

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Bioprospeção de compostos naturais de microalgas  
para o tratamento da doença inflamatória do intestino**

**Mariana Piscarreta Duque Alves**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação de:

**Professora Doutora Luísa Barreira**

**2023**







**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Bioprospeção de compostos naturais de microalgas  
para o tratamento da doença inflamatória do intestino**

**Mariana Piscarreta Duque Alves**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação de:

**Professora Doutora Luísa Barreira**

**2023**



# **Bioprospeção de compostos naturais de microalgas para o tratamento da doença inflamatória do intestino**

## **Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve, 2023

---

**Copyright © 2023** Mariana Piscarreta Duque Alves

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*“Mar, Metade da minha alma é feita de maresia...”*

**Sophia de Mello Breyner**



## **Agradecimentos**

*E cinco anos se passaram... Obrigada a todos vocês que fizeram cada momento deste percurso valer a pena!*

*Quero agradecer,*

*À minha orientadora, **Professora Doutora Luísa Barreira**, por todo o apoio, disponibilidade e dedicação durante a escrita da presente dissertação.*

*A todos os **professores do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**, que fizeram parte do meu percurso académico, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo destes anos, um muito obrigada.*

*À equipa da farmácia do **Centro Hospitalar Médio Tejo** e da **Farmácia Albufeira**, por terem contribuído para a minha formação enquanto futura profissional de saúde.*

*Aos meus **pais**, por fazerem de mim a pessoa que sou hoje, os que estão na primeira fila para festejar as minhas conquistas e quem me consola quando mais preciso. Obrigada por estarem sempre presentes, acreditarem sempre em mim e nunca me deixarem desistir! São os melhores pais do mundo! É uma sorte ser vossa filha.*

*À minha irmãzinha **Sofi**, a minha melhor amiga, a minha cúmplice, a que dá os melhores conselhos e a que me motiva em todos os minutos. Que continuemos unidas forever. És uma inspiração na minha vida, obrigada por tudo, quando for grande quero ser como tu!*

*A toda a minha família, **avós, tios e primos**, que sempre me apoiaram em todas as circunstâncias. Obrigada por todo o incentivo e carinho constante.*

*Ao meu **João**, obrigada pelo teu apoio incondicional em todos os momentos. A vida ao teu lado fica mais leve e bonita, que seja para sempre. Love you!*

*Às amigas que a universidade me deu e espero levar para a vida, **Filipa, Rita, Margarida, Mafalda, Mariana** e afilhada **Barrita**. Que todas as memórias que criamos juntas se mantenham eternas, sem vocês não era a mesma coisa.*

*A todas as pessoas incríveis que conheci na UAlg e que de alguma forma marcaram o meu trajeto. Em especial, às minhas madrinhas **Margarida, Mariana, Mélanie** e **Ana**, obrigada por me terem acolhido e acompanhado ao longo desta caminhada.*

*...esta dissertação é dedicada a todos vocês!*



## Resumo

As doenças inflamatórias do intestino, caracterizam-se pela inflamação crónica do trato gastrointestinal e compreendem duas formas principais, a Doença de Crohn e a Colite Ulcerosa. Apesar de evoluírem de diferentes formas e apresentarem características distintas, manifestam-se de maneiras semelhantes e ambas exibem um padrão de alternância entre períodos de agravamento e períodos de ausência de sintomas. Os sintomas mais frequentes são diarreia, dor abdominal intensa, perda de apetite e perda de peso. Embora a etiologia destas doenças seja desconhecida, pensa-se que esteja associada a uma combinação de fatores como a predisposição genética, a disbiose intestinal e a desregulação imunológica.

Uma vez que não existe cura, é através da adoção de um conjunto de medidas não farmacológicas adequadas, da suplementação ponderada e da farmacoterapia direcionada para o alívio dos sintomas, redução da inflamação e promoção da cicatrização da mucosa, que é possível alcançar uma boa gestão da doença. Segundo as diretrizes atuais os fármacos mais comumente utilizados são os anti-inflamatórios intestinais, os corticosteroides, os imunomoduladores e os medicamentos biológicos.

Contudo, os efeitos indesejáveis, a resposta inadequada e as falhas da terapêutica disponível, tornam imprescindível a procura de novas opções terapêuticas que permitam aumentar o número de opções de tratamento disponíveis. As microalgas como fonte de compostos bioativos de elevado interesse, nomeadamente, micronutrientes como ácidos gordos, minerais, vitaminas e pigmentos, e outros metabolitos secundários com elevado potencial pré-biótico, anti-inflamatório e antioxidante, podem constituir uma alternativa futura mais segura, económica e sustentável para prevenção, controlo e tratamento das DII.

**Palavras-chave:** *Doença inflamatória do intestino; Doença de Crohn; Colite ulcerosa; Microalgas; Pesquisa de novos fármacos.*



## **Abstract**

Inflammatory bowel disease is characterized by chronic inflammation of the gastrointestinal tract, comprising two main forms: Chron's Disease and Ulcerative Colitis. Although these diseases can evolve uniquely and present different characteristics, they manifest similarly, presenting periods of aggravation alternating with the absence of symptoms. The most frequent symptoms are diarrhoea, intense abdominal pain, loss of appetite, and weight loss. While the aetiology of these diseases is unknown, they are believed to be associated with a combination of factors like genetic predisposition, intestinal dysbiosis, and immune imbalance.

As there is no cure, non-pharmacological measures, appropriate supplementation, and carefully designed pharmacological therapy are used to alleviate symptoms, reduce inflammation, and promote healing of the mucous membranes and manage the illness. According to current practice guidelines, intestinal anti-inflammatory drugs, corticosteroids, immunomodulators and biological medicines are the most widely used. However, secondary effects, the inadequate response to the pharmacological therapy, and/or lack of therapy available make it essential to find new therapeutic solutions. Microalgae as a natural source of bioactive compounds are of high interest. These may include micronutrients as fatty acids, minerals, vitamins and pigments as other secondary metabolites with pre-biotic, anti-inflammatory potential that could become safer, more economical, and sustainable therapeutic drugs for the prevention and management of inflammatory bowel disease.

**Keywords:** *Inflammatory bowel disease; Crohn's disease; Ulcerative colitis; Microalgae; Drug development.*



# Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>v</b>
<b>Índice .....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de quadros .....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de abreviaturas e acrónimos .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. Introdução e Metodologia .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Intestino .....</b>	<b>3</b>
2.1 Anatomofisiologia do sistema digestivo .....	3
2.2 Mucosa Intestinal .....	4
2.2.1 Imunidade da mucosa intestinal .....	6
2.2.2 Microbiota intestinal .....	7
<b>3. Inflamação .....</b>	<b>9</b>
3.1 Definição .....	9
3.2 Inflamação aguda .....	9
3.3 Inflamação crónica .....	10
<b>4. Doença Inflamatória do Intestino .....</b>	<b>11</b>
4.1 Patogénese .....	11
4.2 Doença de Crohn .....	12
4.3 Colite Ulcerosa .....	13
4.4 Abordagens Terapêuticas .....	13
4.4.1 Terapêutica não farmacológica .....	14
4.4.2 Suplementação .....	15
4.4.3 Probióticos, Prebióticos e Simbióticos .....	16
4.4.4 Farmacoterapia .....	18
4.4.5 Necessidade de novas opções terapêuticas .....	24
<b>5. Aplicação das Microalgas no tratamento e prevenção das Doenças Inflamatórias do Intestino .....</b>	<b>25</b>
5.1 Microalgas .....	25
5.2 Compostos bioativos presentes nas Microalgas e aplicabilidade no contexto das DII .....	26

5.2.1	Atividade Anti-inflamatória .....	27
5.2.2	Atividade Antioxidante .....	29
5.2.3	Atividade Prebiótica .....	30
5.3	Processo de pesquisa de novas opções terapêuticas .....	30
<b>6.</b>	<b>Conclusão e Considerações finais.....</b>	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>39</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 2.1-</b> Anatomia do sistema digestivo. Divisões do intestino. ....	3
<b>Figura 2.2 -</b> Histologia do tubo digestivo. ....	4
<b>Figura 2.3 -</b> Células do epitélio intestinal. ....	6
<b>Figura 4.1-</b> Patogénese da doença inflamatória intestinal. ....	12
<b>Figura 4.2-</b> Mecanismo de ação dos probióticos. ....	17
<b>Figura 5.1-</b> Compostos bioativos provenientes das microalgas. ....	25
<b>Figura 5.2 -</b> Exemplos de diferentes tipos de cultivo de Microalgas. ....	32
<b>Figura 5.3 -</b> Comparação dos diferentes métodos de disrupção celular. ....	34



## Índice de quadros

<b>Quadro 4.1-</b> Suplementação de micronutrientes nas DII. ....	15
<b>Quadro 4.2 -</b> Medicamentos Imunomoduladores utilizados no tratamento das DII, os seus mecanismos de ação e observações relevantes. ....	20
<b>Quadro 4.3 -</b> Medicamentos Biológicos usados no tratamento das DII. Exemplos e mecanismos de ação. ....	22
<b>Quadro 5.1-</b> Compostos Bioativos das Microalgas .....	26
<b>Quadro 5.2-</b> Técnicas de concentração de biomassa de microalgas (131, 132).....	33
<b>Quadro 5.3 -</b> Comparação dos diferentes métodos cromatográficos, tendo em conta os diferentes tipos de biomoléculas. Adaptado de (135).....	36



## **Lista de abreviaturas e acrónimos**

**5-ASA** - Ácido 5-amino salicílico

**6-MP** - 6-Mercaptopurina

**ABTS** - Ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

**ADME** - Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção

**AMPs** - Proteínas antimicrobianas

**CCK** – Colecistocinina

**CORDIS** - Serviço Comunitário de Informação sobre Investigação e Desenvolvimento

**CU** - Colite ulcerosa

**DC** - Doença de Crohn

**DII** – Doença Inflamatória do Intestino

**DPPH** - Radical livre 2,2-difenil-1-picrihidrazil

**EFCCA** - Federação Europeia das Associações da Doença de Crohn e Colite Ulcerosa

**ELISA** - Ensaio imunoenzimático

**FGF** - Fatores de crescimento dos fibroblastos

**FOS** - Fruto-oligossacáridos

**GALT** - Tecido linfático associado ao intestino

**GIP** - Péptido inibidor gástrico

**GOS** - Galacto-oligossacáridos

**GP** - Glicoproteína

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência

**IEX** - Cromatografia de troca iónica

**IFN- $\gamma$**  – Interferão gama

**IL** - Interleucina

**JAK** - *Janus Associated Kinases*

**LPS** - Lipopolissacarídeo bacteriano

**MAdCAM** - Molécula de adesão da célula de adressina mucosal

**MDA** - Malondialdeído

**MPO** - Mieloperoxidase

**NF $\kappa$ B** - Fator nuclear kappa B

**NK** - Células natural killer

**PGE2** – Prostaglandina E2

**PPAR** - Recetores ativados por proliferadores de peroxissoma

**PUFA** - Ácidos gordos polinsaturados  
**RCAAP** - Repositórios Científicos de Acesso Aberto de Portugal  
**ROS** - Espécies reativas de oxigénio  
**SEC** - Cromatografia de exclusão molecular  
**Se** - Selénio  
**sIgA** - Imunoglobulina A secretora  
**TEAC** - Capacidade antioxidante equivalente trolox  
**TGF- $\beta$**  - Fator de transformação do crescimento beta  
**TLC** - Cromatografia em camada fina  
**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa  
**Trolox** - Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico  
**TYK** - Tirosina cinase  
**VEGF** - Fatores de crescimento do endotélio vascular

## 1. Introdução e Metodologia

Não se consegue precisar ao certo quando foram descobertas as doenças inflamatórias intestinais (DII), no entanto, vários relatos evidenciando sintomas que hoje sabemos ser característicos das patologias em questão, foram sendo descritos ao longo de vários anos. A colite ulcerosa (CU) foi a primeira DII a ser identificada, em 1859, por Samuel Wilks (1, 2). Anos depois, em 1932, Burrill B. Crohn, Leon Ginzburg, Gordon D. Oppenheimer, publicam o artigo “*Regional Ileitis: A Pathologic and Clinical Entity*”, que descreve pela primeira vez a Doença de Crohn (DC) (3, 4). Desde aí, vários progressos têm sido feitos no diagnóstico e no tratamento destas doenças.

Segundo a Federação Europeia das Associações da Doença de Crohn e Colite Ulcerosa (EFCCA), estima-se que em todo o mundo mais de 10 milhões de pessoas sejam afetadas pela doença inflamatória do intestino (DII), sendo que 3,4 milhões estão situadas na Europa e cerca de 25 mil em Portugal (5, 6).

A prevalência e incidência das DII tem vindo a crescer de forma exponencial ao longo dos últimos tempos. Tradicionalmente, verificava-se uma distribuição maioritariamente ocidental da doença, no entanto, isso tem se vindo a reverter, registando-se um aumento dos casos em países recém industrializados na Ásia, África e América do sul (7, 8). Tendo em conta esta tendência, podemos pressupor que a crescente urbanização e industrialização da sociedade possa contribuir para o aumento do risco de aparecimento destas doenças.

Devido à sua natureza crónica, início precoce, baixa mortalidade e elevada morbilidade, os doentes que padecem destas patologias requerem assistência médica contínua ocorrendo em encargos económicos e de cuidados de saúde consideráveis. Para além do acompanhamento prolongado, também o crescente uso da terapêutica biológica, a necessidade de intervenções cirúrgicas e de internamentos hospitalares contribuem para o aumento do custo associado à doença. Segundo um estudo publicado em 2022, em Portugal o custo total estimado foi de 146 milhões de euros anuais (considerando custos diretos e indiretos), sendo o custo médio anual por doente de DII de 6.075 euros (5).

Apesar da terapêutica eficaz disponível, é necessário cada vez mais definir novas estratégias para gestão da doença, passando por estudar novas abordagens terapêuticas, adicionais ou complementares, com melhores perfis de segurança, que permitam um maior controlo e eventual prevenção da doença. Sendo a ausência de resposta ou resposta

inadequada de alguns doentes e os efeitos indesejáveis dos fármacos usados, algumas das limitações das terapêuticas atuais.

Neste sentido, as microalgas, em virtude da sua riqueza em ácidos gordos, minerais, vitaminas e pigmentos, e outros metabolitos secundários com elevado potencial bioativo, têm sido alvo de inúmeros trabalhos de pesquisa de compostos com propriedades farmacológicas nos últimos anos. Possuem, uma vasta aplicabilidade biotecnológica que vai desde a produção de energias renováveis à indústria alimentar, cosmética, nutracêutica e farmacêutica. Considerando que muitos destes estudos apontam para a presença de compostos com atividade anti-inflamatória e potencial pré-biótico, as microalgas têm demonstrado ser uma matéria-prima promissora em estudos relacionados com a prevenção ou terapêutica das DII. Poderá assim dizer-se que as microalgas constituem uma abordagem alternativa e complementar como forma possível de impedir a proliferação de patógenos e o desenvolvimento de disbiose intestinal.

Por conseguinte, a presente dissertação, “Bioprospeção de compostos naturais de microalgas para o tratamento da doença inflamatória do intestino”, tem como finalidade realizar uma revisão bibliográfica das Doenças Inflamatórias do Intestino, com foco na doença de Crohn e Colite Ulcerosa, onde serão abordados e explorados os seguintes tópicos: a etiologia da doença, as opções terapêuticas disponíveis, a caracterização das microalgas, o processo de pesquisa de compostos bioativos em microalgas e a análise da viabilidade do uso destes microrganismos como fonte de compostos que possam constituir estratégias futuras no controlo e prevenção da DII.

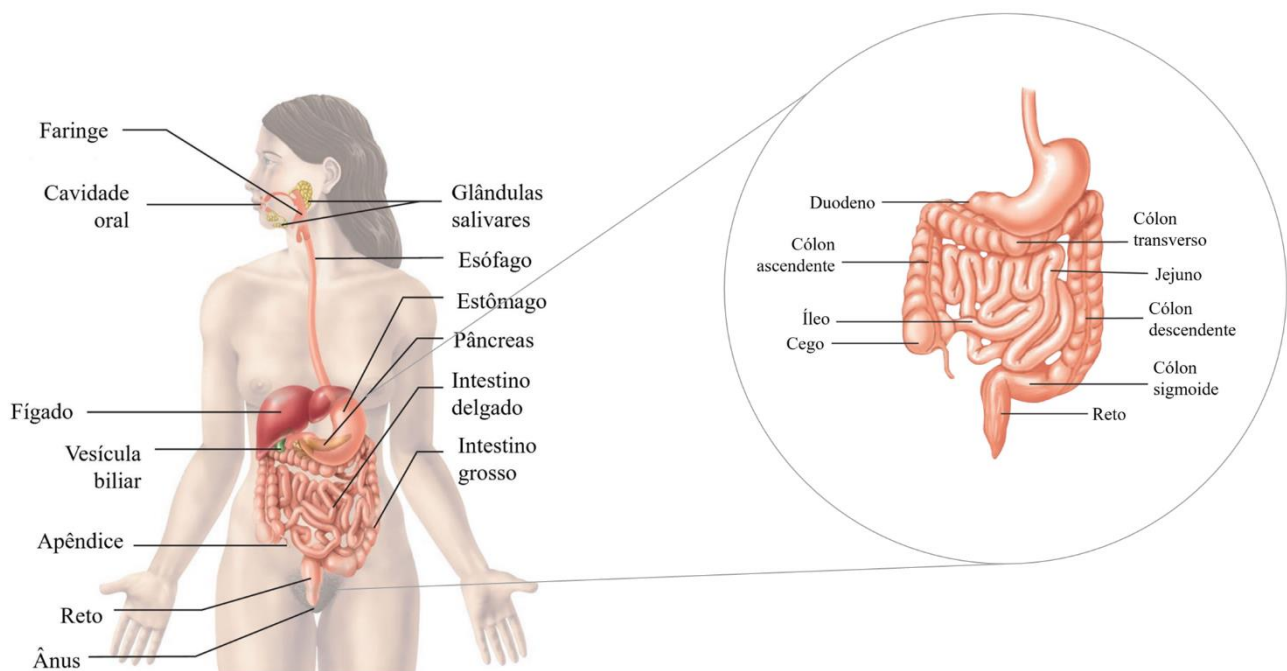
A pesquisa bibliográfica foi realizada com recurso a plataformas como Google Scholar, PubMed, ScienceDirect, MDPI, Repositórios Científicos de Acesso Aberto de Portugal (RCAAP), Serviço Comunitário de Informação sobre Investigação e Desenvolvimento (CORDIS), sites, revistas/ jornais científicos e livros de referência.

## 2. Intestino

### 2.1 Anatomofisiologia do sistema digestivo

O aparelho digestivo é composto pelo tubo digestivo, que inclui a cavidade oral, a faringe, o esôfago, o estômago, o intestino delgado, o intestino grosso e o ânus, aos quais se encontram associados as glândulas anexas, como glândulas salivares, fígado e pâncreas.

O intestino delgado é dividido em 3 porções, duodeno, jejuno e íleo. Já o intestino grosso subdivide-se no cego, cólon e reto (Figura 2.1).



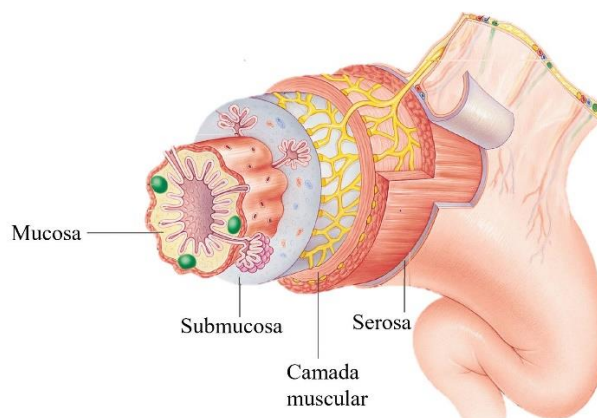
**Figura 2.1-** Anatomia do sistema digestivo. Divisões do intestino.  
Adaptado de (9)

O sistema digestivo tem como funções: a ingestão, processo através do qual os alimentos atravessam a cavidade oral; digestão mecânica e química onde as grandes moléculas orgânicas são convertidas em moléculas mais pequenas, para posterior absorção, sendo este processo potenciado pelas enzimas libertadas pelo fígado e pelo pâncreas; absorção, que consiste na passagem das moléculas já digeridas do tubo digestivo para o sistema sanguíneo e linfático, sendo que, nesta fase, são absorvidos os nutrientes, eletrólitos e água; e eliminação, onde os resíduos que não foram digeridos são excretados pelas fezes (9).

## 2.2 Mucosa Intestinal

O revestimento intestinal tem uma organização estrutural semelhante ao restante trato digestivo, dividindo-se em quatro camadas principais: mucosa, submucosa, camada muscular e serosa (Figura 2.2). A camada da mucosa apresenta várias vilosidades, microvilosidades e pregas circulares que aumentam a área de superfície de absorção disponível, uma vez que é através destas adaptações da mucosa que todas as substâncias digeridas são absorvidas.

A mucosa intestinal reveste as paredes do intestino e serve como barreira física e imunológica contra substâncias que não sejam digeríveis e substâncias nocivas provenientes do ambiente exterior, possibilitando a absorção específica de nutrientes e permitindo manter a homeostasia interna do organismo (9). São elementos como a camada externa de muco associado às bactérias comensais, as proteínas antimicrobianas (AMPs), a imunoglobulina A secretora (sIgA), a camada central de células epiteliais especializadas e a lâmina própria interna onde residem as células imunes inatas e adaptativas (como células T, células B, macrófagos e células dendríticas) que vão assegurar essa função de barreira protetora (10).

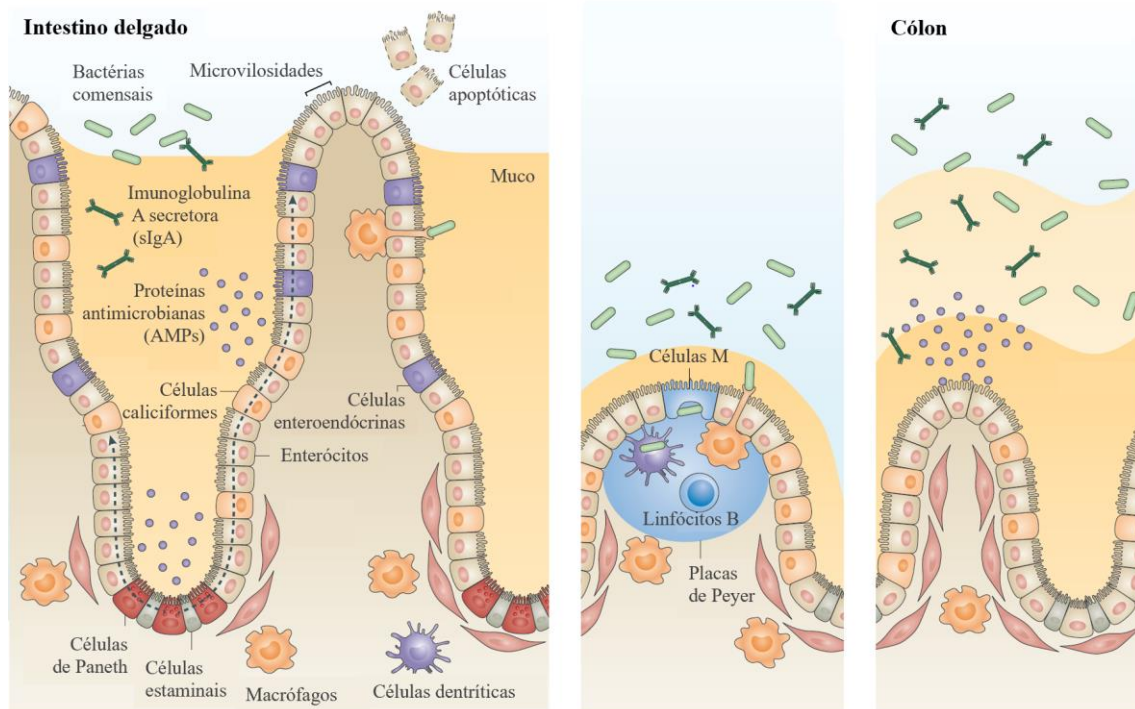


**Figura 2.2** - Histologia do tubo digestivo.  
Adaptado de (9)

O intestino delgado é revestido por um epitélio simples colunar, com cinco tipos de células principais: os enterócitos, células caliciformes, células de Paneth, células enteroendócrinas, células M e pelas células estaminais que lhes dão origem por processos de divisão, migração e diferenciação (Figura 2.3). Os enterócitos são células absorptivas, que se encontram em maior quantidade no epitélio intestinal, possuindo microvilosidades

dotadas de diversos mecanismos de transporte tanto ativo como passivo. Para além de função absorptiva e de transporte, os enterócitos são células secretoras de enzimas necessárias para a digestão terminal. As células caliciformes são responsáveis pela produção e secreção do muco protetor para revestimento da superfície epitelial. As células enteroendócrinas secretam substâncias reguladoras das funções gastrointestinais, nomeadamente a colecistoquinina (CCK) e secretina, que aumentam a atividade pancreática e biliar, e inibem a secreção e a motilidade gástrica; o polipéptido inibidor gástrico (GIP) que estimula a libertação de insulina pelo pâncreas; e a motilina que promove a motilidade. As células de Paneth contêm vesículas secretoras de proteínas antimicrobianas como a lisozima, que digere a parede de determinadas bactérias e  $\alpha$ -defensinas, homólogas dos peptídios que atuam como mediadores nos linfócitos T CD8+ citotóxicos. Devido à sua ação antibacteriana e à capacidade de fagocitar certos microrganismos, este tipo de células tem um papel crucial na regulação da flora bacteriana do intestino e na manutenção da imunidade inata da mucosa. As células M contêm micropregas, e localizam-se superiormente às placas de Peyer (acumulações de tecido linfático) estando conectadas ao espaço extracelular. Possuem micropregas na região apical cobertas por uma camada de glicocálice e uma grande quantidade de recetores de glicoproteína 2 (GP). Estes recetores ligam-se a macromoléculas específicas e são subsequentemente internalizadas em vesículas endocíticas. O seu conteúdo é posteriormente exocitado e entra em contacto com as células imunitárias aí presentes, sendo estimulado o tecido linfático associado ao intestino (GALT). Deste modo consideram-se as células M como células transportadoras de antígenos.

O epitélio do intestino grosso apresenta o mesmo tipo de células que o intestino delgado, com a exceção das células de Paneth que não existem neste epitélio, e as células caliciformes que se encontram em maior quantidade. Porém possui uma superfície “lisa”, desprovida de pregas circulares e vilosidades (11).



**Figura 2.3** - Células do epitélio intestinal.  
Adaptado de (12)

### 2.2.1 Imunidade da mucosa intestinal

A imunidade da mucosa intestinal é assegurada pelo tecido linfoide associado ao intestino (GALT), constituído pelas placas de Peyer, folículos linfoides e gânglios linfáticos mesentéricos. O sistema imunitário intestinal encontra-se separado do conteúdo do lúmen intestinal por uma única camada de células epiteliais. Este é ativado em resposta à presença de antígenos, resultando numa resposta protetora adequada ou no desenvolvimento de mecanismos de tolerância.

Perante uma situação de simbiose os microrganismos comensais que residem no intestino são reconhecidos pelo sistema imunológico sem induzir uma resposta inflamatória exacerbada. Apenas é produzida uma resposta suficiente para controlar o crescimento desses microrganismos. Ao atravessarem a barreira epitelial os metabolitos resultantes dos microrganismos comensais são reconhecidos pelas células epiteliais através dos recetores NOD2 e este reconhecimento resulta num aumento da produção de AMPs. Caso esses metabolitos atinjam a lâmina própria, são reconhecidos por células do sistema imunitário aí presentes, nomeadamente células linfoides inatas do tipo 3 (ILC3) resultando na produção de interleucina 22 (IL22) que também irá resultar num aumento

de AMPs. Esses AMPs são libertados no lúmen e em conjugação com o muco, constituem a primeira barreira, controlando a proliferação das bactérias comensais. Para além disso, os metabolitos produzidos pelos microrganismos comensais, particularmente os ácidos gordos de cadeia curta, atravessam a camada de células epiteliais e atuam sob as células dendríticas que, não sendo ativadas de forma completa, diferenciar-se-ão em células toleranogénicas que vão levar a uma menor produção de células coestimulatórias e a aumento de quantidade de fator de transformação do crescimento-beta (TGF- $\beta$ ). Este, em associação com o ácido retinóico (derivado da vitamina A), induz a diferenciação de células T regulatórias, potentes na supressão da resposta imunológica convencional, e importante na promoção de tolerância a antígenos alimentares e microrganismos comensais. Desta forma a homeostase é mantida.

Numa situação de desequilíbrio do microbioma, as células do sistema imunitário inato são capazes de reconhecer os padrões moleculares associados aos agentes patogénicos, e a célula dendrítica madura é ativada mediante a secreção de mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e IL-23, que são capazes de diferenciar células efectoras CD4<sup>+</sup> T helper 1 (TH1) e células TH17. Estas células apresentam grande capacidade inflamatória, nomeadamente através do recrutamento de neutrófilos e ativação de macrófagos. A IL-22 produzida pela TH17 induz um processo de reparação das células epiteliais (aumento da produção de péptidos antimicrobianos e aumento da função barreira) (13, 14).

### **2.2.2 Microbiota intestinal**

A microbiota intestinal é composta por mais de 100 triliões de microrganismos de diferentes espécies (estando na sua grande maioria presentes no intestino), desde bactérias, fungos, vírus e protozoários, que vivem em simbiose com o ser humano, ou seja, numa relação de cooperação com benefícios mútuos. Atualmente sabe-se que numa microbiota intestinal saudável, há um domínio de 4 filos principais: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. Sendo que os filos Firmicutes e Bacteroidetes representam 90% das espécies bacterianas intestinais (15). O filo Firmicute divide-se em duas grandes classes de bactérias gram-positivas, Bacilli e Clostridia. O filo Bacteroidetes é composto por bactérias gram-negativas, entre as quais o género *Bacterioides* que representa um dos géneros mais abundantes do intestino (16).

Esta microbiota é essencial para manter a homeostase do organismo. Tem como funções: nutrição, pela absorção de minerais (magnésio, cálcio e ferro); produção de vitaminas (sobretudo vitamina k e ácido fólico); digestão de fibras, com consequente produção de ácidos gordos de cadeia curta; regulação do metabolismo; defesa, de forma a manter a integridade da parede intestinal para proteção contra microrganismos invasores, através da barreira mucosa, pela degradação de compostos tóxicos, e pela modulação da resposta imune; e neurológica uma vez que tem influência na função cerebral (17, 18).

Não se consegue definir de forma exata a composição da microbiota, uma vez que difere de indivíduo para indivíduo e depende de vários fatores. Nomeadamente, o período gestacional através da placenta, o tipo de parto (natural ou cesariana) e o tipo de amamentação. Por norma esta relação simbiótica é estabelecida durante os primeiros 2/3 anos de vida, a partir dos quais acaba por estabilizar, permanecendo constante durante grande parte da vida do hospedeiro. No entanto, fatores como a idade, ambiente, genética, estilo de vida, alimentação (19), stress e até mesmo medicação, como os antibióticos, podem fazer com esta se altere no decorrer da vida (15). Alterações da microbiota, situação à qual se dá o nome de disbiose, podem desempenhar um papel importante no aparecimento ou agravamento de determinadas doenças, nomeadamente aterosclerose, autismo, doenças metabólicas (diabetes mellitus e obesidade), artrite reumatoide e doenças inflamatórias intestinais, que são o foco desta dissertação. A disbiose surge, por norma, em situações de diminuição das bactérias comensais, crescimento de bactérias potencialmente patogénicas ou quando há decréscimo da diversidade da microbiota intestinal. No caso das DII, verifica-se uma diminuição do número de bactérias pertencentes ao filo Firmicutes e em oposição há um aumento do número de espécies do filo Bacteroidetes (20).

### **3. Inflamação**

#### **3.1 Definição**

A inflamação é uma resposta protetora normal por parte do organismo, e surge com o principal objetivo de eliminar a causa da lesão celular e de iniciar a reparação dos tecidos. Pode advir do trauma físico, agentes químicos, agentes microbiológicos ou ainda da ativação imprópria do sistema imunitário (21).

O processo inflamatório é induzido pelas células de defesa do hospedeiro (mediadores químicos) em resposta a um estímulo nocivo e manifesta-se através dos chamados sinais cardinais, descritos por Aulus Cornelius Celsus há mais de 2000 anos, sendo eles: rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), dor e calor. Mais tarde, no século XIX, Rudolf Vichow, “pai da patologia moderna”, acrescenta ainda um quinto sinal: a perda de função (22). A inflamação pode ser classificada como aguda ou crônica.

#### **3.2 Inflamação aguda**

A inflamação aguda é iniciada em resposta a estímulos como infecções (por bactérias, vírus, fungos e parasitas), trauma químico ou físico, necrose tecidual e reações de hipersensibilidade. Tem início imediato, é ligeira e autolimitada com uma duração de poucos dias. A resposta inflamatória aguda dá-se através do recrutamento de células do sistema imunitário para eliminação do agente patogénico e reparação tecidual, permitindo restringir o dano gerado ao local afetado.

Este tipo de inflamação ocorre logo após o dano no tecido, partindo da ativação das proteínas plasmáticas, incluindo as da cascata da coagulação. A cascata da coagulação culmina na formação de filamentos de fibrina que formam coágulos limitando a passagem da infecção para o sangue. Adicionalmente os produtos do sistema complemento C3a e C5a ligam-se aos recetores dos mastócitos, contribuindo para a desgranulação dos mesmos. Assim dá-se a libertação de histaminas, prostaglandinas e leucotrienos que promovem a vasodilatação e aumentam a permeabilidade vascular, com consequente aumento da circulação de proteínas plasmáticas. As prostaglandinas e os leucotrienos em particular levam à quimiotaxia dos neutrófilos, que ao atingirem o endotélio do tecido danificado sofrem diapedese. De seguida, vão ter um papel crucial na remoção do agente patogénico por fagocitose. Para além disso, atraem os macrófagos ao libertarem quimiocinas. Estes macrófagos, aquando da sua ativação, secretam citocinas pró-

inflamatórias (IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )) que amplificam a reação inflamatória, sendo que a IL-1 e o TNF- $\alpha$  alargam a expressão das moléculas de adesão no endotélio, permitindo a diapedese de mais células efetoras para o local (23).

Após a eliminação do agente nocivo, há uma diminuição da reação, controle da resposta e reparação do tecido lesado. Caso o agente lesivo e a lesão persistam, a inflamação aguda pode progredir para inflamação crónica.

### **3.3 Inflamação crónica**

A inflamação crónica pode surgir em quadros de infeções persistentes, doenças inflamatórias imuno-mediadas (como é o caso das DII), exposição prolongada a agentes nocivos e doenças cancerígenas. A inflamação crónica tem início tardio, é acentuada, progressiva e prolongada no tempo, que pode ir de meses a anos. É caracterizada pela presença de uma inflamação constante e pelo influxo de linfócitos e macrófagos ativos que se acumulam e libertam mediadores solúveis (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e espécies reativas de oxigénio (ROS)) destruindo progressivamente os tecidos e resultando na morte celular. A inflamação crónica pode ainda levar à acumulação de granulomas, massas de macrófagos e linfócitos ativados, cujo objetivo é capturar/encapsular microrganismos estranhos que atinjam esta camada.

As espécies reativas de oxigénio, são moléculas com um ou mais eletrões desemparelhados, que advêm de processos metabólicos normais do nosso organismo e em baixas quantidades são fundamentais para a nossa saúde, sendo capazes de estimular o sistema imunitário e produzir efeitos benéficos. No entanto, quando não existe um equilíbrio entre a quantidade das ROS e compostos antioxidantes, ou seja, quando existem ROS em excesso, leva ao chamado stress oxidativo, que causa dano nas células, tecidos, lípidos, proteínas e DNA. Este dano celular a longo prazo leva à inflamação crónica e pode contribuir para o aparecimento ou da progressão de doenças como a diabetes, doenças cardíacas, cancro e doenças inflamatórias intestinais (24).

A reposição do tecido danificado é feita através dos fibroblastos, originando fibrose, devido à acumulação de fatores de crescimento como as citocinas fibrogénicas (IL-1 e TNF- $\alpha$ ), e fatores angiogénicos (fatores de crescimento dos fibroblastos - FGF - e do endotélio vascular - VEGF) (23).

## **4. Doença Inflamatória do Intestino**

As doenças inflamatórias do intestino são doenças inflamatórias crônicas do tubo digestivo que resultam numa resposta exacerbada por parte do sistema imunitário. São condições patológicas idiopáticas, uma vez que não se conhece a etiologia exata. Afeta principalmente jovens/adultos com idades compreendidas entre os 15 e os 35 anos, embora possa surgir em qualquer idade. É também independente do sexo, uma vez que afeta mulheres e homens em proporções semelhantes. Englobam duas patologias principais, a Colite Ulcerosa e a Doença de Crohn (25). Apesar de apresentarem características distintas, ambas exibem um padrão de alternância entre períodos de agravamento, em que maior dano é causado, e períodos de remissão quando o tecido começa a regenerar e há ausência de sintomas. Embora sem causa específica associada, pensa-se que uma combinação de fatores como predisposição genética, disbiose intestinal, e desregulação imunológica, possam estar na origem destas doenças (26, 27).

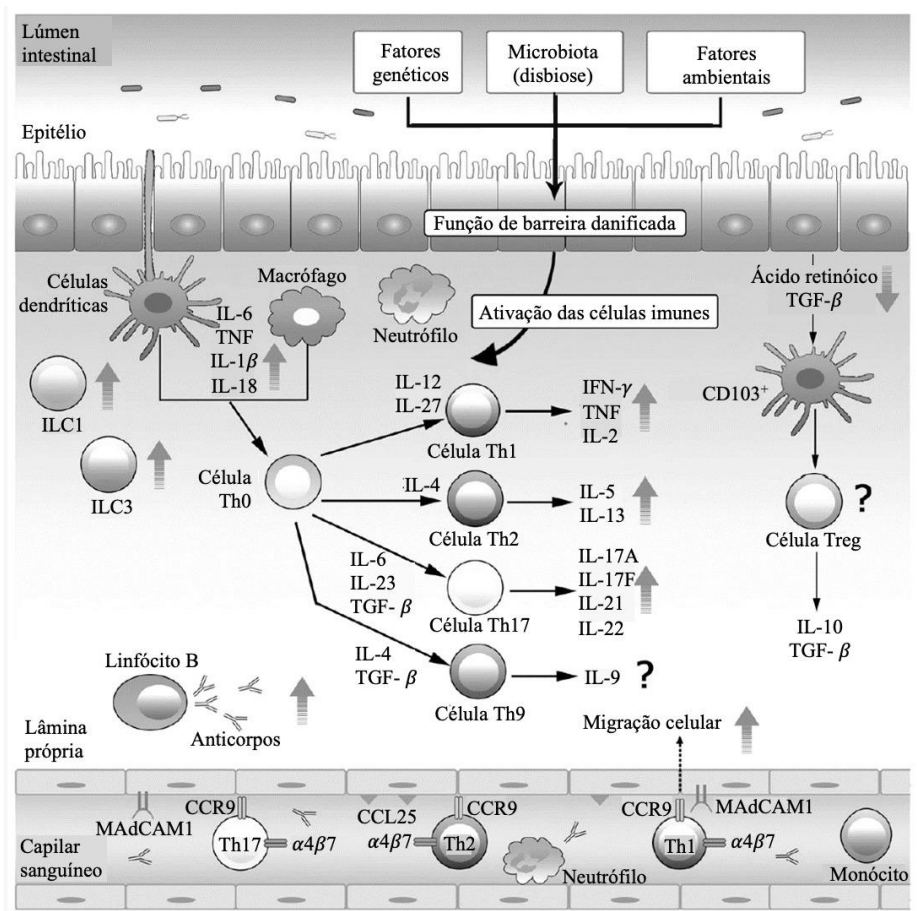
Apesar de não ser fatal, tem grande impacto na qualidade de vida, por isso um diagnóstico atempado e o estabelecimento de um tratamento precoce adequado podem alterar o decorrer natural da doença. Manifestações clínicas de DII incluem diarreia, com/sem a presença de muco (se as células do intestino grosso estão afetadas perdem a capacidade de reabsorver água e mais água é excretada levando à diarreia), hemorragia retal (sangue surge dos danos causados no tecido da parede intestinal), dor abdominal, fadiga, febre, perda de peso e de apetite, anemia, desejo urgente de evacuar, e má absorção (se as células do intestino delgado são as afetadas, podem surgir problemas de má-absorção, uma vez que o intestino delgado tem uma grande importância na absorção dos nutrientes). Manifestações extraintestinais podem ser desenvolvidas em casos mais graves da doença, como dores em articulações, e problemas de pele, e olhos (25).

### **4.1 Patogénese**

Perante uma alteração desfavorável da mucosa intestinal, há aumento da permeabilidade, possibilitando a passagem de microrganismos patogénicos. Desta forma, o sistema imunitário é ativado pela apresentação do antígeno e é gerada uma resposta inflamatória desregulada e exacerbada, levando a um aumento da inflamação e consequente destruição das células da mucosa intestinal. São também ativados os

linfócitos da mucosa, conduzindo a um aumento de produção de citocinas pro inflamatórias originando danos no trato gastrointestinal (28).

No caso da doença de Crohn, observam-se níveis aumentados das IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$  e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), o perfil de citocinas característico da via TH1. Por outro lado, a colite ulcerosa é mediada maioritariamente pela via TH2, com envolvimento da IL-4 e IL-13. Outra via importante é a TH17, com produção das citocinas pro inflamatórias IL-23, IL-17, IL-21, IL-22 e IL-26 (Figura 4.1) (23, 29, 30).



**Figura 4.1-** Patogênese da doença inflamatória intestinal.  
Adaptado de (31)

## 4.2 Doença de Crohn

A doença de Crohn, caracteriza-se por áreas de inflamação descontínuas (alternância entre áreas de tecido saudável e áreas afetadas, com uma aparência cobblestone/ “pedra de calçada”), em que qualquer parte do trato gastrointestinal pode ficar comprometido, desde a boca até ao ânus, no entanto, as áreas mais frequentemente

afetadas são o íleo e o colon. Esta é uma doença inflamatória crônica transmural uma vez que pode atingir todas as camadas da parede intestinal. Na doença de Crohn, para além da sintomatologia já anteriormente referida, podem surgir complicações que incluem, fissuras, fistulas e abscessos na região perianal (32, 33).

### **4.3 Colite Ulcerosa**

A inflamação, na colite ulcerosa, afeta o intestino grosso de forma contínua (estende-se desde o reto até aos segmentos proximais do cólon) e apenas são atingidas as camadas mais superficiais do intestino, a mucosa e a submucosa. Como resultado desta inflamação, surgem pequenas lesões na mucosa, as chamadas úlceras.

No caso da colite ulcerosa, caso as opções de tratamento falhem, pode ser considerada a opção cirúrgica, a colectomia. Uma vez que nesta patologia apenas o intestino grosso é afetado, a remoção cirúrgica do mesmo leva à cura da doença. No entanto deve ser sempre feita uma avaliação risco-benefício (34-36).

### **4.4 Abordagens Terapêuticas**

Uma vez que não existe uma cura para as DII, o tratamento atual tem como principal objetivo controlar a sintomatologia, reduzir a inflamação, promover a cicatrização endoscópica, e induzir remissão da doença e consequente manutenção, de forma a evitar a progressão da doença e aumentar a qualidade de vida do paciente. Só desta forma é possível evitar complicações posteriores, como internamentos e tratamentos cirúrgicos, no caso de existirem complicações não passíveis de tratamento farmacológicos. Para isso, é essencial que haja um equilíbrio entre as terapêuticas não farmacológicas e farmacológicas disponíveis. De forma a estabelecer objetivos e planos terapêuticos adaptados a cada indivíduo, é necessário ter em consideração fatores como idade do paciente, a extensão e gravidade da doença e a sintomatologia que apresenta. É fundamental que esta caracterização seja feita o mais cedo possível, uma vez que o diagnóstico precoce permite delinear uma melhor estratégia de tratamento logo à partida e obter remissões mais sustentadas no tempo.

Após o estabelecimento do plano terapêutico é imprescindível uma monitorização contínua por parte das equipas de saúde interdisciplinares, para garantir eficácia, adesão

à terapêutica e evitar progressão da doença. Esta monitorização pode ser feita através de exames laboratoriais, para quantificação de biomarcadores relevantes da patologia em questão (como a calprotectina fecal) (37), exames endoscópicos, imagiológicos e histológicos.

#### **4.4.1 Terapêutica não farmacológica**

As medidas não farmacológicas têm um papel crucial, no controlo do equilíbrio da microbiota intestinal e na manutenção dos estados de remissão da doença inflamatória intestinal. Estas medidas passam maioritariamente por recomendações ao nível da dieta e estilos de vida. Dada a fraca absorção de proteínas, gorduras, água, vitaminas e minerais, característica neste tipo de doenças, ter uma alimentação completa, equilibrada, variada e com o aporte adequado de calorias, é imprescindível, para evitar estados de desnutrição (38).

Atualmente, não existem evidências que comprovem a associação de certos alimentos à causa das DII, sendo que a maioria das pessoas tolera todo o tipo de alimentação (39). No entanto, é necessário ter atenção às intolerâncias alimentares (ex. à lactose, sacarose, ou glúten), que em determinadas pessoas parece desencadear crises, e diminuir o tempo de remissão, devendo, nestes casos, restringir-se a sua ingestão (40). É de salientar que nos períodos de crise é recomendada a restrição de fibras, com diminuição do consumo de fruta, vegetais, sementes, leguminosas, cereais e cafeína. Nestes casos, aconselha-se ainda uma alimentação à base de líquidos, e a ingestão de pequenas porções ao longo do dia, de forma a minimizar as cólicas abdominais (41). A cessação tabágica e evitar o consumo álcool e substâncias irritantes da mucosa são outras recomendações comuns no controlo das DII (42). A consulta de nutrição clínica permite, através da avaliação do estado nutricional do doente e tendo em consideração a fase da doença onde este se encontra, estabelecer um plano nutricional adaptado, assumindo um papel fundamental de complemento à terapêutica instituída.

Para além dos aspetos nutricionais, já há estudos que sugerem a associação da prática de exercício físico regular a uma melhor evolução da doença inflamatória intestinal. Através da melhoria da densidade óssea (que por vezes se encontra diminuída neste tipo de patologias), o aumento da massa muscular e da sensação de bem-estar contribuem para a diminuição dos níveis de stress e ansiedade, habitualmente aumentados

em pacientes com DII (43). Da mesma forma, terapias cognitivo-comportamentais, como meditação, yoga, técnicas de respiração, entre outras e ainda ritmos de sono regular, demonstram ter um impacto positivo na qualidade de vida de um doente com DII (44). Neste campo a consulta de psicologia clínica direcionada para doentes com DII, tem um papel fundamental na gestão emocional da doença e de tudo o que esta acarreta (45).

#### 4.4.2 Suplementação

Nas doenças inflamatórias intestinais, a capacidade de absorção de nutrientes pelo organismo encontra-se diminuída devido ao comprometimento do trato gastrointestinal, efeitos adversos à terapêutica instituída, má ingestão oral ou complicações como a anemia e osteoporose. Todos estes fatores contribuem para um possível défice nutricional (38, 46).

O aporte de nutrientes conseguido através da alimentação pode não ser suficiente, sendo, nestes casos, necessário considerar o recurso à suplementação, de forma a colmatar essa carência nutricional e evitar perda de peso futura, estados de desnutrição e hospitalizações. De uma forma geral os suplementos mais utilizados são: ferro; zinco; cálcio; vitaminas D, B12, A, E, K; ácido fólico (Quadro 4.1) (47, 48).

**Quadro 4.1-** Suplementação de micronutrientes nas DII.

<b>Suplemento</b>	<b>Aplicação nas DII</b>
<b>Ferro</b>	Em situações de perdas sanguíneas, recorrentes nas DII, evita défice de ferro e possíveis quadros de anemia (49).
<b>Cálcio</b>	Especialmente utilizado em doentes que recorram a corticoterapia, uma vez que estes fármacos diminuem a absorção de cálcio intestinal. Evita complicações, como osteoporose e osteopenia.
<b>Ácido Fólico</b>	Casos em que se observam níveis diminuídos, pelo uso de fármacos como a sulfassalazina e o metotrexato, uma vez que estes interferem na sua absorção (50).

---

**Zinco**

Reposição dos níveis de zinco, na inflamação intestinal agravada pelas diarreias intensas ou prolongadas, ostomias e fístulas anais (51).

---

**Vitaminas D,  
B12, A, E, K**

Doentes em que se verificam níveis diminuídos de vitamina D, B12, A, E, K, suplementação específica das vitaminas em défice. Em dietas vegetarianas e vegans, o défice da vitamina B12 está aumentado. (52)

---

Atualmente já existem alguns estudos com resultados promissores em relação à suplementação com curcumina e ómega-3, que resultaram no aumento da atividade anti-inflamatória na mucosa lesada e consequente melhoria do estado clínico (53-55).

Devido à associação entre inflamação crónica e danos oxidativos causados pela ocorrência de stress oxidativo, a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes ou suplementos alimentares contendo antioxidantes naturais como os polifenólicos (pe., quercetina, catequinas e antocianinas), vitaminas (pe., vitamina E e C) e minerais antioxidantes como o selénio (Se) têm revelado efeitos benéficos na gestão das DII (56).

Quando as necessidades nutricionais não são conseguidas através da via oral, pode ser necessário recorrer à nutrição entérica e em última instância à parentérica (40). Através de análises anuais é possível monitorizar os micronutrientes, verificar se os padrões alimentares estão a ser adequados e iniciar suplementação quando necessário, sendo que o início de suplementação deve ser decidido pela equipa de saúde multidisciplinar que acompanha o doente. Contudo é importante salientar que atualmente não existe evidência científica suficiente que suporte a suplementação nas DII (57).

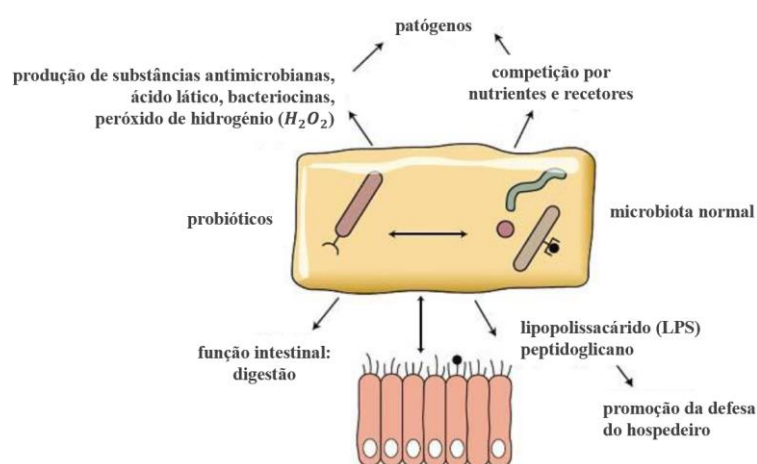
#### **4.4.3 Probióticos, Prebióticos e Simbióticos**

Como já foi referido anteriormente, a relação entre a microbiota intestinal e as DII é clara. Perante isto sabemos que uma possível ferramenta terapêutica é a modulação da microbiota intestinal, recorrendo ao uso de prebióticos, probióticos e simbióticos, que têm um papel protetor do trato gastrointestinal, auxiliando a reverter a disbiose através do controlo da proliferação de algumas estirpes prejudiciais e aumento das benéficas (58).

Segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia, podemos definir Probióticos como “*Microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro*”; Prebióticos como “*Ingredientes seletivamente fermentados que resultam em alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota intestinal, conferindo assim benefícios à saúde do hospedeiro*” e Simbióticos como uma “*mistura que engloba microrganismos vivos e substrato(s) utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros, que conferem benefício à saúde do hospedeiro*” (59).

De uma forma geral os prebióticos parecem ter uma ação na modulação da microbiota, melhorando a função de barreira intestinal e estimulando microrganismos específicos do trato gastrointestinal. Estas ações benéficas, são especialmente úteis em atividades ligeiras da doença e na manutenção da remissão (60). Os oligossacarídeos, fruto-oligossacáridos (FOS), Galacto-oligossacáridos (GOS), e a inulina são as classes de prebióticos mais utilizados nas DII (61).

Dos estudos realizados, apenas os probióticos demonstraram benefícios em casos específicos (62). Os probióticos podem ser encontrados associados a alimentos, na forma de suplementos alimentares ou mesmo como medicamentos e atuam de forma a modular o ecossistema intestinal, afetando os mecanismos imunológicos da mucosa mediante a interação com os microrganismos comensais ou potencialmente patogênicos, para prevenir a colonização de microrganismos oportunistas, diminuir a inflamação e regular a resposta imune por parte do organismo (Figura 4.2).



**Figura 4.2-** Mecanismo de ação dos probióticos.  
Adaptado de (59)

A escolha da(s) estirpe(s) é de extrema importância. A evidência na utilização dos probióticos nas DII apenas é sustentada em estirpes com alvos gastrointestinais específicos, por isso, devem ser selecionadas mediante esse critério (63, 64).

Nas DII, segundo ensaios realizados, os probióticos que demonstram ter algum efeito benéfico, na indução da remissão da doença (65), são: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (66), *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) (67, 68), *Bifidobacterium infantis* 35624, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS DSM 7067, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 DSM 15954 (69).

Contudo, é importante ressaltar que apesar de representarem uma terapêutica segura, sem contraindicações e praticamente isenta de riscos, os estudos nesta área ainda são limitados, não existindo evidência científica atual que justifique a utilização de probióticos, prebióticos e simbióticos por períodos prolongados (70).

#### **4.4.4 Farmacoterapia**

A farmacoterapia das DII inclui a terapêutica convencional, que engloba três classes farmacoterapêuticas distintas, anti-inflamatórios intestinais, glucocorticoides e imunomoduladores e a terapêutica biológica, que inclui os medicamentos biológicos. Fármacos adjuvantes e a antibioterapia, podem também ser necessários em determinadas situações. Desta forma, a abordagem terapêutica passa por “silenciar” o sistema imunológico, de forma a controlar a inflamação, promover a cicatrização das lesões da mucosa e controlar a sintomatologia (23, 25, 46, 71-73). Neste sentido, após a seleção do alvo terapêutico é elaborado o plano de tratamento farmacológico mais adequado à situação.

##### **4.4.4.1 Anti-inflamatórios intestinais**

Os aminosalicilatos, que estão incluídos na classe farmacoterapêutica dos anti-inflamatórios intestinais, são fármacos derivados do ácido 5-amino salicílico (5-ASA). Atualmente, são considerados fármacos de primeira linha no tratamento de formas ligeiras a moderadas da colite ulcerosa e doença de Crohn (74). No caso da CU, demonstram ser efetivos não só na indução e manutenção da remissão como ainda na

prevenção de recorrências. Já no caso da DC, demonstram eficácia na manutenção dos estados de remissão, mas são ineficazes na indução da mesma.

Dentro desta classe de fármacos incluem-se a messalazina e a sulfassalazina (pro-fármaco, que após absorção intestinal sofre clivagem originando dois metabolitos, a sulfapiridina e o metabolito ativo a messalazina). Embora ainda sem mecanismo de ação totalmente compreendido, estes fármacos parecem ter efeito anti-inflamatório tópico nas células epiteliais do cólon. Esta diminuição da inflamação engloba vários tipos de interações, por um lado, pensa-se que advém do bloqueio da ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase com conseqüente inibição da produção de prostaglandinas e leucotrienos, envolvidos na resposta pro-inflamatória, ao nível do cólon. Apresenta ainda o potencial de ativação dos recetores ativados por proliferadores do peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ), levando a uma resposta anti-inflamatória que inclui a diminuição da ativação do fator nuclear kappa B (NF  $\kappa$  B), um fator de transcrição nuclear que está diretamente envolvido com a expressão dos genes pro-inflamatórios, logo diminui a produção de citocinas pro-inflamatórias essenciais (75, 76).

Em geral, estes fármacos são bem tolerados sendo que uma das vantagens da sua utilização é o facto de apresentarem menos efeitos adversos ou estes serem de menor gravidade. Os efeitos adversos mais frequentes incluem dispepsia, náuseas, vômitos, diarreia, cefaleias e erupções cutâneas. A administração pode ser oral ou retal (28, 77).

#### **4.4.4.2 Glucocorticóides**

Os corticosteroides são usados principalmente em períodos de exacerbação da doença e em situações em que não existe resposta aos aminosalicilatos. Estes tipos de fármacos difundem-se através das membranas celulares e ligam-se aos recetores citoplasmáticos; estes entram nos núcleos celulares e através da sua ligação ao ADN estimulam a síntese de mediadores pro-inflamatórios (78). Outra ação importante é a inibição da atividade da fosfolipase A2 com conseqüente diminuição da produção de prostaglandinas e leucotrienos (78, 79). Nunca são usados de forma crónica, apenas em situações de crise, constituindo um tratamento de curta duração, na indução dos estados de remissão e nunca como manutenção devido ao seu potencial elevado para a ocorrência de efeitos adversos (72). Estes estão diretamente relacionados com a dose administrada e duração da terapêutica, estando maioritariamente associados a tratamentos com doses

elevadas num uso prolongado. São eles osteoporose, uma vez que a absorção e excreção de cálcio é afetada, hipertensão arterial, hiperglicemia, hipocalcemia, hirsutismo, imunossupressão, distúrbios emocionais, aumento do apetite, edema periférico, cataratas, glaucoma, diminuição do crescimento em crianças, aumento do apetite, modificação da aparência física (face de lua cheia, pescoço búfalo) (79). O tipo de administração, tópica ou sistêmica, dependendo da severidade da doença em causa. Apesar de existirem pacientes que respondem à terapêutica com corticosteroides, alguns tornam-se resistentes ou dependentes deste tipo de terapêutica (80).

#### 4.4.4.3 Imunomoduladores

Normalmente, são usados em situações em que os corticosteroides não são tolerados ou estão contraindicados (81). A azatioprina, o metotrexato, a ciclosporina e o tacrolímus são alguns dos imunomoduladores usados nas DII (Quadro 4.2).

**Quadro 4.2** - Medicamentos Imunomoduladores utilizados no tratamento das DII, os seus mecanismos de ação e observações relevantes.

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Observações</b>
<b>Azatioprina</b>	Pertence à classe das tiopurinas, esta é convertida em 6-mercaptopurina (6-MP). A 6-MP atravessa as membranas celulares e é transformada em análogos da purina que são incorporados na estrutura dos ácidos nucleicos interferindo na sua síntese e inibindo a proliferação de linfócitos (82-84).	Efeitos adversos: depressão da medula óssea, leucopenia, aumento do risco de infeções. Usada na manutenção da remissão.
<b>Metotrexato</b>	Antagonista do ácido fólico atuando como agente imunomodulador e anti-inflamatório, através da inibição competitiva da enzima di-hidrofolato redutase e consequente inibição da síntese do ADN (85).	Efeitos adversos: estomatite, dispepsia, náuseas, perda de apetite, dor abdominal, hepatotoxicidade, leucopenia. Contraindicado em grávidas, uma vez que possui atividade teratogénica (86).

---

Por norma, é bem tolerado.  
Disponível em solução injetável.

**Ciclosporina,  
Tacrolímus**

Inibidores da calcineurina, são potentes imunossupressores. Mecanismo de ação tem por base inibição seletiva da calcineurina importante fator de regulação envolvido na transcrição de diversos genes de citocinas, sendo esta transcrição inibida, não há produção de interleucinas, nomeadamente a IL-2 o que leva à redução da proliferação de células T (87).

Efeitos adversos: tremores, cefaleias, nefrotoxicidade, hipertensão arterial, hiperglicemia, distúrbios gastrointestinais, risco de infeções (88).

#### **4.4.4.4 Medicamentos Biológicos**

Os medicamentos biológicos são tratamentos inovadores, em que a substância ativa é produzida ou extraída de uma fonte biológica. Em oposição aos fármacos convencionais os biológicos são moléculas de grandes dimensões, complexas, de difícil caracterização e reprodução devido à grande variabilidade que apresentam no processo de produção (89, 90). Nas DII estes fármacos são usados em estados mais avançados da doença (moderada a grave), tanto na indução como na manutenção da remissão. Por norma, são apenas considerados quando as terapêuticas anteriores não foram toleradas ou apresentaram efeitos adversos graves e complicados de gerir.

Como já referido anteriormente as DII resultam de uma atividade exacerbada do sistema imunitário, assim, de uma forma geral, os medicamentos biológicos vão atuar de forma a bloquear parte desta ação, reduzir a inflamação e melhorar os sintomas. Dependendo da classe a que pertencem vão ter diferentes formas de ação (91). Atualmente existem seis fármacos biológicos disponíveis para o tratamento das DII. São eles: Infliximab, Adalimumab, Golimumab, Vedolizumab, Ustekinumab, Tofacitinib (Quadro 4.3). Sendo que nem todos estão indicados para ambas as condições.

**Quadro 4.3** - Medicamentos Biológicos usados no tratamento das DII. Exemplos e mecanismos de ação.

<b>Classificação farmacoterapêutica</b>	<b>Exemplo de fármacos</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
<b>Inibidores do Fator de Necrose Tumoral alfa (Anti-TNF)</b>	Infliximab, Adalimumab, Golimumab	Têm como alvo a proteína TNF- $\alpha$ , citocina pró inflamatória, à qual se vão ligar especificamente, bloqueando a sua interação com o recetor e reduzindo a inflamação intestinal.
<b>Inibidores da Interleucina 12 e 23 (Anti-interleucina)</b>	Ustekinumab	Ligam-se às IL-12 e IL-23 humanas (mais especificamente à subunidade p40), citocinas que ativam as vias Th1e Th7, impedindo a sua ligação aos respetivos recetores e inibindo a sua bioatividade, levando à redução do processo inflamatório (92, 93).
<b>Inibidor da família Janus Associated Kinases (JAK)</b>	Tofacitinib	Imunossupressor que inibe as JAK1, JAK2 e JAK3 e, em menor extensão, a tirosina cinase 2 (TyK2), atenuando a sinalização de interleucinas e de interferões que resulta na modulação da resposta imunitária e inflamatória (94).
<b>Inibidor da Integrina <math>\alpha 4\beta 7</math> (Anti-integrina)</b>	Vedolizumab	Liga-se especificamente à integrina $\alpha 4\beta 7$ , expressa em linfócitos T adjuvantes alojados no intestino, inibindo a adesão destas células á molécula-1 de adesão da célula de adressina mucosal (MAdCAM-1), também expressa nas células endoteliais do intestino, consequentemente diminui a inflamação gastrointestinal característica das DII. Assim sendo o Vedolizumab, é considerado um imunossupressor seletivo do intestino (95).

Uma vez que vão atuar como imunossupressores, apresentam riscos elevados no desenvolvimento de infeções (96). E uma vez que o modo de administração é por injeção

intravenosa ou subcutânea, reações no local da injeção são também reações adversas comumente descritas. Não são eficazes de igual forma para todas as pessoas, sendo que, antes da decisão de iniciar um tratamento com fármaco biológico, deve ser feito um balanço entre os potenciais riscos e benefícios. Uma vez que, por norma, este tipo de tratamentos perde efeito com o decorrer do tratamento, pode ser necessária alteração de doses, associação de outra medicação ou ainda alteração do biológico (91).

#### **4.4.4.5 Antibióticos**

Perante a evidência atual, conclui-se que o uso de antibióticos apenas é recomendado em casos de complicação da doença por infecção (abscessos, crescimento descontrolado de bactérias) ou fístulas perianais (71). Assim a antibioterapia vai ter um papel importante no reequilíbrio da microbiota. Alguns dos antibióticos que demonstraram ter efeito nestas situações são ciprofloxacina, rifaximina, azitromicina, metronidazol (97).

#### **4.4.4.6 Medicação adjuvante**

Paralelamente aos fármacos referidos anteriormente existem medicamentos usados no alívio dos sintomas. Fármacos que vão atuar no alívio da dor, analgésicos como o paracetamol, e anti-inflamatórios não esteroides, devido aos efeitos adversos que apresentam, devem ser evitados de forma a não agravar a condição (98). Antiespasmódicos como a butilescopolamina e a mebeverina, que atuam na musculatura lisa do trato gastrointestinal, proporcionam alívio do desconforto abdominal associado aos espasmos (99).

Embora seja menos comum, podem ocorrer períodos de obstipação, sendo nessas situações necessário o uso de laxantes osmóticos (macrogol) ou laxantes expansores do volume fecal (fibra vegetal) (100). Em situações de diarreia, frequente neste tipo de patologias, podem ser usados antidiarreicos, como a loperamida.

#### **4.4.5 Necessidade de novas opções terapêuticas**

Sendo a DII uma doença sem cura e para a qual não existe atualmente nenhum tratamento totalmente eficaz, uma vez que nem todos os doentes respondem de forma positiva e durante o mesmo período e alguns dos tratamentos atuais apresentam efeitos indesejáveis severos, surge a necessidade emergente de identificar e desenvolver novas abordagens terapêuticas, menos agressivas, invasivas e dispendiosas, que ajudem a complementar as já existentes assim como novas estratégias da sua aplicação.

Uma das possibilidades é a utilização de microalgas, uma vez que estas possuem compostos anti-inflamatórios de elevado interesse que podem vir a constituir estratégias terapêuticas futuras de tratamento e/ou prevenção. Estes compostos bioativos podem ser efetivos no tratamento da doença através da modulação da microbiota, no tratamento e prevenção da inflamação e ainda no tratamento da dor.

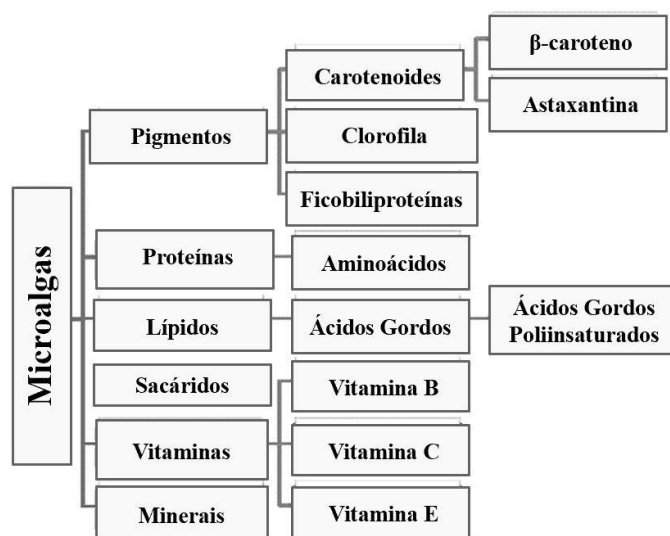
## 5. Aplicação das Microalgas no tratamento e prevenção das Doenças Inflamatórias do Intestino

### 5.1 Microalgas

As microalgas são microrganismos que vivem em ambiente aquático, já existem há mais de 2400 milhões de anos e constituem a base da cadeia alimentar. São seres vivos unicelulares, procariotas ou eucariotas. Sendo seres fotossintéticos desempenham um papel fundamental no nosso planeta ao gerar uma atmosfera respirável que o torna habitável. São microrganismos morfológicamente dinâmicos com um amplo intervalo de diâmetros que pode chegar aos 200  $\mu\text{m}$  (101, 102). Têm elevada capacidade adaptativa, sendo capazes de sobreviver em diversos ambientes, inclusive em condições extremas, como desertos, fontes hidrotermais, etc. Atualmente estão descritas mais de 40 000 espécies de microalgas (103).

Em relação à sua composição, esta é formada por uma vasta quantidade de compostos como: proteínas; lípidos, com destaque para os ácidos gordos polinsaturados (PUFA); polissacarídeos; vitaminas; minerais e pigmentos, como carotenoides, clorofila e ficobiliproteínas (Figura 5.1) (104).

Esta abundância em compostos bioativos, faz das microalgas organismos de elevado interesse com diversas aplicações possíveis, desde a produção de energias renováveis à indústria alimentar, cosmética, nutracêutica e farmacêutica.



**Figura 5.1-** Compostos bioativos provenientes das microalgas.  
Adaptado de (105)

De acordo com a literatura atual os metabolitos provenientes das microalgas, já descritos anteriormente, demonstram ter efeitos benéficos na saúde, resultante da sua capacidade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e capacidades anti-inflamatórias e anticancerígenas (106). É partindo destas as evidências que mais estudos têm sido feitos ao longo das últimas décadas, com o objetivo de demonstrar este efeito.

## 5.2 Compostos bioativos presentes nas Microalgas e aplicabilidade no contexto das DII

A grande diversidade de microalgas existentes permite-nos aceder a uma infinidade de compostos com possíveis propriedades benéficas para a saúde. No contexto das DII, têm sido realizados várias investigações científicas direcionadas para o estudo de diferentes espécies de microalgas e identificação de novas biomoléculas, com potencial anti-inflamatório, antioxidante, imunomodulador e prébiótico, eficazes ao nível do trato gastrointestinal. Através da introdução destes compostos em alimentos funcionais, suplementos alimentares, nutracêuticos ou fármacos, podem surgir soluções inovadoras de prevenção e tratamento da dor, inflamação e regulação da microbiota intestinal nas DII (107-109).

Microalgas como *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina*, *Chlorella sp.*, *Dunaliella bardawil*, *Tetraselmis suecica*, *Chlorella ellipsoidea*, *Tetraselmis chuii*, *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus maximus*, e *Chlorococcum sp. cf hypnosporum*, são algumas das espécies que demonstraram ser fontes de estruturas químicas promissoras, com possível aplicação futura no âmbito das doenças inflamatórias intestinais (Quadro 5.1). Alguns desses estudos serão descritos de seguida.

**Quadro 5.1-** Compostos Bioativos das Microalgas

Atividade	Microalga	Composto	Ensaio	Referência
Anti-inflamatória	<i>Spirulina platensis</i> ; <i>Dunaliella salina</i>	-	In vivo (ratos)	(110)
Anti-inflamatória	<i>Spirulina platensis</i>	-	In vivo (ratos)	(111)

Anti-inflamatória	<i>Chlorella sp.</i>	Péptido <i>Chlorella-11</i>	In vitro (RAW264.7) In vivo (ratos)	(112)
Anti-inflamatória	<i>Dunaliella bardawil,</i>	$\beta$ -caroteno	In vivo (ratos)	(113)
Antioxidante	<i>Tetraselmis suecica</i>	Carotenoides	In vitro (Linha celulares de cancro de pulmão humano - A549))	(114)
Antioxidante	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Péptido	In vitro (Linha celulares de células renais do macaco)	(115)
Antioxidante	<i>Tetraselmis chuii</i>	PUFA, Polifenóis	In vivo (ratos)	(116)
Prebiótica	<i>Chlorella vulgaris,</i> <i>Desmodesmus maximus,</i> <i>Chlorococcum sp. cf</i> <i>hyposporum,</i> <i>Spirulina platensis</i>	Oligossacarídeos	In vitro	(117)

### 5.2.1 Atividade Anti-inflamatória

Sendo as DII resultantes da inflamação cônica do intestino, compostos capazes de reverter o processo inflamatório e melhorar a cicatrização da mucosa intestinal são imprescindíveis no tratamento destas patologias. Nas microalgas compostos como péptidos e carotenoides demonstram ter essa atividade elevada e parecem ser promissores, inclusive a nível intestinal.

A atividade anti-inflamatória das microalgas *Dunaliella salina* e *Spirulina platensis* foi comparada e avaliada num ensaio in vivo realizado em ratos. Neste ensaio foi induzida a inflamação do cólon pela instilação retal de ácido acético e administrados, por via oral, extratos de ambas as microalgas, assim como do fármaco padrão, sulfasalazina. Foram analisadas as lesões no cólon e avaliados os marcadores inflamatórios. Em relação às lesões macroscópicas, os extratos das microalgas *Dunaliella*

*salina* e *Spirulina platensis* melhoraram significativamente a inflamação severa presente após a indução com ácido acético, e ambas foram comparáveis ao medicamento padrão. Os marcadores da inflamação do cólon como mieloperoxidase (MPO) e prostaglandina (PGE2), assim como as citocinas pro-inflamatórias; TNF- $\alpha$  e interleucinas (IL-1b, IL-6), revelaram-se aumentados nos grupos apenas induzidos pelo ácido acético, tendo esse aumento sido revertido nos grupos tratados (110).

Uma formulação à base do extrato de biomassa de *Spirulina platensis* combinado com curcumina, foi testada em modelos de ratinhos com colite induzida por sulfato de sódio dextrano, para elaboração de um sistema de administração oral de fármaco, para o tratamento de doenças intestinais. A combinação dos dois produtos demonstrou elevada capacidade anti-inflamatória no intestino, através da redução do nível de citocinas pró-inflamatórias. Os sintomas derivados da colite, como perda de peso, sangramento e redução do comprimento do cólon, também melhoraram drasticamente no grupo tratado com *Spirulina platensis*. Adicionalmente foi ainda realizado um teste de biosegurança in vivo através da administração intragástrica da mistura em ratinhos saudáveis durante 30 dias, que comprovou a segurança da terapêutica (111, 118).

Foi estudado o efeito anti-inflamatório do péptido proveniente da *Chlorella sp.*, com a seguinte sequência de aminoácido: Val-Glu-Cys-Tyr-Gly-Pro-Asn-Arg-ProGln-Phe. O ensaio foi feito in vitro, utilizando linhas celulares de macrófagos (RAW264.7) ativadas por LPS. Após a ativação foi medida a produção de óxido de azoto (NO), através de um ensaio colorimétrico, e monitorizadas as alterações na PGE2 e no TNF- $\alpha$ , recorrendo aos ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Foram também feitos ensaios in vivo, para os quais foram utilizados ratos, que sofreram ação térmica, e avaliados os níveis séricos de malondialdeído (MDA) e TNF- $\alpha$ . Os ensaios demonstraram resultados concordantes, tendo-se chegado à conclusão que o péptido proveniente da *Chlorella sp.*, não só possui uma elevada capacidade inibitória do ON, como também é capaz de suprimir as citocinas pró-inflamatórias, demonstrando grande potencial anti-inflamatório (112).

Num outro estudo foi avaliado, o efeito preventivo do  $\beta$ -caroteno nas condições inflamatórias intestinais. O  $\beta$ -caroteno, extraído da microalga *Dunaliella bardawil*, foi testado em modelos de ratos que apresentavam inflamações intestinais, previamente induzidas pelo ácido acético. Durante 10 semanas, os ratos foram alimentados com dietas à base de  $\beta$ -caroteno. O efeito do composto foi avaliado pela atividade da mieloperoxidase e análise histopatológica intestinal. No grupo apenas induzido com

ácido acético, detetou-se níveis aumentados de atividade da MPO e danos histopatológicos pronunciados nas vilosidades. Já no grupo tratado, a atividade da MPO foi suprimida pelo  $\beta$ -caroteno e não foram verificadas alterações nas vilosidades intestinais, permanecendo idênticas às do grupo de controlo (113). A existência de estudos que comprovam a utilidade do  $\beta$ -caroteno na atenuação da gravidade de doenças como a colite ulcerosa, corroboram a utilização de microalgas ricas em  $\beta$ -caroteno nas DII (119).

### 5.2.2 Atividade Antioxidante

O stress oxidativo prolongado está intimamente relacionado com as doenças inflamatórias intestinais, constituindo um elevado fator de risco para o seu aparecimento ou no agravamento das manifestações clínicas. Os compostos antioxidantes vão atuar através da regulação da quantidade de espécies reativas de oxigénio presentes no organismo, mediante a doação de átomos de hidrogênio de forma a neutralizar os efeitos nocivos da oxidação celular excessiva (106).

Um estudo recente revelou um efeito protetor da astaxantina nas doenças intestinais, através de mecanismos de aumento da atividade das enzimas antioxidantes e supressão dos fatores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Estes avanços na pesquisa da astaxantina, reforçaram o seu interesse antioxidante e anti-inflamatório já conhecido (120).

Um extrato da microalga *Tetraselmis suecica*, composto por carotenoides como as xantofilas luteína, violaxantina, neoxantina, anteraxantina e loroxantina, demonstrou ter elevada atividade na neutralização dos radicais livres, em ensaios in vitro realizados em células cancerígenas de pulmão humano. Esta atividade antioxidante foi testada através do ensaio DPPH (114).

A microalga *Chlorella ellipsoidea* foi hidrolisada para obtenção de um péptido com atividade antioxidante. Neste estudo a atividade antioxidante do composto obtido, foi utilizado a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, método direto na deteção de radicais livres. O péptido antioxidante, Leu-Asn-Gly-Asp-Val-Trp, identificado demonstrou ter maior atividade que os restantes hidrolisados, possuindo a capacidade de estabilizar radicais livres, peroxil, DPPH e hidroxila (115). Embora não diretamente testado em DII, estes estudos revelam o potencial terapêuticos das microalgas na gestão de danos oxidativos que também ocorrem nestas doenças.

Recentemente, foi publicado um estudo onde foi avaliada a suplementação à base de TetraSOD®, ingrediente de origem marinha com potente atividade antioxidante, composto pela microalga *Tetraselmis chuii*, rica em PUFA e compostos polifenólicos. Durante 8 semanas ratos induzidos com síndrome metabólica e suplementados com TetraSOD® apresentaram redução significativa do stress oxidativo e inflamação, através da promoção de mecanismos de defesa antioxidantes, modulação de marcadores inflamatórios e regulação de genes envolvidos em vias antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. (116).

### **5.2.3 Atividade Prebiótica**

O desequilíbrio da microbiota intestinal, constitui um dos fatores relevantes para o aparecimento da inflamação intestinal. Os prebióticos, como fontes de fibra não digeríveis, demonstraram ser capazes de estimular a produção de bactérias benéficas, modulando conseqüentemente a resposta imunitária da mucosa do hospedeiro. Atualmente, já existem resultados promissores demonstrados em ensaios pré-clínicos e em estudos em humanos, no que diz respeito à utilização dos prebióticos na doença de Crohn e colite ulcerosa (121). Os polissacarídeos presentes na constituição das microalgas, assim como os seus derivados, podem constituir uma fonte futura de prebióticos.(122)

Num estudo in vitro, foram testados os efeitos de microalgas digeridas e frutooligossacarídeos, na microbiota do cólon humano, por fermentação. Resultou num aumento das abundâncias relativas das bactérias *Lactobacillus-Enterococcus* e *Bifidobacterium* e diminuição de *Prevotellaceae-Bacteroidaceae*, *Clostridium histolyticum*, e cocoides de *Eubacterium rectale-Clostridium*. De uma forma geral a biomassa algal demonstrou um índice prebiótico superior do que os frutooligossacarídeos, evidenciando maior estimulação das bactérias benéficas e inibição das bactérias indesejáveis na microbiota do cólon (117).

### **5.3 Processo de pesquisa de novas opções terapêuticas**

A pesquisa de compostos bioativos em microalgas, segue um processo complexo até à formulação do produto final, passando pelas seguintes etapas: seleção das espécies de microalgas, cultivo, obtenção da biomassa, extração dos compostos bioativos, medição

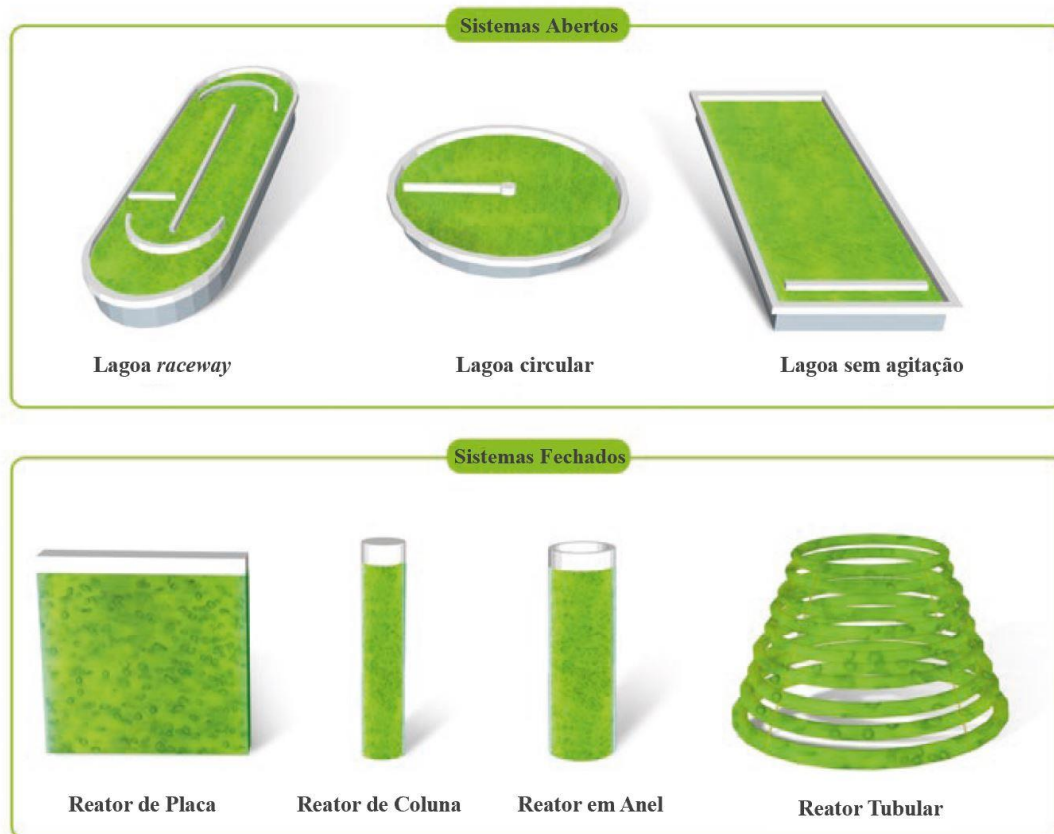
da atividade, purificação dos compostos ativos, identificação e caracterização do metabolito de interesse e numa fase posterior os ensaios ex vivo e in vivo, avaliação farmacocinética, eficácia e segurança. De seguida, estas etapas serão abordadas de forma mais detalhada.

### **5.3.1.1 Cultivo**

Após seleção das espécies de interesse, é necessário adequar as condições de cultivo às necessidades específicas da microalga selecionada, de forma a otimizar o seu crescimento. Ajustando parâmetros como a temperatura, luminosidade, salinidade, pH, composição de nutrientes e possível suplementação da cultura com dióxido de carbono de forma a obter as condições ideais de cultivo e garantir a qualidade da biomassa obtida (123).

De uma forma geral os sistemas de cultura podem ser classificados como abertos ou fechados, com diferentes configurações possíveis (Figura 5.2). Sistemas abertos, como as lagoas, estão amplamente expostos ao meio ambiente utilizando os recursos naturais disponíveis e têm baixos custos de construção e operação. No entanto tem as desvantagens de ocupar áreas extensas, e devido à natureza aberta do sistema torna-se difícil controlar os parâmetros de crescimento e está mais suscetível à contaminação (103). De forma a colmatar as falhas dos sistemas abertos, bem como, aumentar o rendimento dos mesmos surgiram os sistemas de cultivo fechados. Os sistemas fechados também designados por fotobiorreatores, são altamente controlados, uma vez que permitem o ajuste dos vários parâmetros de cultivo, apresentam maior produtividade e estão isentos de contaminações, uma vez que são desprovidos de trocas com o ambiente exterior (124). Constituem uma melhor abordagem e mais inovadora, que em virtude das condições de operação otimizadas que possuem, permitem cultivar biomassa de alta qualidade e gerar matéria-prima de valor acrescentado (125, 126).

A escolha dos sistemas de produção das microalgas deve ser feita de acordo com tipo de microalga e para o tipo de mercados que vai ser direcionado (127). É necessário ter em conta os prós e contras de cada um, custos, produtividade, concentração e prevenção de contaminação da cultura. Quando a biomassa se destina a consumo humano é preferível a utilização de um sistema fechado, por razões de segurança (128, 129).



**Figura 5.2** - Exemplos de diferentes tipos de cultivo de Microalgas.  
Adaptado de (130)

### 5.3.1.2 Concentração da biomassa Microalgal

A colheita das microalgas constitui um dos principais passos do processamento das mesmas, representando uma percentagem significativa do custo total de produção. As principais técnicas de concentração da biomassa são: filtração, centrifugação, floculação, flutuação e sedimentação gravítica (Quadro 5.2), sendo que estas podem ser combinadas de forma a aumentar a eficiência da colheita. De uma forma geral, estas técnicas visam a remoção máxima dos meios de cultura da biomassa das microalgas de forma a facilitar o passo seguinte de extração de compostos bioativos (124).

A escolha da(s) técnica(s) mais adequada vai depender do tipo de microalga e da qualidade do produto final pretendido. No caso de uma colheita mais simples, a técnica de sedimentação por gravidade pode ser uma opção, enquanto para produção de produtos de valor acrescentado, em que é necessário obter biomassa de elevada qualidade, pode-se recorrer à técnica de centrifugação, por exemplo (126).

**Quadro 5.2-** Técnicas de concentração de biomassa de microalgas (131, 132).

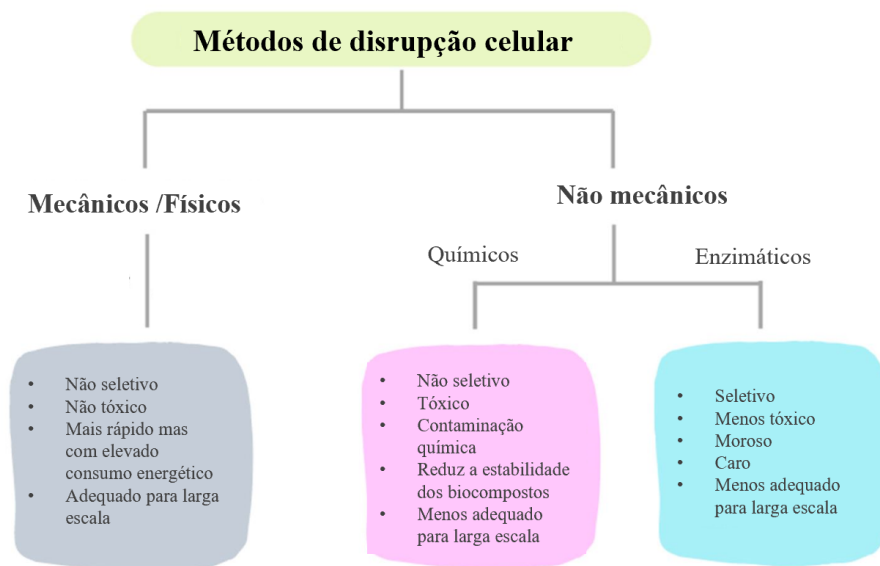
<b>Técnica</b>	<b>Descrição</b>
Filtração	Separação da fase sólida (microalgas) da fase líquida (meio de cultura) pela passagem através de uma membrana semipermeável. A seleção da dimensão dos poros das membranas do filtro é feita consoante o tamanho das microalgas usadas.
Centrifugação	Aplicação de forças centrífugas para separar a biomassa microalgal do meio de cultura, com base na densidade de cada componente e nos tamanhos de partícula.
Floculação	Agregação das células das microalgas através da adição de agentes floculantes (como os sais de ferro e alumínio).
Flutuação	Utilização de microbolhas de ar que vão adsorver as células das microalgas e arrastá-las para a superfície do meio
Sedimentação gravítica	Sedimentação da biomassa pela ação das forças gravíticas.

### **5.3.1.3 Processo de extração dos compostos bioativos**

De forma a obter os compostos bioativos provenientes das microalgas é necessário passar por uma etapa de disrupção celular, que permite a libertação do conteúdo intracelular presente na matriz das microalgas. A extração dos constituintes de interesse pode ser mecânica/ física ou não mecânica.

Os métodos mecânicos ou físicos promovem a lise celular através de forças de cisalhamento (moinho de esferas, homogeneizador de alta velocidade ou alta pressão), por transferência de energia através de ondas (micro-ondas, ultrassons ou laser), corrente elétrica (campos elétricos pulsados) ou temperatura (autoclavagem ou ciclos de congelamento/descongelamento). Os métodos não mecânicos compreendem métodos químicos (utilização de solventes, ácidos e bases) e os métodos enzimáticos (133, 134).

O método escolhido deve ter em conta as características da microalga escolhida e do produto final pretendido e devem ser tidos em conta as vantagens e desvantagens de cada método (Figura 5.3).



**Figura 5.3** - Comparação dos diferentes métodos de ruptura celular.  
Adaptado de (135)

### 5.3.1.4 Medição de atividade

Nesta etapa o principal objetivo prende-se na avaliação da bioatividade dos extratos de microalgas. Atualmente, já existe uma enorme variedade de métodos que podem ser utilizados, com diversas adaptações possíveis. A ação anti-inflamatória, antioxidante ou imunomoduladora é muita das vezes analisada no contexto das DII.

O potencial antioxidante pode ser avaliado com recursos a técnicas de captura de radicais como o ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), TEAC (capacidade antioxidante equivalente Trolox - ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), DPPH (radical livre 2,2-difenil-1-picrihidrazil) utilizando espectrofotometria (136).

Um dos exemplos da medição da atividade anti-inflamatória passa pela realização de ensaios *in vitro* com células de monócitos ou de macrófagos, humanas ou de murino. Um dos ensaios mais comuns usa células RAW264.7, uma linha celular de macrófagos proveniente de murinos ou THP-1, uma linhagem monocítica derivada de um paciente com leucemia mielóide aguda e que pode ser diferenciada em macrófagos. Estas células

podem ser estimuladas com lipopolissacarídeos de origem bacteriana (LPS), de forma a induzir a resposta inflamatória, permitindo determinar e quantificar a secreção de citocinas pro-inflamatórias como IL6, IL1 e TNF- $\alpha$ , através de ensaios ELISA) (137-141).

Após a medição de atividade, é feita a seleção do extrato que demonstra ser mais promissor, para que posteriormente seja fracionado e isolado o composto de interesse.

### **5.3.1.5 Fracionamento do extrato**

Após a medição de atividade procede-se ao fracionamento do extrato que demonstrou ter maior atividade. Desta forma são obtidas frações com número sucessivamente mais reduzido de metabolitos, até se isolar o composto responsável pela atividade biológica medida. Esta separação dos compostos bioativos é feita através da utilização de técnicas cromatográficas como: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia de troca iónica (IEX), cromatografia em camada fina (TLC), ou cromatografia de exclusão molecular (SEC).

Os métodos cromatográficos separam os diferentes compostos de acordo com as propriedades de adsorção, partição, afinidade e pesos moleculares. Por conseguinte, o método para o fracionamento, deve ter selecionado mediante a natureza da biomolécula (Quadro 5.3). Após fracionamento, as frações voltam a ser analisadas no ensaio inicial e o processo de fracionamento e re-testagem repetido até que um composto ativo puro seja obtido.(142)

A caracterização estrutural da molécula isolada é geralmente efetuada recorrendo a estudo espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) capazes de elucidar a estrutura de moléculas desconhecidas e complicadas, como é geralmente o caso dos compostos naturais. Muitas vezes, não é necessária a estrutura completa da molécula para que se obtenha o efeito desejado. Estudos de Relação Estrutura-Atividade podem ser desenvolvidos para determinar que parte da molécula é essencial para a atividade. Para tal, recorre-se a síntese química para sintetizar partes da molécula original que são testados novamente. Com este processo, é também possível introduzir modificações estruturais que visam aumentar a absorção do composto ou diminuir toxicidade ou possíveis efeitos secundários indesejáveis.

**Quadro 5.3** - Comparação dos diferentes métodos cromatográficos, tendo em conta os diferentes tipos de biomoléculas. Adaptado de (135)

Método Cromatográfico	Descrição	Tipo de biomolécula							
		Hidrofílica	Hidrofóbica	Iónica	Não-iónica	Volátil	Não-volátil	Simples	Complexa
HPLC	É exercida uma pressão positiva sobre o eluente, facilitando o escoamento da fase móvel.	X	X	X	X		X		X
IEX	Interação iónica entre a fase estacionária e a fase móvel.	X		X			X	X	
TLC	Fase estacionária num plano e fase móvel desloca-se por capilaridade.	X	X	X	X		X	X	
SEC	Separação de compostos com base no seu tamanho.	X	X		X		X		X
Adsorção	Adsorção dos componentes da fase móvel à superfície da fase estacionária sólida.		X		X		X		X

### 5.3.1.6 Desenvolvimento de fármacos

Após as etapas de identificação do composto potencialmente ativo, caracterização e otimização da molécula de interesse, passa-se então aos ensaios pré-clínico e clínicos. Só após o sucesso destas etapas, é que o composto pode ser aprovado para posterior comercialização.

Na fase pré-clínica são realizados estudos farmacológicos (atividade biológica, determinação do mecanismo de ação), farmacocinéticos (estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção - ADME) e toxicológicos (segurança) (143). Estes incluem ensaios *in vitro*, *ex vivo*, ou *in vivo* recorrendo a modelos animais. Esta fase é crucial para analisar a viabilidade da utilização do composto e na decisão do avanço da investigação, uma vez que é nela que será recolhida a informação sobre os possíveis benefícios e limitações do composto em questão para posterior avaliação em humanos (144). Numa fase posterior, quando já existe evidência científica sustentada e dados de segurança suficientes, dá-se início à fase clínica. Nesta última etapa de desenvolvimento são realizados ensaios clínicos, conduzidos no ser humano, com o objetivo de apurar a eficácia do composto, analisar o seu perfil de segurança e determinar a dose terapêutica (144). Infelizmente, a maior parte dos estudos não chega a esta fase, ficando apenas como ensaios pré-clínicos, por falta de evidência. Apesar disso, há exemplos de ensaios clínicos bem-sucedidos.

## 6. Conclusão e Considerações finais

A doença inflamatória do intestino, é uma doença idiopática, que se manifesta frequentemente através de dor abdominal intensa, diarreia e perda de peso. Caracteriza-se pela inflamação crónica do trato gastrointestinal e a terapêutica atual instituída engloba fármacos como anti-inflamatórios intestinais, corticosteroides, imunomoduladores, medicamentos biológicos e fármacos adjuvantes, que controlam a sintomatologia. O facto de nem todos os doentes responderem de forma eficaz aos tratamentos, os custos das terapêuticas e os seus efeitos adversos, são questões que tornam fundamental a pesquisa de novos compostos eficazes nestas patologias.

As microalgas são fontes ricas de proteínas/péptidos, polissacarídeos, ácidos gordos polinsaturados e carotenoides, como a astaxantina,  $\beta$ -caroteno entre outros pigmentos, compostos com atividade anti-inflamatória, antioxidante e prebiótica, que revelam ser um recurso promissor no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas nas DII, atuando na redução da inflamação, stress oxidativo e modulação da microbiota intestinal. Assim sendo, as microalgas podem ser consideradas produtos de valor acrescentado, em virtude dessa riqueza em compostos bioativos, da sua segurança e da sua elevada sustentabilidade ambiental, pela captação do  $CO_2$  e conseqüente combate do efeito de estufa.

É também essencial que os processos de cultivo e extração desta matéria-prima sejam otimizados, com o uso de tecnologias recentes, de forma a obter as quantidades desejadas e ao mesmo tempo preservar a biodiversidade. Assim como a realização de mais estudos que permitam identificar os compostos responsáveis pela atividade.

Uma vez que os estudos na área das microalgas ainda são limitados e o seu potencial em saúde pouco explorado, é essencial o desenvolvimento de projetos como o *Algae4IBD*. Este projeto junta especialistas de todo o mundo, com o objetivo de desenvolver suplementos e alimentos funcionais para prevenir o aparecimento das DII, e produzir medicamentos e nutracêuticos para tratar os sintomas e prevenir a sua ocorrência, retirando o melhor partido das micro- e macroalgas.

As crescentes taxas de prevalência e incidência das DII, associadas aos efeitos indesejáveis, à resposta inadequada da terapêutica e falhas na mesma, são importantes fatores para o fomento de interesse por parte das indústrias. Aliado a todos estes aspetos, existe ainda uma tendência crescente de mercado na preferência por produtos naturais, uma vez que a população está mais consciencializada dos problemas ambientais. Assim,

estão presentes inúmeras importantes razões para o despertar de interesse das indústrias alimentar, nutracêutica e farmacêutica para a valorização desta matéria-prima, ainda que haja uma regulamentação exigente a dificultar o desenvolvimento e a comercialização da mesma. Como tal, a realização de mais estudos clínicos é de facto importante, não só para validar os ensaios em animais, como para garantir alto nível de segurança, qualidade, consistência e eficácia das terapêuticas com microalgas. É importante salientar ainda, que existe um longo caminho a percorrer e várias barreiras a serem ultrapassadas, para que a natureza das microalgas passe à realidade atual dos doentes com DII.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Actis GC, Pellicano R, Fagoonee S, Ribaldone DG. History of Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(11):1970.
2. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol*. 2001;7(2):175-84.
3. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *Am J Med*. 1952;13(5):583-90.
4. Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol*. 2007;42:16-25.
5. Magro F, Portela F, Lago P, Chagas C, Moreira F, Pereira F, et al. Burden of Disease and Cost of Illness of Inflammatory Bowel Diseases in Portugal. *GE Port J Gastroenterol*. 2022;30(4):283–92.
6. What is IBD? Belgium: European Federation of Crohn's & Ulcerative Colitis Associations; 2023. [12-04-2023]. Disponível em: <https://efcca.org/content/what-ibd>.
7. Wang R, Li Z, Liu S, Zhang D. Global, regional and national burden of inflammatory bowel disease in 204 countries and territories from 1990 to 2019: a systematic analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019. *BMJ Open*. 2023;13(3).
8. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2017;390(10114).
9. VanPutte C, Regan J, Russo A. SEELEY'S ESSENTIALS OF ANATOMY & PHYSIOLOGY, TENTH EDITION. 10 ed. New York: McGraw-Hill Education; 2019.
10. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(9):821–34.
11. Pawlina W. *Ross Histologia - Texto e Atlas*. 7 ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN LTDA; 2016.
12. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014;14:141–53.
13. Maranduba C, Castro S, Souza G, Rossato C, Guia F, Valente M, et al. Intestinal Microbiota as Modulators of the Immune System and Neuroimmune System: Impact on the Host Health and Homeostasis. *J Immunol Res*. 2015.
14. Zhang M, Sun K, Wu Y, Yang Y, Tso P, Wu Z. Interactions between Intestinal Microbiota and Host Immune Response in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*. 2017;8(942).
15. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019;7(14).
16. Forbes JD, Domselaar GV, Bernstein CN. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Front Microbiol*. 2016;7.
17. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787-803.
18. Pires EC. A importância do Microbioma na Saúde Digestiva - Saúde Digestiva Lisboa: Sociedade Portuguesa de Gastreenterologia; 2020. [21-04-2023]. Disponível em: <https://saudedigestiva.pt/a-importancia-do-microbioma-na-saude-digestiva/>.

19. BIBBÒ S, IANIRO G, GIORGIO V, SCALDAFERRI F, MASUCCI L, GASBARRINI A, et al. The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(22):4742-9.
20. Talapko J, Vcev A, Mestrovic T, Pustijanac E, Jukic M, Skrlec I. Homeostasis and Dysbiosis of the Intestinal Microbiota: Comparing Hallmarks of a Healthy State with Changes in Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms.* 2022;10(2405).
21. Whalen K, Finkel R, Panavelil TA. *Farmacologia Ilustrada.* 6 ed. Brazil: Artmed; 2016.
22. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins Patologia Básica.* 9 ed. Brasil: Elsevier Editora Ltda.; 2013.
23. Brunton LL, Knollmann BC. *Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 14 ed: McGraw Hill LLC; 2023.
24. Sharifi-Rad M, Kumar NVA, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol.* 2020;11:694.
25. Bernstein CN, Eliakim A, Fedail S, Michael Fried M, Richard Geary M, Goh K-L, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol.* 2016;50(10):803-18.
26. Zhang Y-Z, Li Y-Y. Inflammatory bowel disease: Pathogen. *World J Gastroenterol.* 2014;20(1):91-9.
27. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet.* 2007;369(9573):1627-40.
28. Veloso PM, Machado R, Nobre C. Mesalazine and inflammatory bowel disease – From well-established therapies to progress beyond the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2021;167: 89-103.
29. Lee SH, Kwon Je, Cho M-L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res.* 2018;16(1):26-42.
30. Choy MC, Visvanathan K, Cruz PD. An Overview of the Innate and Adaptive Immune System in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;23(1):2-13.
31. Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Ohman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol.* 2018;53(4):379-89.
32. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *J Crohns Colitis.* 2020;14(1):4-22.
33. Veauthier B, Hornecker JR. Crohn's Disease: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2018;98(11):661-9.
34. Raine T, Bonovas S, Burisch J, Kucharzik T, Adamina M, Annese V, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis: Medical Treatment. *J Crohns Colitis.* 2021;16(1):2-17.
35. Porter RJ, Kalla R, Ho G-T. Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis *F1000Res.* 2020.
36. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis. *Lancet.* 2016;389(10080):1756-70.
37. Calprotectina Fecal Faro: Laboratórios Aqualab; 2020. [04-05-2023]. Disponível em: <https://www.aqualab.pt/conhecimento/calprotectina-fecal/>.
38. Bischoff SC, Escher J, Hebuterne X, Kłęk S, Krznaric Z, Schneider S, et al. ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in inflammatory bowel disease. *Clin Nutr.* 2019;39(3):632-53.

39. Schreiner P, Martinho-Grueber M, Studerus D, Vavricka SR, Tilg H, Biedermann L. Nutrition in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion*. 2020;101(1):120-35.
40. Oliveira C, Antunes C, Santos C, Marques A, Sousa M. SUPORTE NUTRICIONAL NA DOENÇA DE CROHN. *ACTA PORTUGUESA DE NUTRIÇÃO*. 2017;10:44-8.
41. Dieta e Nutrição - Um futuro sem Doença de Crohn e Colite Ulcerosa. Associação Portuguesa da Doença Inflamatória do Intestino; 2017.
42. Wang Q, Mi S, Yu Z, Li Q, Lei J. Opening a Window on Attention: Adjuvant Therapies for Inflammatory Bowel Disease. 2020.
43. Gibert MC, Sánchez PL, Murie PdIC, Sola NR, Barrueta OI, Pastor TP, et al. GUÍA DE PRÁCTICA FARMACÉUTICA EN ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL: SEFH. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria; 2022.
44. Watt M, Peerani F, Madsen K, Siffledeen J, Kroeker K, Lim A, et al. Exploring Patient Perspectives on a 12-Week Online, Stress Reduction Intervention in Inflammatory Bowel Disease. *Crohns Colitis* 360. 2022;4(3).
45. Ascensão J. Dia de Cirurgia. *APDI News*. 2023:6-8.
46. Peixe B, Monteiro E, Magro F, Portela F, Cremers I, Deus JRd, et al. Terapêutica Farmacológica na Doença Inflamatória Intestinal: GEDII – Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal; 2007.
47. Diet & Nutrition New York: Crohn's & Colitis Foundation; 2023. [25-05-2023]. Disponível em: <https://www.crohnscolitisfoundation.org/diet-and-nutrition/supplementation>.
48. Issokson K. Common Micronutrient Deficiencies in IBD - The Crohn's & Colitis Foundation. New York; 2017.
49. Kilby K, Mathias H, Boisvenue L, Heisler C, Jo JL. Micronutrient Absorption and Related Outcomes in People with Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Nutrients* 2019;11(6):1388.
50. Eiden KA. Nutritional Considerations in Inflammatory Bowel Disease. *PRACTICAL GASTROENTEROLOGY*. 2003.
51. Zupo R, Sila A, Castellana F, Bringiotti R, Curlo M, Pergola GD, et al. Prevalence of Zinc Deficiency in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2022;14(19):4052.
52. Branco JC, Cardoso MF, Anapaz V, Lourenço LC, Oliveira AM, Rodrigues CG, et al. Vitamin D Deficiency in a Portuguese Cohort of Patients with Inflammatory Bowel Disease: Prevalence and Relation to Disease Activity. *GE Port J Gastroenterol*. 2018;26(3):155-62.
53. Santos CHM, Torresilha AL, Momm GC, Yamaki GL, Souza MSd, Castilho NS, et al. Uso da cúrcuma no tratamento da Retocolite Ulcerativa. *Res, Soc Dev*. 2022;11(5).
54. Marton LT, Goulart RdA, Carvalho ACAd, Barbalho SM. Omega Fatty Acids and Inflammatory Bowel Diseases: An Overview. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19):4851.
55. Jadhav P, Jiang Y, Jarr K, Layton C, Ashouri JF, Sinha SR. Efficacy of Dietary Supplements in Inflammatory Bowel Disease and Related Autoimmune Diseases. *Nutrients*. 2020;12 (7):2156.
56. Dziąbowska-Grabias K, Sztanke M, Zajac P, Celejewski M, Kurek K, Szkutnicki S, et al. Antioxidant Therapy in Inflammatory Bowel Diseases. *Antioxidants* 2021;10(3):412.
57. Smith MA, Smith T, Trebble TM. Nutritional management of adults with inflammatory bowel disease: practical lessons from the available evidence. *Frontline Gastroenterol*. 2012;3:172-9.

58. Prebióticos e Probióticos Lisboa: Farmácias Portuguesas; 2023. [08-06-2023]. Disponível em: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/blog/prebioticos-e-probioticos>.
59. Guarner F, Sanders ME, Szajewska H, Cohen H, Eliakim R, Herrera C, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Probiotics and prebiotics. 2023.
60. Akutko K, Stawarski A. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in Inflammatory Bowel Diseases. *J Clin Med*. 2021;10(11):2466.
61. Rasmussen HE, Hamaker BR. Prebiotics and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin N Am* 2017;46(4): 783-95.
62. Richman E, Rhodes JM. Review article: evidence-based dietary advice for patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38(10):1156-71.
63. Gerasimidis K, Godny L, Sigall-Boneh R, Svolos V, Wall C, Halmos E. Current recommendations on the role of diet in the aetiology and management of IBD. *Frontline Gastroenterol*. 2021;13(2):160-7.
64. Probiotics and inflammatory bowel disease (IBD) - Crohn's disease and ulcerative colitis: IBD Relief Ltd.; 2023. [08-06-2023]. Disponível em: <https://www.ibdrelief.com/learn/probiotics-and-ibd>.
65. Kaur L, Gordon M, Baines PA, Iheozor-Ejiofor Z, Sinopoulou V, Akobeng AK. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. 2020(3).
66. Andresen V, Gschossmann J, Layer P. Heat-inactivated *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (SYN-HI-001) in the treatment of irritable bowel syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Lancet*. 2020;5(7):658-66.
67. Ducrotté P, Sawant P, Jayanthi V. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2012;18(30):4012-8.
68. Chapman TM, Plosker GL, Figgitt DP. Spotlight on VSL#3 Probiotic Mixture in Chronic Inflammatory Bowel Diseases. *BioDrugs*. 2007;21(1):61-3.
69. Ford AC, Harris LA, Lacy BE, Quigley EMM, Moayyedi P. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of prebiotics, probiotics, synbiotics and antibiotics in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;48(10):1044-60.
70. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Assche GV, Lindsay JO, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* 2017;11(1):3-25.
71. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, Hendy PA, Smith PJ, Limdi JK, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2019;68(3):1-106.
72. Panaccione R, Steinhart AH, Bressler B, Khanna R, Marshall JK, Targownik L, et al. Canadian Association of Gastroenterology Clinical Practice Guideline for the Management of Luminal Crohn's Disease. *J Can Assoc Gastroenterol*. 2019;2(3):1-34.
73. Farraye FA, Odze RD, Eaden J, Itzkowitz SH. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2010;138(2):746-74.

74. Formulário Nacional de Medicamentos - Messalazina Lisboa: INFARMED; 2019. [03-07-2023]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/fnmfo/#/FichaMedicamento/Messalazina>.
75. RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO - Mezavant® 1200 mg (sulfassalazina), comprimidos gastrorresistentes de libertação prolongada 2011.
76. HAUSO Ø, MARTINSEN TC, WALDUM H. 5-Aminosalicylic acid, a specific drug for ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2015;50(8):933-41.
77. Murray A, Nguyen T, Parker C, Feagan B, MacDonald J. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2020(8).
78. RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO - Proctorrane® 10 mg/g (hidrocortisona), pomada retal 2022.
79. Williams DM. Clinical Pharmacology of Corticosteroids. *Respir Care.* 2018;63(6):655-70.
80. Dubois-Camacho K, Ottum PA, Franco-Muñoz D, Fuente MDI, Torres-Riquelme A, Díaz-Jiménez D, et al. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel diseases: From clinical practice to molecular biology. *World J Gastroenterol.* 2017;23(36):6628-38.
81. Magro F, Cordeiro G, Dias AM, Estevinho MM. Inflammatory Bowel Disease – Non-biological treatment. *Pharmacol Res.* 2020;160.
82. Dubinsky MC. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy, and safety. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004;2(9):731-43.
83. RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO - Azafalk® 100 mg (azatioprina), comprimidos revestidos por película 2021.
84. Mateen B, Patel M, Akobeng A, Gordon M, Hayee B. 6-thioguanine nucleotide monitoring in azathioprine and mercaptopurine monotherapy for the treatment of inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021(10).
85. RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO - Metex® 50 mg/ml (metotrexato), solução injetável em seringa pré-cheia 2023.
86. AlAmeel T, Sulais EA, Raine T. Methotrexate in inflammatory bowel disease: A primer for gastroenterologists. *Saudi J Gastroenterol.* 2022;28(4):250-60.
87. Weissman S, Chris-Olaiya A, Mehta TI, Aziz M, Alshati A, Berry R, et al. A novel player: cyclosporine therapy in the management of inflammatory bowel disease. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2019;4:67.
88. Wu B, Tong J, Ran Z. Tacrolimus Therapy in Steroid-Refractory Ulcerative Colitis: A Review. *Inflamm Bowel Dis.* 2020;26(1):24-32.
89. Severiano A, Martins AS, Mousinho C, Costa EdF, Bragança F, Hergy F, et al. Boletim de Farmacovigilância - Medicamentos Biológicos. NFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.; 2019. Report No.: 0873-7118 Contract No.: 3.
90. A.L. C, J.M. SL, A.C. S. Medicamentos biológicos - Exemplos aprovados em Portugal. *Acta Farmacêutica Portuguesa.* 2020;9(2):36-62.
91. Biologic Medicines - Fact Sheet. United Kingdom: Crohn's & Colitis UK; 2019.
92. D'Amico F, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Ustekinumab in Crohn's Disease: New Data for Positioning in Treatment Algorithm. *J Crohns Colitis.* 2022;16:ii30-ii41.
93. RELATÓRIO PÚBLICO DE AVALIAÇÃO STELARA (USTEKINUMAB). INFARMED, I.P | Direção de Avaliação das Tecnologias de Saúde (DATS); 2020.

94. Santos D, Mendes S, Morgado M. Inibidores das Janus Associated Kinases na Terapêutica Farmacológica. *Rev Port Farmacoter.* 2017;9:21-34.
95. RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO PRÉVIA DO MEDICAMENTO PARA USO HUMANO EM MEIO HOSPITALAR - Vedolizumab. Lisboa: INFARMED; 2018.
96. Stallmach A, Hagel S, Bruns T. Adverse effects of biologics used for treating IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010;24(2):167-82.
97. Ledder O, Turner D. Antibiotics in IBD: Still a Role in the Biological Era? *Inflamm Bowel Dis.* 2018;24(8):1676-88.
98. Docherty MJ, III RCWJ, Wallace MS. Managing Pain in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2011;7(9):592–601.
99. Guia da Doença de Crohn - Um futuro sem Doença de Crohn e Colite Ulcerosa. Associação Portuguesa das Doenças Inflamatórias do Intestino; 2022.
100. Miller C, Emmanuel A, Zarate-Lopez N, Taylor S, Bloom S. Constipation in ulcerative colitis: pathophysiology and practical management. *Frontline Gastroenterol.* 2021;12(6):493-9.
101. Machado L, Carvalho G, Pereira RN. Effects of Innovative Processing Methods on Microalgae Cell Wall: Prospects towards Digestibility of Protein-Rich Biomass. *Biomass.* 2022;2(2):80-102.
102. Jacob-Lopes E, Maroneze MM, Queiroz MI, Zepka LQ. *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Academic Press; 2020.*
103. Khan MI, Shin JH, Kim JD. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact.* 2018;17(36).
104. Wong JF, Hong HJ, Foo SC, Yap MKK, Tan JW. A review on current and future advancements for commercialized microalgae species. *Food Sci Hum Wellness.* 2022;11(5):1156-70.
105. Koyande AK, Chew KW, Rambabu K, Tao Y, Chu D-T, Show P-L. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Sci Hum Wellness.* 2019;8(1):16-24.
106. Ampofo J, Abbey L. Microalgae: Bioactive Composition, Health Benefits, Safety and Prospects as Potential High-Value Ingredients for the Functional Food Industry. *Foods.* 2022;11(12):1744.
107. Algae4IBD – Treating chronic inflammation with the help of algae: *Algae4ibd; 2023. [19-07-2023].* Disponível em: <https://algae4ibd.eu/2023/03/09/algae4ibd-treating-chronic-inflammation-with-the-help-of-algae/>.
108. Kiron V, Hayes M, Avni D. Inflammatory bowel disease - A peek into the bacterial community shift and algae-based ‘biotic’ approach to combat the disease. *Trends Food Sci Technol.* 2022;129:210-20.
109. Eilam Y, Khattib H, Pintel N, Avni D. Microalgae—Sustainable Source for Alternative Proteins and Functional Ingredients Promoting Gut and Liver Health. *Global Chall.* 2023;7(5):2200177.
110. Abdel-Daim MM, Farouk SM, Madkour FF, Azab SS. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Spirulina platensis* in comparison to *Dunaliella salina* in acetic acid-induced rat experimental colitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2015;37(2):126-19.
111. Zhong D, Zhang D, Wei Chen JH, Chaojie Ren XZ, Kong N, Tao W, et al. Orally deliverable strategy based on microalgal biomass for intestinal disease treatment. *Sci Adv.* 2021;7(48).

112. Cherng JY, Liu C, Shen CR, Lin HH, Shih MF. Beneficial effects of Chlorella-11 peptide on blocking LPS-induced macrophage activation and alleviating thermal injury-induced inflammation in rats. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23(3):811-29.
113. Lavy A, Naveh Y, Coleman R, Mokady S, Werman MJ. Dietary *Dunaliella bardawil*, a beta-Carotene-Rich Alga, Protects Against Acetic Acid-Induced Small Bowel Inflammation in Rats. *Inflamm Bowel Dis*. 2003;9(6):372-9.
114. Sansone C, Galasso C, Orefice I, Nuzzo G, Luongo E, Cutignano A, et al. The green microalga *Tetraselmis suecica* reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells. *Sci Rep*. 2017;7.
115. K S-C, Kim D, Jeon Y-J. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(7):2294-302.
116. Gil-Cardoso K, Bas JMD, Caimari A, Lama C, Torres S, Mantecón L, et al. TetraSOD®, a Unique Marine Microalgae Ingredient, Promotes an Antioxidant and Anti-Inflammatory Status in a Metabolic Syndrome-Induced Model in Rats. *Nutrients* 2022;14(19):4028.
117. Medeiros VPBd, Souza ELd, Albuquerque TMRd, Sassi CFdC, Lima MdS, Sivieri K, et al. Freshwater microalgae biomasses exert a prebiotic effect on human colonic microbiota. *Algal Res*. 2021;60.
118. Morais E, Cristofoli N, Bombo G, Maia I, Cassuriaga A, Costa J, et al. SPIRULINA AND ITS HEALTH BENEFITS. *Nova Medicine Health*; 2021.
119. Trivedi PP, Jena GB. Mechanistic insight into beta-carotene-mediated protection against ulcerative colitis-associated local and systemic damage in mic. *Eur J Nutr*. 2015;54:639–52.
120. Lee J, Kim M-H, Kim H. Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Effects of Astaxanthin on Gastrointestinal Disease. *Int J Mol Sci* 2022;23(24):15471.
121. Langen MACLv, Dieleman LA. Prebiotics in Chronic Intestinal Inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(3):454-62.
122. Gouda M, Tadda MA, Zhao Y, Farmanullah F, Chu B, Li X, et al. Microalgae Bioactive Carbohydrates as a Novel Sustainable and Eco-Friendly Source of Prebiotics: Emerging Health Functionality and Recent Technologies for Extraction and Detection. *Front Nutr*. 2022;9.
123. Rotter A, Bacu A, Barbier M, Bertoni F, Bones AM, Cancela ML, et al. A New Network for the Advancement of Marine Biotechnology in Europe and Beyond. *Front Mar Sci*. 2020;7.
124. Tan JS, Lee SY, Chew KW, Lam MK, Lim JW, Ho S-H, et al. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*. 2020;11(1):116–29.
125. Mehariya S, Goswami RK, Verma P, Lavecchia R, Zuurro A. Integrated Approach for Wastewater Treatment and Biofuel Production in Microalgae Biorefineries. *Energies*. 2021;14(8):2282.
126. Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain Energy Rev*. 2010;14(1):217-32
127. Zuccaro G, Yousuf A, Pollio A, Steyer J-P. Chapter 2 - Microalgae Cultivation Systems In: Yousuf A, editor. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* Academic Press; 2019. p. 11-29.
128. Bennouna C. Choosing your microalgae production system Non classé: *Synoxis Algae*; 2019. [15-08-23]. Disponível em: <https://www.synoxis-algae.com/microalgae-production-system/>.

129. Hallmann A. Algae Biotechnology – Green Cell-Factories on the Rise. *Current Biotechnology*. 2015;4(4):389 - 415.
130. Zerrouki D, Henni A. Outdoor Microalgae Cultivation for Wastewater Treatment. In: Gupta SK, Bux F, editors. *Application of Microalgae in Wastewater Treatment - Volume 1: Domestic and Industrial Wastewater Treatment*. 1: Springer Cham; 2019.
131. Singh G, Patidar. Microalgae harvesting techniques: A review. *J Environ Manage*. 2018;217:499-508.
132. Li Y, Markley B, Mohan AR, Rodriguez-Santiago V, Thompson D, Niekerk DV. Utilization of carbon dioxide from coal-fired power plant for the production of value-added products. 23rd Annual International Pittsburgh Coal Conference 2006.
133. Salinas-Salazar C, Garcia-Perez JS, Rashmi Chandra, Castillo-Zacarias C, Iqbal HMN, Parra-Saldívar R. Chapter 11 - Methods for Extraction of Valuable Products from Microalgae Biomass. In: Alam A, Wang Z, editors. *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*. 1 ed: Springer Singapore; 2019. p. 245-63.
134. Ventura SPM, Nobre BP, Ertekin F, Hayes M, García-Vaquero M, Vieira F, et al. 19 - Extraction of value-added compounds from microalgae. In: Gonzalez-Fernandez C, Muñoz R, editors. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: Woodhead Publishing Series in Energy*; 2017.
135. Corrêa PS, Júnior WGM, Martins AA, Caetano NS, Mata TM. Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods. *Processes*. 2020;9(1):10.
136. Yang N, Zhang Q, Chen J, Wu S, Chen R, Yao L, et al. Study on bioactive compounds of microalgae as antioxidants in a bibliometric analysis and visualization perspective. *Front Plant Sci*. 2023;14.
137. Kong L, Smith W, Hao D. Overview of RAW264.7 for osteoclastogenesis study: Phenotype and stimuli. *J Cell Mol Med*. 2019;23(3077–3087).
138. Silva M, Kamberovic F, Uota ST, Kovan I-M, Viegas CSB, Simes DC, et al. Microalgae as Potential Sources of Bioactive Compounds for Functional Foods and Pharmaceuticals. *Appl Sci*. 2022;12:5877.
139. Riccio G, Lauritano C. Microalgae with Immunomodulatory Activities. *Mar Drugs*. 2019;18:2.
140. Lakshmegowda SB, Rajesh SK, Kandikattu HK, Nallamuthu I, Khanum F. In Vitro and In Vivo Studies on Hexane Fraction of *Nitzschia palea*, a Freshwater Diatom for Oxidative Damage Protective and Anti-inflammatory Response. *Rev Bras Farmacogn*. 2020;30:189-201.
141. Lind KF, Hansen E, Østerud B, Eilertsen K-E, Bayer A, Engqvist M, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of baretin. *Mar Drugs*. 2013;11(7):2655-66.
142. Portal de Engenharia Química - Fundamentos: FCTUC DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA; [28-08-23]. Disponível em: [http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com\\_content&task=view&id=63&Itemid=148](http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=63&Itemid=148).
143. Majee SB, Dhruvi Avlani P, Ghosh, Biswas GR. Absorption, distribution, metabolism and elimination (ADME) and toxicity profile of marine sulfated polysaccharides used in bionanotechnology. *AJPP*. 2018;12(1):1-10.
144. Deore AB, Dhumane JR, Wagh HV, Sonawane RB. The Stages of Drug Discovery and Development Process. *Asian j pharm*. 2019;7(6):62-7.

