

Minuta de Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos

Esta minuta de Guia traz orientações sobre a forma de instrução de petição para avaliação de probiótico para uso em alimentos, abordando os aspectos relacionados à identidade, segurança e eficácia. Ele não confere ou cria novas obrigações, devendo ser utilizado por agentes públicos e privados como referência para cumprimento legislativo. Abordagens alternativas são possíveis, desde que sejam observados os requisitos legais.

Contribuições à minuta de Guia podem ser encaminhadas pelo seguinte endereço:

http://formsus.datasus.gov.br/site/formulario.php?id_aplicacao=36260.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	3
2.	COMPONENTES DA INSTRUÇÃO PROCESSUAL	4
3.	APRESENTAÇÃO DO DOSSIÊ TÉCNICO-CIENTÍFICO	5
4.	COMPROVAÇÃO DA IDENTIDADE	7
4.1	Nomenclatura.....	7
4.2	Depósito em Coleção de Cultura.....	8
4.3	Origem da Linhagem	8
4.4	Identificação	8
5.	COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA	11
5.1	Estudos sobre as propriedades intrínsecas da linhagem	12
5.2	Estudos sobre interações entre a linhagem e o hospedeiro.....	18
5.3	Requisitos adicionais para novas linhagens	18
5.4	Considerações sobre parâmetros de avaliação de testes in vivo.....	19
6.	COMPROVAÇÃO DO BENEFÍCIO	21
6.1	Comprovação da eficácia de uma alegação geral	21
6.2	Comprovação da eficácia de uma alegação específica	25
6.3	Comprovação de uma alegação em mistura de probióticos.....	32
7.	CONCLUSÃO DO DOSSIÊ TÉCNICO-CIENTÍFICO	33
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
	Anexo 1 - Árvore decisória para análise da natureza da resistência microbiana.	38
	Anexo 2 – Lista de Referências excluídas do Dossiê Técnico-Científico.	39
	Anexo 3 – Lista de Referências incluídas ao Dossiê Técnico-Científico.	40
	Anexo 4 – Instrumento de Análise da Qualidade do Estudo.....	41

Minuta de Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para uso em Alimentos

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. A avaliação efetuada contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico.

Este Guia destina-se a orientar os interessados na instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. Sua elaboração considerou a experiência acumulada pela Anvisa e por outras autoridades de regulação estrangeiras.

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.

Podem existir circunstâncias em que sejam necessários dados ou ensaios adicionais para a avaliação, além de procedimentos suplementares. Por outro lado, a instrução processual também pode seguir caminhos alternativos, desde que demonstrada a equivalência da informação na comprovação dos requisitos estabelecidos na legislação.

O presente Guia não abarca os micro-organismos não viáveis, mesmo quando houver evidências de seu benefício para a saúde, sendo nesses casos adotada distinta abordagem. Semelhantemente, também não se aplica à avaliação de micro-organismos geneticamente modificados.

Este Guia deve ser aplicado em conjunto ao regulamento técnico específico, atos normativos subsidiários e outros documentos de orientação.

2. 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.



A avaliação das linhagens de probióticos está estruturada em fundamentos que são comuns, entretanto, é realizada caso-a-caso. O presente Guia aborda questões que podem ser generalizadas ou situações específicas que, por sua alta frequência, merecem ser destacadas.

Sempre que necessário, são apresentadas as diferenças na instrução processual, a depender da origem da linhagem, público indicado, tipo de alimento e alegação utilizada, dentre outras variáveis relevantes.

Recomenda-se que a instrução de uma petição de avaliação de uma linhagem de probiótico e estruturação do dossiê técnico-científico seja realizada pelo fornecedor do

micro-organismo, pois este detém maior conhecimento sobre o seu produto e dispõe das informações que são essenciais para comprovação da sua identidade, segurança e benefícios. Além disso, em alguns casos, uma parte destas informações possui sigilo industrial ou comercial.

Todo o dossiê técnico-científico deve ser apresentado na língua portuguesa, com exceção das publicações técnico-científicas e dos pareceres de autoridades ou instituições estrangeiras, que poderão ser aceitos em língua inglesa ou espanhola, desde que essas sejam as línguas dos textos originais. Textos em outros idiomas traduzidos para a língua portuguesa podem ser apresentados, todavia, esses serão avaliados caso-a-caso e, eventualmente, as versões originais podem ser requisitadas.

Quando o dossiê contiver informações de caráter confidencial, essas devem ser claramente identificadas com a respectiva fundamentação legal do sigilo.

Caso a documentação seja apresentada em suporte eletrônico, devem ser atendidos os requisitos da RDC n. 86/2016, conforme orientações contidas no manual específico (ANVISA, 2016).

3. APRESENTAÇÃO DO DOSSIÊ TÉCNICO-CIENTÍFICO

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

Nesse sentido, todo o dossiê técnico-científico deve ser estruturado de forma a comprovar a identidade, segurança e eficácia da linhagem de probiótico a qual se atribui o efeito. No documento de apresentação do dossiê, essa linhagem do micro-organismo deve ser claramente identificada, seguida da alegação que se pretende utilizar.

Na identificação da alegação, o interessado deve optar entre a alegação geral ou uma específica. A alegação geral está previamente estabelecida, conforme o seguinte texto: “pode contribuir com a saúde do trato gastrointestinal”. Não será admitido o uso

de textos diversos, por isso, caso haja interesse em apresentar benefícios para além do que está previsto na alegação geral, o interessado deve optar por uma alegação específica.

Alegações específicas são desejáveis, uma vez que comunicam mais claramente ao consumidor o benefício alegado (FAO/WHO, 2002). Ao escolher esta opção, o interessado deve escrever o texto literalmente da forma que será apresentado na rotulagem e veiculado no material promocional. A legislação brasileira impede a atribuição de efeitos medicamentosos e terapêuticos a alimentos (BRASIL, 1969); portanto, as alegações específicas não podem estar associadas à prevenção, ao tratamento ou à cura de doenças. Esse tipo de alegação também não deve ser demasiadamente genérica, sob o risco de não ser possível obter evidências capazes de comprovar o efeito e comunicar adequadamente sobre o benefício alegado. O texto proposto pelo interessado deve ser aquele que melhor reflita o benefício demonstrado por meio do dossiê.

No documento de apresentação, o interessado deve ainda indicar a população a quem se destina a linhagem probiótica, informação que tem um papel vital para a avaliação da segurança e eficácia. É relevante destacar que o dossiê deve ser construído para demonstrar a segurança e o efeito benéfico para a população alvo, sendo possível a extrapolação de dados em situações específicas. Quando o dossiê apresentar dados de população distinta daquela a qual o probiótico é indicado, é necessário explicar plausibilidade biológica para a extrapolação dos dados ou se não há variáveis intrínsecas do grupo que podem comprometer as conclusões.

Considerando ainda que um dos elementos considerados na avaliação é a relação dose- efeito, é necessário que o interessado especifique a quantidade sugerida para a obtenção do efeito e que o dossiê instruído seja suficiente para comprovar a eficácia na dose sugerida.

Eventuais advertências ou condições especiais de uso ou conservação também devem constar dessa apresentação inicial.

4. COMPROVAÇÃO DA IDENTIDADE

A classificação, identificação e nomenclatura adequadas dos micro-organismos constituem o ponto de partida para a avaliação de suas propriedades microbianas, sendo o elemento de partida 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. A identificação permite a previsão da capacidade de produção de toxinas específicas, alérgenos ou fatores de virulência que são tipicamente expressos no gênero/espécie. A identificação de um microorganismo, 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 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. 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. Os nomes utilizados devem estar de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Micro-organismos Para as bactérias, a taxonomia e a nomenclatura são mantidas no Comitê Internacional de

Sistemática de Procariotos¹ e coberto pelo Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos. Novas unidades taxonômicas ou reatribuições à taxonomia e à 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 a coleção de cultura de bactérias onde a linhagem está depositada e 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.

4.4 Identificação

A especificação do micro-organismo constante do dossiê deve ser estabelecida usando a metodologia mais atual e válida, pela combinação de testes fenotípicos (morfológicos e bioquímicos) e genotípicos (ex. sequenciamento genético). A tipagem da linhagem deve ser realizada por métodos de tipagem molecular internacionalmente aceitos, de alto poder discriminatório.

4.4.1 Identificação Fenotípica

Métodos fenotípicos incluem técnicas que direta ou indiretamente detectam, medem ou identificam características de um micro-organismo, a partir da expressão de sua constituição genética total observável. Características fenotípicas de bactérias

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

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

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

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

incluem características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, e requerem a multiplicação do organismo em cultura pura, sob condições adequadas. Métodos genotípicos comparam diretamente sequências, em vez de contar com a expressão do gene, e muitas vezes são necessários para a discriminação correta entre espécies e linhagens.

Métodos fenotípicos incluem 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 desconhecidos 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.

As características morfológicas de micro-organismos 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 ao Gram).

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

As características metabólicas, em sua maior parte, são indiretamente observadas porque se baseiam em reações bioquímicas ou atividades metabólicas dos micro-organismos. Os métodos bioquímicos geralmente envolvem crescimento em vários substratos, ensaios para avaliação de atividade enzimática ou ensaios para subprodutos metabólicos resultantes da atividade enzimática (ex. teste de catalase, oxidase, utilização de carboidratos e produção de ácidos).

Além disso, muitas empresas comerciais desenvolveram sistemas de identificação miniaturizados compostos por múltiplos ensaios em uma única placa/dispositivo.

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 das espécies destes grupos, os testes bioquímicos não devem ser utilizados como abordagem única.

4.4.2 Identificação Genotípica

Um grupo de especialistas da Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que os testes fenotípicos sejam feitos em primeiro lugar, seguidos de identificação genética, utilizando métodos como a hibridização DNA-DNA ou a análise de sequência de genes 16S rRNA (FAO/WHO, 2006). No entanto, é importante ressaltar que, 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: *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei*; e *Bifidobacterium animalis* e *Bifidobacterium longum* (VANKERCKHOVEN et al., 2008).

Além disso, os métodos de tipagem são principalmente úteis para a diferenciação de linhagens, mas não são adequados para a identificação de espécies. 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 (EFSA, 2016).

Portanto, somente quando a identificação da espécie e a tipagem da linhagem é realizada com métodos internacionalmente aceitos, a linhagem é considerada suficientemente caracterizada. Os métodos reconhecidos encontram-se listados a seguir.

4.4.2.1 Bactérias

a) Identificação da espécie: por hibridização DNA-DNA ou análise de sequência de marcadores taxonômicos robustos (ex. sequenciamento de genes 16S rRNA).

b) Identificação da linhagem: Pelas seguintes técnicas de tipagem: a) macrorrestrição de DNA seguida por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), técnica que usa eletroforese em gel de campo pulsado para separar grandes fragmentos de DNA cromossômico gerados por digestão com enzimas de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP); b) análise de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (*Random Amplification of Polymorphic DNA* - RAPD); c) outros métodos moleculares de tipagem genética internacionalmente aceitos como, por exemplo,

polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - AFLP).

4.4.2.2 Leveduras

a) Identificação da espécie: por *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP (RFLP de produtos de PCR da região de transcrição interna (ITS) do 5.8S rDNA) ou pela análise de sequenciamento de marcadores taxonômicos de DNA (por exemplo, os domínios D1 e D2 do rDNA 26S ou suas regiões).

b) Identificação da linhagem: Pelas seguintes técnicas de tipagem: 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, alguns podem ser substituídos 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.

5. COMPROVAÇÃO DA SEGURANÇA

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), OMS). O grupo de risco orientará sobre os principais problemas de segurança relacionados ao micro-organismo.

Ademais, o dossiê deve ser composto por estudos sobre as propriedades intrínsecas da linhagem, sobre interações entre a linhagem e o hospedeiro e sobre efeitos remotos. Os dois primeiros tipos de estudos devem ser apresentados para todas as linhagens probióticas, até mesmo as pertencentes ao status QPS (*Qualified Presumption of Safety*) e GRAS (*Generally Recognised as Safe*).

Na **Figura 2** abaixo, há uma estruturação esquemática dos principais aspectos abordados na avaliação de segurança.

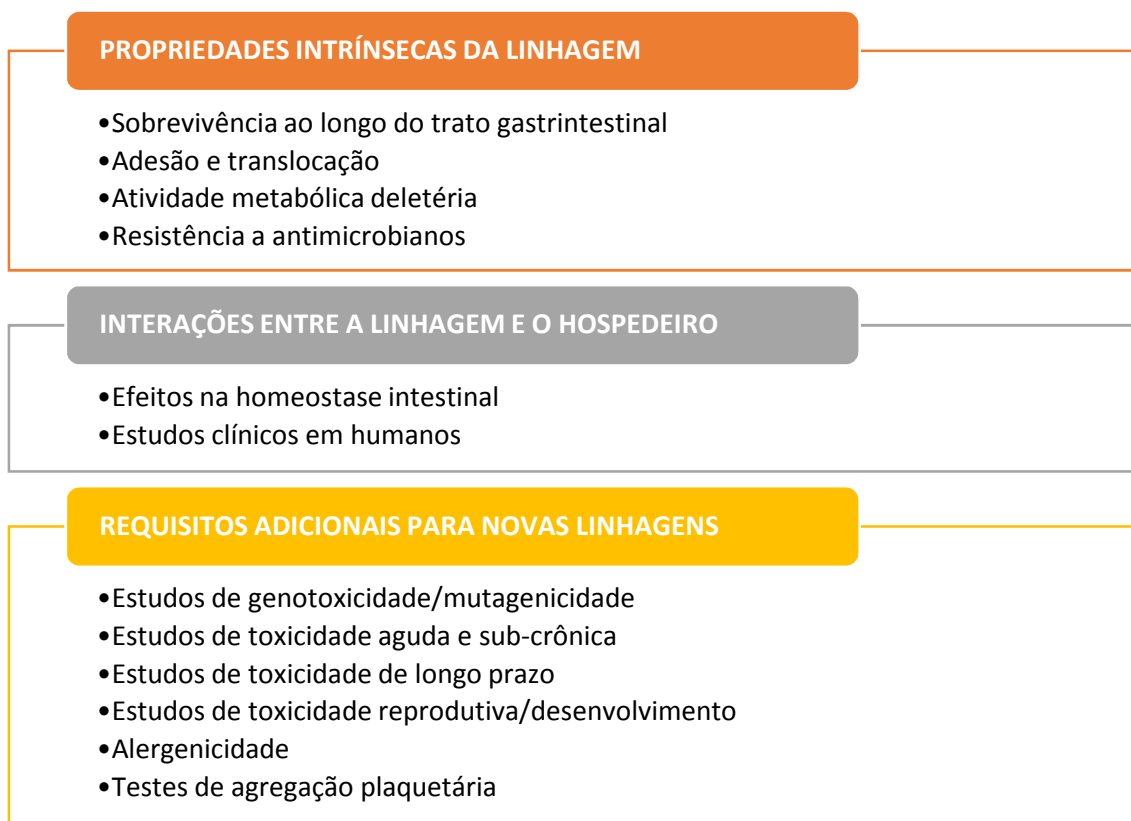


Figura 2 – Principais aspectos abordados na avaliação de segurança.

5.1 Estudos sobre as propriedades intrínsecas da linhagem

5.1.1 Sobrevivência ao longo do trato gastrointestinal

A sobrevivência no trato gastrointestinal precisa ser demonstrada para cada linhagem. Além de ser um pré-requisito para exercer o benefício, informações sobre os mecanismos de sobrevivência fornecem indicações de possíveis efeitos adversos. É recomendável que sejam incluídos ao dossiê testes *in vitro* apropriados correlacionados com testes *in vivo*. Os principais testes recomendados e que devem ser submetidos à avaliação são:

- Tolerância à temperatura corporal;
- Resistência ao ácido gástrico e sais biliares;
- Sobrevivência à passagem no trato gastrointestinal; e

- Aderência a mucosa e/ou células epiteliais humanas ou outras linhagens celulares.

A resistência ao ácido gástrico e sais biliares pode ser comprovada por ensaios *in vitro* (ex. simulação do pH, enzimas e sais biliares) ou em modelos animais (ex. isentos de germes e convencionais). Em animais convencionais, isso é mais difícil de ser avaliado devido à interferência da microbiota presente. Para comprovar a sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal são realizados ensaios de recuperação e identificação da linhagem do micro-organismo, a partir das fezes e mucosa como, por exemplo, durante e após o uso do probiótico, tanto em modelos animais como em humanos. Este tipo de experimento também é útil para avaliar a possibilidade de colonização permanente da linhagem, o que dificultaria o restabelecimento da microbiota indígena.

Considera-se relevante apresentar justificativas que afastem possíveis efeitos prejudiciais ao hospedeiro provocados pela desconjugação dos sais biliares pelo probiótico. A ausência de eventos adversos observados por meio de estudos clínicos pode compor essa fundamentação.

5.1.2 Efeitos na homeostase intestinal

Um requisito de segurança primordial é que o probiótico não pode perturbar os micro-organismos comensais da microbiota humana, ou seja, a microbiota indígena. Por esse motivo, é necessário incluir ao dossiê estudos *in vitro* relacionados à produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas, antibióticos, ácidos orgânicos) e ao efeito antagonista do probiótico contra os principais grupos de bactérias comensais.

O raciocínio geral é que as bactérias que degradam o muco enfraquecem a barreira intestinal, pois desestabilizam a proteção do epitélio. No entanto, algumas bactérias comensais usam mucinas, os principais constituintes do muco, como uma fonte de energia e podem estimular a produção de muco hospedeiro. Assim, tal mecanismo não prejudicaria necessariamente os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Além disso, o teste *in vitro* de degradação da mucina (gel de agarose ou cultura líquida) 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*. Embora a capacidade de degradar muco pareça ser um critério controverso para estimar proteção ou efeito deletério de uma bactéria, este teste deve ser fornecido, pois será avaliado com o conjunto de evidências.

Ademais, a estimulação da produção de mucina é frequentemente utilizada como critério favorável para seleção de um probiótico. Nesse sentido, é necessária a apresentação dos resultados da realização de testes de produção de mucinase e de estimulação à produção de muco pelos micro-organismos candidatos a registro como probiótico.

5.1.3 Adesão e translocação

A adesão à camada mucosa é comumente mencionada como um fator que favorece a permanência de um probiótico no sítio de ação. No entanto, os agentes patogênicos frequentemente têm uma alta afinidade por proteínas como o colágeno, fibrinogênio e muco, uma vez que estes lhes dão acesso aos tecidos do hospedeiro. Portanto, testes de adesão entre a linhagem probiótica e linhagens de células epiteliais do intestino devem ser apresentados.

A degradação da mucosa também pode enfraquecer a barreira intestinal. O teste *in vitro* realizado para avaliar a degradação da mucosa é a atividade da gelatinase, o qual também deve ser apresentado.

Estes testes são relevantes para estimar a possibilidade de adesão e translocação do micro-organismo. A avaliação da possibilidade de translocação também deve ser realizada em modelos animais (ex. modelos animais convencionais imunocomprometidos e isentos de germes).

5.1.4 Atividade metabólica deletéria

5.1.4.1 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,

consequentemente, 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 principalmente os recém-nascidos e neonatos de alto risco, devido à excreção renal parcial e ausência de função de barreira do trato gastrointestinal e indivíduos com síndrome do intestino curto.

Estudos clínicos randomizados controlados que comparam a concentração sanguínea de D-lactato em pacientes que receberam o probiótico e pacientes que receberam o placebo são necessários na avaliação de linhagens probióticas que podem produzir D-lactato em excesso.

5.1.4.2 Fatores de Virulência

Para efeito deste Guia, são incluídos aos fatores de virulências, as toxinas, hemolisinas, aminas biogênicas e gelatinas.

Caso a linhagem probiótica pertença a gênero onde espécies patogênicas são conhecidas, o dossiê deve ser suficiente para demonstrar a ausência de fatores de virulência como hemolisina, toxinas ou outros metabólitos tóxicos (ex. aminas biogênicas).

Análise computacional, simulação computacional ou análise *in silico* (comparação da sequência genética com bancos de dados de genes associados a virulência) devem ser realizadas como método de triagem. Em caso de identificação de homologia, a confirmação da virulência deve ser realizada por meio de análises *in vitro* e *in vivo*.

Para confirmação da atividade hemolítica, devem ser realizados testes *in vitro*, pela observação da hemólise em ágar sangue.

A confirmação da capacidade de produção de toxina e amina biogênica também deve ser testada *in vivo*. O protocolo inicial recomendado pela EFSA é o protocolo estabelecido para avaliação de espécies de *Bacillus* utilizadas na nutrição animal (*European Commission Health and Consumer Protection Directorate, 2000*).

5.1.5 Resistência a antimicrobianos

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 devem ser avaliadas quanto à susceptibilidade a um número relevante de antimicrobianos de importância humana e veterinária. Essa avaliação é um componente relevante do dossiê técnico-científico.

Para a avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos devem ser utilizados procedimentos de diluição seriada em ágar ou caldo e linhagens-controle devem ser incluídas nos testes. Estes devem ser realizados de acordo com padrões internacionalmente reconhecidos, como o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, www.clsi.org), padrão ISO ou similar. Um padrão ISO está atualmente disponível para bifidobactérias e bactérias de ácido láctico não enterocócicas (ISO 10932: 2010; IDF223: 2010). Como requisito básico, a concentração mínima inibitória (CMI) dos antimicrobianos expressos em mg/L ou µg/mL devem ser determinados para cada uma das seguintes substâncias: ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, cloranfenicol e, em casos específicos, tilosina, apramicina, ácido nalidíxico, sulfonamida e trimetoprim. Estes antimicrobianos foram escolhidos para detectar uma ampla gama de determinantes para a resistência (EFSA, 2012). Métodos qualitativos ou semi-qualitativos que determinam a Concentração Mínima Inibitória (CMI) indiretamente, como os métodos de difusão, geralmente não são aceitáveis (EFSA, 2012).

Com o objetivo de distinguir as linhagens resistentes e suscetíveis, deve-se utilizar os valores de corte (*breakpoints*) estabelecidos pelo painel de especialistas da comunidade europeia para aditivos e produtos ou substâncias usadas na alimentação animal (EFSA, 2012). Os valores de corte microbiológico são estabelecidos estudando a distribuição de CMI 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 ($CMI \leq \text{valor de corte}$),

ou resistente, se o seu crescimento não for inibido em uma concentração de antimicrobiano superior ao valor de corte estabelecido (CMI > valor de corte).

Em caso de resistência a algum antibiótico, deve-se determinar sua natureza, se intrínseca ou adquirida. 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, *integrons* e *transposons*) devem ser fornecidos.

Em caso de resistência a algum antibiótico, a empresa deve determinar sua natureza, se intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características naturais, fenotípicas do micro-organismo, transmitida apenas verticalmente à prole e fazendo parte da herança genética do micro-organismo. 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.

Quando houver informações limitadas sobre a distribuição do CMI dentro da unidade taxonômica considerada, a natureza estrutural e a base genética da resistência devem ser demonstradas analisando uma seleção representativa de cepas pertencentes dessa unidade taxonômica.

Quando uma cepa 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 (ex. resistência à vancomicina ou à tetraciclina que frequentemente residem em elementos móveis, tais como plasmídeos ou *transposons*).

A decisão sobre a segurança de uso da linhagem será realizada conforme árvore decisória (Anexo 1).

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

5.2 Estudos sobre interações entre a linhagem e o hospedeiro

5.2.1 Estudos clínicos 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. Portanto, estudos clínicos em humanos sempre serão requeridos nos dossiês técnicos-científicos. Estudos de tolerância e ensaios clínicos de curto prazo em voluntários saudáveis (Fase I) são obrigatórios para qualquer linhagem (FAO/WHO, 2002).

Estudos epidemiológicos observacionais de coorte (retrospectivos ou prospectivos) ou transversais, assim como ensaios clínicos controlados randomizados, devem ser apresentados, quando disponíveis.

Para avaliação de linhagens probióticas, cuja indicação de uso seja para gestantes, 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.

É relevante destacar a importância de que todo ensaio clínico seja registrado internacionalmente no site: *International Standard Randomized Controlled Trial* (www.isrctn.org).

5.3 Requisitos adicionais para novas linhagens

Os estudos que constam neste item devem ser compor dossiês de linhagens que não foram isoladas de alimentos ou da microbiota indígena humana ou para aquelas em que a segurança de uso ainda não foi estabelecida para o gênero/espécie (ex. linhagens de espécies não classificadas como GRAS ou QPS).

Os possíveis efeitos nocivos de um micro-organismo são examinados, avaliados e interpretados testando-se em modelos animais. É necessário avaliar o perfil toxicológico, incluindo a genotoxicidade, para estabelecer a segurança de uma nova linhagem. Embora os testes *in vitro* possam ser muito informativos, as propriedades dos candidatos probióticos devem sempre ser avaliadas *in vivo* porque eles são fortemente influenciados pelo ecossistema intestinal, cuja complexidade não pode ser reproduzida

integralmente *in vitro* (ex. propriedades bioquímicas, interação com micro-organismos comensais ou com o hospedeiro e disponibilidade de substrato).

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 ou gavagem.

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

Como estratégias mais sofisticadas para a manipulação da saúde humana com micro-organismos está aumentando, especialmente, o uso de linhagens além das encontradas tradicionalmente em fermentações lácticas e em quantidades elevadas, torna-se mais importante desenvolver ferramentas para avaliar os efeitos dessas novas exposições. Esses testes são capazes de detectar interrupções na função digestiva pelo uso da linhagem probiótica que pode ser monitorada por sinais genéricos de estado de saúde, como baixa sobrevivência ou baixo peso ao nascer de filhotes, crescimento ou desenvolvimento mais lento de filhotes ou defeitos histológicos em órgãos específicos, como as paredes intestinais. Além dos parâmetros finais usuais de teste de toxicidade no desenvolvimento, é relevante que seja investigado se um organismo probiótico se torna um residente permanente da microbiota adulta da prole (GUEIMONDE, 2006; SANDERS, 2010; ISA, K. et al., 2016). Isso seria particularmente relevante para linhagens isoladas de espécies que indicam probabilidade de translocação.

Como este guia não é exaustivo, podem ser necessários testes adicionais para avaliação de outros efeitos remotos, tais como: teratogênese, efeitos reprodutivos no sexo masculino, alergenicidade e agregação plaquetária.

5.4 Considerações sobre parâmetros de avaliação de testes *in vivo*

A avaliação do estado geral de saúde dos animais durante o ciclo de vida pode ser realizada pela medida de parâmetros sanguíneos e histopatológicos que reflitam

possível alteração na fisiologia ou função biológica. Em modelos murinos, a proteína alfa-amilóide sérica pode ser usada como um marcador plasmático de sepse (LARA-VILLOSLADA et al., 2007; SANDERS, 2010) e a proteína C-reativa também poderia ser medida como um indicador geral da inflamação (SALMINEN et al., 2004; SANDERS, 2010).

A presença dos probióticos administrados em amostras de sangue (hemocultura e/ou métodos baseados em PCR) é de relevância clínica como indicador de translocação e bacteremia potencial (SALMINEN et al., 2004; SALMINEN et al, 2006; LARA-VILLOSLADA et al., 2007; SANDERS, 2010). Em modelos animais, esta análise também pode ser realizada no fígado, baço, sangue ou outros órgãos/tecidos-alvo potenciais.

Alterações do índice esplênico (proporção entre o peso do baço e o peso corporal do animal) podem ser usadas como indicadores de infecções e comparações devem ser realizadas entre grupos de pesos corporais iguais e entre animais do mesmo gênero (NIELSEN & DUNCAN, 1990; SANDERS, 2010).

Uma alteração na relação peso-comprimento do intestino poderia ser um sinal de inflamação intestinal (LARA-VILLOSLADA et al., 2007; SANDERS, 2010). Usado sozinho, a relevância clínica deste parâmetro é bastante limitada e uma avaliação da relação peso-comprimento no intestino deve ser complementado por um exame macroscópico em necropsia, seguida de uma posterior avaliação histopatológica (SANDERS, 2010).

A concentração total de glutathione no fígado e a concentração plasmática de malondialdeído poderiam ser determinadas a fim de avaliar mudanças na capacidade antioxidante e peroxidação lipídica, respectivamente, como consequência possível de bacteremia (GIL ET AL., 2006; LARA-VILLOSLADA et al., 2007; SANDERS, 2010).

Devido à baixa patogenicidade de alguns gêneros (ex. *Lactobacillus*), testes *in vitro* especializados ou modelos animais fora de seus estados fisiológicos normais (ex. imunodeprimidos ou severamente debilitados), assim como o uso rotas de administração incomuns, têm papel importante para permitir a detecção de qualquer potencial patogenicidade da linhagem probiótica candidata (SANDERS, 2010).

6. COMPROVAÇÃO DO BENEFÍCIO

O efeito benéfico de um probiótico deve necessariamente ser traduzido por uma alegação de propriedade funcional ou de saúde. São aceitos dois tipos de alegações: uma geral e outra específica. A alegação geral está limitada à saúde gastrointestinal, tendo a seguinte redação: “contribui com a saúde do trato gastrointestinal”. Alegações diferentes desta serão consideradas específicas.

Para a comprovação da alegação geral, dar-se-á maior peso às evidências existentes para as espécies quando comparadas às linhagens. No caso das alegações específicas, a comprovação do efeito benéfico está condicionada à existência de evidências robustas da linhagem do micro-organismo.

Em ambos os casos, a explicação dos mecanismos de ação é um fator relevante na sustentação de determinado efeito.

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).

6.1 Comprovação da eficácia de uma alegação geral

6.1.1 Seleção dos estudos clínicos em humanos

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

Na regulação brasileira para probióticos, é requisito fundamental para a comprovação do efeito dispor de estudos realizados com humanos. Estudos em animais e estudos *in vitro* são importantes na sustentação de uma alegação, particularmente para o estabelecimento de mecanismos fisiológicos que justifiquem o efeito observado.

Em relação aos estudos em humanos, os estudos clínicos controlados são altamente indicados na estruturação de dossiês para avaliação da eficácia de uma alegação, particularmente pela sua capacidade no estabelecimento de uma relação causal e pelo seu potencial na redução de viés ou fatores de confundimento. Por isso, os dossiês para comprovação do efeito benéfico de probióticos devem ser formados por ensaios clínicos bem desenhados, ou seja, duplo-cego, randomizados, placebo controlado. Este requisito está alinhado com as principais diretrizes internacionais (FAO/WHO, 2002).

Sabe-se que os estudos clínicos apresentam limitações quando se pretende extrapolar as conclusões para além da população estudada ou para sustentar efeitos prolongados. Apesar de estudos epidemiológicos eventualmente preencherem essas lacunas, não se recomenda que eles sejam incluídos ao dossiê, pois apresentam alta limitação no controle de variáveis e suscetibilidade a fatores de confundimento.

Idealmente, os estudos clínicos apresentados devem ser o resultado de uma revisão sistemática da literatura, realizada pelo interessado a partir de dados primários. Nesse caso, é desejável que a estratégia de busca seja descrita sinteticamente no dossiê técnico-científico. Admite-se, ainda, a apresentação de revisões sistemáticas já publicadas.

De forma alternativa, o dossiê pode apresentar uma seleção de estudos, realizadas pelo interessado, sem que haja descrição da estratégia de busca. De toda forma, é imprescindível a apresentação de, pelo menos, um ensaio clínico randomizado, duplo cego, placebo controlado, de alta qualidade, realizado com a linhagem a qual está sendo alegado o efeito.

6.1.1.1 Requisitos de qualidade dos estudos clínicos

Para determinação da qualidade dos estudos clínicos, alguns aspectos desempenham um papel essencial, incluindo: os desfechos devem ser suficientes para comprovar o benefício alegado, o grupo de estudo deve ser representativo da população para qual o micro-organismo será indicado, o alimento utilizado deve ser similar ao pleiteado e a dose avaliada deve abranger àquela indicada pelo interessado.

Para o caso das alegações gerais, que partem do reconhecimento de benefícios relacionados ao trato gastrointestinal, foram previamente estabelecidos alguns desfechos que são aceitos, tais como: melhora da constipação intestinal; diminuição na incidência, duração ou severidade de episódios de diarreia; melhora global de sintomas relacionados ao desconforto intestinal (dor abdominal, cólicas, flatulências e sensação de evacuação completa) e diminuição de micro-organismos ou toxinas patogênicas no trato gastrointestinal.

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, gêneros etc.

Considerando a forte correlação entre o tipo de dieta e a composição da microbiota, é desejável que os selecionados tenham um padrão alimentar normal, considerando a dieta da população brasileira, devendo-se evitar dietas controladas ou restritivas (GIBSON et al, 2011; EFSA, 2016). Quando o estudo for realizado com populações com hábitos alimentares muito diversos da população brasileira, também é relevante que o interessado fundamente a plausibilidade na extrapolação dos achados.

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

Quando a alegação tiver como grupo alvo lactentes, crianças de primeira infância, gestantes e lactantes, é necessário que os estudos sejam realizados nesses

grupos. Além disso, conclusões obtidas nesses grupos não devem ser extrapoladas para adultos, excetuados os casos onde comprovada a plausibilidade da extrapolação.

A avaliação da qualidade do estudo também deve incluir outros aspectos relacionados ao desenho, execução e avaliação do estudo, conforme descrito no item 6.2.2. A ficha de avaliação de cada um dos estudos apresentados no dossiê deve ser apresentada, também seguidas as orientações contidas no item 6.2.2.

6.1.2 Estudos relacionados a mecanismos de ação e benefício da espécie

Para instrução do dossiê técnico-científico, é relevante que a empresa apresente documentação que busque explicar o mecanismo de ação da linhagem específica e, quando não disponível, da espécie. Esses documentos devem ser obtidos a partir de revisão da literatura, acrescidos ou não de estudos conduzidos pelo próprio interessado.

Conforme já tratado, os estudos que relacionam uma espécie de micro-organismo a um benefício têm uma função relevante na sustentação de uma alegação geral. Por isso, para esses casos, a inclusão dessas referências no dossiê técnico-científico está prevista.

É indicado o uso de revisões sistemáticas já publicadas para a demonstração do efeito benéfico de uma espécie e, sempre que possível, metanálises. As publicações incluídas no dossiê devem ser de qualidade. Não há necessidade de apresentação da metodologia de revisão, mas devem ser selecionadas as referências mais relevantes.

Complementarmente, são aceitos pareceres conclusivos e bem fundamentados de autoridades de regulação e instituição especializada e independente. Para consideração da autoridade sanitária, é fundamental que estejam disponíveis os fundamentos para a avaliação, as principais referências consideradas e as conclusões, inclusive sobre a força da evidência.

O interessado deve apresentar, suplementarmente, os fundamentos que explicam a plausibilidade da extrapolação das conclusões relacionadas à espécie para a linhagem específica.

6.1.3 Avaliação da força da evidência para alegação geral

Essa é a fase mais complexa do processo, quando o interessado sintetiza o conjunto de evidências disponíveis para sustentar a alegação proposta e conclui sobre sua suficiência, apresentando os fundamentos e argumentos necessários.

Como primeiro elemento é necessário que o conjunto de evidências obtido, a partir dos estudos clínicos, demonstre um efeito positivo e significativo, alinhado com o benefício alegado. É necessário que o conjunto de evidências apresente relevância para a população indicada e plausibilidade biológica do efeito.

A depender da quantidade de estudos apresentados, pode-se aplicar a metodologia descrita no item 6.2.3.

Na conclusão, deve-se ainda apresentar uma síntese do mecanismo de ação, o qual deve estar amparado nas referências contidas no dossiê. A força da evidência será complementada pelos estudos relacionados à espécie, os quais são fundamentais na sustentação dos efeitos benéficos atribuídos à linhagem, particularmente quando a quantidade de estudos apresentados no dossiê for limitada ou não decorrem de uma revisão sistemática da literatura.

O efeito benéfico da espécie, além de estar correlacionado com aquele atribuído à linhagem, deve decorrer de mecanismos amplamente estudados e estar demonstrado em estudos bem desenvolvidos, os quais conferem robustez à evidência.

6.2 Comprovação da eficácia de uma alegação específica

6.2.1 Revisão sistemática dos estudos clínicos

Diferente das alegações gerais, nesse caso, são os estudos clínicos desenvolvidos com a linhagem que devem dar sustentação à alegação específica. Por isso, a revisão sistemática da literatura é elemento essencial para a elaboração do dossiê técnico-científico.

Idealmente, o interessado deve realizar uma revisão sistemática, a partir de dados primários, adotando-se uma estratégia que seja reprodutível. Um caminho alternativo é iniciar o trabalho com base numa revisão sistemática existente, partindo

para a atualização dos dados. Quanto melhor a qualidade e abrangência da revisão, mais fundamentado estará o dossiê técnico-científico.

O *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* traz princípios e metodologia de como as revisões sistemáticas devem ser realizadas e pode ser acessado em <http://handbook-5-1.cochrane.org/>. Além da metodologia, os sites www.cochrane.org e www.centrocochranedobrasil.org.br permitem acesso a uma biblioteca de revisões sistemáticas publicadas.

Independente do ponto de partida, é necessário que o mesmo apresente sinteticamente a estratégia usada na busca, incluindo: bancos de dados e termos chave usados na pesquisa, período considerado, quantidade de estudos recuperados, os critérios para elegibilidade dos estudos, assim como os critérios para exclusão. Os estudos excluídos do dossiê devem ser listados, conforme quadro apresentado no Anexo 2 e os estudos incluídos devem ser apresentados conforme tabela constante no Anexo 3. A versão original das referências recuperadas na busca deve ser inserida no dossiê, observados os requisitos anteriormente mencionados sobre documentos em idioma estrangeiro.

Dados não publicados, incluindo estudos desenvolvidos pelo interessado ou parceiros, podem ser inseridos no dossiê, reconhecendo-se a limitação desses resultados, inclusive por não terem passado pela avaliação de outros especialistas.

De modo geral, os critérios para a exclusão dos estudos estão relacionados a aspectos gerais (ex. idioma, artigos de revisão ou artigo em duplicata) ou específicos, compreendendo tipo ou desenho do estudo, marcador selecionado ou efeito avaliado, matriz utilizada, grupo de estudo distinto da população alvo etc.

Estudos envolvendo populações distintas daquela ao qual a linhagem de probiótico se destina podem ser relevantes para a comprovação do efeito benéfico, especificamente nos casos onde a extrapolação de dados é plausível. Por isso, a avaliação da inclusão ou exclusão de um estudo baseado neste critério deve ser bastante criteriosa. Nos critérios de inclusão, podem ser selecionados estudos realizados em diferentes matrizes, desde que essa não seja fator de confundimento.

Adicionalmente à revisão sistemática, o interessado pode apresentar os resultados após a realização de uma metanálise. É necessário destacar que a necessidade de se dispor de, no mínimo, dois estudos que respondam a uma mesma pergunta, utilizem pelo menos um desfecho em comum e tenham desenhos de estudos semelhantes. A metanálise, quando realizada, deve ser aplicada aos resultados de uma revisão sistemática. Os resultados devem ser representados por um ou mais gráficos do tipo floresta, com os resultados padronizados de cada estudo incluído, com seus intervalos de confiança e o valor da síntese dos resultados de todos os estudos incluídos. Ao realizar uma metanálise, também devem ser considerados os vieses de publicação, podendo ser utilizados os gráficos de funil invertido (*funnel plot*), (Revisão sistemática como ferramenta da avaliação de riscos microbiológicos – OPAS). O site www.prisma-statement.org possui um *check-list* de como fazer o relatório de uma revisão sistemática ou uma metanálise, além de um diagrama de fluxo.

Quando for realizada metanálise, devem ser feitas análises de sensibilidade para verificar se os achados gerais são robustos. Estas análises são feitas repetindo o processo da metanálise e substituindo critérios que foram arbitrários ou não claros. Devem ser realizadas diversas análises de sensibilidade, alterando a cada vez um critério. Caso haja mudança no resultado da metanálise, a confiança nos resultados obtido é menor. (<http://handbook-5-1.cochrane.org/>).

6.2.2 Análise individual da qualidade dos estudos

Apesar da abundância de literatura científica que aborda os efeitos benéficos dos micro-organismos probióticos, há uma discussão bastante atual sobre a limitação no desenho dos estudos usados para sustentar a avaliação de eficácia. Alguns dos aspectos discutidos são gerais, ou seja, independem do objeto em estudo. Entretanto, outras limitações estão diretamente vinculadas à comprovação de um benefício para probióticos.

Por isso, a construção de um dossiê robusto depende da habilidade do interessado em selecionar estudos bem desenhados, executados e analisados; capazes de controlar fatores de confundimento, minimizar vieses e de demonstrar um efeito causal, significativo e direcionado ao público alvo. Essa análise é geralmente um passo

subsequente à revisão da literatura, sendo realizada caso-a-caso. Alternativamente, a análise da qualidade dos estudos pode ser uma etapa acoplada à revisão da literatura, aplicada com o propósito de selecionar os estudos que serão inseridos no dossiê.

São muitas as informações e variáveis que devem ser consideradas nessa análise. O site www.consort-statement.org traz um *check-list* de itens que devem conter um relatório de um estudo clínico.

Adicionalmente, no Anexo 4, está apresentado um instrumento que estrutura os critérios de análise para os estudos adicionados ao dossiê, para tanto, foram considerados dois aspectos: aqueles que analisam se o estudo foi desenhado, executado e avaliado adequadamente e outros que se referem à qualidade do estudo para a sustentação da alegação pleiteada. A intenção desse instrumento é minimizar a subjetividade na análise da qualidade dos estudos, além de alinhar expectativas e necessidades. É recomendável que o interessado adicione os formulários de análise à documentação de instrução, os quais serão considerados durante a avaliação da alegação.

Nesse instrumento estão previstos 15 itens de avaliação, sendo que cinco receberam uma classificação de imprescindíveis e dez de necessários. Os itens imprescindíveis refletem requisitos explicitamente previstos no regulamento técnico e, portanto, o não cumprimento deve ser motivo para a exclusão do estudo. Os itens necessários ajudam a qualificar o estudo, quer seja pelo seu desenho e sua forma de execução, como pelo seu potencial na sustentação de uma alegação. No caso dos itens necessários, toda vez que o interessado indicar uma resposta NÃO ou NÃO REPORTADO é relevante que sejam apresentadas notas que expliquem a manutenção do estudo no dossiê mesmo com a falha identificada. Estudos que não atendam 3 ou mais itens necessários não deveriam compor o dossiê, mas, caso sejam mantidos, fazem ainda mais relevantes as explicações.

Durante a avaliação do dossiê pela autoridade sanitária, todos os estudos serão reanalisados considerando os mesmos itens apresentados no Anexo 5. Quando houver divergência de análise em relação ao interessado, será apresentada a fundamentação

técnica que respalde o entendimento do órgão, desde que o dossiê esteja adequadamente instruído.

6.2.2.1 Desfechos dos estudos clínicos relacionados à alegação específica

Conforme mencionado no item 6.1.1.1, entre os fatores críticos para a avaliação da qualidade de um estudo clínico estão: os desfechos devem ser suficientes para comprovar o benefício alegado, o grupo de estudo deve ser representativo da população para qual o micro-organismo será indicado, o tipo de alimento testado deve ser similar ao pleiteado e a dose avaliada deve abranger àquela indicada pelo interessado.

As recomendações relacionadas ao grupo de estudo, contidas no item 6.1.1.1 são também aplicáveis aos dossiês elaborados para sustentação de alegações específicas. Entretanto, para as alegações específicas, não foram pré-estabelecidos desfechos, até pela abrangência que essas alegações podem ter.

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

Um problema bem caracterizado é a escolha de marcadores que demonstram alterações fisiológicas que não são consideradas suficientes para comprovação do efeito (desfechos intermediários). Entre esses desfechos, podemos citar: alterações no epitélio intestinal, mudanças em marcadores imunológicos ou alguns tipos de alteração da composição da microbiota. Essas alterações podem compor o dossiê como mecanismos de ação que ajudam a explicar o efeito.

Quando o estudo utiliza o 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.

6.2.3 Avaliação da força da evidência e conclusão

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. Uma evidência forte tem menor possibilidade de mudanças em relação ao avanço da ciência e, por isso, é preferível para a sustentação de determinado efeito.

A metodologia proposta para avaliação da força da evidência foi adaptada dos modelos adotados pela Ministério de Saúde do Canadá (HEALTH CANADA, 2009) e pela Agência Americana de Alimentos e Medicamentos (FDA, 2003). Para conclusão sobre a força da evidência foram considerados os seguintes domínios: consistência, força da associação, relação de dose e efeito, plausibilidade biológica e adequação do grupo de estudo.

Uma das condições necessárias para a avaliação da força da evidência de uma alegação específica é que se tenha, no mínimo, dois estudos clínicos de qualidade.

DOMÍNIOS DA AVALIAÇÃO DA FORÇA DA EVIDÊNCIA

	DEFINIÇÃO
	Avalia o grau de convergência entre os estudos considerando a direção do efeito (positivo, neutro ou negativo)
CONSISTÊNCIA	FORMA DE AVALIAÇÃO (quantitativa)
	$\frac{\text{Número de estudos com resultado positivo - efeito benéfico}}{\text{Total de estudos avaliados}}$
	INTERPRETAÇÃO
	Alta consistência $\geq 0,75$
	Consistência moderada = $0,6$ até $< 0,75$
	Baixa consistência $< 0,6$

DEFINIÇÃO

Avalia a força de associação entre o probiótico e o efeito positivo, considerando a proporção dos estudos com resultado significativo ($p < 0,05$)

FORÇA DA ASSOCIAÇÃO

FORMA DE AVALIAÇÃO (quantitativa)

Número de estudos com resultado positivo significativo
Total de estudos avaliados

INTERPRETAÇÃO

Forte associação $\geq 0,75$

Associação moderada = $0,6$ até $< 0,75$

Fraca associação $< 0,6$

DEFINIÇÃO

Avalia a relação entre a dose sugerida e o efeito alegado.

RELAÇÃO DE DOSE E EFEITO

FORMA DE AVALIAÇÃO (quantitativa)

Nos casos onde se observa uma relação positiva e significativa entre o consumo da linhagem do microrganismos e o efeito desejado, estabelecer o intervalo das doses utilizadas.

INTERPRETAÇÃO

Dose suficiente: a dose sugerida é capaz de produzir efeitos positivos.

Não conclusivo: não se pode afirmar que a dose sugerida trará um efeito benéfico à população.

DEFINIÇÃO

Avalia a relevância da evidência para a população indicada.

RELEVÂNCIA PARA A POPULAÇÃO INDICADA

FORMA DE AVALIAÇÃO (quantitativa)

Dos estudos em que se observa um efeito positivo e significativo, identificar aqueles cujo grupo de estudo é representativo da população indicada (incluindo aqueles em que a extrapolação de resultados é plausível). Quantificar a quantidade de estudos que atendem a esse requisito.

INTERPRETAÇÃO

Com relevância: há pelo menos dois estudos realizados com grupo representativo da população indicada ou cujos dados podem ser extrapolados.

Sem relevância: não há quantidade suficiente de estudos realizados com com grupo representativo da população indicada ou cujos dados podem ser extrapolados.

**PLAUSIBILIDADE
BIOLÓGICA DO
EFEITO**

DEFINIÇÃO

Avalia se há mecanismos bem estabelecidos que expliquem o efeito benéfico.

FORMA DE AVALIAÇÃO (qualitativa)

Para avaliação dessa plausibilidade são usados os estudos adicionais ao dossiê, geralmente, estudos em animais e *in vitro*. Não há necessidade de uma quantidade abrangente de estudos, sendo fundamental apresentar estudos de qualidade.

INTERPRETAÇÃO

Mecanismo estabelecido: há literatura de qualidade que explica o mecanismo de ação do probiótico.

Mecanismos não definido: não há informações conclusivas sobre o mecanismo de ação do probiótico.

A conclusão final da força da evidência requer uma ponderação sobre o resultado da avaliação de cada um dos domínios, não havendo uma fórmula simplificada para direcionar essa decisão. A importância de cada um desses domínios para a comprovação do benefício deve ser levada em conta, assim como deve-se contrapor os resultados obtidos.

Para a sustentação de um efeito benéfico é necessário que a evidência apresente alta e forte associação. Ademais, é necessário que a dose seja suficiente, que os resultados sejam relevantes para a população alvo e o efeito explicado por mecanismos bem estabelecidos.

Quando a avaliação indicar que a evidência não cumpre os requisitos acima estabelecidos, mas haja interesse na submissão do dossiê, devem ser apresentados os argumentos que fundamentem a adoção de uma abordagem diversa dessa descrita neste item do Guia.

6.3 Comprovação de uma alegação em mistura de probióticos

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 e a sua previsão na lista positiva.

Nesse caso, não será aceito o uso de uma alegação geral, devendo o efeito benéfico ser demonstrado por mesmo nível de evidência exigido para uma alegação específica. A decisão será vinculativa, ou seja, somente reconhecida quando produtos apresentarem a mesma combinação de linhagens.

7. CONCLUSÃO DO DOSSIÊ TÉCNICO-CIENTÍFICO

Deve ser apresentada uma conclusão do dossiê técnico-científico, por intermédio do qual o interessado apresenta sua fundamentação sobre a suficiência da informação para comprovação da identidade, segurança e eficácia da linhagem de probiótico.

Especial atenção deve ser dada a ausência de informações consideradas necessárias, conforme disposto nos regulamentos e recomendado neste Guia. Semelhantemente, quando forem utilizadas abordagens alternativas para a elaboração do dossiê técnico-científico, sugere-se que os fundamentos que explicam a equivalência de resultados sejam sinteticamente reafirmados neste tópico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANVISA. Manual de procedimentos para protocolização de documentos em formato eletrônico. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33892/2881316/ggqip_manual.pdf/a5db800c-f31d-4a5e-9dc8-5d97d175f27a> Acessado em: 29 de outubro de 2017

ASAHARA T, TAKAHASHI M, NOMOTO K, TAKAYAMA H, ONOUE M, MOROTOMI M, et al. Assessment of safety of *Lactobacillus* strains based on resistance to host innate defense mechanisms. **Clin Diagn Lab Immunol** 10:169-73, 2003.

BECKERMAN KP, ROGERS HW, CORBETT JA, SCHREIBER RD, MCDANIEL ML, UNANUE ER. Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. **J Immunol** 150:888-95, 1993.

BERTAZZONI, E. et al. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? **Journal of Chemotherapy**, 25: 193-212, 2013.

BINNS, N. Probiotics, prebiotics and the gut microbiota. ILSI Europe, 2013.

BRAEGGER, C. et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, 52:238–250, 2011.

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.

CHALMERS, T. C. et al. A method for assessing the quality of a Randomized Control Trial. **Controlled Clinical Trials**, 2: 31-49, 1981.

COMMISSION, J.; GARRITY, G. M. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology International Code of Nomenclature of Prokaryotes International Code of Nomenclature of Prokaryotes Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH , 2016.

DIDARI, T. et al. A systematic review of the safety of probiotics. **Exp Op Drug Saf**, 13: 227–239, 2014.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH AND CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE- GENERAL, SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION. Opinion of the scientific committee on animal nutrition on the safety of use of *Bacillus* species in animal nutrition. 2000.

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 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.

FDA. Guidelines for industry. Early clinical trials with live biotherapeutic products: chemistry, manufacturing, and control information. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Biologi.../UCM292704.pdf>> Acessado em: 29 de outubro de 2017.

FDA. Guidance for industry: interim procedures for qualified health claims in the labeling of conventional human food and human dietary supplements. Disponível em:<<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/LabelingNutrition/ucm053832.htm>> Acessado em: 29 de outubro de 2017.

FDA.Guidande fori Industry and FDA: interim evidence-based ranking system for scientific data. 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 an Related Clains Standard of the Australia New Zealand Food Standards Code. Disponível em: <http://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/FINAL%20-%20ISFR%20Health%20Claims.pdf>. Acessado em 2 de novembro de 2017.

HOFFMANN, D. E. et al. Science and regulation. Probiotics: finding the right regulatory balance. **Science** 342, 314-315. 2013.

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

FRIEDEN, T. R. Evidence for health decision making - beyond randomized, controlled trials. **N Engl J Med**, 377:5 465-475. 2017.

GIL L, SIEMS W, MAZUREK B, GROSS J, SCHROEDER P, VOSS P, et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. **Free Radic Res** 40:495 505, 2006.

GIBSON, G. R. et al. The design of probiotic studies to substantiate health claims. **Gut Microbes**, 2:5, 299-305, 2011.

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

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

HEALTH CANADA. Guidance Document for Preparing a Submission for Food Health Claims. 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.

HOFFMAN, D. E. et al. Federal Regulation of Probiotics : An Analysis of the Existing Regulatory Framework and Recommendations for Alternative Frameworks. p. 115, 2012.

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.

LARA-VILLOSLADA F, SIERRA S, DIAZ-ROPERO MP, OLIVARES M, XAUS J. Safety assessment of the human milk isolated probiotic *Lactobacillus salivarius* CECT5713. **J Dairy Sci** 90:3583-9, 2007.

MASCO L, HUYS G, DE BRANDT E, TEMMERMAN R, SWINGS J. Culture-dependent and culture independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. **Int J Food Microbiol** 102:221-30, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Diretrizes metodológicas : elaboração de pareceres técnico-científicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 80 p. : il.

MIQUEL, S. et al. A proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe. **Microb Cell Fact**, 14: 48, 2015.

MOGENSEN, G. et al. Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. **Bull Intern Dairy Fed**, p. 10–19, 2002.

NIELSEN K, DUNCAN J. Animal Brucellosis. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc 1990.

OCDE. The microbiome, diet and health: towards a science and innovation agenda. Disponível em < http://www.oecd-ilibrary.org/science-and-technology/the-microbiome-diet-and-health_d496f56d-em > Acessado em 29 de outubro de 2017.

REPORT, V. K. M. et al. Guidelines for assessment of safety aspects of probiotic (food) products. 2014.

SALMINEN, S. et al. Demonstration of safety of probiotics - A review. **Intern J Food Microbiol**, 44: 93–106, 1998.

SALMINEN MK, TYNKKYNNEN S, RAUTELIN H, POUSSA T, SAXELIN M, RISTOLA M, et al. The efficacy and safety of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG on prolonged, non-infectious diarrhea in HIV Patients on antiretroviral therapy: a randomized, placebo-controlled, crossover study. **HIV Clin Trials** 5:183-91, 2004.

SALMINEN MK, RAUTELIN H, TYNKKYNNEN S, POUSSA T, SAXELIN M, VALTONEN V, ET AL. *Lactobacillus* bacteremia, species identification and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. **Clin Infect Dis** 42:35-44, 2006.

SANDERS, M. E. Probiotics: Definition, sources, selection, and uses. **Clin Infect Dis**, 46: S58–S61, 2008.

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

SANDERS, M. E. et al. Health claims substantiation for probiotic and prebiotic products. **Gut Microb**, 2:3, 127–133, 2011.

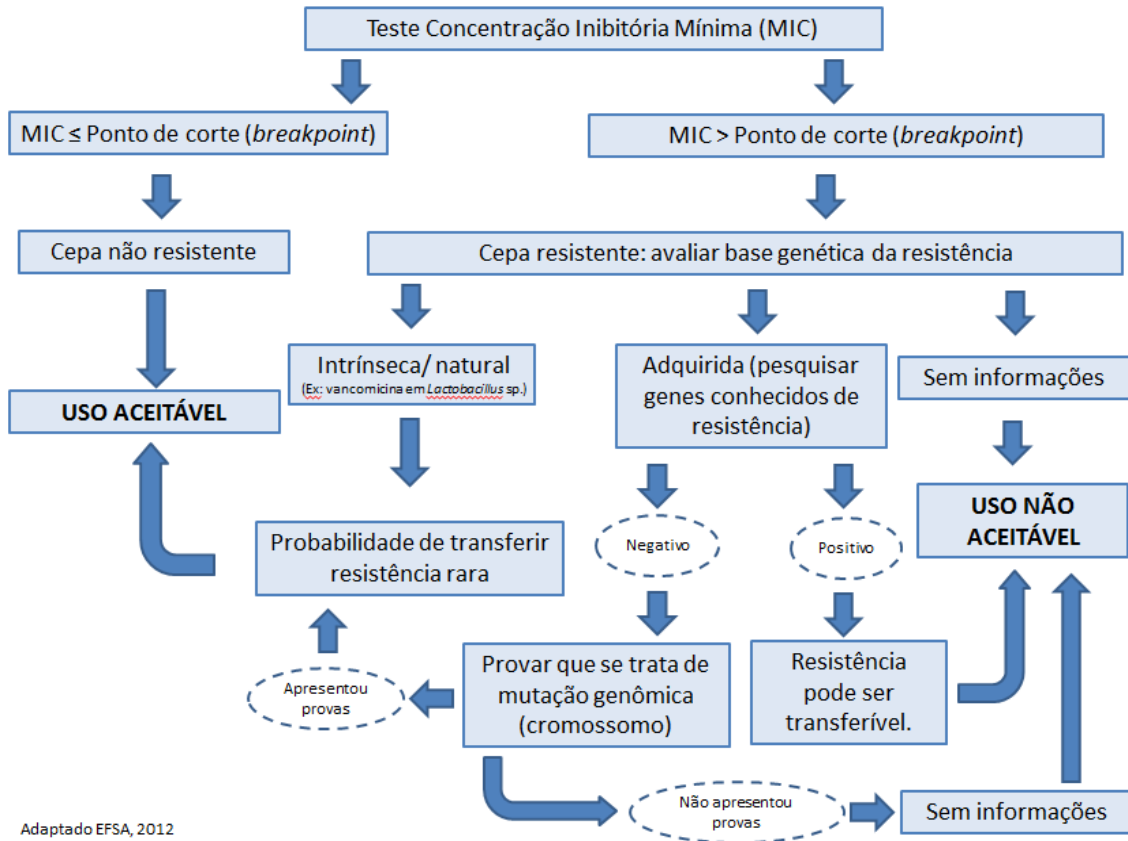
SNYDMAN, D. R. The Safety of probiotics. **Clin Infect Dis**, 46: S104–S111, 2008.

SUVOROV, A. Gut Microbiota, Probiotics, and human health. **Biosci Microb Food Health**, 32: 81–91, 2013.

WATSON, R. R. et al. Chapter 1 – Prebiotics and Probiotics: an assessment of their safety and health benefits. **Probiot Prebiot Synbiot**, January, 3–23, 2016.

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

Anexo 1 - Árvore decisória para análise da natureza da resistência microbiana.



Adaptado EFSA, 2012

Anexo 4 – Instrumento de Análise da Qualidade do Estudo.

Identificação do Estudo:	(Autor, Título e Ano)		
	ITEM DE AVALIAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO DO ITEM	SIM
A hipótese testada está claramente definida.	NECESSÁRIO		
O grupo de estudo é representativo da população alvo da alegação. ^a	IMPRESINDÍVEL		
O tamanho da amostra foi estabelecido a partir de fundamentos estatísticos.	NECESSÁRIO		
As características dos grupos de tratamento e de controle são semelhantes.	NECESSÁRIO		
Os critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos de pesquisa consideraram potenciais fatores de confundimento, inclusive aqueles relacionados à alimentação ou estilo de vida.	NECESSÁRIO		
A distribuição dos sujeitos de pesquisa nos grupos foi randomizada.	IMPRESINDÍVEL		
Houve sigilo da alocação.	NECESSÁRIO		
Participantes e investigadores foram mantidos "cegos" em relação à intervenção.	IMPRESINDÍVEL		
A matriz utilizada não traz elementos de confundimento.	NECESSÁRIO		

A duração do estudo é suficiente para demonstrar o efeito benéfico.	NECESSÁRIO		
O desfecho ou marcadores usados foram mensurados de forma padronizada, validada e confiável.	NECESSÁRIO		
O desfecho ou marcadores são suficientes para comprovar o benefício alegado. ^b	IMPRESINDÍVEL		
A dose utilizada e a forma de administração correlacionam-se com aquelas indicadas pelo interessado.	IMPRESINDÍVEL		
A quantidade de indivíduos que abandonaram ou foram excluídos da pesquisa não comprometeu a qualidade do estudo. ^c	NECESSÁRIO		
Os resultados foram apresentados com análise estatística adequada.	NECESSÁRIO		
NOTAS DO AVALIADOR:			

- (a) Quando o grupo de estudo for considerado não representativo, será necessária a avaliação da plausibilidade da extrapolação dos resultados. Caso a extrapolação seja plausível, deve-se selecionar a opção SIM. Caso a extrapolação não seja plausível ou não tenham sido apresentados fundamentos para essa extrapolação, selecionar a opção NÃO OU NÃO REPORTADO. No caso de gestantes e crianças menores de 3 anos, deve-se lembrar que os estudos também serão utilizados para comprovação de segurança, devendo ser analisados parâmetros de crescimento, desenvolvimento e a ocorrência de eventos adversos por período de tempo suficiente.
- (b) Caso seja usado um marcador relacionado a um efeito intermediário, é necessário demonstrar que esse efeito está relacionado a um benefício. Caso não sejam apresentados estudos que comprovem essa relação, marcar a opção NÃO OU NÃO REPORTADO.
- (c) Segundo Chalmers et al. (1981), estudos clínicos randomizados realizados durante três meses ou menos com percentual de abandono ou excluídos do estudo superior a 10% e aqueles realizados por período superior a três meses com percentual de abandono superior a 15% devem ser criteriosamente avaliados.