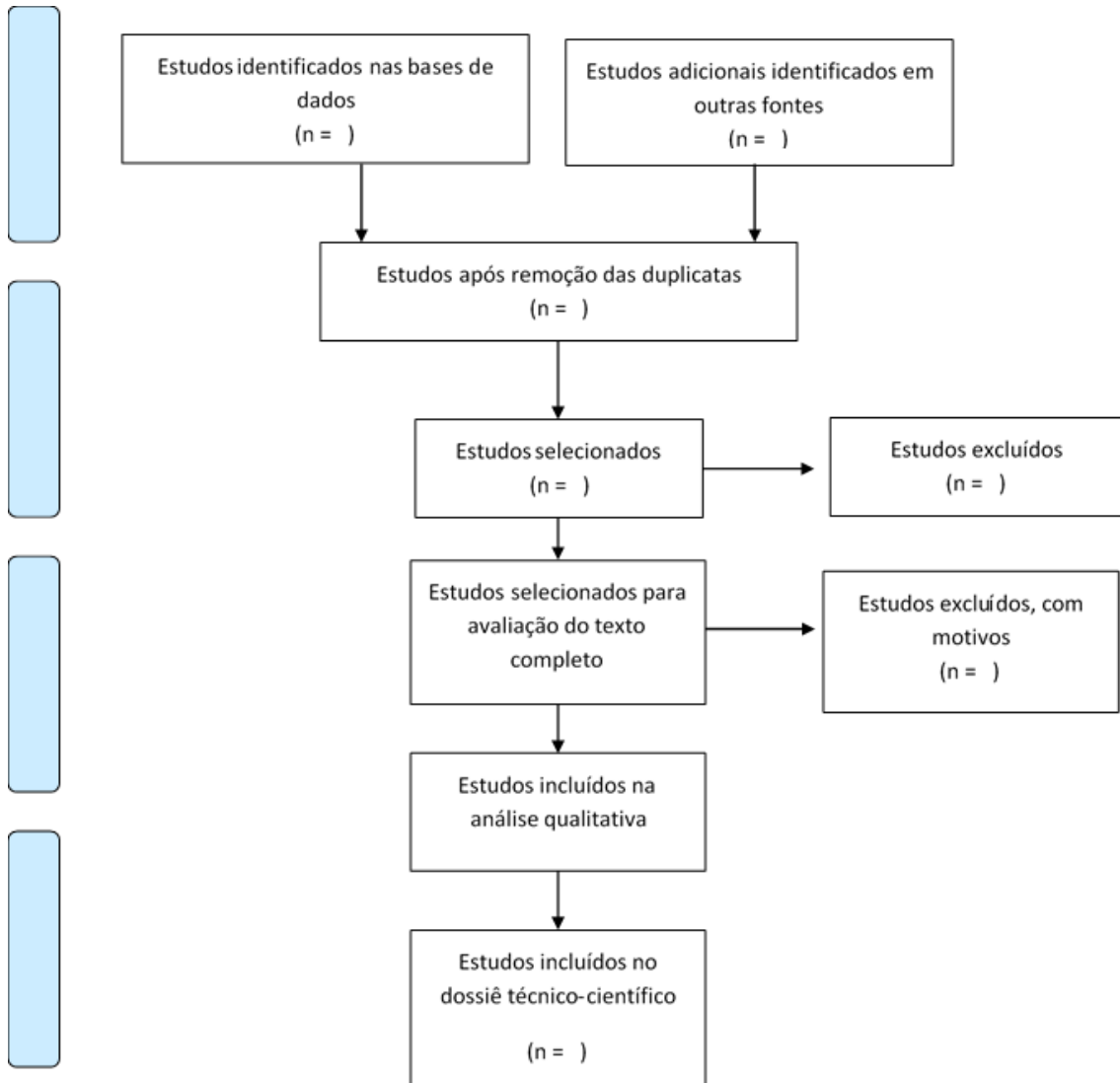
Anexo II - Árvore decisória para análise da natureza da resistência microbiana



Adaptado EFSA, 2012



**Anexo III - Representação quantitativa do processo de seleção dos estudos, baseado no Fluxograma de Prisma (2009)**



**Anexo IV– Lista de Estudos excluídos e a respectiva motivação**

Autor, Ano	Título	Motivo da exclusão


**Anexo V - Lista de estudos incluídos ao dossiê técnico-científico**

REFERÊNCIA	DESENHO DO ESTUDO	GRUPO DE ESTUDO	EXPOSIÇÃO/DURAÇÃO	DESFECHOS AVALIADOS	RESULTADOS/ ANÁLISE ESTATÍSTICA	LIMITAÇÕES DO ESTUDO DESCRITAS PELOS AUTORES	CONCLUSÕES
Autor e ano	Descrição (randomizado, duplo cego, placebo controlado)	Características Nº amostra inicial Nº amostra final	Matriz Dose Forma de consumo Duração da intervenção <i>Wash up</i> <i>Follow up</i>				




**Anexo VI – Síntese dos Pareceres incluídos ao Dossiê Técnico-Científico**

<b>REGULAÇÃO DE ALEGAÇÃO DE SAÚDE E/OU PROPRIEDADE FUNCIONAL EM OUTROS PAÍSES</b>					
<b>País</b>	<b>Orgão/Agência Regulatória/ Instituição Especializada</b>	<b>Data em que foi submetida (data/mês/ano)</b>	<b>Informações sobre a alegação aprovada ou benefício avaliado</b>		
			<b>Benefício avaliado ou alegação aprovada</b>	<b>Condições para uso (dose, público, tipo de alimento)</b>	<b>Data da aprovação da alegação</b>


**ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019**
**Anexo VII - Ferramenta para Avaliação Individual da Qualidade de Estudos Observacionais**

Assinale sim ou não para cada item e preencha o campo "Citação do estudo", quando julgar necessário				
Referência (Autor, Ano):				
Item	Questão	Resposta		Citação do estudo
		Sim	Não	
<b>1. Viés originado por confundimento</b>	No início do estudo (linha de base), os sujeitos foram comparados?			
	Os principais fatores de confusão relacionados à demografia dos sujeitos foram contabilizados na análise estatística? <sup>2</sup>			
	Os principais fatores de confusão relacionados a outros fatores de risco do desfecho em saúde foram considerados na análise estatística? <sup>3</sup>			
	O início do acompanhamento e o início da intervenção coincidem para a maioria dos participantes?			
<b>2. Viés de classificação de intervenções</b>	Os grupos de intervenção foram claramente definidos?			
<b>3. Viés decorrente de desvios das intervenções pretendidas</b>	Os autores refizeram a pergunta de pesquisa ou explicaram o(s) motivo(s) causadores dos efeitos adversos?			
<b>4. Viés decorrente de ausência de dados</b>	Os dados dos resultados foram suficientes para comprovar o desfecho do estudo?			


**ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019**

	Houve exclusão de participantes devido a perda de dados durante o período de intervenção? <sup>4</sup>			
<b>5. Viés ao mensurar desfechos</b>	Os avaliadores de resultados possuíam conhecimento do tipo de intervenção recebido pelos participantes do estudo? <sup>5</sup>			
	Os métodos de avaliação dos resultados foram semelhantes entre os grupos de intervenção?			
<b>6. Viés na seleção de desfechos comunicados</b>	Todos os desfechos inicialmente informados foram reportados no final do estudo? <sup>6</sup>			
	Todos os desfechos foram inicialmente informados analisados? <sup>7</sup>			
	Nem todos os subgrupos inicialmente planejados foram reportados no final do estudo. <sup>8</sup>			
<b>7. Questões abrangentes</b>	O tamanho da amostra foi estabelecido a partir de fundamentos estatísticos.			
	A quantidade de indivíduos que abandonaram ou foram excluídos da pesquisa não comprometeu a qualidade do estudo.			
	Os resultados foram apresentados com análise estatística adequada.			
	Critérios de inclusão e exclusão estão descritos de forma clara no estudo			



## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

1. É relevante estabelecer uma linha de base a fim de garantir os sujeitos são comparáveis.
2. Os fatores de confusão relacionados à demografia dos participantes incluem idade, sexo e etnia. Esses fatores podem ocorrer durante a seleção dos sujeitos (por exemplo, critérios de inclusão / exclusão), conduta do estudo ou análise de dados.
3. Os fatores de confusão relacionados a outros fatores de risco do resultado de saúde incluem, mas não estão limitados a dieta, atividade física, tabagismo, ingestão de álcool, índice de massa corporal (IMC), perda de peso, estado de saúde, histórico familiar e uso de medicação / suplemento.
4. Dados incompletos não podem ser excluídos da análise estatística.
5. Se os avaliadores de resultados estivessem cegos para o status de intervenção, a resposta para essa pergunta seria "Não". Em outras situações, os avaliadores de resultados podem não estar cientes das intervenções recebidas pelos participantes apesar de não haver cegueira ativa pelos pesquisadores do estudo; a resposta desta questão seria então também "Não". Em estudos onde os participantes relatam seus resultados, por exemplo, em um questionário, o avaliador do resultado é o participante do estudo. Em um estudo observacional, a resposta a essa questão geralmente será "Sim" quando os participantes relatam seus resultados.
6. Se várias medições foram feitas, mas somente uma ou um subconjunto é relatado, existe um risco de relato seletivo com base nos resultados.
7. Se várias medições foram feitas, mas somente uma ou um subconjunto é analisado ou discutido, principalmente em caso de ausência de benefício ou prejuízo à saúde, caracterizando um risco de análise seletiva.
8. Caso apenas um dos subgrupos inicialmente planejados for relatado (em detrimento de outros) pode ocorrer risco na seleção de desfechos comunicados.


**Anexo VIII - Ferramenta para Avaliação Individual da Qualidade de Estudos Randomizados**

Assinale sim ou não para cada item e preencha o campo "Citação do estudo", quando julgar necessário				
Referência (Autor, Ano):				
Item	Questão	Resposta		Citação do estudo
		Sim	Não	
<b>1. Viés decorrente do processo de randomização</b>	A sequência de alocação foi randomizada? <sup>1</sup>			
	A sequência de alocação foi ocultada até que os participantes fossem inscritos e designados para intervenções? <sup>2</sup>			
	As diferenças na linha de base entre os grupos de intervenção sugerem um problema com o processo de randomização? <sup>3</sup>			
<b>2. Viés devido a desvios da intervenção pretendida</b>	Os participantes estavam cientes da intervenção designada durante os ensaios? <sup>4</sup>			
	Os cuidadores e as pessoas responsáveis por aplicar as intervenções estavam cientes da intervenção atribuída aos participantes do estudo? <sup>5</sup>			
	Foi realizada a análise de intenção de tratar? <sup>6</sup>			
<b>3. Viés devido à falta de dados do desfecho</b>	Os resultados da pesquisa foram totalmente, ou quase totalmente, analisados com participantes randomizados? <sup>7</sup>			


**ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019**

<b>4. Viés na mensuração dos desfechos</b>	O método usado para avaliar o desfecho é adequado? <sup>8</sup>			
<b>5. Viés na seleção do resultado reportado</b>	Medidas de múltiplos desfechos (por exemplo, escalas, definições, pontos de tempo) dentro do domínio de resultados? <sup>9</sup>			
<b>6. Questões abrangentes</b>	O tamanho da amostra foi estabelecido a partir de fundamentos estatísticos.			
	A quantidade de indivíduos que abandonaram ou foram excluídos da pesquisa não comprometeu a qualidade do estudo.			
	Os resultados foram apresentados com análise estatística adequada.			
	Critérios de inclusão e exclusão estão descritos de forma clara no estudo			

- 1 "Sim" se um componente aleatório foi usado no processo de geração de sequência. Exemplos incluem números aleatórios gerados por computador; referência a uma tabela de números aleatórios; lançamento de moeda; embaralhar cartas ou envelopes; jogando dados; ou lotes de desenho. "Não" se nenhum elemento aleatório tiver sido usado na geração da sequência de alocação ou se a sequência for previsível. Exemplos incluem alternância; métodos baseados em datas (de nascimento ou admissão); números de registro de pacientes; decisões de alocação feitas por clínicos ou participantes; alocação baseada na disponibilidade da intervenção; ou qualquer outro método sistemático ou aleatório.



## ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019

- 2 'Sim' se o ensaio usou qualquer método de administração remota ou centralizada para alocar intervenções aos participantes, onde o processo de alocação é controlado por uma unidade externa ou organização, independentemente do pessoal de inscrição (por exemplo, farmácia central independente, telefone ou internet). Os envelopes devem ser numerados sequencialmente, lacrados com lacre inviolável e opacos. Os recipientes de medicamentos devem ser numerados sequencialmente e de aparência idêntica.
- 3 "Sim" se houver desequilíbrios que indicam problemas com o processo de randomização, incluindo: diferenças substanciais entre os tamanhos dos grupos de intervenção e comparador; ou excesso substancial de diferenças estatisticamente significativas nas características iniciais entre os grupos de intervenção; ou desequilíbrio em um ou mais fatores prognósticos fundamentais, ou medidas de linha de base das variáveis de desfecho.
- 4 Se os participantes estiverem cientes de sua atribuição de grupo.
- 5 Se a alocação aleatória não foi ocultada, é provável que os cuidadores e as pessoas responsáveis pelas intervenções tenham conhecimento da intervenção atribuída pelos participantes durante o estudo.
- 6 Se não houver perda de participantes, a análise por protocolo é apropriada, sendo a análise de intenção para tratar não aplicável. Nessa situação, marque sim. A análise de intenção para tratar é uma estratégia para análise de dados na qual todos os participantes são incluídos no grupo onde foram inicialmente alocados, independente se completaram ou não o estudo nesse grupo. Essa análise previne vies causado por perda de participantes que pode prejudicar a equivalência estabelecida na linha de base pela alocação randômica e não refletir adesão ao protocolo.
- 7 A disponibilidade de dados obtidos por meio de participantes randomizados é suficiente quando igual ou maior a 90%.
- 8 Essa questão é particularmente relevante quando os métodos usados para avaliação não são internacionalmente aceitos ou validados.
- 9 Há vies quando existe evidência clara que um domínio foi medido de várias maneiras, mas os dados para apenas um ou algumas medidas são totalmente reportados (sem justificativa).


**Anexo IX - Ferramenta para Avaliação Individual da Qualidade de Revisões Sistemáticas**

Assinale sim ou não para cada item e preencha o campo "Citação do estudo", quando julgar necessário

Referência (Autor, Ano):

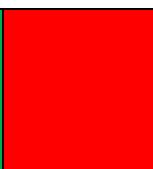
Questão	Resposta		Citação do estudo
	Sim	Não	
1. As perguntas da pesquisa e os critérios de inclusão para a revisão incluem os componentes do PICO?			
2. O relatório da revisão continha uma declaração explícita de que os métodos de revisão foram estabelecidos antes da realização da revisão e o relatório justificou quaisquer desvios significativos do protocolo?			
3. Os autores da revisão explicaram sua seleção dos desenhos de estudo para inclusão na revisão?			
4. Os autores da revisão utilizaram uma estratégia abrangente de pesquisa bibliográfica?			
5. Os autores da revisão realizaram a seleção do estudo em duplicata?			
6. Os autores da revisão executaram a extração de dados em duplicata?			




**ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019**

7. Os autores da revisão forneceram uma lista de estudos excluídos e justificaram as exclusões?			
8. Os autores da revisão descreveram adequadamente os detalhes dos estudos incluídos?			
9. Os autores da revisão utilizaram uma técnica validada para avaliar o risco de viés em estudos individuais incluídos na revisão?			
10. Os autores da revisão relataram as fontes de financiamento para os estudos incluídos na revisão?			
11. Se a metanálise foi realizada, os autores da revisão utilizaram métodos apropriados para combinação estatística de resultados?	<b>Sim ou não se aplica</b>		
12. Se a metanálise foi realizada, os autores da revisão avaliaram o impacto potencial do risco de viés em estudos individuais sobre os resultados da metanálise ou outra síntese de evidências?	<b>Sim ou não se aplica</b>		
13. Os autores da revisão responderam pelo risco de viés em estudos individuais ao interpretar / discutir os resultados da revisão?			
14. Os autores da revisão forneceram uma explicação satisfatória e discutiram qualquer heterogeneidade observada nos resultados da revisão?			


**ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019**

15. Se foi realizada uma síntese quantitativa, os autores da revisão conduziram uma investigação adequada do viés de publicação (pequeno viés de estudo) e discutiram seu provável impacto nos resultados da revisão?	<b>Sim ou não se aplica</b>		
16. Os autores da revisão relataram alguma fonte potencial de conflito de interesses, incluindo qualquer financiamento recebido para a realização da revisão?	