

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

Guia nº 21/2021 – versão 2



Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa

2021

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

VIGENTE A PARTIR DE 06/05/2021

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 pelos marcos legislativo e regulatório da Agência.¹

Trata-se de instrumento regulatório não normativo, de caráter recomendatório e não vinculante, sendo, portanto, possível o uso de abordagens alternativas às proposições aqui dispostas, desde que compatíveis com os requisitos relacionados ao caso concreto. A inobservância ao conteúdo deste documento não caracteriza infração sanitária, nem constitui motivo para indeferimento de petições, desde que atendidos os requisitos exigidos pela legislação.

As recomendações contidas neste Guia produzem efeitos a partir da data de sua publicação no Portal da Anvisa.

¹[Portaria nº 162, de 12 de março de 2021](#), que dispõe sobre as diretrizes e os procedimentos para melhoria da qualidade regulatória na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

Copyright©2021. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. A reprodução parcial ou total deste documento por qualquer meio é totalmente livre, desde que citada adequadamente a fonte. A reprodução para qualquer finalidade comercial está proibida.

SUMÁRIO

1.	<u>INTRODUÇÃO</u>	5
2.	<u>BASE LEGAL</u>	6
3.	<u>TÓPICOS ESPECÍFICOS DO GUIA</u>	7
3.1.	<u>COMPONENTES DA INSTRUÇÃO PROCESSUAL</u>	7
3.2.	<u>APRESENTAÇÃO DO DOSSIÊ TÉCNICO-CIENTÍFICO</u>	7
4.	<u>COMPROVAÇÃO DA IDENTIDADE</u>	9
4.1.	<u>Nomenclatura</u>	9
4.2.	<u>Depósito em Coleção de Cultura</u>	10
4.3.	<u>Origem da Linhagem</u>	10
4.4.	<u>Identificação</u>	10
4.4.1.	<u>Testes Fenotípicos</u>	11
4.4.2.	<u>Testes Genotípicos</u>	12
4.5.	<u>Processo de Fabricação</u>	13
5.	<u>COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA</u>	15
5.1.	<u>Identificação do grupo ou classe de risco do micro-organismo</u>	15
5.2.	<u>Histórico de Uso</u>	15
5.3.	<u>Revisão de literatura</u>	16
5.4.	<u>Ensaio <i>in vitro</i></u>	16
5.4.1.	<u>Testes mínimos</u>	17
5.4.1.1.	<u>Perfil de resistência a antimicrobianos de importância clínica</u>	17
5.4.1.2.	<u>Pesquisa de fatores de virulência</u>	19
5.4.2.	<u>Testes complementares</u>	20
5.4.2.1.	<u>Produção de substâncias antimicrobianas</u>	20
5.4.2.2.	<u>Produção de mucinase</u>	20
5.4.2.3.	<u>Produção de D-lactato</u>	21
5.5.	<u>Ensaio em animais</u>	21
5.6.	<u>Ensaio em humanos</u>	22
5.7.	<u>Vigilância pós-mercado</u>	23
6.	<u>COMPROVAÇÃO DO BENEFÍCIO</u>	24
6.1.	<u>Alegações de propriedade funcional ou saúde</u>	24

6.2.	<u>Estudos para caracterização da linhagem probiótica</u>	25
6.3.	<u>Estudos para comprovação do benefício de uma alegação</u>	26
6.3.1.	<u>Tipos de estudos</u>	26
6.3.2.	<u>Critérios para seleção dos estudos</u>	28
6.3.2.1.	<u>População alvo</u>	29
6.3.2.2.	<u>Desfechos dos estudos clínicos</u>	29
6.3.2.3.	<u>Matriz alimentar e dose</u>	30
6.4.	<u>Busca da Totalidade de Evidências</u>	30
6.5.	<u>Avaliação da qualidade dos estudos</u>	32
6.6.	<u>Avaliação da totalidade das evidências</u>	33
6.6.2.	<u>Estudos primários</u>	34
6.6.3.	<u>Revisão Sistemática</u>	37
6.7.	<u>Mecanismo de Ação</u>	37
6.8.	<u>Comprovação de uma alegação em mistura de probióticos</u>	37
7.	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	38
8.	<u>GLOSSÁRIO</u>	41
9.	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	44
10.	<u>ANEXOS</u>	47
	<u>Anexo I - Ficha de Apresentação do Dossiê Técnico-Científico para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para uso em Alimentos</u>	47
	<u>Anexo II - Árvore decisória para análise da natureza da resistência microbiana</u>	48
	<u>Anexo III - Representação quantitativa do processo de seleção dos estudos, baseado no Fluxograma de Prisma (2009)</u>	49
	<u>Anexo IV- Lista de Estudos excluídos e a respectiva motivação</u>	50
	<u>Anexo V - Lista de estudos incluídos ao dossiê técnico-científico</u>	51
	<u>Anexo VI – Síntese dos Pareceres incluídos ao Dossiê Técnico-Científico</u>	52
	<u>Anexo VII - Ferramenta para Avaliação Individual da Qualidade de Estudos Observacionais</u>	53
	<u>Anexo VIII - Ferramenta para Avaliação Individual da Qualidade de Estudos Randomizados</u>	56
	<u>Anexo IX - Ferramenta para Avaliação Individual da Qualidade de Revisões Sistemáticas</u>	59

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 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.

As orientações descritas neste Guia não são mandatórias. 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 com o regulamento técnico específico, atos normativos subsidiários e outros documentos de orientação. Ressalta-se que as informações e interpretações deste guia estão sujeitas à 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 17, de 30 de abril de 1999, que aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos.

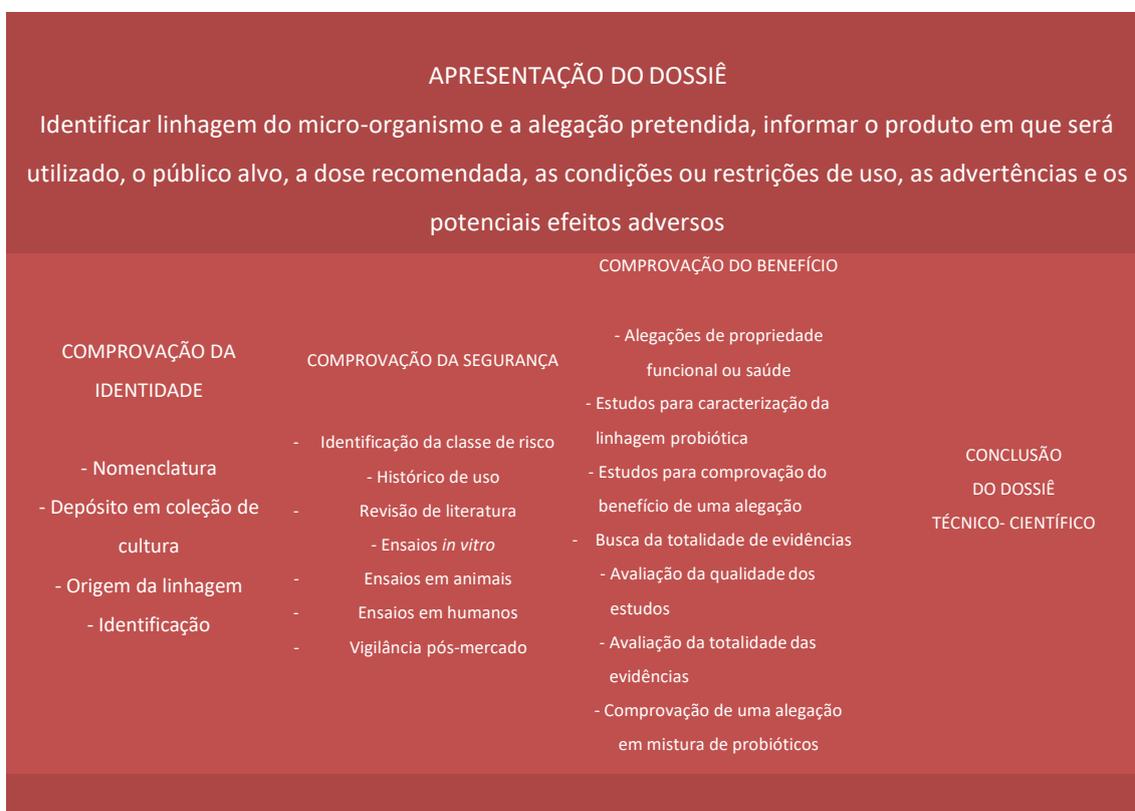
Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, que aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.

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 os 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.

As avaliações são feitas caso a caso (item 5, Resolução 18/99) e somente uma alegação será avaliada por processo. Para comprovação do benefício de uma linhagem probiótica, é necessário direcionar a busca estruturada de estudos conforme a alegação pleiteada (Público-alvo, micro-organismo, dose, desfechos adequados). Assim, alegações distintas, na maioria das vezes, implicam em buscas e avaliações diferentes, motivo pelo qual deve-se protocolizar uma alegação por petição. Variação textual de um mesmo benefício pode ser incluído no dossiê.

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 da 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.

4. 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.

4.1. 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 Procariotos¹. Novas unidades taxonômicas ou reatribuições à taxonomia e à

¹ <http://www.the-icsp.org/>

nomenclatura são publicadas no *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM²). A nomenclatura e a taxonomia dos fungos são estabelecidas pelo Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas³. A nomenclatura atualmente aprovada para fungos pode ser encontrada no banco de dados *MycoBank*⁴.

4.2. 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.

4.3. 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, mas, de toda forma, é importante relatar a forma de obtenção da linhagem.

4.4. 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. 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

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

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

⁴ <http://www.mycobank.org>

por métodos de tipagem molecular, de alto poder discriminatório.

4.4.1. 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 de multiplicar 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.

4.4.2. 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 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 ribossômicos (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) macrorrestrrição 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 Polimorphism* - AFLP).

Para leveduras, a identificação da espécie pode ser realizada pelas seguintes técnicas: *Restriction Fragment Length Polimorphism* – 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.

4.5. Processo de Fabricação

Informar o fabricante da linhagem probiótica e descrever detalhadamente todas as etapas do processo de obtenção da linhagem, desde sua manutenção no banco de cultura até a obtenção da cultura final que será utilizada nos produtos. Informações sobre matérias-primas, controles operacionais e parâmetros do processo de produção devem ser fornecidos. Informar também as medidas implementadas no controle de produção e garantia de qualidade (por exemplo, HACCP, GMP, ISO), incluindo testes de controle adotados pela empresa para verificar a identidade da linhagem. Fornecer fluxograma de produção que inclua as verificações de controle de qualidade. A adoção de medidas adequadas de controle durante o processo de fabricação da linhagem probiótica implicam diretamente na sua identidade e, conseqüentemente, em sua segurança e benefício, garantindo que o micro-organismo

obtido seja realmente aquele pretendido e comprovando a ausência de contaminação do processo por outro micro-organismo. Adicionalmente, informar a especificação da linhagem.

5. COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA

A linhagem probiótica deve ser segura para o uso pretendido, considerando a população-alvo e as condições de uso recomendadas. A segurança da linhagem deve ser demonstrada por meio de testes *in vivo* e *in vitro* capazes de evidenciar a inocuidade da linhagem.

O dossiê de segurança deverá ser composto, minimamente, por identificação do grupo ou classe de risco do micro-organismo, 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.

5.1. 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, devem 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.

5.2. Histórico de Uso

Evidências que caracterizem o histórico de uso do produto contendo a linhagem/espécie microbiana, também podem contribuir para a comprovação da sua 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).

5.3. 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.

5.4. Ensaio *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 micro-organismos 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 (incisos III, IV, V e VI, art. 8º da RDC nº 241/2108). 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.

5.4.1. Testes mínimos

5.4.1.1. Perfil de resistência a antimicrobianos de importância clínica

Este ensaio é necessário para qualquer linhagem probiótica (incisos V e VI, art. 8º da RDC nº 241/2108). O desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos entre bactérias é uma preocupação crescente em saúde. Supondo que o probiótico em questão não apresenta características patogênicas, 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 necessitam ser avaliadas quanto à susceptibilidade a um número relevante de antimicrobianos de importância humana e veterinária.

Para a avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos é necessária a adoção de procedimentos de diluição seriada em ágar ou caldo, devendo ser incluídas linhagens-controle 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 determinadas 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) . Para fungos ou leveduras, os valores de corte podem ser consultados em padrões internacionalmente reconhecidos, como o *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)* ou o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Test (EUCAST)*.

Os valores de corte microbiológico são estabelecidos estudando a distribuição de CIM dos antimicrobianos escolhidos em populações bacterianas pertencentes a uma 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 ($CIM \leq \text{valor de corte}$), ou resistente, se o seu crescimento não for inibido em uma concentração de antimicrobiano superior ao valor de corte estabelecido ($CIM > \text{valor de corte}$).

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.

5.4.1.2. 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, é necessária a realização de ensaios *in vitro* que avaliem a presença destes determinantes na linhagem probiótica (incisos III e IV, art. 8º da RDC nº 241/2108).

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 (incisos III e IV, art. 8º da RDC nº 241/2108).

Algumas bactérias do ácido lático, 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, imunoenaios, métodos fluorimétricos, colorimétricos e cromatográficos, reconhecidos e validados, devem ser utilizados para determinar a ausência das aminas biogênicas nos alimentos (EFSA, 2011).

5.4.2. Testes complementares

5.4.2.1. Produção de substâncias antimicrobianas

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. 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.

5.4.2.2. 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 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*.

5.4.2.3. 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.

5.5. 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 gestantes ou a crianças, especialmente antes do desmame.

À luz da crescente sofisticação das estratégias para a manipulação da saúde com micro-organismos, em especial o uso de linhagens distintas daquelas tradicionalmente usadas em fermentações lácticas e o emprego de quantidades elevadas, é importante desenvolver ferramentas para avaliar os efeitos dessas inovações. 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).

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

É recomendável que o ensaio clínico esteja registrado em referência internacionalmente aceita, como por exemplo, *International Standard Randomized Controlled Trial* (www.isrctn.com). Resultados de ensaios clínicos não publicados também podem ser incluídos no dossiê.

5.7. 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.

6. COMPROVAÇÃO DO BENEFÍCIO

6.1. 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. A requerente deve propor a redação da alegação (em língua portuguesa), bem como as condições específicas de uso do probiótico (grupo alvo, quantidade a ser consumida em UFC/dia para obter o efeito desejado, restrições de uso e advertências).

Uma 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. 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). Embora permitida para os probióticos, esse tipo de alegação não deve ser demasiadamente genérica, sob o risco de não ser possível obter evidências capazes de comprovar o efeito de forma mensurável ou comunicar inadequadamente o benefício alegado (FAO/WHO, 2002; BRASIL, 1969). Assim, ressaltamos que as alegações gerais de probióticos são atribuídas mais facilmente à saúde do trato gastrointestinal, local no qual essas linhagens agem diretamente. Alegações gerais para outros sistemas do organismo geralmente não comunicam adequadamente o benefício pretendido, sendo enganosas ao consumidor por permitir múltiplas interpretações (por exemplo: “benéficas à saúde” ou “favorecem a saúde imunológica”).

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. Alegações específicas são preferíveis, uma vez que comunicam mais claramente ao consumidor o benefício alegado.

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. Uma alegação de propriedade de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente e doença ou condição relacionada à saúde, objetivando a redução do risco à doença. Reduzir o risco de uma doença significa a redução significativa de um fator (ou fatores) de risco importante para uma doença ou de condição relacionada à saúde. Então, a única possibilidade é que a alegação de saúde esteja associada a uma alegação de redução do risco, sendo sempre de caráter específico.

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).

6.2. 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 (art. 14 da RDC n. 241/2018). Essa caracterização pode ser realizada por testes *in vivo* e *in vitro*.

É necessária a realização de testes que demonstrem, ao menos: 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 fundamentos ao dossiê ao agregar dados que ajudam a explicar os mecanismos e a plausibilidade biológica do efeito.

6.3. 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 causalidade 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.

6.3.1. 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 de estabelecer 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.

Assim, os estudos que são considerados para comprovação de uma alegação são os estudos de intervenção em humanos e os observacionais prospectivos. Estudos observacionais retrospectivos e estudos descritivos não permitem a comprovação da causalidade.

Para a alegação de saúde (redução de risco) temos duas situações distintas:

a) o fator de risco de determinada doença está bem estabelecido (Ex.: colesterol e doenças cardiovasculares). Neste caso, a evidência de que a intervenção dietética com o alimento/constituente específico induz uma redução (ou alteração

benéfica) do fator de risco seria suficiente para a comprovação científica da alegação. Evidências para um efeito nos resultados clínicos relacionados a condição de saúde ou doença (por exemplo, incidência, gravidade e/ou duração dos sintomas) não são necessárias; ou

b) o fator de risco de determinada doença não está bem estabelecido (Ex.: IgA e infecções respiratórias). Neste caso, evidências de que a intervenção dietética com o alimento/ constituinte específico induz uma redução (ou alteração benéfica) do provável fator de risco e também uma redução do risco de doença ou condição de saúde precisam ser fornecidas (por exemplo, incidência, gravidade e/ou duração dos sintomas) ou somente evidências de que a intervenção dietética com o alimento/constituente específico induz a redução do risco de doença (por exemplo, incidência, gravidade e/ou duração dos sintomas), caso o fator de risco seja biologicamente válido, ou seja, a base da sua aceitação seja fornecida e seja explicado o papel deste nas vias causais do resultado.

Na primeira situação, o texto da alegação deve informar o fator de risco implicado. A menção à doença é realizada por meio de um intermediário que não é uma doença, seguido por uma declaração de que o intermediário é um fator de risco para uma doença (Ex.: O consumo de cálcio ajuda a reduzir a perda de mineral ósseo em mulheres na pós-menopausa. A baixa densidade mineral óssea é um fator de risco para fraturas ósseas osteoporóticas em mulheres após 50 anos).

Na segunda situação, como o fator de risco não está bem estabelecido, mas sim a redução do risco de doença ou condição de saúde (por exemplo, incidência, gravidade e/ou duração dos sintomas), a alegação deve ser construída em torno de um elo entre o alimento/constituente e um efeito na saúde, podendo incluir uma doença (Ex.: “O *Lactobacillus rhamnosus* HN001 pode reduzir o risco de dermatite atópica na infância, quando administrado a gestantes e lactantes, desde a 35ª semana de gestação até o 6º mês de amamentação, e aos seus filhos, lactentes de alto risco, desde o nascimento até os dois anos de idade”).

É importante ressaltar que as doenças têm vários fatores de risco e alterar um desses fatores de risco pode ou não ter um efeito benéfico. Portanto, a apresentação de declarações de redução de risco deve garantir, por exemplo, o uso de linguagem

apropriada ou referência a outros fatores de risco, para que os consumidores não as interpretem como alegações de prevenção.

Os estudos observacionais prospectivos são padrão-ouro para avaliação de fatores prognósticos de doença ou fatores de risco de desenvolvimento de determinada condição. Em contrapartida, para a avaliação de medidas clínicas de saúde/doença, os estudos clínicos randomizados são o tipo de estudo mais adequado. Portanto, para as alegações de saúde (redução de risco), os dois tipos de estudo podem ser aportados, a depender da situação (fator de risco de doença bem estabelecido ou não).

É importante ressaltar que revisões sistemáticas e metanálises que integram resultados de estudos primários conduzidos com diferentes linhagens servem para avaliar tendências. Portanto, complementam, mas não substituem os resultados de estudos primários realizados com a linhagem.

A aprovação de uma alegação geral ou específica não está condicionada à presença de um tipo específico de estudo, mas são consideradas como determinantes a presença de estudos de qualidade e, ainda, a força da evidência apresentada, entre outros aspectos discutidos no item 7.

6.3.2. Critérios para seleção dos estudos

Conforme art. 14 da RDC n. 241/2018, 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.

6.3.2.1. 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 muito 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, apresentando a justificativa da extrapolação no dossiê.

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.

6.3.2.2. Desfechos dos estudos clínicos

É relevante que todo efeito alegado seja demonstrado a partir de desfechos bem definidos ou marcadores válidos. Idealmente, os desfechos de interesse a serem considerados devem ser aqueles capazes de proporcionar a evidência clínica mais relevante e convincente em relação ao objetivo primário do estudo (desfechos primários).

Para o caso das alegações 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 ou bioquímicas 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 à sua relação com desfechos clínicos importantes.

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.

6.3.2.3. 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.

6.4. 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 reprodutível. 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

<u>BASE DE DADOS</u> <u>(DATA)</u>	<u>ESTRATÉGIA DE BUSCA</u>	<u>TOTALIDADE</u> <u>DE ARTIGOS</u> <u>ENCONTRADOS</u>
MEDLINE / PubMed (Busca realizada até 19/09/2017)	"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 (Immunology) AND "Hypersensitivity"[Mesh] OR (Hypersensitivities) OR (Allergy) OR (Allergies) OR (Allergic Reaction) OR (Allergic Reactions) OR (Reaction, Allergic) OR (Reactions, Allergic	53

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).

Após a seleção de estudos para a leitura completa, os estudos excluídos do dossiê devem ser listados, conforme quadro apresentado no **Anexo IV**. Nesse quadro, devem ser descritos os 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 em relação às alegações aprovadas. O **Anexo VI** traz um quadro para apresentação sintética dos pareceres incluídos ao dossiê.

6.5. 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 torná-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.

6.6. 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.

6.6.2. 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**. Essa avaliação deve ser apresentada, separadamente, por desfecho. Desfechos substitutos ou intermediários (marcadores fisiológicos ou bioquímicos), que não são considerados suficientes para comprovação do efeito, não devem ser incluídos nessa qualificação.

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 (C1). O segundo considera apenas os estudos com qualidade satisfatória (C2).

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 (A1). O segundo considera apenas os estudos com qualidade satisfatória (A2).

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 (CR1). O segundo é calculado a partir da totalidade dos estudos com aumento de risco (CR2). O terceiro é calculado a partir da totalidade dos estudos com ausência de risco (CR3). O quarto considera apenas os estudos com qualidade satisfatória e redução de risco (CR4).

Quadro 2. Domínios de avaliação da força da evidência

ALEGAÇÃO FUNCIONAL (GERAL OU ESPECÍFICA)
ESTUDOS DE INTERVENÇÃO
<u>CONSISTÊNCIA</u>
CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS COM RESULTADO FAVORÁVEL (C1)
$C1 = [\text{Número total de estudos com resultado favorável (com ou sem significância estatística)} / \text{Número total de estudos incluídos}] \times 100$
Alta consistência $\geq 75\%$ Consistência moderada $60\% > 75\%$ Baixa consistência $<60\%$
CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS DE QUALIDADE SATISFATÓRIA COM RESULTADO FAVORÁVEL(C2)
$C2 = [\text{Número total de estudos com resultado favorável e qualidade satisfatória (estudos com ou sem significância estatística)} / \text{Número total de estudos com qualidade satisfatória incluídos}] \times 100$
Alta consistência $\geq 75\%$ Consistência moderada $60\% > 75\%$ Baixa consistência $<60\%$
<u>ASSOCIAÇÃO</u>
ASSOCIAÇÃO DOS ESTUDOS COM RESULTADO FAVORÁVEL E SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (A1)
$A1 = [\text{Número total de estudos com resultado favorável e significância estatística} / \text{Número total de estudos incluídos}] \times 100$
Alta associação $\geq 75\%$ Associação moderada $60\% > 75\%$ Baixa associação $< 60\%$
ASSOCIAÇÃO DOS ESTUDOS COM QUALIDADE SATISFATÓRIA COM RESULTADO FAVORÁVEL E SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (A2)
$A2 = [\text{Número total de estudos com resultado favorável, significância estatística e qualidade satisfatória} / \text{Número total de estudos com qualidade satisfatória incluídos}] \times 100$
Alta associação $\geq 75\%$ Associação moderada $60\% > 75\%$ Baixa associação $< 60\%$

ALEGAÇÃO DE SAÚDE (ESPECÍFICA)**ESTUDOS OBSERVACIONAIS DE COORTE PROSPECTIVO****CONSISTÊNCIA****CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS COM REDUÇÃO DE RISCO (CR 1)**

CR 1 = [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 $< 60\%$

CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS COM AUMENTO RISCO (CR 2)

CR 2 = [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 $< 60\%$

CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS COM AUSÊNCIA DE EFEITO (CR 3)

CR 3 = [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 $< 60\%$

CONSISTÊNCIA DOS ESTUDOS COM QUALIDADE SATISFATÓRIA COM REDUÇÃO DE RISCO (CR 4)

CR 4 = [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 $< 60\%$

6.6.3. Revisão Sistemática

Para que uma revisão sistemática seja elegível como base científica para uma alegação, a revisão não poderá ter resultados inconclusivos e deverá ter sido preparada de acordo com as diretrizes de uma organização reguladora internacional ou científica, além de abordar diretamente a relação entre a linhagem e o benefício alegado.

Se a revisão for um tipo de revisão elegível é fortemente recomendado incluí-la no dossiê. Resultados inconclusivos serão considerados evidência de recomendação fraca e não serão aceitos como única evidência para comprovar o benefício pretendido.

6.7. Mecanismo de Ação

Diversos mecanismos de ação têm sido elencados para explicar os benefícios dos probióticos, tais como, imunomodulação, inibição da colonização de patógenos, estabilização da função barreira do intestino e modulação de microbiota humana (microbioma). Os estudos sobre mecanismo de ação serão avaliados de forma a complementar a evidência de benefício, que deve ser sustentada essencialmente por estudos clínicos de qualidade conduzidos em humanos.

6.8. 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.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para aprovação de uma alegação de propriedade funcional ou saúde, os seguintes critérios de causalidade devem ser observados:

A. Consistência: Os resultados dos estudos devem convergir de forma favorável ao uso do probiótico nas condições pleiteadas. Resultados de estudos que são replicados em diferentes populações e por diferentes investigadores têm mais peso do que aqueles que não o são. Se os resultados dos estudos forem inconsistentes, essa inconsistência deve ser explicada. Ressaltamos que estudos únicos raramente são definitivos.

B. Associação: Deve haver demonstração de uma relação estatística entre o consumo da linhagem e os desfechos avaliados (probabilidade). Os estudos devem apresentar resultados estatisticamente significativos. A força da associação é melhor medida pela extensão em que o risco relativo ou *odds ratio* se afasta da unidade (1). Dentro do escopo de alegações de saúde (redução de risco), o risco relativo ou *odds ratio* abaixo de um e um intervalo de confiança que não se sobreponha a um (ou um alto nível de significância estatística) seria indicativo de uma força significativa de associação. Relações fracas de associação são suscetíveis a confusão e podem refletir uma medição inadequada de exposição ou resultado.

C. Magnitude do efeito: A magnitude de um efeito é refletida na mudança no efeito (benefício) em relação ao controle (tamanho do efeito). Trata-se da diferença numérica e percentual entre o grupo placebo/controle e o grupo intervenção e à existência de diferença estatisticamente significativa entre intervenção e controle.

D. Relação temporal: Um ingrediente só pode ser considerado como tendo um efeito causal em função ou estrutura do corpo, ou ainda, na redução de risco de doença, caso esse ingrediente seja administrado antes da observação do efeito em função/estrutura do corpo, ou antes do tempo que a doença teria se desenvolvido.

E. Ausência de evidências opostas igualmente fortes.

Existem critérios adicionais de causalidade. Não é obrigatório que eles sejam

atendidos, no entanto, quanto mais critérios adicionais de causalidade forem apresentados, mais forte a evidência. São eles:

F. Relações dose-resposta: Se um agente é benéfico ou se um fator é de fato a causa de uma doença, geralmente (mas não invariavelmente) quanto maior a dose do agente ou a exposição, maior o efeito benéfico ou risco da doença. Essa relação dose-resposta nem sempre pode ser evidenciada porque muitas relações biológicas importantes são dicotômicas e possuem um nível de limiar para os efeitos observados.

G. Reversão ou cessação dos efeitos: Se um agente tem um efeito benéfico, então o agente deve reverter um fator de risco ou condição adversa (se prevenir a ocorrência do fator de risco ou condição adversa não pode ser mostrada em humanos por razões éticas). Da mesma forma, se um agente tem um efeito benéfico, então espera-se que o benefício cesse quando for removido de uma população (a menos que haja um efeito de transição).

H. Plausibilidade biológica: Um mecanismo biologicamente plausível deve ser capaz de explicar por que tal efeito seria esperado que ocorresse.

I. Explicações alternativas (confundimento): Até que ponto as explicações alternativas (devido a confusão não controlada ou outros requisitos metodológicos) foram explorados é um critério importante para julgar causalidade.

J. Especificidade do efeito: até que ponto a precisão da associação entre a exposição e o agente podem ser demonstrados – A ingestão do probiótico leva apenas ao benefício X?

K. Especificidade da causa: Somente a ingestão do probiótico leva ao benefício X?

L. Coerência: O efeito é visto em uma variedade de desfechos relacionados como seria de esperar?

Para a sustentação de um efeito benéfico de caráter geral é necessário observar que a evidência seja consistente, e a força da associação **receba** menor criticidade, não podendo ser baixa. 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.

Finalmente, a peticionante deve apresentar uma conclusão para o dossiê e a proposta de alegação. Para tanto, deve ser apresentado o racional, com base nas evidências apresentadas (e os fatores que diminuem ou aumentam a confiança nesses resultados), e a ponderação sobre os domínios, de modo a comprovar a alegação pretendida. A peticionante deve considerar primeiramente se os critérios essenciais de causalidade foram atendidos. A alegação de propriedade funcional e/ou saúde deve ser proposta considerando os resultados dos estudos incluídos e os fatores que diminuem ou aumentam a confiança nesses resultados. São eles: consistência, associação, vieses dos estudos, desfechos avaliados, população dos estudos (viabilidade de generalizar os resultados encontrados nos estudos favoráveis, para a população alvo, observando se a população alvo está representada nos estudos), tamanho final da amostra, doses testadas, resultados (incidência dos desfechos de interesse e razões de risco aplicáveis - taxa de risco, risco relativo, IC 95%, p valor) e magnitude do efeito (diferença numérica e percentual entre o grupo placebo/controle e o grupo intervenção).

8. 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.

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 de 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.

9. 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 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 Nutr**, 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>. Acessado em 29 de outubro de 2017.

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[®] 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.

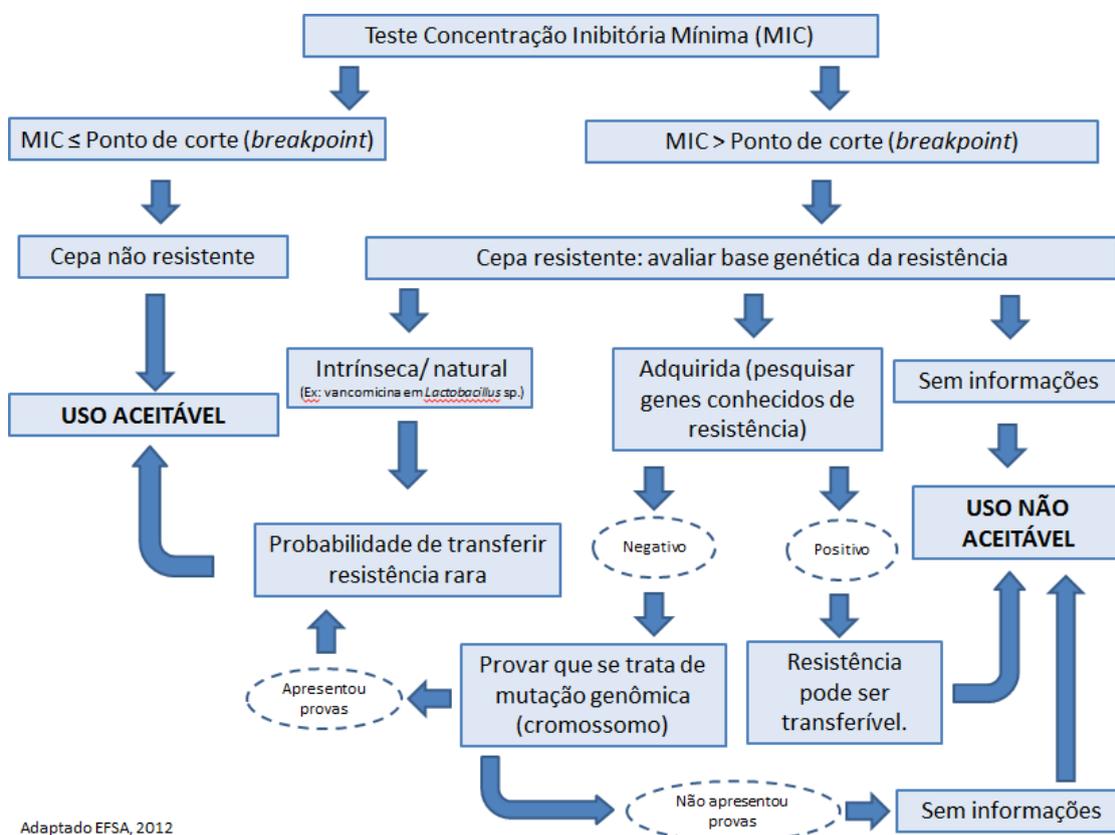
VANKERCKHOVEN, V. et al. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. **Trend Food Sci Tech** 19:102-14, 2008.

10.ANEXOS

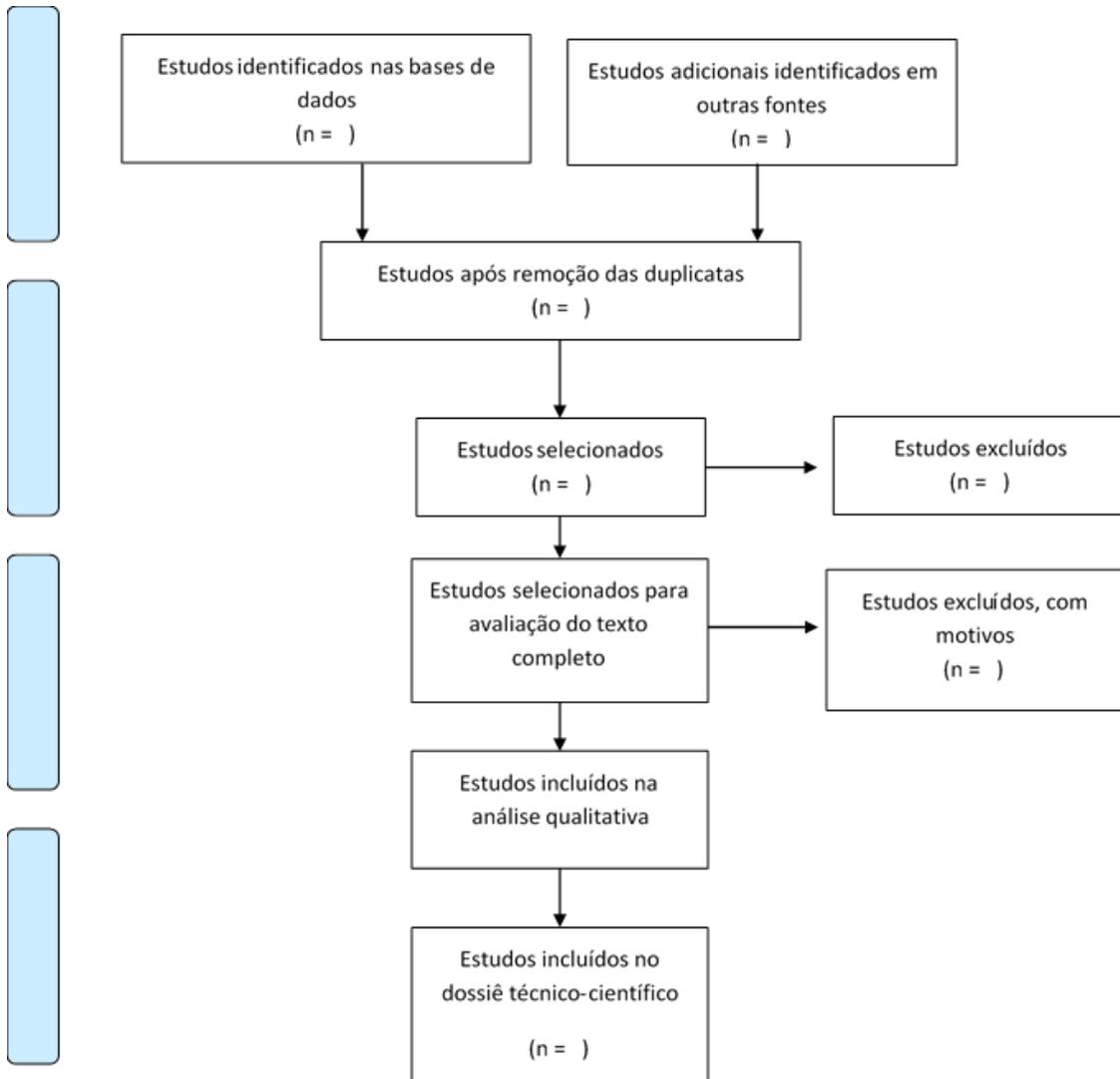
Anexo I - Ficha de Apresentação do Dossiê Técnico-Científico para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para uso em Alimentos

SOLICITAÇÃO DE ALEGAÇÃO DE SAÚDE OU ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE FUNCIONAL	
ITEM	DESCRIÇÃO
Linhagem(ns)	
Desfecho(s) avaliado(s)	
Proposta de alegação funcional ou de saúde	
População alvo	
Tipos de alimentos indicados: - alimentos convencionais (fornecer exemplos de alimentos nos quais a linhagem será adicionada; informar obrigatoriamente quando a linhagem probiótica for utilizada em alimentos fermentados); - alimentos para fins especiais (informar obrigatoriamente se a linhagem será adicionada em fórmulas infantis ou dietas enterais e para quais grupos populacionais se destinam – lactentes, crianças de primeira infância, lactentes com APLV, etc); - suplementos alimentares (informar para quais grupos populacionais o suplemento se destina).	
Quantidade mínima sugerida do (s) micro-organismo (s) para obtenção do benefício alegado (UFC/dia)	
Advertências ou restrições de uso	
Potenciais efeitos adversos	

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



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, ano.	<p>Descrição</p> <p>Randomizado ou não randomizado;</p> <p>Duplo cego ou não;</p> <p>Controlado por placebo ou não;</p> <p>Paralelo ou cruzado.</p>	<p>Características dos participantes:</p> <p>País;</p> <p>Status de saúde;</p> <p>Idade;</p> <p>Número de pessoas recrutadas;</p> <p>Número de pessoas randomizadas por grupo;</p> <p>Número de pessoas analisadas por grupo;</p>	<p>Matriz;</p> <p>Dose;</p> <p>Forma de consumo;</p> <p>Duração da intervenção;</p> <p>Wash up;</p> <p>Follow up.</p>	<p>Listar todos os desfechos avaliados e informar quais são os desfechos primários</p>	<p>Descrever os resultados encontrados para todos os desfechos listados, relatando os valores de p entre os grupos. Se os valores de p entre grupos não forem relatados no estudo, relatar os valores dentro do grupo e indicar que os valores se aplicam às análises dentro do grupo. Informar se foi realizada análise por protocolo ou intenção de tratar.</p>		

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

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

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	
1. Viés originado por confundimento	Os sujeitos dos diferentes grupos foram comparados no início do estudo (linha de base)?			
	Os principais fatores de confundimento relacionados à demografia dos sujeitos foram contabilizados na análise estatística? ²			
	Os principais fatores de confundimento relacionados a outros fatores de risco do desfecho em saúde foram considerados na análise estatística? ³			
	O início do acompanhamento e o início da intervenção coincidem para a maioria dos participantes?			
2. Viés de classificação de intervenções	Os grupos de intervenção foram claramente definidos?			
3. Viés decorrente de desvios das intervenções pretendidas	Houve desvio da intervenção pretendida além do que seria esperado na prática usual? ⁴			

4. Viés decorrente de ausência de dados	Os dados dos resultados foram suficientes para comprovar o desfecho do estudo?	Verde	Vermelho	
	Houve exclusão de participantes devido a perda de dados durante o período de intervenção? ⁵	Vermelho	Verde	
5. Viés ao mensurar desfechos	Os avaliadores de resultados possuíam conhecimento do tipo de intervenção recebido pelos participantes do estudo? ⁶	Vermelho	Verde	
	Os métodos de avaliação dos resultados foram semelhantes entre os grupos de intervenção?	Verde	Vermelho	
6. Viés na seleção de desfechos comunicados	Todos os desfechos inicialmente informados foram reportados no final do estudo? ⁷	Verde	Vermelho	
	Todos os desfechos inicialmente informados foram analisados? ⁸	Verde	Vermelho	
	Todos os subgrupos inicialmente planejados foram reportados no final do estudo? ⁹	Verde	Vermelho	
7. Questões abrangentes	O tamanho da amostra foi estabelecido a partir de fundamentos estatísticos?	Verde	Vermelho	
	A quantidade de indivíduos que abandonaram ou foram excluídos da pesquisa não comprometeu a qualidade do estudo?	Verde	Vermelho	
	Os resultados foram apresentados com análise estatística adequada?	Verde	Vermelho	
	Critérios de inclusão e exclusão estão descritos de forma clara no estudo?	Verde	Vermelho	

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 medicamento / suplemento.
4. Os desvios que acontecem na prática usual após a intervenção (por exemplo, a cessação de uma intervenção medicamentosa devido à toxicidade aguda) fazem parte da intervenção pretendida e, portanto, não levam a um viés no efeito da atribuição à intervenção. Podem surgir desvios devido à diferença de expectativa entre a intervenção e o comparador (por exemplo, porque os participantes se sentem azarados por terem sido atribuídos ao grupo do comparador e, portanto, buscam a intervenção ativa, ou seus componentes, ou outras intervenções). Tais desvios não fazem parte da prática usual, portanto, podem levar a estimativas de efeito enviesadas.
5. Dados incompletos não podem ser excluídos da análise estatística.
6. 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.
7. Se várias medições foram feitas, mas somente uma ou um subconjunto é relatado, existe um risco de relato seletivo com base nos resultados.
8. 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.
9. 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	
1. Viés decorrente do processo de randomização	A sequência de alocação foi randomizada? ¹			
	A sequência de alocação foi ocultada até que os participantes fossem inscritos e designados para intervenções? ²			
	As diferenças na linha de base entre os grupos de intervenção sugerem um problema com o processo de randomização? ³			
2. Viés devido a desvios da intervenção pretendida	Os participantes estavam cientes da intervenção designada durante os ensaios? ⁴			
	Os cuidadores e as pessoas responsáveis por aplicar as intervenções estavam cientes da intervenção atribuída aos participantes do estudo? ⁵			
	Foi realizada a análise de intenção de tratar? ⁶			
3. Viés devido à falta de dados do desfecho	Os resultados da pesquisa foram totalmente, ou quase totalmente, analisados com participantes randomizados? ⁷			

4. Viés na mensuração dos desfechos	O método usado para avaliar o desfecho é adequado? ⁸			
5. Viés na seleção do resultado reportado	Medidas de múltiplos desfechos (por exemplo, escalas, definições, pontos de tempo) dentro do domínio de resultados? ⁹			
6. Questões abrangentes	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.

- 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 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.
- 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 viés 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?			

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?	Sim ou não se aplica		
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?	Sim ou não se aplica		
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?			

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?	Sim ou não se aplica		
16. Os autores da revisão relataram alguma fonte potencial de conflito de interesses, incluindo qualquer financiamento recebido para a realização da revisão?			

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

SIA Trecho 5, Área Especial 57, Lote 200

CEP: 71205-050

Brasília – DF

www.anvisa.gov.br

www.twitter.com/anvisa_oficial

Anvisa Atende: 0800-642-9782

ouvidoria@anvisa.gov.br