

Sumário

VOLUME 6
FASCÍCULO 2
2018

EDITORIAL

- 1 **Novas e velhas tecnologias: o desafio da regulação**
Geraldo Lucchese

DEBATE

- 3 ***Laudato Si'*: a bridge towards access to medicines**
Jorge Antonio Zepeda Bermudez, Adriana Mendoza-Ruiz, Sandra Pereira Soares, Mansur Ferreira Campos, Ana Paula Oliveira Brum, Silvania Iacovino Dantas, Jorge Carlos Santos da Costa

ARTIGO

- 7 **Uso da Análise dos Modos de Falha e seus Efeitos (FMEA) como ferramenta para mapear os riscos em um estudo clínico**
Monique Gurgel de Oliveira, Antonio Carlos Siani, Cristiane Machado Quental, Tiago Filgueiras Porto, Valeria Cavalcanti Rolla
- 18 **Perfil de resistência aos antibióticos e prevalência dos genes *qacEΔ1* e *sul1* em *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar**
Rosa Maria Pinto Novaes, Mariana de Melo Rodrigues Sobral, Camila Barreto, Ana Paula Alves Nascimento, Mychelle Alves Monteiro, Bernardete Ferraz Spisso, Kayo Bianco, Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão, Maysa Mandetta Clementino
- 29 **Interações medicamentosas e consequentes intervenções farmacêuticas na Unidade de Terapia Intensiva de um hospital privado em Macapá, Amapá**
Uriel Davi de Almeida e Silva, Carla Luciane De Souza Soeiro, Rafael Lima Resque, Madson Ralide Fonseca Gomes, Érika Rodrigues Guimarães Costa, Mayara Amoras Teles Fujishima, Alessandra Azevedo do Nascimento, Jaderson Vieira Ferreira, Deyse de Souza Dantas
- 38 **Risco em processamento de produtos para saúde em Unidades Básicas de Salvador, BA**
Eliana Auxiliadora Magalhães Costa, Quêzia Nunes Frois dos Santos, Isabele dos Santos Dantas
- 44 **Estudos de palatabilidade de medicamentos: análise sensorial e aceitabilidade de formulações pediátricas**
Marina dos Santos Garruti de Medeiros, Deborah dos Santos Garruti
- 54 **Características dos Recursos Humanos e desafios no trabalho de coordenadores de Vigilância em Saúde no interior de Pernambuco**
Cleber Vinicius Brito dos Santos, Daniel Friguglietti Brandespim
- 61 **Análise de limite de galactosamina em hexosaminas totais em amostras injetáveis de heparina sódica suína**
Andreza da Costa de Santana, Anna Carolina Machado Marinho, Patrícia Condé de Lima, Ozéias de Lima Leitão, Debora Alves Fonseca, Raíssa Lamin Teixeira, Claudia Maria da Conceição, Silvana do Couto Jacob
- 67 **Validação de método analítico para o monitoramento de vitamina A em leites do Programa Viva Leite**
Lucile Tiemi Abe-Matsumoto, Angela Sueko Mikaro, Simone Alves da Silva, Fabiana Dognani Castro, Meiry Mayumi Takeda, Miriam Solange Fernandes Caruso

REVISÃO

- 74 **Sistemas microfisiológicos compostos por organoides humanos em dispositivos microfluídicos: avanços e desafios**
Talita Miguel Marin, Eduardo Pagani
- 92 **Perspectivas e desafios regulatórios no uso de células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais**
Cintia Delai da Silva Horinouchi, Ana Paula Ressetti Abud, Ariane Caroline Paschoal, Crisciele Kuligovisk, Thamile Luciane Reus, Bruno Dallagiovanna Muniz, Alessandra Melo de Aguiar
- 106 **Risk Analysis: A generalized Hazop methodology state-of-the-art, applications, and perspective in the process industry**
Miguel Angel de la O Herrera, Aderval Severino Luna, Antonio Carlos Augusto da Costa, Elezer Monte Blanco Lemes
- 122 **Determinación de residuos de antibióticos veterinarios en productos de origen animal mediante cromatografía líquida**
Pedro Enrique La Rosa Zambrano, Juan Antonio Espinoza Blanco, Carlos Adam Conte-Junior, César Aquiles Lázaro de la Torre

Novas e velhas tecnologias: o desafio da regulação

Geraldo Lucchese

Em que época vivemos! A ciência avança em grande velocidade. A tecnologia oferece novos materiais, produtos, serviços, processos. Alguns em fase ainda experimental, outros em pleno uso. Tecnologias poderosas, como a engenharia genética, que permitem manipular os códigos genéticos de qualquer espécie, são instrumentos capazes de intervir na natureza de forma dramática. Clonagens já são possíveis em grandes animais e, possivelmente, em humanos. Organismos geneticamente modificados são amplamente produzidos e constituem matéria-prima para o processamento de alimentos em larga escala. Materiais nanoparticulados apresentam propriedades físico-químicas completamente diferentes das dos materiais que lhes dão origem e também já são amplamente utilizados, principalmente nas áreas farmacêutica, cosmética e de alimentos. Células-tronco, com poder de diferenciação celular, trazem perspectivas de terapias inéditas para males que não contam com alternativas terapêuticas, mas apresentam, além de sérios problemas técnicos, questões éticas, morais e religiosas. A biotecnologia e o armazenamento e processamento de informações por meio eletrônico confirmam a nova onda tecnológica que provoca uma verdadeira revolução; mudam processos produtivos, profissões, organizações, instituições, sistemas de controle, gestão de empresas e do Estado. Muitos e grandes interesses estão em jogo.

Toda essa realidade reivindica sistemas bem estruturados e qualificados de regulação dos riscos por meio de instituições públicas. Ao contrário do que se pode pensar, é necessário um Estado forte, com políticas transparentes e voltadas à proteção da vida e do ambiente; que tenha como missão a proteção dos setores mais expostos a fatores de risco e os mais vulneráveis. Tais sistemas são incompatíveis com rupturas na ordem democrática e exigem o funcionamento pleno do Estado de Direito, no qual as normas e as ações de justiça não sejam manipuladas pelos grandes investidores.

Entretanto, em contraste com a dinamicidade dos avanços científicos e tecnológicos e a necessidade de aprimorar o conhecimento e o gerenciamento dos riscos já conhecidos, vivemos no Brasil mais uma ruptura da ordem democrática e a decadência do Estado de Direito. A hegemonia de uma narrativa que nomeia a crise econômica como o principal problema e a austeridade fiscal como único remédio elide a crise política e o questionamento do remédio adotado, o que significa que o Estado não pode gastar em políticas de amplo espectro social, como a saúde pública, a educação e a previdência social. Os recursos para pesquisa e inovação também são reduzidos drasticamente. Neste contexto, a estrutura de todo o setor de regulação sanitária também se fragiliza. Não há como acompanhar as demandas da vigilância sanitária e dar eficácia às medidas de proteção da saúde.

A história já nos ensinou que cada nova tecnologia traz novos riscos e, portanto, que devemos investir na produção de conhecimento dos efeitos nocivos da produção, uso ou consumo destes materiais, produtos, serviços e processos. Mas a dinâmica da sociedade capitalista não espera. O uso amplo destas novas tecnologias antecede o conhecimento mais esclarecido sobre os potenciais danos à saúde dos indivíduos, das coletividades e ao ambiente. E o desafio da avaliação e do gerenciamento dos riscos destas novas tecnologias segue em ritmo lento, ao sabor das instabilidades políticas e econômicas. Mesmo tecnologias já bastante conhecidas, como os agrotóxicos ou os medicamentos, ainda não têm controle sanitário razoável. Em geral, são abusivamente utilizadas, em especial no Brasil. Embora ainda não tenhamos avaliações mais precisas, sabemos que as consequências desse uso abusivo e inadequado são alarmantes. O controle sanitário destas tecnologias que já conhecemos ainda é um desafio.

Editor Científico



Esta Revista continua perseverante em sua missão de identificar e divulgar conhecimentos sobre novas e velhas tecnologias e seus impactos sobre a saúde da coletividade. Este número contém artigos de revisão relacionados aos desafios da ciência regulatória - sistemas microfisiológicos; novas tecnologias - emprego de células-tronco; análise de riscos pelo método Hazop; e resíduos de antibióticos veterinários em produtos de origem animal. Tem artigos sobre controle de medicamentos - interações farmacológicas, resistência bacteriana e ambiente, riscos das terapias multidrogas para HIV/TB, qualidade da heparina; dilemas da organização do sistema nacional de vigilância sanitária - recursos

humanos; reprocessamento de materiais em serviços de saúde; e metodologia de análise de alimentos - vitamina A.

Como entendemos que não há sentido na existência de tecnologias inovadoras com risco avaliado e regulado se a população não tiver acesso a elas, trazemos o debate a respeito da dificuldade dos sistemas de saúde e da imensa maioria da população mundial em ter acesso a medicamentos novos, às vezes, as únicas alternativas farmacológicas para algumas doenças.

Boa leitura.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Laudato Si': a bridge towards access to medicines

Laudato Si': uma ponte para acesso a medicamentos

Jorge Antonio Zepeda Bermudez^{1,*}

Adriana Mendoza-Ruiz^{II}

Sandra Pereira Soares^{II}

Mansur Ferreira Campos^{II}

Ana Paula Oliveira Brum^{II}

Silvania Iacovino Dantas^{II}

Jorge Carlos Santos da Costa^{II}

ABSTRACT

Pope Francis' Encyclical *Laudato Si'*, albeit not explicitly, has drawn attention worldwide to the access to medicines as a fundamental human right, as it raises awareness about the current situation of the world and the poor. The reflections set forward by the Encyclical *Laudato Si'* bring us to the intersections between trade and health care, and how to correctly frame the need for innovation, affordable and accessible health technologies to those in need and how to reach the poorest of the poor. The issues of how to provide access, promote innovation, stimulate reasonable competitive market forces and ensure viable supply are central to the question of how to address Universal Human Rights. Also in this context, intellectual property has gained particular significance with increased attention to new essential medicines for the treatment of diseases of global incidence, including communicable and non-communicable diseases. This article intends to bring elements for a reflection on the debate on universal access to medicines.

KEYWORDS: Essential Medicines; Access to Medicines; Human Rights

RESUMO

A Encíclica *Laudato Si'* do Papa Francisco, ainda que não explicitamente, chamou a atenção mundial para o acesso aos medicamentos como um direito humano fundamental, quando conscientiza sobre a situação atual do mundo e dos pobres. As reflexões propostas pela Encíclica *Laudato Si'* nos trazem as interseções entre o comércio e a saúde, como enquadrar corretamente a necessidade de ter tecnologias de saúde inovadoras, acessíveis aos necessitados e como alcançar os mais pobres dos pobres. As questões sobre maneiras de fornecer acesso, promover inovação, estimular forças de mercado competitivas razoáveis e assegurar fornecimento viável são centrais para a questão de como abordar os Direitos Humanos Universais. Também neste contexto, a propriedade intelectual ganhou particular importância com maior atenção a novos medicamentos essenciais para o tratamento de doenças de incidência global, tanto as transmissíveis como as não transmissíveis. Este artigo pretende trazer elementos de reflexão para o debate sobre o acesso universal a medicamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Medicamentos Essenciais; Acesso a Medicamentos; Direitos Humanos

^I Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (VPPIS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: jorge.costa@fiocruz.br



INTRODUCTION

Pope Francis' Encyclical *Laudato Si'*¹ stands out by a critique of consumerism and irresponsible development, besides making a plea for change and global unification of actions to combat social inequality and environmental degradation. While underscoring the importance of scientific development as a way to increase the welfare of people², we realize that the incorporation of modern technologies has not been integrated with the enhancement of the concepts of human rights. Rather, trade has been priority over public health and access to medicines³.

In fact, the issues of how to provide access, promote innovation, stimulate reasonable competitive market forces and ensure viable supply are central to the question of how to address Universal Human Rights, particularly the primary goal of ensuring the right of all to enjoy life and liberty fully. In spite of all efforts and promising results from the Millennium Development Goals, millions have been left behind, and the Member States have agreed on the Sustainable Development Goals targeting the year 2030^{4,5}. Recently, the United Nations Secretary-General has convened a High-Level Panel on Access to Medicines, "to review and assess proposals and recommend solutions for remedying the policy incoherence between the justifiable rights of inventors, international human rights law, trade rules and public health in the context of health technologies"⁴.

The HLP Report⁴, recently issued, clearly addresses crucial recommendations to guide research and development (R&D) of health technologies and access, stressing that today barriers constrain both rich and poor countries. Undue political and economic pressure on trade agreements hampering the use of the flexibilities belong to the World Trade Organization TRIPS Agreement is strongly criticized whereas the current intellectual property (IP) system has divergent visions on this Report. This article aims to make a reflection on access to medicines, highlighting synergies with *Laudato Si'*.

DISCUSSION

Barriers to access to medicines

Despite all progress in health care, there still are disabling inequalities in access to medicines and health services and billions of people live without access to the necessary health products. There is also an awareness that access to medicines is a broad issue that affects people and health systems worldwide⁶.

Barriers to access to medicines have different roots, but they are deeply interrelated, such as global R&D and production with a focus on potentially more profitable products; intellectual property system plus multilateral and bilateral trade agreements interest conflicts.

The current R&D system of new medicines does not adequately meet the needs of the majority of the world's population^{6,7}. Such needs include affordable medicines for diseases with global incidence, new treatments for neglected diseases, new

antimicrobials and other essential medicines for conditions that disproportionately affect the poor.

IP has gained particular significance with increased attention to new essential medicines for the treatment of diseases of global incidence, including communicable and non-communicable diseases.

New monopoly medicines, like those for Hepatitis C or Cancer, are being launched at unaffordable prices, bringing health systems near collapse whenever new technologies are made available.

Effective tools for global governance are required to generate medical R&D as a global public good, based on the understanding that a politically and financially sustainable system will require both fair contributions from all, and fair benefit-sharing for all⁶.

Lessons from *Laudato Si'* and other teachings of Pope Francis

Contemporary issues such as access to medicines, pollution, climate change or global equality are confronted with weak political responses and submit politics to technology and finance¹. Nonetheless, Technology has remedied countless evils which used to harm and limit human beings. How can we not feel gratitude and appreciation for this progress, especially in the fields of medicine, engineering, and communications? How could we not acknowledge the work of many scientists and engineers who have provided alternatives to make development sustainable?¹.

As stated in *Laudato Si'*, "Politics and economy tend to blame each other when it comes to poverty and environmental degradation. It is hoped that they can acknowledge their own mistakes and find forms of interaction directed to the common good"¹.

Pope Francis has drawn attention to the full exercise of human dignity and the cruel consequences of a globalized economy. Based on the Pope thoughts we can conclude that he is challenging us to reflect on the development of nations and of health care, through a discussion on trade agreements and access to medicines. The purpose of this discussion could be to claim that certain health issues, including the elimination of specific diseases, require urgent political attention, above and beyond all other commercial or political interests^{8,9}.

The Encyclical Letter points to the "intimate relationship between the poor and the fragility of the planet, the conviction that everything in the world is connected, the critique of new paradigms and forms of power derived from technology, the call to seek other ways of understanding the economy and progress, the value proper to each creature, the human meaning of ecology, the need for forthright and honest debate, the serious responsibility of international and local policy, the throwaway culture and the proposal of a new lifestyle"¹.

As known: "science and technology are not neutral"¹, but it is our moral obligation to seek, fight and build a better future for those behind us and for the generations we will deliver to.



We need to recover the expectations that initiatives like these awake in humanity. “There is also the fact that people no longer seem to believe in a happy future; they no longer have blind trust in a better tomorrow based on the present state of the world and our technical abilities. There is a growing awareness that scientific and technological progress cannot be equated with the progress of humanity and history, a growing sense that the way to a better future lies elsewhere [...]”¹.

The Encyclical *Laudato Si'* and other teachings of Pope Francis emphasized some main pillars to encourage a more effective global AIDS response. According to Pope Francis, “caring for our common home, and for all people who live on this earth, requires not just an economic and technological revolution, but also a cultural and spiritual revolution - a profoundly different way of living the relationship between people and the environment, a new way of ordering the global economy”.

Pope Francis insists on the urgency of changing our sense of progress, our management of the economy, and our lifestyle¹⁰.

The report of the United Nations Secretary-General's High-Level Panel on Access to Medicines mentions in its preface that in spite of our scientific knowledge, many people and communities in need are neglected due to diverse reasons. Availability, affordability and adaptation to specific settings and patient categories remain problematic. Recommendations from the Report aim to address TRIPS Flexibilities and eliminate TRIPS-plus provisions, to deal with publicly-funded research, with innovation, with governance and with transparency in all the innovation chain⁴.

As the UN Secretary-General has stated during the transition from the Millennium Development Goals to the Sustainable Development Goals and 2030 Agenda, if the goal is to leave no one behind, concrete and actionable steps must be enforced by all stakeholders, including governments, policy-makers, business leaders, international organizations and civil society in a worldwide mobilization for improving health and well-being for all.

Yet, as per the *Laudato Si'*, “the principle of the maximization of profits, frequently isolated from other considerations, reflects a misunderstanding of the very concept of economy”¹¹.

Human dignity, human rights and the way forward

Even if Pope Francis's Encyclical does not specifically mention medicines, it truly talks about technology and challenging situations directly related to areas of health. The reflections set forward by *Laudato Si'* lead us to realize the connections that exist between trade and health. They also give us elements to correctly frame the need for having innovation in medicines affordable and accessible to those in need. The concern for the poorest of the society is also a fundamental point from the Encyclical that can guide this change in health-trade relationships.

Certainly, not with the State-assured more than 20 years of monopolies and prices set up by the industry with no concern for the consequences, especially making new products unavailable for the poor. After all, “the rich and the poor have equal dignity [...]”¹.

Access to medicines is a complex and multidimensional issue involving public health, social justice and international human rights obligations. Access to medicines' gap is a paradigm showing how economics and trade rules conflict with human rights, including the right to life, health and development¹¹.

According to the Encyclical Letter *Laudato Si'*, “the technocratic paradigm tends to dominate economic and political life”¹¹. At the same time, it is recognized that by itself, the market cannot guarantee integral human development and social inclusion. The discussion related to trade and health and the balance between innovation and public health addressing the need to ensure access to medicines as part of the human right to health has been a long battle.

To ensure human dignity and policies having a human rights approach at the core, we need to face and remove barriers, such as intellectual property, monopolies and oligopolies, unaffordability and particularly overwhelming and unacceptable human greed. If we are to really build a better world and a better future for our next generations, we must remedy or correct the misalignments and policy incoherence between the individual and corporate rights of inventors, innovators or manufacturers and the human rights of humankind, discussing trade and health in the context of public health and access to technologies as a right linked to health and life.

In fact, *Laudato Si'* stresses “the urgent need for a radical change in the conduct of humanity”. Based on the text, we can affirm that it suggests an ethical foundation for the change. Then, the text gives us a caution: “the most extraordinary scientific advances, the most amazing technical abilities, the most astonishing economic growth, unless they are accompanied by authentic social and moral progress, will definitely turn against men”¹¹.

For the reasons discussed, we urge further action and we acknowledge *Laudato Si'* as a bridge towards ensuring access to medicines with a human rights approach at the core.

In spite of all efforts and promising results from the MDG, millions have been left behind and Member States have agreed on the SDG targeting the year 2030^{4,12}. This commitment has repeatedly been stressed by Pope Francis, when he mentions that “The future demands of us critical and global decisions in the face of worldwide conflicts which increase the number of the excluded and those in need”¹³.

CONCLUSIONS

Although not explicitly mentioning access to medicines, the scope contained in *Laudato Si'* addresses reflections that aim to criticize irresponsible development, at the same time highlighting the need for innovation and modern technologies to the benefit of humankind. These possibilities can be interpreted as a very strong message of a human rights approach while urging a pledge for equity, universality and integrality. Therefore, the Encyclical brings us on a link to the shift from the Millennium Development Goals to the 2030 Agenda for Sustainable Development.



Additionally, we understand that the recommendations derived from the UNSG HLP Report, as moving to remedy the policy incoherence between individual rights and collective rights, eliminating barriers and pledging to leave no one behind, are completely aligned with the progress conceived on health care worldwide.

As mentioned before, effective tools for ensuring adequate global governance are necessary to seek the balance between

health and trade and address innovation and new health technologies reaching the poorest of the poor, addressing policies that will be able to eliminate regulatory and IP barriers. *Laudato Si'* is undoubtedly a major pledge on the need to ensure a human rights approach. Access to medicines is a way of alleviating suffering and ensuring prevention, promotion and treatment of diseases and other conditions that affect human beings globally, with a stronger impact on neglected and vulnerable populations.

REFERENCES

1. Vatican. Francis. Encyclicals. Encyclical letter: *Laudato Si'* of the Holy Father: Francis on care for our common home. Vatican: Libreria Editrice Vaticana; 2015[cited 2016 Mar 30]. Available from: <http://w2.vatican.va/content/francesco/en/encyclicals.index.html#encyclicals>
2. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Uso racional de medicamentos: temas selecionados. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2012[cited 2018 Mar 03]. (Série A. Normas e manuais técnicos). Available from: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/uso_racional_medicamentos_temas_selecionados.pdf
3. Malta DC, Morais Neto OL, Silva MMA, Rocha D, Castro AM, Reis AAC et al. National Health Promotion Policy (PNPS): chapters of a journey still under construction. *Cienc Saúde Coletiva*. 2016;21(6):1683-94. <https://doi.org/10.1590/1413-81232015216.07572016>
4. United Nations Secretary-General's. High-Level Panel on Access to Medicines. Report of the United Nations Secretary-General's high-level panel on access to medicines: promoting innovation and access to health technologies. New York; United Nations Secretary-General's; 2016[cited 2018 Mar 03]. Available from: <http://www.unsgaccessmeds.org/final-report/>
5. Boerma JT. The SDGs: reflections on the implications and challenges for health. In: World Health Organization. Health in 2015: from MDGs to SDGs. Geneva: World Health Organization; 2015[cited 2016 May 18]. Available from: http://www.who.int/gho/publications/mdgs-sdgs/MDGs-SDGs2015_chapter9.pdf?ua=1
6. Moon S, Bermudez J, Hoen E. Innovation and access to medicines for neglected populations: could a treaty address a broken pharmaceutical R&D System? *PLoS Med*. 2012;9(5):e1001218. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001218>
7. Bermudez J. Acesso a medicamentos: direito ou utopia? Rio de Janeiro: E-papers; 2014[cited 2018 Apr 06]. Available from: http://www.e-papers.com.br/produtos.asp?codigo_produto=2567
8. Vatican. Francis. Message of his Holiness Pope Francis on the occasion of the Third World Forum of Local Economic Development. Vatican: Libreria Editrice Vaticana; 2015[cited 2016 Mar 30]. Available from: https://w2.vatican.va/content/francesco/en/messages/pont-messages/2015/documents/papa-francesco_20151010_messaggio-forum-sviluppo-locale.html
9. Vatican. Francis. Message of His Holiness Pope Francis to the Executive President of the World Economic Forum on the Occasion of the Annual Gathering in Davos-Klosters (Switzerland). Vatican: Libreria Editrice Vaticana; 2015[cited 2017 Dec 14]. Available from: https://w2.vatican.va/content/francesco/en/messages/pont-messages/2015/documents/papa-francesco_20151230_messaggio-wef.html
10. Turkson P. Ethical and Religious Foundations for this Dialogue. The Encyclical *Laudato Si'* and other teachings of Pope Francis: an ethical basis for efforts to "fast track" a more effective global AIDS response. Vatican: Libreria Editrice Vaticana; 2016[cited 2016 May 18]. Available from: http://www.iustitiaetpax.va/content/dam/justiziaepace/presidenteinterventi/2016/Turkson_HLDIALOGUE_140416_ENG.pdf
11. United Nations. Human Right. Access to Medicines in the context of the Right to Health. Geneva: United Nations Human Rights; 2015[cited 2018 Feb 06]. Available from: http://www.ohchr.org/Documents/Issues/SForum/SForum2015/OHCHR_2015-Access_medicines_EN_WEB.pdf
12. World Health Organization. Health in 2015: from MDGs, millennium development goals, to SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2015[cited 2018 Feb 06]. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js22230en/>
13. Vatican. Francis. Apostolic journey of his Holiness Pope Francis to Cuba, to the United States of America and visit to the United Nations Headquarters (19-28 september 2015). Meeting with the members of the General Assembly of the United Nations Organization. Address of the Holy Father. Vatican: Libreria Editrice Vaticana; 2015[cited 2017 Dec 14]. Available from: https://w2.vatican.va/content/francesco/en/speeches/2015/september/documents/papa-francesco_20150925_onu-visita.html

Conflict of Interest

Authors have no potential conflict of interest to declare, related to this study's political or financial peers and institutions.



This publication is licensed under Creative Commons Attribution 3.0 Not Adapted. For a view of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Uso da Análise dos Modos de Falha e seus Efeitos (FMEA) como ferramenta para mapear os riscos em um estudo clínico

Use of Mode and Effects Analysis (FMEA) as a tool to map the risks involved in a clinical study

RESUMO

Monique Gurgel de Oliveira^I

Antonio Carlos Siani^{I,*}

Cristiane Machado Quental^{II}

Tiago Filgueiras Porto^{III}

Valeria Cavalcanti Rolla^{III}

Introdução: O presente estudo descreve a aplicação da ferramenta de gerenciamento de riscos Análise de Modo e Efeito de Falha (*Failure Mode Effects Analysis* - FMEA) a uma pesquisa clínica que estabelecerá um tratamento de indivíduos simultaneamente infectados por HIV e tuberculose. **Objetivo:** Demonstrar a importância da análise de riscos associada aos protocolos de estudos clínicos na salvaguarda do participante e dos dados do estudo, e como padrão de qualidade do estudo. **Método:** Os procedimentos demandados na execução do protocolo clínico e os potenciais modos de falha a eles associados foram estipulados com base na programação de visitas do participante ao centro do estudo. Os modos de falha foram valorados entre 1 e 10 de acordo com: Gravidade, Ocorrência e Detectabilidade, calculando-se o Número de Prioridade de Risco (NPR) pela multiplicação dos três valores. **Resultados:** Num painel de 25 procedimentos e 60 modos de falha, 50% resultaram em NPR > 120; seis deles contendo mais de cinco modos de falha. Os maiores riscos foram associados à estratégia DOT (NPR 294), à coleta de sangue (NPR 288), ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (NPR 270) e a coletas de dados do participante (NPR 240). **Conclusões:** Os resultados demonstraram a importância da FMEA como instrumento de avaliação de riscos em estudos clínicos, alinhando-se com recomendações de órgãos normalizadores internacionais.

PALAVRAS-CHAVE: Pesquisa Clínica; Gerenciamento de Risco; FMEA

ABSTRACT

Introduction: This study describes the application of the Failure Mode and Effects Analysis (FMEA) as a tool for risk management during clinical research to establish the treatment of patients simultaneously infected with HIV and tuberculosis. **Objective:** To demonstrate the importance of risk analysis associated with clinical trial protocols in safeguarding the participant and study data, and as a study's quality standard. **Method:** Procedures demanded by the clinical protocol were detailed and then associated with failure modes based on the programmed visits of the participant to the study center. The failure modes were rated between 1 and 10 according to: Severity, Occurrence and Detectability, and the Risk Priority Number (RPN) was calculated by multiplying the three values. **Results:** In a panel of 25 procedures and 60 failure modes, 50% resulted in RPN > 120; six of which contained more than five failure modes. The highest risks were associated with the DOT strategy (RPN 294), blood collection (RPN 288), the Informed Consent Term (RPN 270) and participant data collection (RPN 240). **Conclusions:** The results demonstrate the importance of FMEA as a tool to assess risks in clinical studies, in line with the recommendations of international standardization organizations.

KEYWORDS: Clinical Research; Risk Management; FMEA

^I Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz (Farmanguinhos/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Centro de Relações Internacionais em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (CRIS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{III} Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (INI/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: antonio.siani@far.fiocruz.br



INTRODUÇÃO

O estudo clínico constitui a base da medicina baseada em evidências¹. Para promover um ensaio clínico com sucesso, é necessário constituir uma equipe multidisciplinar composta por profissionais devidamente especializados, com suas funções e deveres bem estabelecidos. Esta equipe deve integrar médicos, farmacêuticos, enfermeiros e pessoal administrativo, que são peças-chave para a boa condução de um estudo clínico^{2,3}, de acordo com as diretrizes internacionais da IV Conferência Pan-Americana para Harmonização da Saúde⁴. As metas do estudo devem ser integradas e coordenadas para convergir ao objetivo maior representado pelo estabelecimento da nova terapia, aliado à agregação de valor de mercado ao produto ou tratamento desenvolvido⁵, sem negligenciar aspectos éticos ligados à participação dos voluntários e aos projetos de pesquisa.

Ao se estabelecerem como prática no Brasil, os ensaios clínicos atenderam as recomendações apresentadas na Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas⁶ e no Documento das Américas⁷, adotando suas atualizações periódicas. O caráter técnico dos projetos de pesquisa clínica é avaliado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)^{8,9}.

Segundo o estabelecido pela normativa atualmente vigente no país (Resolução n° 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde e complementares), estudos clínicos envolvendo seres humanos devem ser avaliados pelo sistema Comitês de Ética em Pesquisa-Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CEP-CONEP). Neste sistema, as avaliações iniciais ficam a cargo dos CEP institucionais e, conforme aplicável, pela CONEP. Assim, a conduta ética é assegurada pela aprovação prévia dos protocolos pelas autoridades éticas¹⁰ que, ao considerar o envolvimento de seres humanos, têm a função de salvaguardar os direitos, a segurança, e o bem-estar dos participantes da pesquisa⁶. Nesta avaliação, as autoridades consideram, basicamente, o protocolo proposto e documentação complementar para a pesquisa, cuja condução adequada está estritamente relacionada ao sucesso do um estudo clínico.

A equipe de pesquisadores, médicos e técnicos responsáveis e os patrocinadores do estudo, ao lidarem direta ou indiretamente com os sujeitos do estudo, devem pautar suas ações em dois fundamentos: a proteção dos direitos dos participantes e a garantia da segurança e confidencialidade dos dados gerados durante os processos de coleta, registro e tratamento estatístico. Parâmetros éticos regem primordialmente a segurança dos participantes e a confidencialidade de suas informações, enquanto que a adequação a critérios técnico-regulatórios de qualidade e validação científica estão mais relacionados ao segundo¹¹. Entretanto, é de suma importância destacar que as óticas ética e regulatórias são complementares e indissociáveis, formando um binômio fundamental para a boa condução de pesquisas clínicas, em todos os seus aspectos.

Considerando-se a tendência de rápido crescimento da pesquisa clínica em países como o Brasil^{11,12}, a abordagem dos riscos aplicada aos estudos vem crescendo em importância¹³. Órgãos internacionais e pesquisadores têm chamado a atenção para a necessidade de uma gestão efetiva deste processo¹⁴, não apenas para evitar a exposição a riscos, e mesmo a lesão dos participantes da pesquisa (causados por eventual ineficiência da estrutura ou mesmo das equipes), mas também para fortalecer a qualidade do gerenciamento do projeto^{3,15}. Esta preocupação está refletida nas atualizações recentes do Guia de Boas Práticas Clínicas do *International Conference of Harmonisation* (ICH), alcançando os estudos realizados no Brasil, visto que o país passou a integrar o ICH no final de 2016. Ao fazer parte de um complexo desenvolvimento farmacêutico, a gestão organizacional das múltiplas atividades exige um gerenciamento integrado e robusto¹⁶ que garanta a eficiência da aplicação dos recursos financeiros no estudo. Este é também motivo imperioso na demanda pela abordagem com mínimas falhas e erros de previsão.

Durante um ensaio clínico, as questões de segurança relativas ao voluntário, assim como à equipe multiprofissional de saúde, podem ser transpostas ou prontamente adaptadas a partir das rotinas supramencionadas, de atendimento médico e assistência farmacêutica já estabelecidos nos centros, já que, em essência, não diferem quanto à natureza das atividades. Nesses casos, os ganhos na segurança dos participantes das pesquisas, proporcionados por variadas e oportunas análises de risco aplicadas aos cuidados médicos têm sido reportados regularmente na literatura^{14,17,18,19}.

A adoção de técnicas de monitoramento eficazes associadas a ensaios clínicos, num cenário de crescente preocupação geral com serviços médicos seguros e o bem-estar do paciente aliada à pressão de instâncias reguladoras, veem produzindo uma onda de apoio à Monitoria Baseada em Risco (*Risk Based Monitoring* - RBM)²⁰. Esta abordagem tem como objetivo desenvolver as melhores estratégias para a realização de atividades relacionadas ao estudo clínico dentro do centro de pesquisa. De maneira artificial, podem-se equacionar dois momentos relevantes para a abordagem de riscos num estudo clínico:

- Riscos no desenho do protocolo clínico: relacionados à capacidade de previsão e planejamento dos pesquisadores envolvidos no estudo clínico, como: (i) previsões imprecisas de eventos relacionados com a segurança, como, por exemplo: a toxicidade relacionada de um fármaco em teste, que pode levar a danos graves ao participante e à terminação prematura dos estudos; (ii) previsões imprecisas das capacidades de recrutamento, que podem acarretar um estudo não informativo; (iii) estimativa imprecisa da diferença no alcance da terapia proposta ou algum efeito entre as intervenções do estudo (um efeito superestimado pode levar a uma subestimação no tamanho da amostra necessária para se obter uma inferência estatisticamente válida²¹ ou um efeito subestimado pode levar ao



recrutamento excessivo e, portanto, à exposição desnecessária dos voluntários aos riscos)¹⁵.

- Riscos na execução do protocolo clínico: relacionados com a dinâmica do monitoramento do estudo, demandando esforços para mitigar riscos existentes durante a condução dos procedimentos clínicos. Ao balizar as atividades do estudo mediante o referencial do protocolo de pesquisa e avaliar a pertinência de ações adicionais (por exemplo: treinamento de investigadores clínicos e da equipe, esclarecimento dos requisitos do protocolo etc.), o monitoramento passa a constituir uma ferramenta de controle do processo. Levando isso em especial consideração, reforça-se a ideia de este ser o contexto mais adequado para avaliar riscos, já que os seus resultados são essenciais para garantir a proteção dos indivíduos e a qualidade dos dados nos locais²².

O presente estudo insere-se no contexto da gestão de riscos ao protocolo de um estudo clínico em curso, cujo alvo é estabelecer uma terapia com medicamentos antirretrovirais (ARV) em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e tuberculose. Este estudo, assim como a proposta de avaliação de riscos associado ao seu protocolo clínico, foram realizados no Laboratório de Pesquisa Clínica em Micobacterioses (Lapclin-TB) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro. O objetivo foi aportar instrumentos para reforçar a manutenção do padrão de qualidade durante este estudo específico, como meio de salvaguardar a segurança clínica do participante da pesquisa e, também, dos dados do estudo. Os números crescentes de estudos clínicos gerenciados pelo Lapclin-TB, assim como a complexidade envolvida na gestão da qualidade durante os procedimentos clínicos e laboratoriais durante sua execução, justificam buscar meios de minorar as possíveis falhas e criar rotinas mais seguras. Para alcançar tal objetivo, um conjunto de procedimentos do protocolo clínico foi modulado como um processo, em cujas etapas de execução foi aplicada a Análise de Modo e Efeito de Falha (*Failure Mode Effects Analysis - FMEA*) para estabelecer e destacar os potenciais riscos associados aos procedimentos que compõem esse processo.

MÉTODO

O projeto de pesquisa avaliado neste estudo envolve o processo de administração de medicamento aos participantes da pesquisa, e também da cadeia completa de procedimentos ao longo das suas visitas clínicas, conforme designados no protocolo do estudo. O estudo multidisciplinar está em curso no Ambulatório de Tuberculose do Lapclin-TB do INI da Fiocruz no Rio de Janeiro. Neste setor estão sendo realizadas as visitas de um estudo para avaliar a farmacocinética de um medicamento tuberculostático, quando aumentadas as doses dos ARV-1/ARV-2 (combinação de antirretrovirais selecionada para teste) em pacientes com HIV e tuberculose. Com seus termos protegidos pela confidencialidade, o estudo em pauta atende todas as aprovações ético-regulatórias aplicáveis, sendo registrado no site *ClinicalTrials.gov*.

A ferramenta escolhida foi a FMEA, por ser esta uma ferramenta estruturada, com flexibilidade de utilização em processos estruturados por encadeamento de etapas²³. Trata-se de uma ferramenta qualitativa de avaliação de riscos que fornece resultados comparáveis entre si, permitindo subsidiar decisões e aperfeiçoar o processo em andamento, com base na mitigação dos riscos²⁴. O mapeamento dos riscos teve por base o Documento das Américas (publicação da Organização Pan-Americana da Saúde que dispõe sobre Boas Práticas Clínicas). O referencial teórico foi o guia tripartite harmonizado pelo *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* sobre Gerenciamento de Risco ICH Q9 e sua versão atualizada (ICH E6(R2) de 2016)^{10,25}.

O desenvolvimento metodológico envolveu três abordagens integradas. Primeiramente, todos os processos do protocolo do estudo envolvendo o participante da pesquisa foram estabelecidos dentro de um fluxograma, cujo objetivo foi demonstrar o encadeamento de etapas idealizadas como base de análise de riscos. Para tal, foram utilizadas como evento orientador e principal perspectiva de risco, as visitas protocolares dos participantes ao ambulatório.

Em seguida, a construção da FMEA caracterizada para o caso em estudo teve base nas três matrizes de critérios de abordagem das falhas: **Gravidade**, **Ocorrência** (frequência) e **Detectabilidade** (possibilidade de ser detectada). Dentro de cada critério, as falhas são equacionadas e valoradas segundo pontuação entre 1 e 10. Para a **Gravidade** da falha, o valor 1 representa um risco inócuo e o valor 10 pode significar lesão ao participante ou mesmo o seu óbito. Na escala de **Ocorrência**, quanto mais o valor se aproxima de 10, maior a possibilidade de ocorrer o modo de falha. De tendência inversa, o valor 1 para **Detectabilidade** representa a maior probabilidade de se detectar a causa e/ou modo de falha antes ou durante a realização do procedimento e o valor 10 corresponde à impossibilidade de sua detecção no processo. A caracterização da FMEA está apresentada na Tabela 1. Este processo foi realizado em sessões de *brainstorming* com a equipe de profissionais envolvida no estudo: duas coordenadoras, uma médica, uma farmacêutica, duas enfermeiras e uma técnica de enfermagem.

Uma vez elaboradas essas matrizes, a ferramenta foi aplicada a cada procedimento estabelecido inicialmente. Isto também envolveu a dinâmica de *brainstorming* consensual com a equipe, quando foram exaustivamente aventadas todas as falhas passíveis de colocar cada procedimento em risco. Foi calculado o Número de Prioridade do Risco (NPR) para classificar cada modo de falha no caso em estudo, multiplicando entre si os três valores obtidos (gravidade x ocorrência x detecção), e cujo máximo é representado pelo valor 300. Para uma perspectiva do impacto prático dos resultados, foram classificadas faixas de valores relacionadas a riscos baixos ($NPR \leq 120$), intermediários ($121 \leq NPR \leq 200$) e altos ($NPR \geq 200$).



Tabela 1. Valoração dos modos de falha segundo os critérios de Gravidade, Ocorrência e Detectabilidade aplicados às visitas protocolares do participante ao Centro do Estudo.

| Critérios (níveis) para Gravidade da falha | Índice |
|--|--------|
| A falha afeta em nada (nenhum) | 1 |
| Possível atraso no procedimento (menor) | 2 |
| Atraso no procedimento (baixo) | 3 |
| Provável perda de dados e atraso no procedimento. Pode haver algum impacto regulatório (baixo) | 4 |
| Certamente haverá perda de dados e atraso no procedimento (moderado) | 5 |
| Possível lesão ao paciente, perda de dados e atraso no procedimento. Há impacto regulatório (alto) | 6 |
| Provavelmente irá lesar o paciente, perda de dados e atraso no procedimento. Há impacto regulatório (alto) | 7 |
| Lesão ao paciente, perda de dados e atraso no procedimento. Há alto impacto regulatório (alto) | 8 |
| O modo de falha potencial afeta a segurança do participante na operação e/ou gera não conformidades regulatórias. O procedimento deve ser interrompido até novas ações para eliminar os perigos. Danos sérios ao participante (alto) | 9 |
| Óbito do paciente | 10 |
| Escala de Ocorrência (frequência) da falha | Índice |
| Improvável | 1 |
| Não provável, remoto | 2 |
| Não comum, mas pode acontecer | 3 |
| Menos de uma vez em dez procedimentos | 4 |
| Menos de uma vez a cada quatro procedimentos | 5 |
| Menos de uma vez a cada dois procedimentos | 6 |
| Mais de uma vez a cada dois procedimentos | 7 |
| A maioria do tempo | 8 |
| Quase contínuo | 9 |
| Constante, contínuo | 10 |
| Escala para Detectabilidade da falha | Índice |
| Quase certa de detecção | 1 |
| Muito alta a chance de detecção | 2 |
| Alta a chance de detecção | 3 |
| Moderada a alta a chance de detecção | 4 |
| Moderada chance de detecção | 5 |
| Baixa chance de detecção | 6 |
| Muito baixa a chance de detecção | 7 |
| Remota a chance de detecção | 8 |
| Muito remota a chance de detecção | 9 |
| Nenhuma chance de detecção | 10 |

RESULTADOS

A aplicação da FMEA ao conjunto de procedimentos contidos no protocolo do estudo, com referência às visitas do participante ao centro de estudo, está resumida na Tabela 2, na qual a primeira coluna apresenta os 25 procedimentos distintos executados neste estudo (segundo encadeamento cronológico), conforme desdobrados em 60 modos de falhas (numerados na segunda coluna da Tabela 2). A abordagem dos modos de falha pela FMEA no caso do estudo clínico em foco permitiu: (i) mapear as falhas potenciais dentro dos processos nos quais o paciente participa, (ii) identificar as possíveis causas e probabilidade de ocorrência para cada modo de falha, (iii) balizar a severidade no caso de ocorrência da falha e (iiii) avaliar o sistema de detecção das falhas. No geral, dos 60 modos de falhas tabelados, 10 resultaram em NPR acima de 200 (17%) e 19 ficaram entre 120-200 (32%) (Figura).

Uma visualização comparativa dos resultados está apresentada na Figura, que também inclui uma rápida abordagem sobre a

distribuição e variabilidade dos dados obtidos, representados pelos valores dos NPR resultantes para cada modo de falha.

A distribuição dos valores obtidos para NPR foram plotados em um gráfico *Box-Plot* (inserido na Figura), no qual se visualiza a mediana (linha central) e os quartis. A metade dos modos de falha com NPR mais altos (acima da mediana de 108) compreendeu a variação mais alta do conjunto de dados, numa razão de 2:1 comparativamente à variação dos NPR dos procedimentos abaixo da mediana. As etapas no quartil superior abrangem 15 modos de falha relacionados aos maiores NPR, e que também compreendem uma maior dispersão dos dados, produzindo também uma variação mais ampla no conjunto deles, conforme alinhados de maneira decrescente na Figura. Neste conjunto de valores, dez procedimentos com NPR > 200 (17% do total de procedimentos) seriam merecedores de maior atenção durante a execução do estudo clínico, já que incorporam maiores riscos.



Tabela 2. Aplicação da Análise do Modo e Efeito de Falha (FMEA) nas visitas programadas no estudo clínico para estabelecer terapia em casos de HIV-Tuberculose.

| Etapa do processo ¹ | Modo de falha potencial ² | G | O | D | NPR | Ação preventiva |
|--|--|----|---|-----|-----|---|
| Visita de Triagem | | | | | | |
| I. Aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 1. Não assinatura pelo médico | 9 | 2 | 2 | 36 | Intensificar o treinamento da equipe no protocolo do estudo e nas Boas Práticas Clínicas. Checagem do coordenador a cada novo consentimento do paciente. |
| | 2. Não assinatura pelo participante | 9 | 2 | 2 | 36 | |
| | 3. Versão obsoleta aplicada | 9 | 3 | 4 | 108 | |
| | 4. Versão não aprovada | 9 | 3 | 4 | 108 | |
| | 5. Processo de consentimento comprometido | 10 | 3 | 9 | 270 | |
| II. Garantia da confidencialidade | 6. Confidencialidade revelada | 6 | 3 | 3 | 54 | Codificar o controle randomizado dos pacientes. Treinar a equipe em Boas Práticas Clínicas. |
| III. Avaliação da história médica | 7. Procedimento executado inadequadamente ou não realizado | 9 | 3 | 5 | 135 | Criar <i>checklist</i> e modelos-padrão para alertar o médico em suas ações. Treinar os médicos no protocolo e nos procedimentos antes de iniciar o estudo. |
| | 8. Transcrição incompleta da informação no CRF | 9 | 4 | 5 | 180 | |
| IV. Aferição de peso, altura e sinais vitais | 9. Procedimento executado inadequadamente ou não realizado | 9 | 3 | 5 | 135 | Atualizar a planilha de controle dos equipamentos de maneira periódica (por exemplo: semanal). Treinar e atualizar a equipe de enfermagem. |
| | 10. Coleta errada de informações | 10 | 3 | 8 | 240 | |
| V. Exame físico completo | 11. Não realização do exame físico | 10 | 2 | 2 | 40 | Treinamento da equipe. |
| | 12. Realizado de maneira incorreta | 9 | 4 | 8 | 288 | Intensificar treinamento nos procedimentos laboratoriais. |
| 13. Registro equivocado dos resultados | 9 | 4 | 8 | 288 | | |
| 14. Quantidade errada coletada | 4 | 2 | 8 | 192 | | |
| 15. Paciente não pronto para os procedimentos | 6 | 4 | 2 | 48 | | |
| 16. Ato de coleta de maneira incorreta | 9 | 3 | 8 | 216 | | |
| VI. Coleta de sangue | 17. Material de análise bioquímica vencido | 7 | 3 | 2 | 42 | Conferir estoque periodicamente. Organizar material para disponibilizá-lo segundo o prazo de validade. |
| | 18. Infecção do participante por material não estéril | 9 | 3 | 5 | 135 | Treinar os técnicos responsáveis para contínua conferência do material estéril x validade. Elaborar POP de coleta. |
| | 19. Troca de tubos coletores | 7 | 3 | 8 | 168 | Intensificar treinamento nos procedimentos laboratoriais. Separar tubos por reagentes. Rotular previamente à coleta. Elaborar POP. |
| | 20. Contaminação de tubos coletores | 7 | 3 | 8 | 168 | Ter disponível pipeta de reserva. |
| | 21. Erros de pipetagem | 6 | 4 | 8 | 192 | Reforçar o treinamento do técnico e a equipe de enfermagem nos procedimentos do estudo. Usar uma pipeta para cada visita. |
| | 22. Centrifugação incorreta | 7 | 4 | 8 | 224 | |
| | 23. Transporte da amostra incorreto | 6 | 3 | 4 | 72 | Reforçar o treinamento do técnico e a equipe de enfermagem nos procedimentos do estudo. |
| | 24. Armazenamento inadequado da amostra | 6 | 4 | 3 | 72 | |
| VII. Solicitação para inclusão ou não do participante | 25. Exames não solicitados ou solicitação incompleta | 9 | 3 | 2 | 54 | Promover <i>checklist</i> , modelo com todas as informações que os médicos devem usar para evoluir no prontuário. |
| | 26. Exames não realizados pelo participante | 7 | 4 | 3 | 84 | Promover orientação médica cuidadosa e designar acompanhamento do participante ao laboratório. |
| VIII. Avaliação dos critérios de inclusão e exclusão do participante | 27. Não avaliação dos critérios | 8 | 2 | 2 | 32 | Promover <i>checklist</i> , modelo com todas as informações que os médicos devem usar para evoluir no prontuário. |
| | 28. Interpretação errônea dos critérios | 9 | 2 | 6 | 108 | Treinar regularmente a equipe médica nos procedimentos do estudo e reforço. |
| | 29. Corrupção conflito de interesses | 10 | 2 | 8 | 160 | |
| IX. DOT-telefônico | 30. DOT incompleto ou não realizado pela equipe | 7 | 3 | 3 | 63 | Promover <i>double check</i> e/ou duas pessoas realizarem esta atividade. |

Continua



Continuação

| | | Visita nº 1 e Escalonamento | | | | |
|---|--|-----------------------------|---|---|-----|---|
| X. Janelas | 31. Participante não iniciar medicação com os ARV de escolha na consulta 1 | 8 | 3 | 5 | 120 | Treinar a equipe para aspectos específicos da medicação (informação que consta em formulário específico no Manual Operacional) |
| | 32. Participante não escalonar a medicação na data correta | 6 | 4 | 6 | 120 | Treinar a equipe para aspectos específicos da medicação (informação que consta em formulário específico no Manual Operacional). Utilizar DOT-telefônico. |
| XI. Omissão de informações clínicas pelo participante | 33. Não descrição de doença concomitante existente ou de novos eventos adversos que tenham ocorrido desde o início do estudo | 9 | 3 | 7 | 189 | Promover o bom relacionamento médico-participante. Alertar no diário do participante (que o mantém como posse) uma lista de possíveis eventos adversos causados pela medicação, solicitando anotações feitas por ele em sua casa. |
| XII. Medicação concomitante | 34. Participante fazendo uso de medicação proibida pelo protocolo | 8 | 4 | 3 | 96 | Treinar a equipe para aspectos específicos da medicação (informação que consta em formulário específico no Manual Operacional) |
| | 35. Não investigação sobre medicação concomitante | 8 | 3 | 7 | 168 | Treinar médico e disponibilizar uma lista de medicamentos para consulta no momento do atendimento. |
| XIII. Dispensação da medicação | 36. Não dispensação da medicação para o participante | 10 | 2 | 3 | 60 | Treinar o farmacêutico. |
| | 37. Orientação incorreta sobre administração da medicação | 9 | 4 | 6 | 216 | Treinar a equipe, estabelecer POP bem definido e adotar planilhas de controle das medicações. |
| | 38. Quantitativo dispensado erradamente, entre uma visita e outra | 8 | 3 | 3 | 72 | Atualizar o formulário a cada visita. |
| | 39. Dispensação de medicamento vencido ou próximo do vencimento | 10 | 3 | 3 | 90 | Checar a embalagem antes de entregar o medicamento ao paciente. |
| XIV. Escalonamento | 4. Não escalonamento | 6 | 4 | 6 | 144 | Aperfeiçoar a assistência farmacêutica. Alertar médico para tornar simples e fáceis as explicações. |
| XV. Realização dos exames de segurança | 41. Não realização dos exames | 8 | 3 | 2 | 48 | Treinar regularmente a equipe médica nos procedimentos do estudo e reforço. |
| | | Visita nº 2 | | | | |
| XVI. Janela | 42. Perda da janela de 1-2 semanas após escalonamento | 7 | 3 | 4 | 84 | Atualizar a planilha de controle das visitas. Confirmar na véspera a consulta com o participante, fornecendo as recomendações necessárias. |
| XVII. Eventos adversos graves | 43. Não monitoramento dos eventos adversos graves | 10 | 2 | 9 | 180 | Treinar o médico. |
| XVIII. Adesão aos ARV (contabilidade dos comprimidos no frasco) | 44. Não adesão aos ARV | 9 | 5 | 5 | 225 | Acompanhar o DOT com o participante, insistindo sobre a importância da medicação tomada corretamente. |
| | 45. Participante não trazer as medicações para contabilização; ou trazer incompleta | 6 | 5 | 5 | 150 | Registrar no diário (cartão DOT) a necessidade e importância da medicação tomada corretamente. |
| XIX. Coleta de sangue para farmacocinética | 46. Falta de leito hospitalar para o dia da farmacocinética | 9 | 3 | 5 | 135 | Reservar a sala com antecedência. |
| | 47. Participante não cumpriu regime de jejum de 12 h | 6 | 4 | 5 | 80 | Contatar o participante na véspera, instando sobre necessidade do jejum. |
| | 48. Participante não tomou a última medicação 12 h antes | 6 | 4 | 5 | 80 | Contatar o participante na véspera, instando sobre necessidade da medicação 12 h antes da consulta. |
| | 49. Desvio da temperatura da amostra coletada | 6 | 3 | 3 | 54 | Criar formulário para registro de saída, chegada, centrifugação e armazenamento da amostra. |
| | 50. Formulários preenchidos de maneira incorreta | 6 | 3 | 3 | 54 | Intensificar o treinamento nos procedimentos laboratoriais. |
| XX. Transporte da amostra para o exterior | 51. Pessoas não delegadas realizando a atividade | 8 | 3 | 3 | 72 | Verificar continuamente o formulário de delegações e as atividades atribuídas a cada profissional. |
| | 52. Amostra não chega ao seu destino | 7 | 2 | 7 | 98 | Preparar com antecedência a documentação da transportadora e do pesquisador. Aplicar <i>checklist</i> na documentação. Escolher transportadora idônea. |
| | 53. Amostra chega ao destino com qualidade inadequada | 6 | 3 | 5 | 90 | Aplicar <i>checklist</i> na documentação do patrocinador e do centro de estudo. Usar termômetro de monitoração preventiva junto com amostra. |
| | | Visita nº 3 | | | | |
| XXI. Transporte da amostra para o laboratório internacional | 54. Não disponibilidade da amostra em tempo hábil | 7 | 3 | 7 | 147 | Promover a rastreabilidade da amostra com a transportadora. |

Continua



Continuação

| | | Visita nº 4 | | | | |
|---|---|-------------|---|---|-----|--|
| XXII. Janela | 55. Perda da janela de 3-5 semanas | 7 | 3 | 4 | 84 | Atualizar a planilha de controle das visitas. Confirmar na véspera a consulta com o participante, fornecendo as recomendações necessárias. |
| XXIII. Adesão ao DOT-Plus | 56. Registro incorreto da tomada das medicações pelo Participante ou a pessoa por ele escolhida | 7 | 6 | 7 | 294 | Utilizar novos meios de se comunicar com o participante (por exemplo: <i>WhatsApp</i>). |
| | 57. Participante informa erradamente a farmacêutica ou durante a consulta | 7 | 6 | 7 | 294 | Melhorar a comunicação e a empatia com o participante. |
| XXIV. Adesão ao tratamento | 58. Não adesão | 9 | 5 | 4 | 180 | Acompanhar o DOT, instando regularmente o participante se medicar corretamente. |
| XXV. Inclusão das informações na ficha clínica no CRF | 59. Não inclusão ou inclusão de maneira incorreta | 8 | 4 | 3 | 96 | Manter constantemente a garantia da qualidade para cumprir os prazos comprometidos para liberar os dados para o patrocinador. |
| | 60. Atraso na inclusão das informações na CRF | 7 | 4 | 3 | 84 | Registrar na agenda (<i>Google</i>) a data limite para a inclusão das informações. |

¹ As etapas representam textualmente o fluxograma de procedimentos desenhado para as visitas durante o estudo clínico. O termo “janela” refere-se ao intervalo entre as visitas. “Escalonamento” refere-se às transposições de doses de medicamentos previstas no protocolo do estudo. Durante as visitas 2, 3 e 4, diversas etapas são repetições de procedimentos da visita 1 ou da visita anterior imediata; essas foram aqui suprimidas para evitar redundância, já que não influenciam o objetivo final, que é uma classificação de riscos por procedimentos.

² Na prática, os modos de falhas foram desdobrados quanto às causas potenciais e mecanismo de ocorrência de cada falha considerada individualmente (dados não mostrados).

G: gravidade; O: ocorrência; D: detecção; NPR: Número de Prioridade de Risco ($G \times O \times D$); CRF: *Case Report Form*; ARV: antirretrovirais; *ABAC: *Anti-Bribery Anti-Corruption* (ação usual na indústria farmacêutica para eliminar este risco específico); POP: procedimento operacional padrão; DOT: *Directly Observed Therapy*.
Fonte: Elaboração própria.

DISCUSSÃO

No cômputo geral, as atividades com maiores riscos potenciais comparativos ($NPR > 200$) e, portanto, destacadas como merecedoras de maior atenção durante o estudo clínico foram: a adesão pelo paciente aos medicamentos e à terapia pelo DOT-Plus, a correção no processo do TCLE, os registros adequados durante as coletas de sangue e a aferição de peso e sinais vitais. O potencial comprometimento no processo de aplicação do TCLE resultou em NPR 270, demonstrando a importância de se efetuar este procedimento de maneira adequada. Essa preocupação exarada da análise da FMEA está alinhada com as preocupações das Boas Práticas Clínicas em torno da qualidade do processo de consentimento dos voluntários para participação em uma pesquisa. O comprometimento deste processo pode gerar impactos relevantes no âmbito da ética na condução de tais pesquisas.

Os maiores potenciais de riscos resultaram para a etapa de adesão à estratégia DOT-Plus (procedimento da etapa XXIII), que envolve a participação direta de um membro da família ou voluntário encarregado de monitorar e registrar cada dose de medicamento tomada pelo paciente. Os dois modos de falha associados a esse procedimento resultaram em NPR 294: anotar corretamente as tomadas da medicação e o repasse de informação falsa ou errada ao responsável. A estratégia DOT (*Directly Observed Therapy*) é recomendada pela Organização Mundial de Saúde²⁶ para melhorar a adesão à terapia, sendo o DOT-Plus²⁷ adaptado para o presente estudo, porque permite a participação de familiares na supervisão do tratamento.

As etapas envolvendo coleta de sangue na visita de triagem (procedimento da etapa VI) e durante os testes farmacocinéticos (procedimento da etapa XIX) possuem 13 e 6 modos de falhas,

respectivamente. No primeiro caso, os valores de NPR variam entre 42 e 288, e no segundo caso, entre 54 e 135, revelando diferenças qualitativas relevantes. Assim, múltiplas origens de potenciais falhas, associadas a uma mesma etapa, podem representar diferentes potenciais de riscos, a depender do consenso dos especialistas durante o processo de valoração e geração do NPR. Adicionalmente, algumas operações se repetem durante diferentes visitas do participante, podendo gerar diferentes valores de NPR. Por exemplo: a falha associada ao registro equivocado dos resultados da coleta de sangue acarreta um alto risco no início do estudo (NPR máximo = 288, falhas VI.12 e VI.13), mas apenas moderado no estágio da farmacocinética (NPR máximo = 180, falha XIX.46). Ainda, o menor número de modos de falhas não implica simplesmente em menor ou maior risco para determinada etapa. Por exemplo: no processo estruturado por visitas, existem seis etapas com apenas 1 modo de falha apontado (II.6, IX.30, XVI.42, XXII.55, XVII.43, XXI.55 e XXIV.58 na Tabela 2), com NPR variando entre 54 e 180, representando riscos relativamente baixo e médio. Na prática, é importante considerar os riscos intermediários mais próximos de NPR 200 (utilizado como número de corte para efeito de análise) também como geradores de falhas relevantes.

O uso da FMEA em atividades e serviços hospitalares em geral já repousa em um histórico mais extenso. Desde 2001, a organização canadense de acreditação *Joint Commission on Accreditation of Health Care Organization* - JCAHO (nome atualmente simplificado para *Joint Commission International* - JCI), considerada uma das mais importantes do mundo, tem recomendado a FMEA nas atividades emergenciais dos hospitais com o intuito de reduzir o número de erros médicos²⁸. Por exemplo: a aplicação da FMEA na administração da medicação em Centros Médicos tem permitido regular janelas de dosagens e melhorar

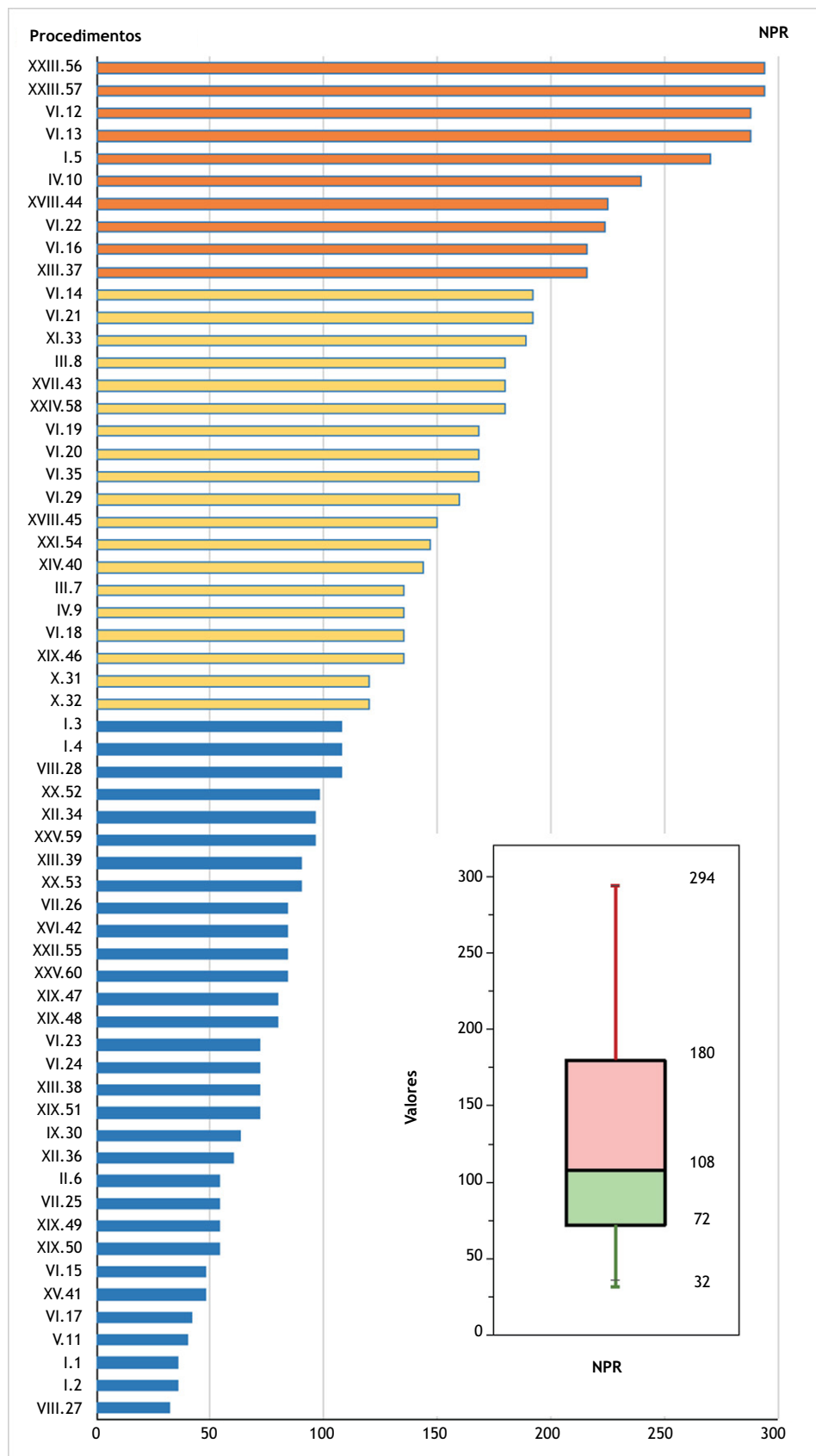


Figura. Classificação do Número de Prioridade de Risco (NPR) utilizando Análise do Modo e Efeito de Falha (FMEA) dos modos de falha (algarismos arábicos) associados à cadeia de procedimentos (etapas) do estudo clínico (algarismos romanos). Grupo superior: NPR > 200. Grupo intermediário: 120 < NPR < 200. Inserido em destaque: gráfico *Box-Plot* da distribuição dos valores de NPR associados aos procedimentos envolvidos no estudo em questão, destacando os valores da mediana, mínimo, máximo e entre quartis. O teste de Grubbs indicou não haver *outlier* ($P > 0,05$) no conjunto total de dados.



o gerenciamento do sistema de distribuição de medicamentos²⁹, assim como estabelecer prescrição, administração e adesão como etapas básicas para estruturar a análise dos riscos³⁰.

Em um estudo clínico que visa gerar dados para colaborar para o desenvolvimento e aprimoramento de terapias, é de alta relevância a minimização de erros nos registros da tomada dos medicamentos. Tão importante quanto a correta adesão à terapia é a acurácia dos registros gerais de um projeto. Não basta apenas garantir que os voluntários da pesquisa estejam fazendo o uso adequado dos produtos da investigação; se os dados não forem precisos, a validade da condução da pesquisa pode ser colocada em cheque. Neste sentido, um gerenciamento apropriado dos riscos inerentes à documentação é de grande valia.

Além de questões técnicas, é fundamental a preocupação com os impactos éticos da ocorrência de erros que, eventualmente, podem ser evitados. Além dos procedimentos ligados à adesão, à terapia e aos registros apropriados de dados, um fator importante destacado na presente análise foi a aplicação do TCLE. Desvios de conduta no que tange ao processo de consentimento para participação em estudos clínicos ferem princípios básicos das boas práticas clínicas e, mais importante, impactam negativamente os direitos dos participantes de pesquisa.

Apesar de recomendada desde 2001³¹, a gestão de riscos como atividade agregada aos estudos clínicos apenas recentemente foi incorporada ao guia de Boas Práticas Clínicas do ICH por um Termo Aditivo em seus itens 4.2.5 e 4.2.6 (ICH E6(R2) 2016)²⁵. Este guia preconiza que a garantia da proteção dos participantes e a habilitação dos resultados num estudo clínico iniciam-se com o mapeamento dos processos críticos e identificação de dados, aos quais a identificação de riscos deve estar associada já durante o desenvolvimento do protocolo. Neste sentido, a FMEA é bastante adequada, como demonstram os resultados obtidos no presente estudo.

O presente estudo demonstra, ainda, que tanto procedimentos clínicos quanto cuidados éticos e práticas de gerenciamento médico são fontes de modos de falhas importantes. Algumas abordagens sugerem uma categorização prévia dos riscos envolvidos nas pesquisas clínicas, de acordo com variáveis associadas a diferentes estágios do desenvolvimento farmacêutico, como forma de facilitar o gerenciamento pelos pesquisadores e demais *stakeholders*, visando a produção de resultados mais acurados³².

A visibilidade oferecida pelos procedimentos estruturados e a aplicação da FMEA permitiu escalonar os riscos a eles associados,

pontuando aqueles mais vulneráveis como focos de ações corretivas prioritárias. Estas decorrências foram importantes na implementação do plano de monitoria para o estudo, e na determinação dos procedimentos mais necessitados de ajustes pelo redesenho do protocolo específico ou pelo reforço no treinamento de pessoal. Além disso, o conjunto de dados permitiu a elaboração de um Manual Operacional específico para o estudo em foco, com função de dar suporte à monitoria do conjunto de atividades do projeto. Como *feedback*, este documento também representou uma ferramenta de alerta aos membros da equipe sobre os riscos e à urgência na mitigação dos mais graves; permitindo um melhor controle das ações corretivas, durante o estudo.

CONCLUSÕES

O presente estudo está alinhado com as diretrizes recentemente atualizadas de órgãos internacionais de acreditação²⁵, que recomendam considerar os riscos tanto na abordagem dos sistemas (procedimentos operacionais padrão, sistemas computadorizados e personalizados) quanto no nível clínico (desenho do estudo, coleta dos dados e processos de consentimento). Na avaliação dos riscos, o patrocinador do estudo deve identificá-los mediante: (i) a probabilidade de ocorrência de falhas; (ii) a medida em que tais falhas são detectáveis; (iii) o impacto de tais falhas na proteção do participante e na confiabilidade dos resultados. Neste contexto, a FMEA demonstrou ser uma ferramenta eficaz e provedora do devido detalhamento à análise proposta. O uso de ferramentas de risco - em especial a FMEA - é universalmente reconhecido como eficaz quanto aos objetivos que se propõe³³; contudo, apenas recentemente sua aplicação em estudos clínicos vem sendo reportada com mais intensidade³⁴. Isso demonstra que, apesar de ser essencialmente qualitativa, a FMEA tem se revelado extremamente útil para aplicação em laboratórios clínicos³⁵, tendo sido crescentemente recomendada em estudos internacionais patrocinados pela JCI, um órgão acreditador de unidades de saúde baseado nos Estados Unidos^{31,33}.

O uso de ferramentas potentes para auxiliar o gerenciamento de riscos em pesquisas clínicas, tal como apontado no presente estudo, deve ser incorporado nas políticas de tais projetos objetivando maior efetividade na produção de resultados, otimização de recursos, e redução de impactos negativos tanto para os participantes voluntários das pesquisas como para garantir a qualidade dos dados gerados.

REFERÊNCIAS

1. Steen RG. Retractions in the medical literature how can patients be protected from risk? *J Med Ethics*. 2012;38(4):228-32. <https://doi.org/10.1136/medethics-2011-10018>
2. Carneiro R, Andrade RP, Bastos LC. Pesquisa clínica em seres humanos: o papel do coordenador de estudos clínicos. *Femina*. 2009;37(11):627-32.
3. Lousana G, Accetturi C, Castilho VC. Guia prático para coordenadoras de estudos clínicos. *Interface (Botucatu)*. 2002;1(2):15-28.
4. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised tripartite guideline. Q9 Quality risk management. Geneva; 2005.



5. Silveira CCDF, Corrêa MCDV, Barroso WBG, Figueiredo TA. Registro, incorporação tecnológica e produção pública de medicamento: estudo sobre o atazanavir. *Vigil Sanit Debate*. 2016;4(3):18-27. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.00740>
6. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Harmonised Tripartite Guideline. Guideline for Good Clinical Practice E6(R1)*. Geneva; 1996.
7. Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS. Documento de las Américas. Buenas prácticas clínicas. In: IV Conferencia Panamericana para la armonización de la reglamentación farmacéutica; 2005; República Dominicana.
8. Ministério da Saúde (BR). Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial União*. 13 jun 2013.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Instrução Normativa Nº 20, de 2 de outubro de 2017. Dispõe sobre procedimentos de inspeção em boas práticas clínicas para ensaios clínicos com medicamentos. *Diário Oficial União*. 3 out 2017.
10. Dainesi SM, Goldbaum M. Clinical research as a development strategy in health. *Rev Ass Med Bras (English Edition)*. 2012;58(1):2-6. [https://doi.org/10.1016/S2255-4823\(12\)70142-X](https://doi.org/10.1016/S2255-4823(12)70142-X)
11. Nishioka AS, Sá PFG. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a pesquisa clínica no Brasil. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52(1):60-2. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302006000100025>
12. Zago MAA. Pesquisa clínica no Brasil. *Cienc Saúde Coletiva*. 2004;9(2):363-74. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232004000200013>
13. Brown AS. Clinical trials risk: a new assessment tool. *Clin Govern Int J*. 2011;16(2):103-110. <https://doi.org/10.1108/14777271111124455>
14. ECRI Institute. Sample risk management plan for a Community Health Center: patient safety and risk management program. 2010[acesso 29 abr 2017]. Disponível em: <https://bphc.hrsa.gov/ftca/riskmanagement/riskmgmtplan.pdf>
15. Hey SP. Ethics and epistemology of accurate prediction in clinical research. *J Med Ethics* 2015;41(7):559-62. <https://doi.org/10.1136/medethics-2013-101868>
16. Quental CM, Salles FS. Ensaos clínicos: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. *Rev Bras Epidemiol*. 2006;9(4):408-24. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2006000400002>
17. Milagres LM. Gestão de riscos para segurança do paciente: o enfermeiro e a notificação dos eventos adversos [dissertação]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora; 2015.
18. Brosteanu O, Houben P, Ihrig K, Ohmann C, Paulus U, Pfister B et al. Risk analysis and risk adapted on-site monitoring in noncommercial clinical trials. *Clin Trials*. 2009;6(6):585-96. <https://doi.org/10.1177/1740774509347398>
19. Breves I. Gerenciamento do risco não clínico contribui para a Segurança do Paciente. *Proqualis*; 2015[acesso 23 mar 2018]. Disponível em: <http://proqualis.net/noticias/gerenciamento-do-risco-n%C3%A3o-cl%C3%ADnico-contribui-para-seguran%C3%A7a-do-paciente>
20. Medical Research Council - MRC. Department of Health. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency. Risk-adapted approaches to the management of clinical trials of investigational medicinal products. London: Medical Research Council; 2011[acesso 23 mar 2018]. Disponível em: <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20150111011944/http://www.mhra.gov.uk/home/groups/l-ctu/documents/websitesresources/con111784.pdf>
21. Djulbegovic B, Kumar A, Magazín A, Schroen AT, Soares H, Hozo I et al. Optimism bias leads to inconclusive results: an empirical study. *J Clin Epidemiol*. 2011;64(6):583-93. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2010.09.007>
22. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for industry: oversight of clinical investigations: a risk-based approach to monitoring. Silver Spring: Food and Drug Administration; 2013[acesso 23 mar 2018]. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM269919.pdf>
23. Silva EM. FMEA ferramenta de gerenciamento de risco. 2016[acesso 23 mar 2018]. Disponível em: <https://pt.linkedin.com/pulse/fmea-ferramenta-de-gerenciamento-risco-edson-miranda-da-silva>
24. Dalosto DN. Análise da consistência do FMEA: Uma abordagem quantitativa à uma ferramenta qualitativa [dissertação]. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá; 2015.
25. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Harmonised Tripartite Guideline for Good Clinical Practice ICH E6(R2)*. Integrated Addendum. Geneva; 2016.
26. Karumbi J, Garner P. Directly observed therapy for treating tuberculosis. 2015. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(5):CD003343. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003343.pub4>
27. Farmer P, Kim JY. Community based approaches to the control of multidrug resistant tuberculosis: introducing “DOTS-plus”. *Brit Med J*. 1998;317(7159):671-4. <https://doi.org/10.1136/bmj.317.7159.671>
28. DeRosier J, Stalhandske E, Bagian JP, Nudell T. Using health care failure mode and effect analysis™: the VA National Center for Patient Safety's prospective risk analysis system. *Jt Comm J Qual Improv*. 2002;28(5):248-67. [https://doi.org/10.1016/S1070-3241\(02\)28025-6](https://doi.org/10.1016/S1070-3241(02)28025-6)
29. Lago P, Bizzarri G, Scalzotto F, Parpaiola A, Amigoni A, Putoto G et al. Use of FMEA analysis to reduce risk of errors in prescribing and administering drugs in paediatric wards: a quality improvement report. *BMJ Open*. 2012;2(6):e001249. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001249>
30. Jain K, Jain K. Use of failure mode effect analysis (FMEA) to improve medication management process. *Int J Health Care Qual Assur*. 2017;30(2):175-86. <https://doi.org/10.1108/IJHCQA-09-2015-0113>



31. Andrianov A, Wilder B, Proupín-Pérez M. ICH GCP goes risk based. *Appl Clin Trials*. 20 Oct 2016[acesso 23 mar 2018]. Disponível em: <http://www.appliedclinicaltrials.com/ich-gcp-goes-risk-based?pageID=1>
32. Hartmann M, Hartmann-Vareilles F. Concepts for the risk-based regulation of clinical research on medicines and medical devices. *Drug Inf J*. 2012;46(5):545-54. <https://doi.org/10.1177/0092861512453574>
33. Chatman IJ. Failure mode and effects analysis in health care: proactive risk reduction. 3rd ed. Oakbrook Terrace: The Joint Commission Resources; 2010.
34. Hurley C, Shiely F, Power J, Clarke M, Eustace JA, Flanagan E et al. Risk based monitoring (RBM) tools for clinical trials: a systematic review. *Contemp Clin Trials*. 2016;51:15-27. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2016.09.003>
35. Hinrichsen SL, Possas L, Oliveira CLFD, Ramos DM, Vilella TDAS. Análise de Modos e Efeitos de Falhas (FMEA) e metas internacionais de segurança do paciente: estudo-piloto. *Rev Adm Saúde*. 2012;14(57):151-60.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.
Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Perfil de resistência aos antibióticos e prevalência dos genes *qacEΔ1* e *sul1* em *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar

Antibiotic resistance pattern and prevalence of *qacEΔ1* and *sul1* genes in *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater

RESUMO

Rosa Maria Pinto Novaes^{1,II}
Mariana de Melo Rodrigues Sobral^I
Camila Barreto^I
Ana Paula Alves Nascimento^I
Mychelle Alves Monteiro^I
Bernardete Ferraz Spisso^I
Kayo Bianco^I
Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão^I
Maysa Mandetta Clementino^{I,*}

Introdução: Efluentes hospitalares representam riscos à saúde pública e ambiental devido à presença de microrganismos patogênicos, drogas e produtos químicos. *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista frequentemente encontrado no ambiente hospitalar. **Objetivo:** Avaliar o resistoma de isolados de *P. aeruginosa* da estação de tratamento de esgoto hospitalar (ETE) de um complexo hospitalar na cidade do Rio de Janeiro. **Método:** Vinte isolados dos cinco estágios da ETE foram identificados como *P. aeruginosa* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. A suscetibilidade aos antibióticos foi determinada segundo o CLSI e os genes *qacEΔ1* e *sul1* foram detectados pela PCR. Resíduos de sulfonamidas foram pesquisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. **Resultados:** Foi demonstrada a presença de sulfametoxazol em nível inferior a 50 ng·L⁻¹, resistência às sulfonamidas (80%) seguida pelas quinolonas (50%) e 13 perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os genes *qacEΔ1-sul1* foram detectados em 100% dos isolados, sugerindo a presença de integrons de classe 1 em toda a ETE. **Conclusões:** Os resultados sinalizaram limitações no tratamento e a propagação de genes de resistência nas etapas da ETE. Esses dados contribuem com órgãos competentes no desenho de ações preventivas frente aos impactos negativos à saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE: Efluente Hospitalar; *Pseudomonas aeruginosa*; Bactérias Multirresistentes; Integron de Classe 1

ABSTRACT

Introduction: Hospital effluents may pose great environmental risk due to the presence of pathogenic microorganisms, drugs and chemical components. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen frequently found in hospital environment. **Objective:** To evaluate the resistome of *P. aeruginosa* from the hospital wastewater treatment plant (HWTP) in a hospital complex of Rio de Janeiro city. **Method:** Twenty isolates from the five stages of the HWTP were identified as *P. aeruginosa* by 16S rRNA gene sequencing analysis. Susceptibility to antibiotics was determined according to CLSI and *qacEΔ1* and *sul1* genes were detected by PCR. Sulphonamide residues were investigated by high performance liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry. **Results:** The sulfamethoxazole has been demonstrated at a level below 50 ng L⁻¹. Sulfonamide resistance (80%) has been demonstrated followed by quinolone class (50%) and 13 susceptibility patterns to antimicrobials. The *qacEΔ1-sul1* genes were detected in 100% of isolates suggesting the presence of class 1 integrons in the whole HWTP. **Conclusions:** The results signaled limitations of HWTP and propagation of resistance genes in all stages of the HWTP. These data also contribute to the environmental sanitary surveillance in the design of prevention actions against negative impact on the public health.

KEYWORDS: Hospital Sewage; *Pseudomonas aeruginosa*; Multidrug-Resistant Bacteria; Class 1 Integrons

^I Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Subsecretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e Controle de Zoonoses (SubVISA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: maysa.mandetta@incqs.fiocruz.br



INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a propagação da resistência aos antibióticos entre bactérias são considerados uma ameaça para a saúde humana e ambiental. Muitos estudos têm demonstrado a importância de cenários ambientais, como por exemplo, água e solo, no ciclo da resistência aos antibióticos na natureza^{1,2}.

As águas residuais provenientes de hospitais e encaminhadas para a estação de tratamento de efluente hospitalar (ETE) contêm em sua composição altas concentrações de bactérias, nutrientes, oxigênio, produtos químicos, metais pesados, agentes antimicrobianos e outras drogas não metabolizadas³. Esse ambiente proporciona o aumento da pressão seletiva e, com isso, a transferência horizontal e a disseminação de genes de resistência e de organismos resistentes para o meio ambiente^{4,5,6}.

Dentre as bactérias encontradas em efluentes hospitalares, a *Pseudomonas aeruginosa* se destaca como um patógeno nosocomial oportunista geralmente envolvido em infecções hospitalares⁷. É conhecido não só por seu metabolismo versátil, mas também por sua excepcional capacidade de se adaptar e colonizar uma ampla variedade de ambientes (águas, solo, rizosfera, animais). Além disso, sua resistência natural (intrínseca) e adquirida a uma ampla gama de agentes antimicrobianos resulta no surgimento de cepas resistentes a múltiplos fármacos^{8,9}. Essa multirresistência tem sido extensivamente descrita e envolve diferentes mecanismos, tais como sistemas bombas de efluxo, baixa permeabilidade da membrana, alteração do alvo do agente antimicrobiano, alteração de proteínas da membrana externa, produção de β-lactamases e outras enzimas^{6,10}.

No Brasil, estudos referentes à avaliação de perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos em isolados bacterianos de efluentes hospitalares revelaram a presença de linhagens multidroga resistentes em todas as etapas do sistema e até mesmo após o tratamento^{1,6,11,12}. Além disso, outro estudo revelou a presença de cepas produtoras de enzimas β-lactamases de espectro estendido (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) e metalo-β-lactamases (MBL)¹³. Miranda et al.¹¹ detectaram os genes *blaSHV*, *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-2* e *blaTEM*, *blaVIM*, *blaSPM* e *blaKPC* em isolados clínicos e na ETE de um mesmo hospital. O gene *blaSPM-1* é o mais prevalente no Brasil, sua disseminação epidemiológica em amostras ambientais no sul do Brasil foi confirmada em isolados de *P. aeruginosa* de um efluente hospitalar e em água superficial do rio receptor¹⁴.

Problemas associados à baixa suscetibilidade microbiana aos antibióticos datam de longo tempo. A resistência às sulfonamidas surgiu logo após sua introdução na prática clínica (1930) e pode ter sido resultado de mutações no sítio-alvo ou por aquisição de genes de resistência à antissintetase (*sul*)^{15,16}. Essa resistência é primariamente mediada pelos genes *sul1*, *sul2* e *sul3* que codificam a *dihydropteroate synthetase* (DHPS) e que apresenta baixa afinidade às sulfonamidas^{17,18}. Diversas espécies bacterianas abrigam esses genes, localizados em transposons ou em plasmídeos autotransfeteáveis ou mobilizáveis com ampla gama de hospedeiros; eles apresentam resistência antibiótica múltipla, que é cosseleccionada por sulfonamidas^{19,20}.

O gene *sul1* faz parte do segmento 3' conservado do integron de classe 1, enquanto o gene *sul2* aparece associado com genes que conferem resistência à estreptomicina. Em alguns estudos, 70% da resistência à sulfonamida poderiam ser conferidas a esses genes²¹. Posteriormente, a disseminação de *sul3*, detectado em uma cepa de *Escherichia coli* na Suíça, parece estar relacionado com transposons²². O sistema integron/cassete é tido como um dos melhores exemplos de captura e expressão de novos genes^{23,24}, ocupando lugar de destaque na pesquisa de resistência aos antibióticos e biocidas^{25,26}.

A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema global e vem progressivamente aumentando com o uso indiscriminado e crescente de substâncias com ação antimicrobiana. Em contrapartida, a resistência aos biocidas é uma questão emergente, uma vez que essas substâncias são amplamente utilizadas na descontaminação, desinfecção e esterilização visando o controle da disseminação de microrganismos^{27,28}.

Dentre essas substâncias, os compostos quaternários de amônio (QAC) são utilizados rotineiramente como antissépticos e desinfetantes em ambientes domésticos, veterinários, industriais e hospitalares^{29,30}. Esses compostos são biodegradáveis em condições aeróbicas e, assim, suas concentrações nos diversos ambientes podem flutuar continuamente. No esgoto, efluentes de estação de tratamento de esgoto, águas superficiais e sedimentos geralmente encontram-se em concentrações subinibitórias, tornando esses ambientes seletivos, o que pode resultar na emergência e disseminação de microrganismos com suscetibilidade diminuída a esses compostos entre diferentes gêneros microbianos, incluindo patógenos de interesse médico³¹.

Dentre os mecanismos de resistência aos QAC, a expressão de bombas de efluxo por *P. aeruginosa* pode abranger sistemas de efluxo multidroga, incluindo as proteínas QacE e QacEA1. O gene *qacEA1* está incluído no segmento conservado 3' do integron de classe I, inicialmente descrito como uma variante do gene *qacE*³².

Até o momento, diversos genes *qac* foram descritos, como *qacA*, *qacB*, *smr* (antigos *qacC* e *qacD*), *qacE*, *qacF*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* e *qacZ*. Em bactérias Gram-negativas, como enterobactérias e *P. aeruginosa*, o gene *qacE* (incluindo a variante atenuada *qacEA1*) é amplamente difundido. Esses genes também podem ser encontrados em outras espécies, como *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e *Acinetobacter* spp.³³. Isto se deve à alta prevalência de integrons de classe I, que em bactérias Gram-negativas geralmente incluem o gene *qacEA1*³⁴. Desta forma, existe a preocupação de que a exposição de microrganismos a compostos quaternários de amônio pode selecionar isolados resistentes a diversos antimicrobianos, favorecendo o surgimento de cepas multirresistentes^{27,35}. Publicações recentes descrevem o aumento nos níveis de resistência associados aos genes *qac*, demonstrando a diminuição do poder de eficácia de compostos como cloreto de benzalcônio e clorhexidina^{36,37}. Além disto, os genes *qacEA1* e *qacE* têm sido detectados em águas superficiais³⁸ e em ambientes poluídos com QAC³⁹.



Este estudo teve como objetivo avaliar os perfis de resistência aos antibióticos em *P. aeruginosa* isoladas de uma ETEH e investigar a presença de genes de resistência aos compostos quaternários de amônio e sulfonamidas (*qacE*, *qacEA1* e *qacEA1-sul1*) associados ao cassete de genes do *integron* de classe I.

MÉTODOS

Local de estudo e obtenção de amostras

O estudo foi realizado na ETEH que atende um complexo hospitalar localizado na Barra da Tijuca, no Rio de Janeiro, Brasil (22°59'42.36"S 43°21'49.62"O). Este complexo é formado por duas unidades de saúde que possuem um total de 322 leitos e realizam 30 mil atendimentos mensais. A estação de tratamento deste complexo tem capacidade para tratar 220 m³ de esgoto por dia. A coleta foi realizada em dezembro de 2010, quando foram retiradas alíquotas (500 mL de cada ponto) dos cinco pontos correspondentes às etapas do tratamento do efluente (Figura 1). As alíquotas foram coletadas em frascos estéreis de polietileno, refrigeradas a 4°C e transportadas para o laboratório.

Dosagens dos parâmetros físicos e químicos

Os parâmetros físicos e químicos, temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido (OD), turbidez, salinidade e cloro das amostras foram analisados utilizando os equipamentos portáteis *Water Quality Checker U-10* (Horiba) e medidor de cloro (Homis), respectivamente.

Deteção de antimicrobianos por cromatografia

A metodologia de extração das sulfonamidas foi baseada no método oficial da *United States - Environmental Protection Agency* (U.S. EPA) - Método 1694⁴⁰ e no método descrito por Monteiro et al.⁴¹. Uma alíquota de 25 mL de amostra filtrada foi acidificada com HCl concentrado para ajuste do pH a 2,5. Em seguida foram adicionados 25 mg de Na₂EDTA e prosseguiu-se para a etapa de extração por fase sólida, empregando-se cartuchos Oasis HLB 500 mg/6 mL (Waters, Millford, MA), previamente condicionados com 5 mL de metanol, 5 mL de água ultrapura e 5 mL de água acidificada com HCl concentrado a pH 2,5. Após uma lavagem com duas porções de 2,5 mL de água ultrapura para eliminação de interferentes, aplicou-se vácuo por 2 minutos para secar o cartucho na pressão de

aproximadamente 35 kPa e, em seguida, os analitos foram eluídos com duas porções de 3 mL de metanol e em seguida com duas porções de 2 mL de solução de metanol:acetona (1:1, v/v). Cinco mL do eluato foram separados para análise das sulfonamidas e evaporados à secura com N₂ à temperatura de, no máximo, 47,5°C. O extrato seco contido no tubo de centrifuga foi reconstituído com 1 mL do solvente de reconstituição (80:20 [v/v] de 0,1% v/v de ácido fórmico em água e metanol). Em seguida, foi agitado em vórtex, filtrado em filtro de fibra de vidro/nylon 0,2 µm e transferido para *vial*, para injeção no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplado à Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS)⁴¹. O sistema de LC-MS/MS é composto de cromatógrafo a líquido de alta eficiência *Shimadzu Prominence* (com os seguintes módulos: bomba quaternária LC-20AD, desgaseificador de membrana DGU-20A5, autoamostrador SIL-20AC, forno de coluna CTO-20AC e controladora CBM-20A) e detector API5000 Applied Biosystems/MDS Sciex com fonte Turbo V® e sonda TurbolonSpray®, controlado pelo *software* Analyst versão 1.4.2 do mesmo fabricante. Os antimicrobianos foram separados a 25°C em coluna C18 (Pursuit™ RS, 2,0 mm x 100 mm x 3 µm - Agilent), com coluna de guarda do mesmo tipo (2,0 mm x 3 µm). As fases móveis utilizadas no programa de eluição gradiente foram 0,1% v/v de ácido fórmico em água (fase móvel A), 0,1% v/v de ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B) e 0,1% v/v de ácido fórmico em metanol (fase móvel C). A programação de eluição gradiente, bem como os parâmetros do espectrômetro de massas encontram-se descritos em Monteiro et al.⁴¹.

Isolamento e identificação bioquímica de *P. aeruginosa*

Após homogeneização, alíquotas de 2 mL, de cada ponto da ETEH foram inoculadas em 5 mL de caldo nutriente e incubadas por 24 h a 37°C. A alíquota da etapa ETEH 1 também foi inoculada em meio de cultura líquido Lethen (DIFCO™) e incubada por 72 h a 37°C. Em seguida, as culturas bacterianas foram semeadas por esgotamento em ágar nutriente e ágar cetrimide (DIFCO™), e incubadas nas mesmas condições. A coloração de Gram e provas bioquímicas convencionais foram realizadas para identificação das cepas, de acordo com o Manual Bergey's⁴². Bastonetes Gram-negativos (BGN) foram submetidos às seguintes provas bioquímicas: Sulfureto, Indol e Motilidade (SIM), catalase, oxidase, OF-glicose, xilose, manitol, lactose, lisina, arginina, ornitina descarboxilase, gelatina e incubação a 42°C.

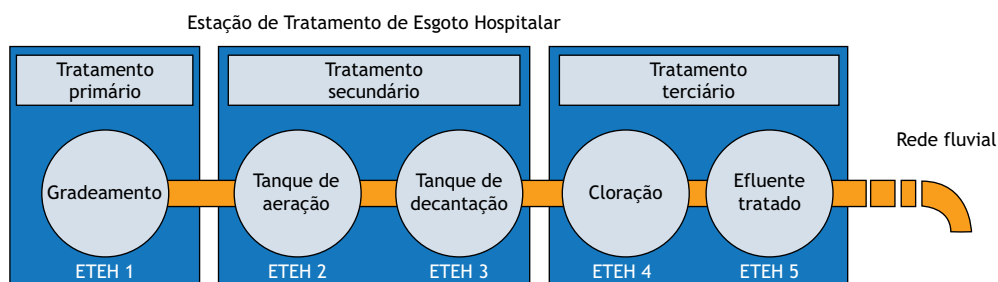


Figura 1. Esquema da estação de tratamento de esgoto do complexo hospitalar (Hospital Municipal Lourenço Jorge e Maternidade Leila Diniz).



Extração de DNA e identificação molecular

Os isolados, previamente identificados fenotipicamente foram certificados por metodologia molecular. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *kit Dnaeasy® Blood&Tissue* (Qiagen GmgH, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. A identificação de isolados foi confirmada pela amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA específico de *P. aeruginosa*. As reações foram realizadas com 50 µL de mistura de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nas seguintes condições: 50 ng de DNA molde, 50 pmol de cada iniciador (PA-SS-F e PA-SS-R) descritos por Spilker et al.⁴³, 0,2 mmol.l⁻¹ de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTPs), 1X PCR *buffer* (pH 9,0), 2,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂ e 2U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen) (Tabela 1). Foram utilizadas como controle das PCR as cepas de referência *P. aeruginosa* INCQS 0024 (ATCC 29336) e *E. coli* INCQS 0033 (ATCC 25922). Os produtos da PCR foram analisados após eletroforese por 1 h a 50 V em gel de agarose 1% no tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, que foi corado com brometo de etídio (3 mg/mL). Utilizou-se o 100 bp DNA *ladder* (Invitrogen) como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, a imagem do gel foi visualizada pelo *software* de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE *Healthcare*). A especificidade dos iniciadores e da PCR foi estabelecida anteriormente com cepas de referência. O fragmento foi purificado com o *kit QIAquick PCR Purification* (Qiagen) e sequenciado com o *kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing Standard Version 3.1* (Applied Biosystems™), por eletroforese capilar em aparelho ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems™), na Plataforma do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (PDTIS/Fiocruz). A análise de similaridade das sequências foi realizada pelo programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no *GenBank*.

Suscetibilidade aos antibióticos

O perfil de suscetibilidade aos antibióticos foi determinado pela técnica de disco-difusão (método de Kirby-Bauer), segundo os

critérios estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI)⁴⁴. A turvação das suspensões utilizadas para testes de sensibilidade foi ajustada em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para a obtenção do padrão de turbidez 0,5 na escala de McFarland e foram inoculadas em meio ágar Mueller-Hinton (DIFCO). Os isolados obtidos foram testados quanto à resistência frente a 13 antimicrobianos (CEFAR®). Os antibióticos empregados foram os seguintes: Piperacilina/tazobactam (PPT-110 µg), ticarcilina/ácido clavulânico (TIC-85 µg), ceftazidima (CAZ-30 µg), cefepime (CPM-30 µg), imipenem (IPM-10 µg), meropem (MER-10 µg), aztreonam (ATM-30 µg), gentamicina (GEN-10 µg), tobramicina (TOB-10 µg), sulfonamida (SUL-300 µg), ciprofloxacina (CIP-5 µg), norfloxacina (NOR-10 µg) e polimixina B (POL-300 UI). O controle de qualidade dos discos de antibióticos foi realizado usando-se as cepas de referência *P. aeruginosa* INCQS 00099 (ATCC 853), *Staphylococcus aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923) e *E. coli* INCQS 00033 (ATCC 25922). Foram estabelecidos três padrões de resistência (Sensível - S, Resistente - R e Multidroga resistente - MDR) para os isolados analisados⁴⁵.

Detecção dos genes *qacE*, *qacEΔ1* e *qacEΔ1-sul1*

A mistura da PCR teve o volume final de 50 µL contendo os seguintes reagentes: 50 ng de DNA molde, 50 pmol de cada iniciador (Tabela 1), 0,2 mmol.l⁻¹ de cada dNTP, 1X PCR *buffer* (pH 9,0), 1,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂ e 1U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen). Os programas utilizados para cada iniciador estão descritos na Tabela 1. Foi utilizada como controle positivo do gene *qacEΔ1*, *P. aeruginosa* 531-95²⁷ (*Genbank* GU182337). O produto da PCR foi analisado em gel de eletroforese por 1 h a 50 V em gel de agarose 1% no tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X, que foi corado com brometo de etídio (3 mg/mL). Utilizou-se o 100 bp DNA *ladder* (Invitrogen) como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, a imagem do gel foi realizada usando-se o *software* de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE *Healthcare*).

Tabela 1. Iniciadores e programas de amplificação utilizados.

| Gene alvo | Iniciadores | Sequência | Programa | Tamanho do Fragmento | Referência | |
|-----------------------------|---------------|----------------------------|--|----------------------|------------|-------------|
| 16S rRNA | PA-SS_F | 5'-GGGGATCTTCGACCTCA-3' | 95°C - 2' 94°C - 20'' 55°C - 1' 72°C - 1' 72°C - 7' | 25X | 956 pb | 43 |
| <i>P. aeruginosa</i> | PA-SS_R | 5'-TCCTTAGAGTGCCACCG-3' | | | | |
| <i>qacE</i> | F1N | 5'-GCCCTACACAAATTGGGAGA-3' | 94°C - 3' 94°C - 30'' 57°C - 90'' 72°C - 1' 72°C - 10' | 30X | 319 pb | 46 |
| | R2B | 5'-TACTACACCACTAACTATGA-3' | 72°C - 1' 72°C - 10' | | | 27 |
| <i>qacEΔ1</i> | FQ1 | 5'-CCCGAATTCATGAAAGGTGG-3' | 94°C - 3' 94°C - 30'' 57°C - 90'' 72°C - 1' 72°C - 10' | 35X | 350 pb | 35 |
| | FQ2 | 5'-TATAAGCTTTCACCTGGCG-3' | | | | |
| <i>qacEΔ1</i> e <i>sul1</i> | P1_Qdelta1 | 5'-TAGCGAGGGCTTTACTAAGC-3' | 94°C - 5' 94°C - 30'' 60°C - 1' 72°C - 2' 72°C - 7' | 35X | 800 pb | Este estudo |
| | <i>Sul1</i> R | 5'-GCCGATCGCGTAAGTTCCG-3' | | | | 47 |

Pb: pares de bases



Tabela 2. Parâmetros físico-químicos.

| Parâmetro | Pontos de Coleta da Estação de Tratamento de Esgoto Hospitalar | | | | | |
|------------------------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Resolução Conama n° 430/2011 | Ponto 1 | Ponto 2 | Ponto 3 | Ponto 4 | Ponto 5 |
| pH | 5,0 a 9,0 | 7,6 | 7,9 | 8,2 | 8,4 | 8,4 |
| Condutividade (mS/cm) | - | 0,82 | 0,38 | 0,38 | 0,48 | 0,35 |
| Turbidez (UNT ^a) | < 100 | 10 | 99 | 6 | 4 | 7 |
| Oxigênio Dissolvido (mg/L) | - | 4,5 | 9,2 | 9,3 | 9,2 | 3,7 |
| Temperatura (°C) | < 40 | 29 | 29 | 29 | 29 | 29 |
| Salinidade (%) | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cloro (ppm) | - | 1,0 | 1,0 | 1,0 | > 10 | 0,01 |

^a Unidades Nefelométricas de Turbidez; Conama: Conselho Nacional do Meio Ambiente; ppm: partes por milhão.

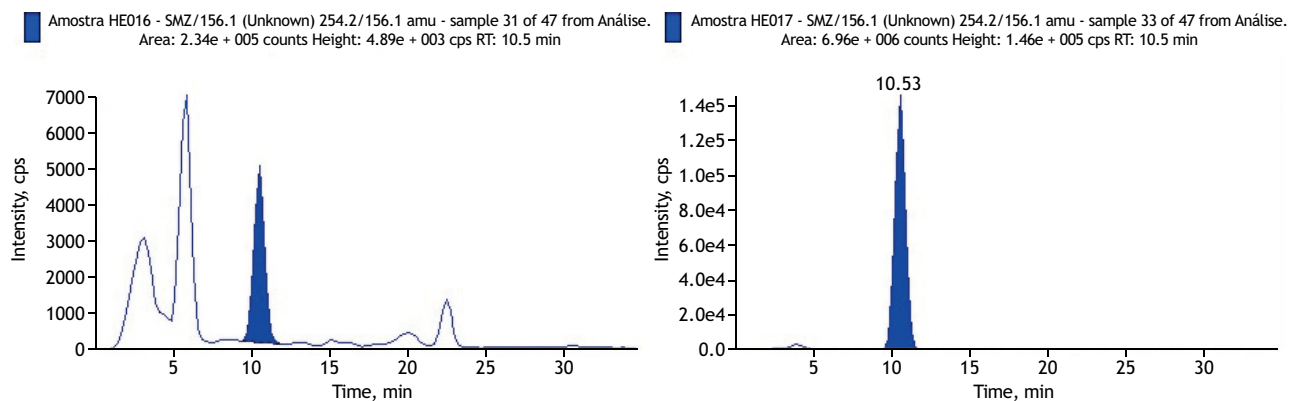


Figura 2a. Detecção de sulfametoxazol no afluente da ETEH (Amostra HE016) e no efluente tratado (Amostra HS017).

RESULTADOS

Dosagem dos parâmetros físico-químicos

O pH das amostras apresentou variação entre 7,6 e 8,4. A condutividade variou entre 0,82 mS/cm e 0,35 mS/cm. O índice de turbidez apresentou maior índice no ponto 2 (99 UNT) em face da injeção de O₂ e o índice de oxigênio dissolvido (DO) iniciou em 4,5 mg/L, posteriormente manteve índices entre 9,2-9,3 mg/L e reduziu para 3,7 mg/L no efluente tratado. A concentração de cloro ativo iniciou em 1,0 ppm, e teve um aumento significativo no ponto onde houve a adição do composto químico. A temperatura e o nível de salinidade permaneceram iguais em todos os pontos (Tabela 2).

Detecção de antimicrobianos por cromatografia

O antimicrobiano sulfametoxazol foi identificado em duas amostras, uma do afluente hospitalar da ETEH e outra do efluente tratado, ambas em concentração inferior a 50 ng·L⁻¹ (limite de quantificação do método) (Figura 2a). A Figura 2b apresenta a injeção de uma solução padrão contendo o sulfametoxazol que também foi injetada no LC-MS/MS, para fins de comparação.

Isolamento de *P. aeruginosa*

Foram isoladas 21 cepas de BGN, móveis; H₂S, indol e lactose negativas; xilose variáveis; oxidativas; manitol, lisina, arginina, ornitina, gelatina, catalase e crescimento a 42°C positivas.

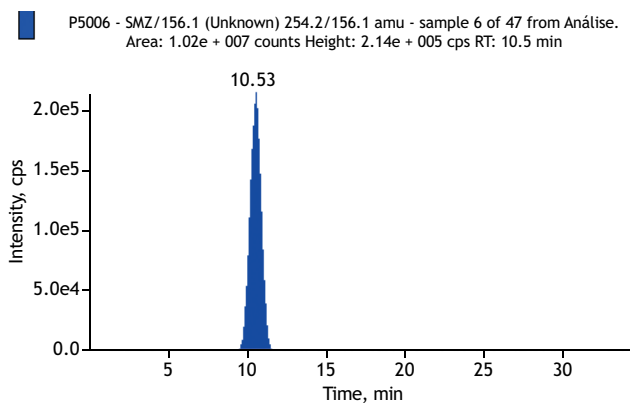


Figura 2b. Detecção de Sulfametoxazol em solução padrão.

A PCR das cepas de *P. aeruginosa* resultou na amplificação de um fragmento de 956 pb em 95% (20/21) das cepas.

Suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antibióticos apresentou maiores percentuais de resistência às sulfonamidas e às quinolonas, seguido pelas outras três classes analisadas (Figura 3). A análise dos dados do antibiograma revelou 13 perfis de resistência distintos entre os isolados (Tabela 3). Quarenta e cinco por cento apresentaram o fenótipo MDR, destes 44% foram da etapa de cloração da estação (Figura 4).

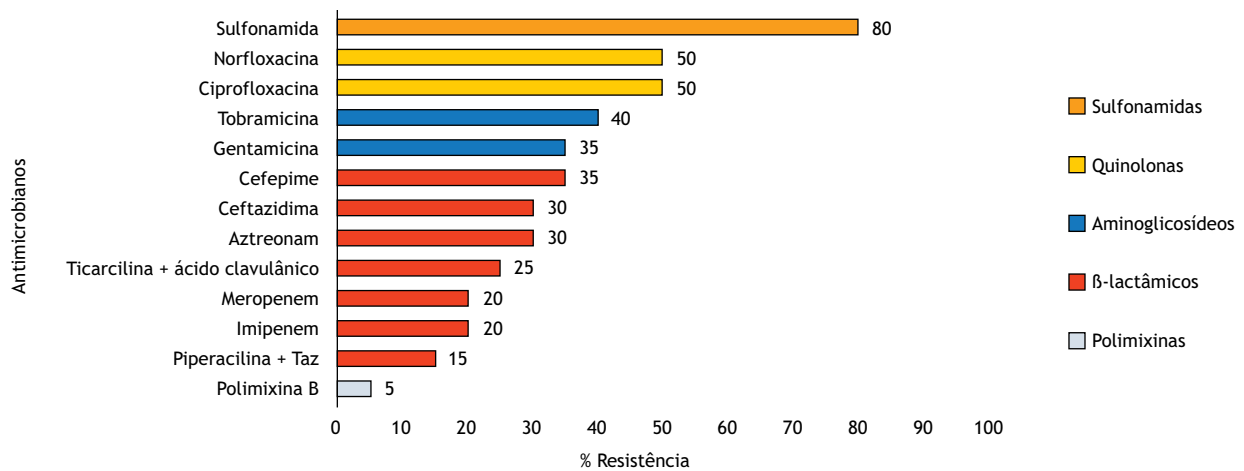
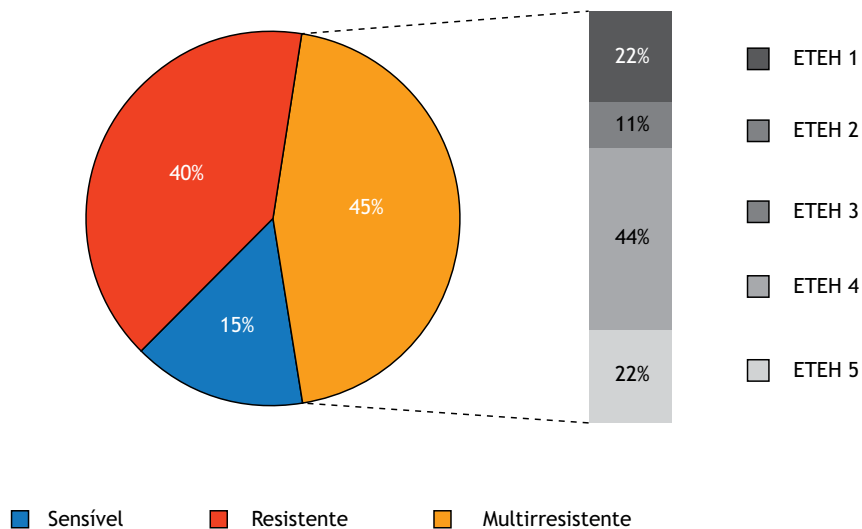


Figura 3. Suscetibilidade às classes de antibióticos nas cepas de *P. aeruginosa*.

Tabela 3. Perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas de *P. aeruginosa* de acordo com o ponto de coleta das cepas.

| Perfil | Resistência | N° de isolados | Origem |
|--------|---|----------------|-------------|
| I | SUSCETÍVEL A TODOS | 2 | ETE 2, 3, 5 |
| II | SUL | 6 | ETE 2, 5 |
| III | TOB, CIP | 1 | ETE 3 |
| IV | CAZ, CPM | 1 | ETE 5 |
| V | GEN, NOR, SUL | 1 | ETE 2 |
| VI | TOB, CIP, NOR, SUL | 1 | ETE 1 |
| VII | TIC, ATM, CIP, NOR, SUL | 1 | ETE 1 |
| VIII | CPM, GEN, TOB, ATM, CIP, NOR, SUL | 2 | ETE 5 |
| IX | TIC, CAZ, CPM, ATM, CIP, NOR, SUL | 1 | ETE 1 |
| X | CAZ, GEN, TOB, IPM, MER, CIP, NOR, SUL | 1 | ETE 4 |
| XI | PPT, TIC, CAZ, CPM, GEN, TOB, IPM, MER, CIP, NOR, SUL | 1 | ETE 4 |
| XII | PPT, TIC, CAZ, CPM, GEN, TOB, ATM, IPM, MER, CIP, NOR, SUL | 1 | ETE 4 |
| XIII | PPT, TIC, CAZ, CPM, GEN, TOB, ATM, IPM, MER, CIP, NOR, SUL, POL | 1 | ETE 4 |

PPT: Piperacilina+Tazobactam; TIC: Ticarcilina + Ácido Clavulânico; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; ATM: Aztreonam; IPM: Imipenem; MER: Meropenem; CIP: Ciprofloxacina; NOR: Norfloxacina; SUL: Sulfonamida; POL: Polimixina. ETEH: Estação de tratamento de esgoto hospitalar; ETEH 1: entrada do esgoto; ETEH 2: tanque de aeração; ETEH 3: tanque de decantação; ETEH 4: cloração; ETEH 5: efluente tratado.



ETE H 1: entrada do esgoto; ETE H 2: tanque de aeração; ETE H 3: tanque de decantação; ETE H 4: cloração; ETE H 5: efluente tratado.

Figura 4. Fenótipos de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *P. aeruginosa*.



Detecção dos genes *qacE*, *qacEA1* e *qacEA1-sul1*

As 20 cepas de *P. aeruginosa* foram submetidas à PCR para verificar a presença dos genes *qacE*, *qacEA1* e *qacEA1-sul1*. O gene *qacE* não foi detectado em nenhum dos isolados. No entanto, o gene *qacEA1* foi verificado em 90% (18/20) dos isolados analisados apresentando um fragmento de 400 pb. Enquanto os genes *qacEA1-sul1* amplificados em conjunto, apresentaram um fragmento único de aproximadamente 800 pb em 100% (20/20) das cepas. O fragmento da cepa *P. aeruginosa* P5520, utilizada como controle positivo da PCR, foi sequenciado e demonstrou identidade de 96%-98% com sequências do banco de dados. Esta sequência foi depositada no *GenBank* sob o número de acesso MF801598.

DISCUSSÃO

Os hospitais são considerados nichos ecológicos para bactérias resistentes aos antibióticos e desempenham um papel importante no surgimento e disseminação de resistência. Essas bactérias deixam hospitais por meio de pacientes colonizados e também através dos sistemas de tratamento de águas residuais⁴⁸.

No presente estudo, foram isoladas cepas de *P. aeruginosa* em todos os pontos de coleta da estação de tratamento de esgoto hospitalar, inclusive na etapa final na qual o efluente já se encontra tratado e apto a ser liberado para os corpos hídricos. Um fato intrigante foi a ausência de células viáveis de *P. aeruginosa*, na 1ª etapa da estação (chegada do afluente). Porém, a presença de crescimento bacteriano após cultivo em meio de cultura contendo inibidores de alguns princípios ativos de antissépticos e desinfetantes, nos permitiu constatar que os microrganismos estavam sob ação bacteriostática desses produtos e de outros antimicrobianos. Os QAC são um dos surfactantes mais utilizados na desinfecção do ambiente hospitalar e que quando liberados nos ambientes aquáticos apresentam ação antimicrobiana em concentrações relativamente baixas^{49,50}. Além da atividade bactericida e/ou bacteriostática, esses produtos podem aumentar a pressão seletiva e a resistência aos antibióticos e biocidas⁵¹.

Nossos resultados revelaram alta diversidade nos perfis de resistência e alta frequência de cepas MDR nas diferentes etapas do tratamento do esgoto hospitalar. O maior índice de cepas com fenótipo MDR no ponto da cloração, provavelmente está relacionado ao favorecimento da transferência de plasmídeos de resistência durante o processo de cloração, etapa crítica do tratamento. Desde a década de 1970, estudos sobre o efeito da cloração em bactérias resistentes aos antibióticos descrevem um aumento considerável de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos na água e no esgoto^{52,53,54}. Além de apresentar o maior número de cepas MDR, no ponto ETEH 4 foi encontrado um isolado resistente a todos os antibióticos testados, inclusive à polimixina B, que é considerada altamente eficaz frente a cepas de *P. aeruginosa*, segundo o Programa de Vigilância Epidemiológica (SENTRY - 2001 a 2004)⁵⁵.

A presença de cepas MDR na etapa onde o efluente já se encontra tratado demonstra certa limitação do tratamento na eliminação

desses patógenos. Essa limitação pode estar associada ao tamanho da população microbiana inicial, aos diferentes estágios de desenvolvimento do microrganismo, à concentração do desinfetante, ao potencial hidrogeniônico do efluente (pH) e ao tempo de exposição ao desinfetante⁵⁶. A avaliação da suscetibilidade aos antibióticos de *Pseudomonas* spp. em afluentes e efluentes de uma estação de tratamento de esgoto demonstrou a presença de cepas resistentes aos antibióticos carbapenêmicos somente no efluente tratado⁵⁷.

Nossos resultados demonstraram claramente que as condições físico-químicas do ambiente e a presença de antimicrobianos provavelmente afetaram os fenótipos de suscetibilidade aos antibióticos dessas bactérias. Além disso, sabe-se que os antibióticos em concentrações subinibitórias podem ter um impacto sobre as funções celulares e alterar a expressão de fatores de virulência ou a transferência de genes de resistência aos antibióticos⁵⁸.

Por outro lado, a baixa suscetibilidade observada frente às sulfonamidas (80%), seguida pela ciprofloxacina e norfloxacina (50%), merece destaque. Embora não tivéssemos informações sobre as prescrições terapêuticas nesses hospitais, a presença de uma sulfonamida, a sulfametoxazol, tanto no esgoto bruto quanto no tratado, observada em nossos dados nos permite sugerir que a utilização de altas concentrações desses antimicrobianos pode interferir na indução de mutações na enzima DNA girase ou na superexpressão do sistema de efluxo, contribuindo para essa resistência^{17,59}. As sulfonamidas também podem resistir fortemente à biodegradação natural, como refletido na alta frequência de sua detecção em ambientes aquáticos. Pesquisadores do *U. S. Geological Service* (USGS) demonstraram a detecção de sulfametoxazol em rios e córregos com frequências de até 27%⁶⁰. Além disso, sua baixa tendência para partição em sedimentos permite que eles sejam transportados por longas distâncias em águas correntes. Perez et al.⁶¹ realizaram a avaliação da degradabilidade da sulfamethazine, sulfametoxazol e sulfatiazol em amostras de águas superficiais. Após mais de um mês, as sulfonamidas não foram degradadas por microrganismos de águas superficiais em um reator de batelada.

Considerando a composição do esgoto hospitalar e a baixa suscetibilidade encontrada às sulfonamidas em nossos isolados (60%), resolvemos investigar a presença dos genes *sul1*, *qacE* e *qacEA1*, que conferem resistência à sulfonamida e aos QAC, respectivamente. Verificamos então que a detecção do gene *sul1* não coincidiu com os resultados revelados pelo fenótipo, nos quais 80% dos isolados apresentaram resistência à sulfonamida e 100% deles apresentaram o gene *sul1*. Esse percentual de resistência pode ter ocorrido devido à ausência de expressão do gene *sul1*. Grape et al.⁶² demonstraram que dentre 105 isolados clínicos da família Enterobacteriaceae, 64 foram resistentes às sulfonamidas. O gene *sul1* foi encontrado em 14 isolados, o gene *sul2* em 23 isolados, os genes *sul1* e *sul2* foram simultaneamente detectados em 25 isolados e o gene *sul3* foi encontrado somente em dois isolados.

A distribuição dos genes *qacE* e *qacEA1* foi avaliada em isolados Gram-negativos de origem clínica e ambiental por Kazama et al.⁴⁶



O percentual de cepas positivas para esses dois genes em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (n = 63) foi 65% para *qacEA1* e 24% para *qacE*. Já em cepas ambientais de *P. aeruginosa* (n = 5) a distribuição foi de 40% para *qacEA1* e nenhum para *qacE*. Outro estudo também detectou a presença de *qacEA1* em 48% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* (n = 60), sendo encontrado em 88% das cepas MDR e em 35% das não multirresistentes, o que reforça a associação da presença deste gene com a multirresistência aos antimicrobianos²⁷.

O presente estudo demonstrou a presença dos genes *qacEA1-sul1* em 100% dos isolados do esgoto hospitalar (45% MDR, 40% R e 15% S) e a ausência do gene *qacE*. Essa ausência, muito provavelmente, se deve à inserção do segmento contendo o gene de resistência à sulfonamida (*sul1*) próximo a região 3' do gene *qacE*, transformando-o em *qacEA1*³².

Os genes *qacEA1* e *sul1* estão frequentemente associados a integrons classe 1^{63,64,65}. A associação desses genes em integron classe 1 foi detectada em 97% de isolados de bactérias do gênero *Salmonella* em Portugal⁶⁶. Assumindo que a presença desses genes sugere fortemente a presença de um integron de classe 1, podemos concluir que estes elementos estão amplamente distribuídos nas diferentes etapas do sistema de tratamento desse esgoto hospitalar.

Compostos à base de QAC estão frequentemente presentes em formulações de biocidas catiônicos. Assim sendo, o uso desses produtos pode ter um papel importante, porém indireto, na seleção de bactérias resistentes aos antibióticos⁶⁷. Genes de resistência aos QAC, especialmente relacionados às bombas de efluxo, são amplamente encontrados em estabelecimentos de assistência à saúde humana e animal. Bombas de efluxo específicas ou multidrogas são importantes determinantes de resistência intrínseca e/ou adquirida aos antimicrobianos. Alguns desses elementos acomodam resistência a ambos antibióticos e biocidas. Este fato, ainda não bem compreendido, pode conduzir à seleção de organismos antibiótico-resistentes via seleção por biocidas^{31,68}.

A exposição a antibióticos, biocidas ou metais pesados e muitos outros fatores ambientais diferentes resulta em um aumento de células contendo integrons^{39,69,70}. Além disso, a exposição a diferentes antibióticos (aminoglicosídeos, β -lactâmicos, fluoroquinolonas, entre outros) facilita a recombinação de casete de genes; envolvendo ocasionalmente a superexpressão da integrase *Int1* desencadeada pelo sistema SOS que induz a

desativação de *LexA*^{71,72}. A tendência atual, de uso mais amplo e indiscriminado de biocidas, pode conduzir à emergência de novos elementos genéticos, com consequências imprevisíveis para o bem-estar humano².

É evidente que, embora exista uma compreensão geral sobre as origens, os mecanismos de aquisição e a disseminação de genes de resistência aos antibióticos nas populações microbianas, ainda faltam muitos detalhes a serem esclarecidos a esse respeito. Esses aspectos pouco esclarecidos, em grande parte, ocorrem porque os estudos se concentram principalmente nas propriedades de patógenos de origem clínica e pouco esforço tem sido despendido para estabelecer o comportamento de cepas ambientais.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados foi possível concluir que a presença de *P. aeruginosa* resistente aos antibióticos em todas as etapas da ETEH do complexo hospitalar estudado tem caráter relevante na avaliação da eficiência do tratamento biológico de efluentes hospitalares. A detecção do maior percentual de cepas MDR na etapa de cloração sugere aumento da transferência horizontal e a disseminação de genes e organismos de resistência.

A presença de cepas de *P. aeruginosa* resistentes e de MDR no efluente tratado indica que o tratamento apresentou limitações na eliminação desses patógenos e alerta para os riscos à comunidade local, uma vez que o destino final desse efluente é um complexo lagunar utilizado como recreação e pesca de subsistência.

Embora com limitações em função do número reduzido de cepas estudadas, os resultados obtidos são altamente impactantes, pois foram detectadas cepas microbianas resistentes a antibióticos utilizados no tratamento de infecções graves, como as cefalosporinas de quarta geração, drogas carbapenêmicas e até resistência à polimixina, um dos últimos recursos no arsenal terapêutico antimicrobiano.

Os dados obtidos no presente estudo colaboram com a interpretação da eficiência do tratamento do resíduo líquido hospitalar. Além disso, poderão contribuir com a Vigilância Ambiental em Saúde no que se refere ao desenho de ações preventivas aos impactos negativos desses efluentes nos sistemas aquáticos e na saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Fuentefria DB, Ferreira AE, Corção G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: are they genetically related? *J Environ Manage.* 2011;92(1):250-5. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.09.001>
2. Gillings MR. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front Microbiol.* 2013;22;4:4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00004>
3. Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM, Vermande P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J Hazard Mater.* 2005;14;117(1):1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.08.032>
4. Perron GG, Gonzalez A, Buckling A. The rate of environmental change drives adaptation to an antibiotic sink. *J Evol Biol.* 2008;21(6):1724-31. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01596.x>



5. Rizzo L, Fiorentino A, Anselmo A. Advanced treatment of urban wastewater by UV radiation: effect on antibiotics and antibiotic-resistant *E. coli* strains. *Chemosphere*. 2013;92(2):171-6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.021>
6. Santoro DO, Cardoso AM, Coutinho FH, Pinto LH, Vieira RP, Albano RM et al. Diversity and antibiotic resistance profiles of *Pseudomonads* from a hospital wastewater treatment plant. *J Appl Microbiol*. 2015;119(6):1527-40. <https://doi.org/10.1111/jam.12936>
7. Garcia LP, Zanetti-Ramos BG. Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde: uma questão de biossegurança. *Cad Saude Publica*. 2004;20(3):744-52. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000300011>
8. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;1;34(5):634-40. <https://doi.org/10.1086/338782>
9. McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med*. 2006;119(6 Suppl 1):S29-36.
10. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007;128(6):1037-50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
11. Miranda CC, Filippis I, Pinto LH, Coelho-Souza T, Bianco K, Cacci LC et al. Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol*. 2015;118(6):1276-86. <https://doi.org/10.1111/jam.12792>
12. Magalhães MJ, Pontes G, Serra PT, Balieiro A, Castro D, Pieri FA et al. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* survey in a stream receiving effluents from ineffective wastewater hospital plants. *BMC Microbiol*. 2016;24;16(1):193. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0798-0>
13. Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho AP, Asensi MD. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol*. 2008;46(1):136-41. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02275.x>
14. Fuentefria DB, Ferreira AE, Gräf T, Corção G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(5):470-3. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500007>
15. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(2):279-89. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.2.279>
16. Enne VI, Livermore DM, Stephens P, Hall LM. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet*. 2001;28;357(9265):1325-8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04519-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04519-0)
17. Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat*. 2000;3(3):155-60. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>
18. Yun MK, Wu Y, Li Z, Zhao Y, Waddell MB, Ferreira AM, et al. Catalysis and sulfa drug resistance in dihydropteroate synthase. *Science*. 2012;335(6072):1110-4. <https://doi.org/10.1126/science.1214641>
19. Heuer H, Szczepanowski R, Schneiker S, Pühler A, Top EM, Schlüter A. The complete sequences of plasmids pB2 and pB3 provide evidence for a recent ancestor of the IncP-1beta group without any accessory genes. *Microbiology*. 2004;150(Pt 11):3591-9. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27304-0>
20. Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P, Boxall AB, Hawkey PM, Wellington EM. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):696-702. <https://doi.org/10.1128/AAC.00652-07>
21. Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol*. 2003;91(1):73-84. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00263-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00263-8)
22. Perreten V, Boerlin P. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(3):1169-72. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003>
23. Hall RM, Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;870:68-80. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08866.x>
24. Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG. Genetics of antimicrobial resistance. *Anim Biotechnol*. 2006;17(2):111-24. <https://doi.org/10.1080/10495390600957092>
25. Hendrickx L, Hausner M, Wuertz S. Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(3):1721-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1721-1727.2003>
26. Barlow RS, Pemberton JM, Desmarchelier PM, Gobius KS. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(3):838-42. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.838-842.2004>
27. Romão C, Miranda CA, Silva J, Mandetta Clementino M, de Filippis I, Asensi M. Presence of *qacEΔ1* gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics. *Curr Microbiol*. 2011;63(1):16-21. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9934-0>
28. Mahzounieh M, Khoshnood S, Ebrahimi A, Habibian S, Yaghoobian M. Detection of antiseptic-resistance genes in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* spp: isolated from burn patients. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2014;9(2):e15402.
29. Bjorland J, Sunde M, Waage S. Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):3999-4004. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3999-4004.2001>
30. Wassenaar TM, Ussery D, Nielsen LN, Ingmer H. Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in



- Staphylococcus* species. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2015;5(1):44-61. <https://doi.org/10.1556/EuJMI-D-14-00038>
31. Tezel U, Pavlostathis SG. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. Curr Opin Biotechnol. 2015;33:296-304. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.018>
32. Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol Rev. 1996;60(4):575-608.
33. Jaglic Z, Cervinkova D. Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds - the *qac* genes and their role: a review. Vet Med (Praha). 2012;57(6):275-81.
34. Cervinkova D, Babak V, Marosevic D, Kubikova I, Jaglic Z. The role of the *qacA* gene in mediating resistance to quaternary ammonium compounds. Microb Drug Resist. 2013;19(3):160-7. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0154>
35. Kücken D, Feucht H, Kaulfers P. Association of *qacE* and *qacEDelta1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2000;183(1):95-8. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00636-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00636-9)
36. Kampf G. Acquired resistance to chlorhexidine - is it time to establish an 'antiseptic stewardship' initiative? J Hosp Infect. 2016;94(3):213-27. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.018>
37. Jennings MC, Forman ME, Duggan SM, Minbiole KPC, Wuest WM. Efflux pumps might not be the major drivers of QAC resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ChemBiochem. 2017;18(16):1573-1577. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700233>
38. Canal N, Meneghetti KL, Almeida CP, Bastos MR, Otton LM, Corção G. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. Braz J Microbiol. 2016;47(2):337-44. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.015>
39. Gaze WH, Abdoulsam N, Hawkey PM, Wellington EM. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(5):1802-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1802-1807.2005>
40. U. S. Environment Protection Agency. EPA. 821-R-08-002. Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS. Washington, DC: U. S. Environment Protection Agency; 2007.
41. Monteiro MA, Spisso BF, Santos JR, Costa RP, Ferreira RG, Pereira UM et al. Occurrence of antimicrobials in river water samples from rural region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. J Environ Prot (Irvine Calif). 2016;7(2):230-41. <https://doi.org/10.4236/jep.2016.72020>
42. Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR, editors. Bergey's Manual® of systematic bacteriology. New York: Springer; 2005. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. Chapter 9: Pseudomonadales Orla-Jensen 1921, 270AL, p. 323-342.
43. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2004;42(5):2074-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004>
44. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100S-26: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-sixth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
45. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
46. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacE delta 1* in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 1998;159(2):173-8.
47. Frank T, Gautier V, Talarmin A, Bercion R, Arlet G. Characterization of sulphonamide resistance genes and class 1 integron gene cassettes in Enterobacteriaceae, Central African Republic (CAR). J Antimicrob Chemother. 2007;59(4):742-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl538>
48. Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. Sci Total Environ. 2013;447:345-60. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
49. Maillard JY. Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems. Ther Clin Risk Manag. 2005;1(4):307-20.
50. Singh M, Sharma R, Gupta PK, Rana JK, Sharma M, Taneja N. Comparative efficacy evaluation of disinfectants routinely used in hospital practice: india. Indian J Crit Care Med. 2012;16(3):123-9. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.102067>
51. Santoro DO, Romão CM, Clementino MM. Decreased aztreonam susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital effluent treatment system and clinical samples. Int J Environ Health Res. 2012;22(6):560-70. <https://doi.org/10.1080/09603123.2012.678000>
52. Grabow WO, Middendorff IG, Prozesky OW. Survival in maturation ponds of coliform bacteria with transferable drug resistance. Water Res. 1973;7(11):1589-97. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90130-9)
53. Armstrong JL, Calomiris JJ, Seidler RJ. Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. Appl Environ Microbiol. 1982;44(2):308-16.
54. Murray GE, Tobin RS, Junkins B, Kushner DJ. Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. Appl Environ Microbiol. 1984;48(1):73-7.
55. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). Clin Microbiol Infect. 2006;12(4):315-21. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01351.x>



56. Nwachuku N, Gerba CP. Emerging waterborne pathogens: can we kill them all? *Curr Opin Biotechnol.* 2004;15(3):175-80. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.04.010>
57. Luczkiewicz A, Kotlarska E, Artichowicz W, Tarasewicz K, Fudala-Ksiazek S. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015;22(24):19823-34. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5098-y>
58. Bernier SP, Surette MG. Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Front Microbiol.* 2013;4:20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00020>
59. Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res.* 2001;32(3-4):261-73. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001123>
60. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol.* 2002;36(6):1202-11. <https://doi.org/10.1021/es011055j>
61. Pérez S, Eichhorn P, Aga DS. Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprim at different stages of sewage treatment. *Environ Toxicol Chem.* 2005;24(6):1361-7. <https://doi.org/10.1897/04-211R.1>
62. Grape M, Sundström L, Kronvall G. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(6):1022-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg473>
63. Arabi H, Pakzad I, Nasrollahi A, Hosainzadegan H, Azizi Jalilian F, Taherikalani M et al. Sulfonamide resistance genes (*sul*) M in extended spectrum beta lactamase (ESBL) and non-ESBL producing *Escherichia coli* isolated from Iranian Hospitals. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(7):e19961. <https://doi.org/10.5812/jjm.19961v2>
64. Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;160(1):37-41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12887.x>
65. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):912-35. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00294.x>
66. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):836-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.836-839.2005>
67. Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist.* 2010;16(2):91-104. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0120>
68. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):20-51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
69. Wright MS, Baker-Austin C, Lindell AH, Stepanauskas R, Stokes HW, McArthur JV. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J.* 2008;2(4):417-28. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.8>
70. Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2012;9;3:119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
71. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S et al. The SOS response controls integron recombination. *Science.* 2009;324(5930):1034. <https://doi.org/10.1126/science.1172914>
72. Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plésiat P et al. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002778. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002778>
73. Wellington EM, Boxall AB, Cross P, Feil EJ, Gaze WH, Hawkey PM et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(2):155-65. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Interações medicamentosas e consequentes intervenções farmacêuticas na Unidade de Terapia Intensiva de um hospital privado em Macapá, Amapá

Interactions medicative and consequents interventions pharmaceuticals in the unity of intensive therapy in a private hospital in Macapa, Amapa

Uriel Davi de Almeida e Silva¹
Carla Luciane De Souza Soeiro^{II}
Rafael Lima Resque^I
Madson Ralide Fonseca Gomes^I
Érika Rodrigues Guimarães Costa^I
Mayara Amoras Teles Fujishima^I
Alessandra Azevedo do Nascimento^I
Jaderson Vieira Ferreira^I
Deyse de Souza Dantas^{I,*}

RESUMO

Introdução: Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) são submetidos a tratamentos com múltiplos fármacos, visto a gravidade dos problemas que são tratados. A interação medicamentosa é definida como um evento causado pela modificação do efeito ou aproveitamento de um fármaco no organismo em virtude de outro. A avaliação das potenciais interações medicamentosas pode auxiliar a equipe multiprofissional a promover um tratamento de qualidade, evitando que estas interações sejam danosas ao paciente, diminuindo o tempo de internação e consequentemente auxiliando na redução de custos. **Objetivo:** Avaliar as principais interações medicamentosas observadas nas UTI de um hospital privado na cidade de Macapá (Amapá, AP) através da análise das prescrições e das consequentes intervenções adotadas a fim de minimizar seus riscos. **Método:** Foram avaliadas prescrições de pacientes internados em UTI quanto à presença de potenciais interações medicamentosas e sua respectiva classificação, segundo seu risco e mecanismo. As principais interações foram destacadas a fim de destacar seu mecanismo e medidas adotadas pela equipe multidisciplinar. **Resultados:** Observou-se que a maioria das interações, tanto na UTI adulto quanto na UTI neonatal, foram consideradas de risco moderado. As interações farmacocinéticas foram mais comuns na UTI adulto, enquanto as farmacodinâmicas predominaram na UTI neonatal. O manejo no horário de administração dos medicamentos foi a intervenção mais adequada para a maioria dos casos das interações medicamentosas. **Conclusões:** o monitoramento das potenciais interações em pacientes críticos procura garantir a segurança do paciente, buscando diminuir os riscos potenciais aos quais estes estão expostos.

PALAVRAS-CHAVE: Serviço de Farmácia Hospitalar; Interações Medicamentosas; Assistência Farmacêutica

ABSTRACT

Introduction: Patients admitted to Intensive Care Units (ICU) are submitted to multiple drug treatments, considering the severity of their problems. Drug interaction is defined as an event caused by the modification of the effect or use of a drug in the body. The evaluation of potential drug interactions can help the multiprofessional team to promote a quality treatment, avoiding harmful interactions, reducing the length of hospitalization and consequently reducing costs. **Objective:** To evaluate the main drug interactions observed in the ICUs of a private hospital in the city of Macapá, Brazil, through the analysis of the prescriptions and the consequent interventions adopted in order to minimize their risks. **Method:** Prescriptions of patients admitted to the ICU were evaluated for the presence of potential drug interactions and their respective classification according to their risk and mechanism. A brief bibliographic study about the main interactions was carried out in order to highlight its mechanism and the measures adopted by the multidisciplinary team. **Results:** We observed that the majority of the interactions, both in the adult ICU

^I Universidade Federal do Amapá (Unifap), Macapá, AP, Brasil

^{II} Secretaria Estadual de Saúde do Amapá, Macapá, AP, Brasil

*E-mail: deysesdantas@yahoo.com.br

Recebido: 22 fev 2017
Aprovado: 5 mai 2018



and in the neonatal ICU, were considered of moderate risk. Pharmacokinetic interactions were more common in the adult ICU, while pharmacodynamics predominated in the neonatal intensive care unit. Management during the administration of medications was the most appropriate intervention for most cases of drug interactions. **Conclusions:** Monitoring of potential interactions in critically ill patients seeks to ensure patient safety in order to reduce the potential risks to which they are exposed.

KEYWORDS: Pharmacy Service Hospital; Drug Interactions; Pharmaceutical Services

INTRODUÇÃO

O paciente internado em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) é submetido a tratamentos com diversos medicamentos, o que é justificado pelo próprio quadro clínico. No entanto, estes fármacos podem interagir entre si, podendo causar reações adversas indesejadas, aumentando o tempo e o custo do tratamento.

Interações medicamentosas são definidas como Reações Adversas a Medicamentos (RAM), que ocorrem quando o efeito de uma droga é alterado na presença de outra, resultando no aumento da toxicidade ou redução do efeito terapêutico¹.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) adota o mesmo conceito de Farmacovigilância preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como: a “ciência e atividade relativa à identificação, avaliação, compreensão e prevenção de efeitos adversos ou quaisquer problemas relacionados ao uso de medicamentos”, o que abrange, portanto, os eventos adversos relacionados a desvios de qualidade, inefetividade terapêutica, erro de medicação, uso abusivo, intoxicações e interações medicamentosas².

As interações medicamentosas são causas significativas das admissões hospitalares e visitas médicas, sendo responsáveis por até 22,2% das reações adversas que levam a internação dos pacientes³. Por este motivo, o monitoramento do desenvolvimento de RAM provenientes de interações medicamentosas deve ser feito em pacientes polimedcados. Portanto, é importante avaliar quais são as principais potenciais interações medicamentosas evidenciadas e de que maneira evitar seus riscos associados.

Além disso, existem poucos estudos farmacoepidemiológicos, que visem à segurança do paciente, desenvolvidos na região norte do país, que possam retratar esta realidade particular e que possam servir de base para a prática e pesquisa.

Dadas às circunstâncias acima, o objetivo desta pesquisa foi identificar e classificar as principais potenciais interações medicamentosas e intervenções farmacêuticas observadas nas UTI de um hospital privado em Macapá (AP).

MÉTODO

Foi realizado um estudo retrospectivo em hospital do setor privado, de grande porte, com 180 leitos. O hospital dispõe de uma UTI adulta e uma neonatal, com dez e nove leitos, respectivamente. Foram analisadas as prescrições emitidas entre janeiro e abril de 2014 em ambas as UTI. No entanto, apenas pacientes que se enquadravam nos seguintes critérios tiveram suas prescrições avaliadas no estudo:

1. Pacientes que faziam uso de Medicamento via sonda;
2. Pacientes submetidos à insulino terapia;
3. Pacientes em uso de três ou mais antibióticos;
4. Pacientes que faziam uso de Medicamentos Potencialmente Perigosos (MPP);
5. Pacientes com sepse;
6. Pacientes com dor torácica;
7. Pacientes em uso de nutrição parenteral.

A justificativa para a escolha desses critérios se deu por serem os utilizados pelo hospital para o acompanhamento do farmacêutico, sinalizando os pacientes que devem receber um seguimento mais próximo.

Para traçar o perfil das prescrições dos pacientes incluídos no estudo, avaliou-se o sexo, idade, motivo da internação, número de medicamentos prescritos e número de potenciais interações medicamentosas. As variáveis sexo e idade não foram avaliadas nos pacientes da UTI neonatal.

Estudo e classificação das interações

As prescrições analisadas foram avaliadas quanto à presença de interações medicamentosas através da utilização das bases de dados *Medscape*[®] e *Micromedex Healthcare Series*[®].

As interações fármaco-fármaco foram contabilizadas por pacientes, e classificadas quanto à gravidade, seguindo o critério adotado por Cruciol-Souza e Thomson⁴, sendo assim divididas em graves, moderadas ou leves.

As interações também foram classificadas, segundo a classificação do Formulário Terapêutico Nacional⁵ em:

- Interações farmacocinéticas;
- Interações farmacodinâmicas;
- Interações farmacêuticas.

Para este estudo, foram eleitas as cinco interações medicamentosas mais prevalentes, que foram avaliadas através de revisão literária em artigos publicados nas bases de dados PubMed, MEDLINE e SciELO.

Este trabalho possui aprovação do comitê de ética da Universidade Federal do Amapá (Unifap), CAAE n° 38712014.4.0000.0003.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram avaliadas 388 prescrições (Tabela 1), das quais 235 eram da UTI adulto, pertencentes a 70 pacientes com idade média de 61,14 anos, sendo 56% do sexo masculino. As demais 153 prescrições da UTI neonatal pertenciam a 33 pacientes acompanhados pelo serviço de farmácia clínica.

Os principais motivos de internação estavam relacionados a doenças cardíacas e circulatórias na UTI adulto (68,57%) e a transtornos respiratórios e cardiovasculares específicos do período perinatal na UTI neonatal (58,38%).

Em estudo semelhante sobre interações medicamentosas potenciais na UTI de um hospital universitário do Ceará desenvolvido por Lima e Cassiani⁶, obteve-se resultado semelhante no que se refere aos pacientes estudados durante a pesquisa, na qual, dos 102 pacientes, 64,7% eram do sexo masculino com idade média de 60 anos. As classes diagnósticas mais frequentes foram as doenças do aparelho circulatório em 24,9% dos casos.

Ao se avaliar o número de medicamentos prescritos e o número de potenciais interações em cada prescrição, observou-se um maior número de interações nos pacientes da UTI adulto em relação aos da UTI neonatal.

Gastelurrutia et al.⁷ estudaram o impacto do farmacêutico na equipe multidisciplinar de uma clínica de pacientes com insuficiência cardíaca e detectaram uma significativa relação entre o número de medicamentos administrados a cada paciente ($10,2 \pm 3,2$) e o número de Resultados Negativos Relacionados a Medicamentos (RNM) e potenciais Resultados Negativos associados a Medicamentos (PRM), de acordo com o Comitê Terceiro Consenso de Granada⁸.

É possível inferir que, quanto maior o número de medicamentos prescritos para um paciente, maior a probabilidade de ocorrerem interações medicamentosas. Em estudo realizado por Hammes et al.⁹, no qual se avaliou a prevalência de potenciais interações droga-droga, a média de medicamentos diferentes por paciente ao final da observação foi de $13,10 \pm 5,95$ e o número de prescrições, $7,64 \pm 6,66$ para cada paciente. Neste mesmo estudo foram avaliadas 1.069 prescrições de 24 h, contendo 159 fármacos, dos quais 775 (72,5%) apresentaram alguma interação.

Para este estudo, elegeram-se as cinco principais interações de cada unidade, sendo descritas na Tabela 2.

Tabela 1. Número de prescrições, número de medicamentos e número de interações medicamentosas nas UTI adulto e neonatal.

| UTI adulto | Prescrições | Fármacos | Nº de interações |
|--------------------|-----------------|------------------|------------------|
| Média por paciente | $3,35 \pm 3,66$ | $17,22 \pm 4,80$ | $4,01 \pm 2,40$ |
| Total | 219 | 52 | 74 |
| UTI neonatal | | | |
| Média por paciente | $4,63 \pm 4,20$ | $9,30 \pm 6,21$ | $1,90 \pm 1,58$ |
| Total | 153 | 17 | 22 |

UTI: Unidade de Terapia Intensiva.
Fonte: Próprio autor.

Tabela 2. Interações medicamentosas mais frequentes por unidade.

| Fármacos envolvidos | Nº | % |
|--------------------------------------|-----|--------|
| UTI adulto | | |
| Metoclopramida + Tramadol | 31 | 14,16 |
| Furosemida + Insulina | 27 | 12,33 |
| Ácido Acetilsalicílico + Clopidogrel | 17 | 7,76 |
| Ácido Acetilsalicílico + Enoxaparina | 16 | 7,31 |
| KCl + Espironolactona | 7 | 3,20 |
| Outras | 121 | 55,24 |
| Total | 219 | 100,00 |
| UTI neonatal | | |
| Gentamicina + Penicilina | 27 | 40,91 |
| Piperacilina/Tazobactam + Amicacina | 4 | 6,06 |
| Captopril + Furosemida | 4 | 6,06 |
| Fenobarbital + Omeprazol | 4 | 6,06 |
| Omeprazol + Midazolam | 3 | 4,55 |
| Outras | 24 | 36,36 |
| Total | 66 | 100,00 |

UTI: Unidade de Terapia Intensiva.
Fonte: Próprio autor.

Na UTI adulto, a interação mais comum foi entre a metoclopramida, indicada para distúrbios gastrointestinais e muito utilizada em UTI a fim de evitar eventos como o refluxo gastroesofágico, e o tramadol, um analgésico opioide. Na UTI neonatal, a interação mais comum ocorreu entre a gentamicina, um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, e a penicilina.

Metoclopramida e tramadol

A metoclopramida (ou 4-amino-5-cloro-2-metoxi-n-(2-dietil-aminoetil) benzamida) possui propriedades colinomiméticas e de antagonista da dopamina e ganha utilidade no tratamento de distúrbios gastrointestinais e no tratamento e prevenção de náuseas e vômitos¹⁰.

O tramadol é um analgésico opioide sintético de ação central, que parece atuar, pelo menos parcialmente, através da ligação aos receptores opióides μ , causando a inibição da via ascendente da dor¹¹.

De acordo com a pesquisa realizada na base de dados *Micromedex*¹², o uso do tramadol com certas drogas aumenta o risco de convulsões. A metoclopramida não é recomendada em pacientes epiléticos ou em pacientes tratados com drogas que possam causar efeitos extrapiramidais uma vez que a frequência e a gravidade das convulsões podem ser agravadas.

A *Micromedex*, no entanto, apresenta esta interação classificada como “documentação fraca”, ou seja, a documentação disponível é insatisfatória, porém, as considerações farmacológicas levam os clínicos a suspeitar da existência da interação.

Apesar disso, ambos os fármacos são necessários na terapia do paciente, portanto, sua suspensão ou substituição pode não ser a solução mais adequada. Por este motivo, a equipe de farmácia clínica interveio no horário de administração dos medicamentos,



para que assim não fossem administrados no mesmo horário, de acordo com a farmacocinética de cada um, de modo que o pico de concentração de cada droga não coincidisse, diminuindo os riscos associados a esta interação.

Ainda de acordo com a *Micromedex*¹², a metoclopramida apresenta um pico de concentração de 15 min após a administração, e um tempo de meia-vida de 5 a 6 h. O tramadol, por sua vez, possui um pico de concentração de 1 h 30 min, com meia vida de 6 a 8 h. Portanto, a intervenção adotada pela equipe nesses casos dá-se no reaprazamento dos medicamentos.

Furosemida e insulina

A furosemida é um diurético de alça que atua inibindo os íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ das membranas apicais de células renais no ramo ascendente da alça de Henle. Esta inibição resulta em um aumento da excreção de sódio e cloro e, indiretamente, de cálcio e magnésio, diminuindo a reabsorção de água no túbulo coletor e aumentando a sua excreção devido à queda da concentração de solutos no interstício medular¹³.

A insulina é um hormônio produzido pelas células β do pâncreas, e tem função de auxiliar a passagem da glicose do sangue para as células. O diabetes tipo I ocorre quando há a destruição destas células por processos autoimunes, o corpo deixa de produzir insulina, devendo ser imediatamente administrada insulina exógena. O diabetes tipo II ocorre quando o corpo produz a insulina, mas esta é insuficiente ou deficiente¹⁴.

Em hospitalizações, alguns pacientes podem necessitar do controle glicêmico com auxílio da insulina por diversos fatores, que podem variar desde o próprio diabetes já pré-existente até o uso de outros medicamentos que podem causar hiperglicemia, como os corticoides.

Os pacientes de UTI são constantemente acompanhados em relação ao seu nível glicêmico. Este trabalho é geralmente feito pela equipe de enfermagem. O farmacêutico é responsável principalmente em verificar a segurança do uso de insulina nos pacientes de acordo com seu quadro clínico e os outros medicamentos utilizados.

Segundo dados da *Micromedex* e da *Medscape*, a furosemida não interage diretamente com o uso de insulina, porém, este medicamento causa o aumento da glicemia, necessitando fazer um ajuste da dose da insulina. Este ajuste da dose é feito em conjunto com a equipe de farmácia clínica, considerando a glicemia, a dose da furosemida e o tipo de alimentação ao qual o paciente está recebendo. Além disso, os níveis glicêmicos são acompanhados diariamente pelo farmacêutico e pela equipe de enfermagem.

Ácido acetilsalicílico, clopidogrel e enoxaparina

As interações entre o ácido acetilsalicílico (AAS), o clopidogrel e a enoxaparina foram a terceira e a quarta interações mais observadas na UTI adulto. Em somente um dos casos no qual estes medicamentos foram prescritos, a enoxaparina não estava inclusa na receita, motivo pelo qual resolveu-se considerar as

interações separadamente no momento da contagem das interações, porém, serão aqui discutidas em conjunto.

O AAS, também conhecido como aspirina, é o anti-inflamatório não esteroideal (AINE) mais antigo e amplamente estudado, entretanto é considerado separadamente dos demais, por seu uso predominante no tratamento das doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, em doses baixas¹⁵.

O mecanismo de ação do AAS se dá pela inibição não seletiva da enzima ciclo-oxigenase em suas duas isoformas. A isoforma COX-1 é expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos; enquanto a COX-2 é induzida nas inflamações por vários estímulos¹⁶.

Em UTI e em pacientes com problemas cardiovasculares, o uso do AAS justifica-se pela redução da produção plaquetária de tromboxano A₂, devido ao bloqueio da COX-1, prevenindo a trombose arterial.

O clopidogrel, cujo mecanismo de ação é baseado na inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP, é utilizado a fim de prevenir eventos trombóticos em pacientes com problemas cardiovasculares e em UTI. Esta inibição é dose dependente e pode ser detectada 2 h após a ingestão de 400 mg, mantendo-se estável por 48 h¹⁷.

A enoxaparina sódica é um antitrombótico capaz de inibir o Fator Xa na cascata de coagulação sanguínea e geralmente sem interferir nos testes de tempo de protrombina e tempo de trombo-plastina parcial ativada¹².

Geralmente estas três drogas são usadas em associação para evitar eventos trombóticos em pacientes internados em UTI, principalmente nos casos em que há comprometimento das funções cardiovasculares. A ampla utilização destes medicamentos no hospital relaciona-se com a alta taxa de pacientes diagnosticados com distúrbios cardiovasculares.

Segundo Oliveira¹⁷, a adição de baixas doses de AAS e clopidogrel na prevenção de pacientes de alto risco pode diminuir o risco de morte cardiovascular associada ao infarto agudo do miocárdio e ao acidente vascular encefálico em até 1/5 dos pacientes e angina refratária em 1/6 dos pacientes. Há também a diminuição de revascularizações recentes, isquemia severa e insuficiência cardíaca em 1/4 a 1/5 dos casos. Entretanto, é observado um aumento no número de sangramentos.

O uso destes três medicamentos em conjunto, apesar de muitas vezes ser proposital a fim de evitar maiores complicações, pode causar sangramentos e hemorragias graves aos pacientes de UTI, e deve ser utilizada somente quando os benefícios se sobrepõem aos riscos.

Nestes casos, o hospital realiza exames de coagulograma constantemente em pacientes que necessitam utilizar estas drogas. Estes exames são sempre acompanhados pelo farmacêutico clínico, pela equipe de enfermagem e pelo médico responsável da unidade. Quando alterações são observadas nestes exames ao ponto de serem prejudiciais ao paciente, o farmacêutico clínico



propõe o ajuste da dose de um dos medicamentos ou a suspensão de pelo menos um deles. Esta interação é importante, sobretudo nos pacientes que foram ou que serão submetidos a qualquer tipo de procedimento cirúrgico.

Cloreto de potássio e espironolactona

O cloreto de potássio é um dos principais constituintes eletrolíticos do espaço intracelular, desempenhando um importante papel na manutenção do volume intracelular devido ao equilíbrio hidroeletrolítico e à estabilidade de membrana celular. É ativador de ATPases de membranas em transporte ativo¹².

Segundo pesquisa realizada na *Medscape* e na *Micromedex*, a espironolactona é um antagonista específico da aldosterona, atuando através da ligação competitiva nos receptores de troca de sódio e potássio aldosterona-dependentes, no túbulo renal distal. É um diurético poupador de potássio causando aumento na quantidade de água e sódio excretados.

Estes dois medicamentos, por suas próprias características farmacodinâmicas, aumentam o nível sérico de potássio, o que pode resultar em hipercalemia (ou hiperpotassemia), se não houver o devido monitoramento.

A hipercalemia acarreta transtornos metabólicos, principalmente para o sistema neuromuscular e coração. Frequentemente causa arritmias e leva à morte por parada cardíaca sempre que níveis superiores a 9 mEq/L são atingidos¹⁸.

Nem sempre é possível evitar esta combinação dependendo do quadro clínico do paciente, por este motivo, faz-se necessário o acompanhamento rigoroso dos níveis de potássio dos pacientes, sobretudo quando esta interação é detectada. Nestes casos, um ajuste de dose ou outro diurético não poupador de potássio é sugerido.

Gentamicina e penicilina

A gentamicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos muito utilizado em infecções por bactérias Gram-negativas em neonatos. Interfere com a síntese proteica bacteriana através da ligação às subunidades ribossomais 30s e 50s. A penicilina interfere na síntese da parede celular mucopolissacarídica durante a multiplicação ativa, resultando em atividade bactericida contra os micro-organismos susceptíveis^{11,12}.

A associação entre estes dois antimicrobianos é muito comum e utilizada no hospital como tratamento de escolha em casos e infecções típicas do recém-nascido e como paliativo destas.

O uso de penicilinas concomitante ao uso de aminoglicosídeos pode diminuir a eficácia destes últimos por um mecanismo desconhecido¹⁹. Assim como a interação entre a metoclopramida e o tramadol, esta é documentada pela *Micromedex* como “fraca” em publicações, porém as evidências clínicas existentes levam a crer na sua existência e relevância.

Além disso, os aminoglicosídeos em geral são sabidamente ototóxicos e nefrotóxicos e devem ser usados com cuidado

em pacientes com insuficiência renal, sobretudo em neonatos. Quando administrados em conjunto com a penicilina, os rins, além de sofrerem a toxicidade dos aminoglicosídeos, ainda devem ser responsáveis por eliminar a penicilina, o que pode causar um estresse maior ao órgão, aumentando o potencial nefrotóxico dos medicamentos.

Em estudo realizado por Martins et al.²⁰, foram detectadas semelhanças com a presente pesquisa, no que se diz respeito às principais interações, uma vez que 60% dos pacientes pediátricos foi exposto à coadministração de antimicrobianos, em sua maioria pela combinação de oxacilina (pertencente ao grupo das penicilinas) com um aminoglicosídeo e associados ao aprazamento simultâneo, aumentando o potencial de interação.

Queiroz et al.²¹ também detectaram a associação de ampicilina, outro medicamento da classe das penicilinas, em associação com a gentamicina, representando a interação mais comum (19,1% dos casos) na UTI neonatal de um hospital de Mato Grosso (MT).

Sendo assim, a ação do farmacêutico clínico neste caso foi informar a equipe de enfermagem acerca da interação, para que, assim, os medicamentos não sejam administrados no mesmo horário. Separando o horário de administração destes antimicrobianos por suas características farmacocinéticas, é possível evitar que o pico de concentração de cada medicamento seja próximo um ao outro, o que diminuiria a possibilidade de interação.

Piperacilina/tazobactam e amicacina

A piperacilina é uma penicilina semissintética que demonstra, portanto, o mesmo mecanismo de ação já descrito. O tazobactam é um potente inibidor de muitas β -lactamases, incluindo as enzimas mediadas por plasmídeos ou por cromossomos que frequentemente causam resistências às penicilinas e às cefalosporinas²².

A amicacina é um aminoglicosídeo que atua de forma semelhante à gentamicina.

Na pesquisa realizada na base de dados na *Medscape*, a piperacilina pode aumentar o efeito da amicacina por sinergismo farmacodinâmico, podendo potencializar seus efeitos ototóxicos e nefrotóxicos. Entretanto, Lacy et al.¹⁹ referem a interação entre estes medicamentos como similar à interação descrita entre a gentamicina e a penicilina, uma vez que os medicamentos são das mesmas classes farmacológicas.

De qualquer forma, semelhante à interação anterior, o manejo clínico se deu pela não administração dos medicamentos no mesmo horário, evitando assim a possível interação.

Captopril e furosemida

O sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona é responsável pela manutenção da pressão sanguínea a longo prazo. A enzima renina é produzida nos rins pelo aparelho justaglomerular pela ação de barorreceptores conhecidos como células de Polkissen e pela ação de quimiorreceptores que constituem a região conhecida como mácula densa. Além disso, há um mecanismo extra-renal



sistêmico de produção de renina, através de barorreceptores do seio carótido, localizado na bifurcação da artéria carótida, e consequente estimulação simpática para a liberação da enzima²³.

A renina, por sua vez, converte uma proteína chamada angiotensinogênio produzida pelo fígado, em angiotensina I. Os pulmões produzem a enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável pela conversão de angiotensina I em angiotensina II. Além disso, a ECA tem como função a quebra da bradicinina, um vasodilatador endógeno. A angiotensina II tem como funções principais a vasoconstrição e a liberação de aldosterona pelo córtex das glândulas adrenais. A aldosterona aumenta a reabsorção de sódio e água elevando a pressão arterial²³.

Uma das classes mais utilizadas para o controle da pressão arterial é a dos Inibidores da ECA, como o captopril, que inibem a conversão de angiotensina I para II, reduzindo os efeitos da angiotensina II como vasoconstrição, liberação de aldosterona, lesão endotelial e síntese proteica vascular e miocárdica²⁴.

Pacientes que utilizam captopril associado à furosemida tem sua pressão arterial monitorada constantemente, uma vez que a associação destes medicamentos pode causar hipotensão aguda devido a um sinergismo farmacodinâmico.

Fenobarbital, midazolam e omeprazol

O fenobarbital é um barbitúrico anticonvulsivante que possui baixa toxicidade quando comparado a outros fármacos da mesma classe, sendo um dos mais utilizados para tal finalidade. Inibe as convulsões provavelmente por potencializar a inibição sináptica através da ação no receptor GABAA²⁵.

O omeprazol é um agente utilizado para supressão da liberação de ácido gástrico através da inibição da bomba de prótons. Também inibe a anidrase carbônica da mucosa gástrica, o que pode contribuir para as suas propriedades de supressão ácida²⁵.

Há indícios de que o metabolismo do fenobarbital pode ser diminuído pela ação do omeprazol como indutor enzimático do citocromo P4503A4. Esta indução também afeta o metabolismo do midazolam, aumentando o seu tempo de ação no indivíduo¹⁹. Este aumento no tempo de ação pode resultar em exacerbação dos efeitos tóxicos.

O midazolam é um benzodiazepínico indutor do sono que promove o aumento na frequência de abertura do canal iônico a uma mesma concentração de GABAA, potencializando seu efeito inibitório e aumentando o período refratário da membrana celular a um novo potencial de ação²⁶. Com a diminuição do metabolismo, o efeito depressor do sistema nervoso central é exacerbado, podendo causar uma sedação exagerada no paciente.

A interação entre estes medicamentos, no entanto, apesar de já reportada pela equipe de farmácia clínica, é muitas vezes desejada pela equipe médica e/ou equipe de enfermagem, uma vez que pacientes em UTI são normalmente sedados. Esta diminuição do metabolismo evita que haja um aumento da dose ou da frequência da administração do medicamento. Ainda assim, os pacientes são cuidadosamente monitorados em relação ao grau de sedação.

Quanto à gravidade das interações, utilizou-se os parâmetros descritos por Cruciol-Souza e Thomson⁴. Os resultados estão expressos na Figura 1.

Tanto na UTI adulto como na neonatal se observou maior incidência de interações consideradas como moderadas, ou seja, que podem resultar em exacerbação da condição do paciente e/ou alteração na terapia. Por este motivo, o acompanhamento pelo farmacêutico clínico para o manejo destas interações, juntamente com o acompanhamento clínico com a equipe multiprofissional, se faz necessário.

Apesar de as interações consideradas como graves estarem em menor número em ambas as unidades, elas representam um perigo maior para o paciente, podendo resultar em complicação clínica ou, inclusive, levar à morte, sendo assim, devem ser evitadas.

As interações graves mais comuns na UTI adulto foram: metoclopramida e tramadol, já discutidos anteriormente, com 31 casos; dopamina e fenitoína, na qual pode resultar num aumento exacerbado do efeito hipotensor da fenitoína por sinergismo farmacodinâmico e amiodarona e ondansetrone, com quatro casos cada. Esta última interação pode ocasionar em prolongamento do intervalo QT. Considerando que a maioria dos pacientes da UTI possuem problemas cardíacos, o uso destes medicamentos em conjunto pode acarretar em danos sérios aos pacientes.

A porcentagem de 52,70% (39) de interações moderadas pode corroborar com o estudo realizado por Carvalho et al.²⁷, no qual 50,1% das interações foram assim classificadas. De modo semelhante, Lima e Cassiani⁶ detectaram que 54,7% das potenciais interações medicamentosas em pacientes de UTI, também foram consideradas de gravidade moderada. Em outro estudo realizado por Hammes et al.⁹, foi encontrado número aproximado de interações potenciais moderadas, representando 50,4% do total.

Em todos os estudos citados anteriormente, a porcentagem de interações leves e graves foi condizente com o encontrado nesta pesquisa.

Na presente pesquisa, 72,80% (16) dos casos foram considerados como risco “moderado” presente na UTI neonatal. Em outro estudo conduzido por Queiroz et al.²¹, 57% das interações

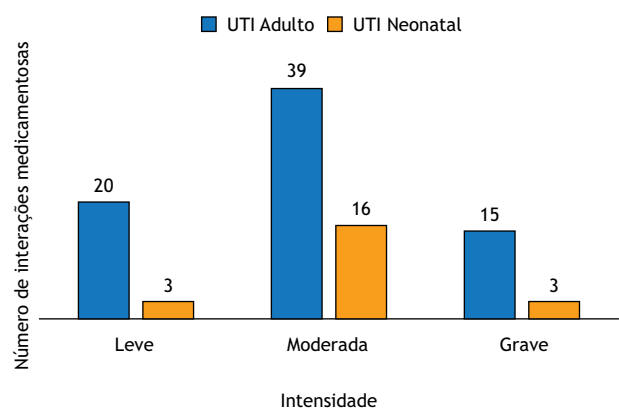


Figura 1. Classificação das interações farmacológicas quanto à gravidade nas unidades avaliadas. UTI: Unidade de Terapia Intensiva.



descritas foram classificadas como “risco a ser avaliado”, quando há interação medicamentosa, mas os benefícios são maiores que os riscos. Porém, o referido estudo utilizou diferentes critérios de classificação, o que enquadraria grande parte das interações citadas no estudo como risco “moderado” caso fossem utilizados os mesmos critérios aqui adotados.

As interações medicamentosas também foram classificadas quanto ao seu mecanismo segundo o Formulário Terapêutico Nacional⁵. Não foram detectadas interações do tipo “farmacêuticas” durante a pesquisa. Os resultados estão expressos na Figura 2.

Observou-se que na UTI adulto as interações farmacocinéticas foram as mais frequentes, ao contrário da UTI neonatal, na qual 59,00% (13) das interações foram classificadas como farmacodinâmicas.

As interações farmacocinéticas também constituíram a maioria das interações no estudo realizado por Carvalho et al.²⁷, representando 42,7% do total. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que 88,5% das interações farmacocinéticas ocorrem pela interferência de um fármaco no metabolismo do outro. Um dos exemplos mais comuns neste estudo foi a coadministração de omeprazol e diazepam. Como já citado anteriormente, o omeprazol é um forte indutor enzimático e pode afetar o metabolismo de diversas drogas, inclusive dos benzodiazepínicos como o diazepam.

As interações farmacodinâmicas foram a maioria na UTI adulto. Tal fato corrobora com o encontrado por Queiroz et al.²¹, das quais 77,58% das interações foram assim classificadas.

As principais formas de monitoramento das interações farmacológicas e de suas medidas profiláticas e/ou corretivas no hospital se dão pelo acompanhamento dos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes. Um exemplo que pode ser tomado como base é o acompanhamento do nível glicêmico no caso da administração conjunta de furosemida e insulina, para possível ajuste de dose. Outro caso comum é o acompanhamento dos níveis dos eletrólitos nos casos em que há administração de cloreto de potássio e espironolactona.

A coexistência de outras doenças e a tentativa de evitar efeitos adversos dos fármacos podem predispor a um elevado número

de medicamentos, que, por sua vez, poderá ocasionar um maior número de interações medicamentosas. Um exemplo disto é a administração de um inibidor da bomba de prótons a fim de evitar os efeitos gastrintestinais causados pelo uso contínuo de AINE.

O bloqueio da COX-1 no trato gastrintestinal pelo AAS, por exemplo, tem como consequência a inibição da proteção da mucosa gástrica e o aumento da secreção ácida, que podem levar à erosão, ulceração, perfuração e hemorragia. A probabilidade desta ocorrência pode aumentar com administração concomitante de corticoides, anticoagulantes e idade avançada¹⁶. A fim de minimizar estes efeitos, medicamentos como omeprazol, lansoprazol e ranitidina são prescritos. Estes, como potentes indutores ou inibidores enzimáticos, podem interagir com outros medicamentos.

Cabe ao farmacêutico, juntamente com o médico e a equipe de enfermagem, avaliar a necessidade dos medicamentos para cada caso, considerando se a interação medicamentosa, quando houver, apresenta riscos que possam sobrepor aos benefícios na terapia do paciente.

O aprazamento seguro e preciso de medicamentos é uma importante responsabilidade do profissional de enfermagem que muitas vezes o realiza de forma manual, seguindo uma rotina de horários fixos que poucas vezes considera as características do medicamento prescrito e/ou a clínica do paciente. Através do aprazamento é possível organizar o plano terapêutico instituído aos pacientes, entretanto, na maioria dos hospitais, o padrão de intervalos de horários está intimamente associado à rotina de cuidados da enfermagem, de médicos e do serviço da farmácia. A distribuição de horários em momentos padronizados, fixos, contribui para que vários medicamentos sejam dados no mesmo momento para o mesmo paciente, podendo causar interações medicamentosas²⁸.

No hospital estudado, observou-se que grande parte das intervenções farmacêuticas foi em relação ao aprazamento, de maneira que os fármacos que apresentem interação, não sejam administrados no mesmo horário, evitando assim, a possibilidade de a interação ocorrer e causar efeitos adversos graves.

Uma proposta para facilitar o acompanhamento de pacientes de UTI é a adoção do conceito de *FAST HUG*, ou abraço rápido, uma forma mnemônica de identificar e verificar alguns dos aspectos fundamentais no cuidado geral de pacientes críticos.

O *FAST HUG* foi proposto por Vincent²⁹ e é hoje utilizado por diversos hospitais do Brasil e do mundo. Este método consiste na avaliação de sete fatores fundamentais:

- F (*feeding* ou alimentação): O paciente pode ser nutrido oralmente? Caso negativo, pode ser alimentado por via enteral? Caso negativo, é possível iniciar a nutrição parenteral?;
- A (analgesia): O paciente não deve sofrer dor, porém a analgesia não pode ser excessiva;
- S (sedação): O paciente não deve sentir desconforto, mas a sedação excessiva deve ser evitada;

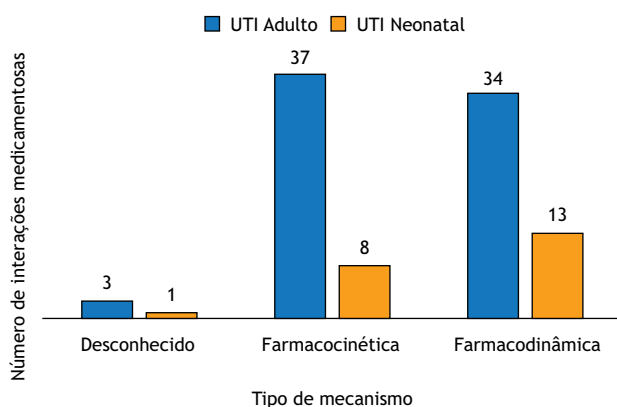


Figura 2. Classificação das interações medicamentosas quanto ao seu mecanismo nas UTI adulto e neonatal.



- T (*thromboembolic prophylaxis* ou profilaxia de trombose venosa profunda [TVP]): A TVP está associada à alta mortalidade, sendo assim, todos os pacientes devem ser avaliados quando ao risco-benefício da terapia;
- H (*head of the bed elevated* ou elevação da cabeceira): a elevação da cabeceira entre 30° e 45° reduz a incidência de refluxo gastroesofágico em pacientes ventilados mecanicamente. Pode ser contraindicada em alguns pacientes, como a ameaça de perfusão cerebral;
- U (*stress ulcer prophylaxis*): prevenção de úlcera de estresse;
- G (*glucose control* ou controle glicêmico): deve-se sempre manter a glicemia dos indivíduos dentro dos padrões de estabilidade.

Outra proposta seria a avaliação da concentração plasmática de alguns fármacos, para o possível ajuste de dose. Pacientes com disfunções renais podem ter a taxa de eliminação destes fármacos comprometida, o que pode aumentar o tempo de ação da droga no corpo.

O valor de depuração renal da penicilina, por exemplo, é consideravelmente menor em recém-nascidos e lactentes. Consequentemente, o fármaco persiste no sangue por mais tempo, principalmente em prematuros devido ao desenvolvimento incompleto da função renal. Em pacientes com função renal comprometida, a meia vida da penicilina de aproximadamente 30 min, pode chegar a 10 h. Nestas situações, cerca de 7% a 10% do fármaco é inativado pelo fígado a cada hora²⁵.

Deste modo, a avaliação da taxa de excreção destes medicamentos associados com a função renal do paciente pode ser uma importante ferramenta de intervenção farmacêutica, a fim de evitar maiores danos aos pacientes.

CONCLUSÕES

Observou-se que a maioria das interações, tanto na UTI adulto quanto na UTI neonatal, foi considerada de risco moderado.

REFERÊNCIAS

1. Moura CS, Acurcio FA, Belo NO. Drug-drug interactions associated with length of stay and cost of hospitalization. *J Pharm Pharm Sci.* 2009;12(3):266-72. <https://doi.org/10.18433/J35C7Z>
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. O que é farmacovigilância? Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2017[acesso 28 nov 2017]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/o-que-e-farmacovigilancia>
3. Dechanont S, Maphanta S, Butthum B, Kongkaew C. Hospital admissions/visits associated with drug-drug interactions: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2014;23(5):489-97. <https://doi.org/10.1002/pds.3592>
4. Cruciol-Souza JM, Thomson JC. A pharmacoepidemiologic study of drug interactions in a Brazilian teaching hospital. *Clinics* 2006;61(6):515-20. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322006000600005>
5. Ministério da Saúde (BR). Formulário terapêutico nacional 2010: Rename 2010. 2a ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2010[acesso 29 jan 2014]. Disponível em: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/formulario_terapeutico_nacional_2010.pdf
6. Lima REF, Cassiani SH. Interações medicamentosas potenciais em pacientes de unidade de terapia intensiva de um hospital universitário. *Rev Latinoam Enfermagem.* 2009;17(2):222-7. <https://doi.org/10.1590/S0104-11692009000200013>
7. Gastelurrutia P, Benrimoj SI, Espejo J, Tuneu L, Mangues MA, Bayes-Genis A. Negative clinical outcomes associated with drug-related problems in heart failure (HF) outpatients: impact of a pharmacist in a multidisciplinary HF clinic. *J Card Fail.* 2011;17(3):217-23. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2010.10.009>

Isto aponta para a necessidade de acompanhamento dos pacientes nos quais estas interações são identificadas, a fim de evitar maiores danos. As interações farmacocinéticas constituíram a maioria dos casos na UTI adulto, diferentemente da UTI neonatal, nas quais as interações farmacodinâmicas prevaleceram.

O manejo no horário de administração dos medicamentos de acordo com suas farmacocinéticas foi a intervenção mais adequada para a maioria dos casos das interações medicamentosas, uma vez que, conforme debate multiprofissional, os medicamentos envolvidos nas referidas interações são essenciais para o tratamento, de forma que sua suspensão ou substituição pode não ser recomendada apesar de o uso simultâneo acarretar danos.

Propôs-se a adoção do conceito de *FAST HUG*, uma forma mnemônica que descreve cuidados fundamentais para o acompanhamento dos pacientes críticos. Este conceito, apesar de não influenciar na detecção direta de interações medicamentosas, pode auxiliar o farmacêutico e a equipe multidisciplinar a terem um cuidado mais completo do paciente, e de forma integrada entre os profissionais.

Outra proposta de intervenção e monitoramento foi a manutenção da dose de medicamentos de acordo com a função renal dos pacientes, a fim de evitar doses subterapêuticas ou doses tóxicas decorrentes do mau funcionamento dos rins.

O acompanhamento pelo serviço de farmácia clínica, a avaliação e a intervenção farmacêutica nas prescrições de UTI podem ajudar a diminuir os riscos associados aos medicamentos.

Este estudo possibilitou a implantação de dados farmacoepidemiológicos da região, ainda incipientes, podendo subsidiar novos estudos e/ou implantações de serviços em prol da segurança do paciente.



8. Comitê de Consenso GIAF-UGR, GIFA-USE, GIF-UGR. Tercer consenso de Granada sobre problemas relacionados con medicamentos y resultados negativos asociados a la medicación. *Ars Pharm.* 2007;48(1):5-17.
9. Hammes JA, Pfuetzenreiter F, Silveira F, Koenig A, Westphal GA. Prevalência de potenciais interações medicamentosas droga-droga em unidades de terapia intensiva. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2008;20(4):349-54. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2008000400006>
10. Albibi R, McCallum RW. Metoclopramide: pharmacology and clinical application. *Ann Intern Med.* 1983;98(1):86-95. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-98-1-86>
11. Medscape: Drugs & diseases information. 2014 [acesso 7 set 2014]. Disponível em: <http://reference.medscape.com/pharmacists>
12. Midromedex healthcare series: Interactions. Base de dados do Portal de Periódicos CAPES. 2014 [acesso 7 set 2014]. Disponível em: http://www.periodicos.capes.gov.br/index.php?option=com_pmetabusc&mn=70&smn=78&base=f&ind-db-1&type=b&Itemid=121
13. Sociedade Brasileira de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro. I Consenso sobre manuseio terapêutico da insuficiência cardíaca. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Cardiologia; 2014 [acesso 28 nov 2014]. Disponível em: <http://sociedades.cardiol.br/socerj/area-cientifica/diureticos.asp>
14. Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014. São Paulo: Sociedade Brasileira de Diabetes; 2013.
15. Howard PA, Delafontaine P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(4):519-25. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.09.043>
16. Batlouni M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(4):556-63. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010000400019>
17. Oliveira GM. Artigo de revisão: antiagregantes plaquetários. *Rev SOCERJ.* 2001;14:21-7.
18. Borges DR, Birolini D, Atallah AN. Atualização terapêutica de Prado, Ramos e Valle: 2012/2013. 24a ed. São Paulo: Artes Médicas; 2012.
19. Lacy CF, Armstrong LL, Goldman MP, Lance LL. Medicamentos Lexi-Comp Manole. São Paulo: Manole; 2009.
20. Martins TS, Silvino ZR, Silva LR, Reis FF, Sousa DG. Medicamentos utilizados na terapia intravenosa pediátrica: um estudo sobre combinações potencialmente interativas. *Rev Rene.* 2012;13(1):11-8. <https://doi.org/10.15253/rev%20rene.v13i1.3758>
21. Queiroz KCB, Nascimento MFS, Fernandes V, Miotto FA. Análise de interações medicamentosas identificadas em prescrições da UTI neonatal da ICU-HGU. *J Health Sci.* 2014;16(3):203-7. <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2014v16n3p%25p>
22. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Hospital Universitário Pedro Ernesto - HUPE. Uso de antimicrobianos. Rio de Janeiro: Hospital Universitário Pedro Ernesto; 2014 [acesso 29 nov 2014]. Disponível em: http://www.hupe.uerj.br/Administracao/AD_coordenacao/pdfs/_piperacilina.pdf
23. Silverthorn DU. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 5a ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2010.
24. Santello JL, Mion Júnior D. Captopril associado à hidroclorotiazida no tratamento da hipertensão leve e moderada: estudo multicêntrico brasileiro. *Arq Bras Cardiol.* 1998;71(5):713-6. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X1998001100012>
25. Brunton, LL.; Chabner, BA.; Knollmann, BC. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman. 12a ed. Rio de Janeiro: Artmed; 2012.
26. Santos EJ, Portella AA. Midazolam. Rio de Janeiro: Sociedade de Anestesiologia do Rio de Janeiro; 2004 [acesso 28 nov 2014]. Disponível em: http://www.saerj.org.br/download/livro%202004/06_2004.pdf
27. Carvalho RE, Reis AM, Faria LM, Zago KS, Cassiani SH. Prevalência de interações medicamentosas em unidades de terapia intensiva no Brasil. *Acta Paul Enferm.* 2013;26(2):150-7. <https://doi.org/10.1590/S0103-21002013000200008>
28. Silva LP, Matos GC, Barreto BG, Albuquerque DC. Aprazamento de medicamentos por enfermeiros em prescrições de hospital sentinela. *Texto Contexto Enferm.* 2013;22(3):722-30. <https://doi.org/10.1590/S0104-07072013000300019>
29. Vincent JL. Give your patient a fast hug (at least) once a day. *Crit Care Med.* 2005;33(6):1225-9. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000165962.16682.46>

Agradecimentos

À Célia Maria Gaudêncio e à Roberta Francese Paiva, pelo auxílio técnico prestado na execução deste trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Risco em processamento de produtos para saúde em Unidades Básicas de Salvador, BA

Risk in reprocessing of health products in Basic Units of Salvador, BA

Eliana Auxiliadora Magalhães
Costa*

Quézia Nunes Frois dos Santos

Isabele dos Santos Dantas

RESUMO

Introdução: Existem lacunas acerca do processamento de produtos em serviços de atenção primária da saúde. **Objetivo:** Analisar o processamento de produtos para a saúde em Unidades Básicas de Salvador, BA. **Método:** Pesquisa de casos múltiplos, realizada em Unidades Básicas de Saúde (UBS) de Salvador. A busca de dados foi feita por meio de entrevista e observação *in loco*. As categorias analíticas foram: gerenciamento das práticas de processamento de produtos para a saúde; estrutura física dos Centros de Material e Esterilização (CME); protocolos de processamento de produtos; monitoramento dos processos e rastreabilidade de produtos. **Resultados:** Foram analisadas 11 UBS (84,6%). Dessas, as atividades de processamento de produtos são desempenhadas pelo auxiliar de saúde bucal em 81,8%. Há ausência de climatização em 100,0% dos CME. Existem protocolos em 36,3% dos CME. O monitoramento físico e químico do processo de esterilização é ausente em 100,0% dos casos e o monitoramento biológico é realizado em 45,4% dos casos. Em nenhum CME é realizada qualificação térmica anual do equipamento esterilizador, nem existe rastreabilidade dos produtos esterilizados. **Conclusões:** As práticas ora identificadas configuram risco potencial para os usuários de produtos processados e urge um controle sanitário efetivo desses serviços a fim de prevenir os danos relacionados com o reúso de produtos para a saúde.

PALAVRAS-CHAVE: Esterilização; Equipamentos e Provisões; Gestão de Risco; Centros de Saúde

ABSTRACT

Introduction: There are gaps in the reprocessing of products in primary health care services. **Objective:** To analyze the reprocessing of medical products in Basic Units of Salvador, BA. **Method:** Multiple case study, carried out in Basic Health Units (UBS) of Salvador. The search for data was by interview and observation *in loco*. The analytical categories: management of the reprocessing practices of medical products; Physical structure of the Material and Sterilization Centers (CME); Product reprocessing protocols; Monitoring of processes and traceability of products. **Results:** 11 UBS (84.6%) were analyzed. Of these, the reprocessing activities of products are carried out by the auxiliary of oral health in 81.8%. Absence of air conditioning in 100.0% of CME. Protocols exist in 36.3% of CME. Physical and chemical monitoring of the sterilization process is absent in 100.0% of the cases and biological monitoring is performed in 45.4% of the cases. In no CME is performed annual thermal qualification of the sterilizing equipment, nor is there traceability of the sterilized products. **Conclusions:** The practices identified herein pose a potential risk to users of reprocessed products and urges an effective sanitary control of these services in order to prevent damages related to the reuse of medical products.

KEYWORDS: Sterilization; Equipment and Supplies; Risk Management; Health Centers

Universidade do Estado da Bahia
(UNEB), Salvador, BA, Brasil

* E-mail: costaeliana2003@hotmail.com

Recebido: 20 jun 2017
Aprovado: 14 mar 2018



INTRODUÇÃO

Os produtos para saúde ou dispositivos, equipamentos, materiais, instrumentos, utilizados nos procedimentos assistenciais são definidos pelo fabricante como artigos reusáveis ou de uso único. Esses últimos, intencionados para serem usados em um único paciente, num único procedimento. A reutilização dos produtos reusáveis requer a ação do processamento, que consiste em converter um produto contaminado em um dispositivo pronto para uso, incluindo não apenas a limpeza, desinfecção e esterilização do produto, mas também a segurança técnico-funcional por meio de testes de integridade e de funcionalidade^{1,2,3}.

É consenso na literatura que a prática de processamento de produtos para saúde é questão complexa pelos riscos relacionados ao potencial de transmissão de patógenos e problemas da integridade e desempenho dos produtos reusados^{4,5,6,7,8}.

Sabe-se que todo produto para saúde, usado na prática assistencial, porta certo grau de risco e que pode causar problemas em determinadas situações, neste sentido, não existe segurança absoluta quando do uso desses materiais^{9,10,11}.

O risco de transmissão de agentes infecciosos por meio do uso de instrumentos e equipamentos depende de alguns fatores, como a presença de micro-organismos (tipo, quantitativo e virulência), o tipo de procedimento a ser realizado (se invasivo ou não), o sítio do corpo onde o produto será inserido¹². Ademais, a utilização de qualquer dispositivo requer a interação entre o profissional de saúde e o paciente que incorpore o risco relacionado com a *performance*/habilidade/qualidade desse ator-cuidador no momento da utilização do produto para a saúde no procedimento assistencial^{9,10,11}.

Essas assertivas de risco decorrente do uso de produtos são potencializadas quando da condição de reúso e de processamento dos produtos, uma vez que os múltiplos passos desse processo, quando executados de forma inapropriada, geram riscos adicionais para pacientes usuários, profissionais de saúde e meio ambiente^{1,2,3}.

Entre os riscos associados ao processamento e ao reúso de produtos para saúde, são reportados na literatura, infecção, presença de endotoxinas, biofilmes, perda da integridade do material, bioincompatibilidade, entre outros^{1,3,4,5,6,7,8}.

A maioria dos dados publicados acerca dessas práticas origina-se de serviços hospitalares. Existe uma lacuna referente às práticas brasileiras de processamento de produtos em serviços de atenção primária da saúde, com poucos estudos publicados^{13,14,15}, o que gera a necessidade, portanto, de maior conhecimento desses processos de trabalho.

Neste sentido, este estudo prioriza o risco decorrente da condição de reúso de produtos para saúde em serviços de atenção primária da saúde e tem por objetivo analisar o processamento de produtos para a saúde em Unidades Básicas de Saúde, Bahia (BA), tendo em vista a segurança sanitária e a proteção da saúde da população usuária de produtos processados.

MÉTODO

Trata-se de uma pesquisa avaliativa, cuja estratégia metodológica é a de estudo descritivo de casos múltiplos holísticos. Um estudo de caso é uma investigação empírica que analisa um fenômeno contemporâneo dentro do seu contexto da vida real, especialmente quando os limites entre o fenômeno e o contexto não estão claramente definidos, tendo lugar de destaque na pesquisa de avaliação. Inclui tanto estudos de caso único (uma unidade sob avaliação), quanto de casos múltiplos (várias unidades sob avaliação). Eles são classificados como holísticos se possuem apenas uma unidade de análise¹⁶.

A unidade de análise deste estudo é a condição técnica de processamento de produtos para a saúde em Unidades Básicas de Saúde (UBS) do Distrito Sanitário do Cabula-Beiru localizado na cidade de Salvador, BA, que serão chamados, nesta metodologia, de “casos”.

A escolha desse distrito sanitário deveu-se ao fato dele ser um distrito de grande densidade geográfica e populacional, que abriga muitas UBS e onde se localiza a Universidade do Estado da Bahia (UNEB), sede desse projeto de Iniciação Científica, que foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição com protocolo número 15277713.0.0000.0057.

Participaram do estudo UBS localizadas no distrito sanitário eleito e que possuíam Centro de Material e Esterilização (CME), identificadas por meio do Cadastrado Nacional de Estabelecimentos de Saúde (CNES).

As estratégias utilizadas para a busca de evidências empíricas foram entrevistas por meio de um formulário com perguntas semiestruturadas com profissionais dos CME estudados e observação *in loco*.

As UBS selecionadas foram contatadas por telefone, quando se agendou visita para coleta de dados. A coleta de dados transcorreu durante os meses de outubro a dezembro de 2016 e foi realizada por duas discentes do 7º semestre do curso de Enfermagem, devidamente treinadas para esse fim, sob supervisão da coordenadora do projeto. Foram entrevistados os profissionais que estavam trabalhando nos CME no dia da coleta.

Foram estudadas as seguintes variáveis independentes que influenciam as condições do processamento de produtos para a saúde: 1) Gerenciamento das práticas de processamento de produtos; 2) Estrutura física dos CME; 3) Protocolos de processamento de produtos; 4) Monitoramento dos processos de desinfecção e esterilização e rastreabilidade de produtos após esterilização.

O formulário da coleta de dados foi elaborado de modo a contemplar as variáveis a serem analisadas, tendo como padrão-ouro a normativa da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) que trata de boas práticas em CME¹⁷ e recomendações de órgãos nacionais e internacionais^{18,19,20}.

Neste estudo foi utilizado o termo “produto para saúde” como sinônimo de produtos médicos, materiais, equipamentos, artigos e dispositivos em sintonia com a Anvisa.



RESULTADOS

O Distrito Sanitário Cabula-Beiru possui 25 UBS, destas, nove não dispõem de CME, duas são UBS não oficiais e sem contato telefônico, uma localiza-se dentro de um complexo penitenciário e, portanto, inacessível à pesquisa, duas unidades recusaram participar desse estudo, resultando num total de 11 (84,6%) UBS analisadas.

A descrição dos resultados dos dados empíricos deste estudo foi iniciada pela caracterização da estrutura física dos CME dos casos múltiplos, conforme Tabela 1.

Os dados apresentados na Tabela 1 revelam que a maioria dos CME das UBS estudadas possuem adequações relacionadas à estrutura física: 72,7% (oito casos) apresentam barreira física entre as atividades de descontaminação de produtos e atividades de desinfecção ou esterilização; em 81,8% (nove casos), existe sala de recepção dos produtos destinados à limpeza e sala de preparo e esterilização; os ambientes de oito CME (72,7%) são passíveis de limpeza (possuem materiais resistentes à ação da água, detergente e desinfetante) e têm iluminação artificial em 90,9% (dez casos). As inadequações de estrutura física identificadas foram: ausência de climatização central em todas as CME (100,0%) e inexistência da sala de desinfecção química em nove casos (81,8%).

A Tabela 2 apresenta as práticas de gerenciamento do processamento de produtos para a saúde nas UBS estudadas.

Segundo os dados da Tabela 2, dos 11 casos analisados, sete (63,6%) centralizam todas as atividades de limpeza, desinfecção e esterilização nos seus CME e essas atividades são desempenhadas pelo auxiliar de saúde bucal em nove casos (81,8%).

Os produtos para saúde utilizados nos CME estudados possuem registro na Anvisa em 90,9% dos casos (dez). Os profissionais responsáveis pelas atividades relacionadas ao processamento de produtos estão imunizados contra o vírus da Hepatite B, Difteria e Tétano em 90,9% dos casos (dez CME), apesar de que, em apenas quatro desses casos (36,3%), há protocolos para prevenção da exposição biológica durante atividades laborais.

Nenhum CME estudado reutiliza produtos considerados de uso único e proscritos de processamento segundo normativa da Anvisa²¹.

Tabela 1. Estrutura física dos Centros de Material e Esterilização das Unidades Básicas de Saúde estudadas. Salvador, 2016.

| | Sim nº (%) | Não nº (%) |
|---|---------------|---------------|
| Barreira física entre as atividades | 8 (72,7%) | 3 (27,2%) |
| Existência de sala de recepção/limpeza | 9 (81,8%) | 2 (18,1%) |
| Existência de sala de preparo e esterilização | 9 (81,8%) | 2 (18,1%) |
| Sala de desinfecção | 3 (27,2%) | 8 (72,7%) |
| Ambientes passíveis de limpeza | 8 (72,7%) | 3 (27,2%) |
| Iluminação artificial | 10 (90,9%) | 1 (9,0%) |
| Climatização central | 0 | 11 (100,0%) |

A Vigilância Sanitária fiscaliza no mínimo anualmente 72,7% dos casos pesquisados (oito CME).

As etapas dos protocolos de processamento de produtos das UBS estudadas são apresentadas na Tabela 3.

Pelos dados presentes na Tabela 3, é observada em apenas quatro CME estudadas (36,3%) a existência de protocolos escritos acerca das etapas que constituem o processamento de produtos e, em nenhum caso (100,0%), a definição de critérios para avaliar se o produto é passível de limpeza e, conseqüentemente, de processamento. O processo de limpeza em todas as CME (100,0%) é realizado pelo método manual e o enxágue com água potável

Tabela 2. Caracterização dos Centros de Material e Esterilização das Unidades Básicas de Saúde segundo o gerenciamento das práticas de processamento de produtos para saúde. Salvador, 2016.

| | Auxiliar de saúde bucal nº (%) | Técnico de Enfermagem nº (%) |
|--|--------------------------------------|------------------------------------|
| Profissional responsável pelo RPM | 9 (81,8%) | 2 (18,1%) |
| | Sim nº (%) | Não nº (%) |
| Centralização das atividades no CME | 7 (63,6%) | 4 (36,3%) |
| Fiscalização do CME pela VISA | 8 (72,7%) | 3 (27,2%) |
| Produtos com registro Anvisa | 10 (90,9%) | 1 (9%) |
| Existência de Protocolo Biológico | 4 (36,3%) | 7 (63,6%) |
| Imunização dos profissionais (HBV, Dif, Tet) | 10 (90,9%) | 1 (9%) |
| Reúso de produtos Lista Anvisa RDC nº 2.606/2006 | 0 | 11 (100,0%) |

HBV: Hepatite B; Dif: Difteria e Tet: Tétano.
RPM: Reprocessamento de produtos médicos.

Tabela 3. Caracterização dos Centros de Material e Esterilização das Unidades Básicas de Saúde segundo os protocolos de processamento de produtos para saúde. Salvador, 2016.

| | Sim | Não |
|--|-------------|-------------|
| Existência de protocolos das etapas de processamento de PPS | 4 (36,3%) | 7 (63,6%) |
| Critérios para avaliar se os PPS são passíveis de limpeza | 0 | 11 (100,0%) |
| Limpeza manual | 11 (100,0%) | 0 |
| Enxágue com água potável e sem filtro | 10 (90,9%) | 1 (9,0%) |
| Secagem com pano limpo e seco | 7 (63,6%) | 4 (36,3%) |
| Secagem com papel toalha | 4 (36,3%) | 7 (63,6%) |
| Avaliação do processo de limpeza | 0 | 11 (100,0%) |
| Existência de autoclave gravitacional | 5 (45,4%) | 6 (54,5%) |
| Papel crepado como embalagem | 10 (90,9%) | 1 (9,0%) |
| Identificação do produto estéril: conteúdo e data do processamento | 6 (54,5%) | 5 (45,4%) |
| Validade da esterilização baseada no tempo | 11 (100,0%) | 0 |

PPS: Produtos para a saúde.



e sem filtro antimicrobiano em dez casos (90,9%). A secagem dos produtos é realizada com pano limpo e seco em sete CME (63,6%) e com papel toalha em quatro CME (36,3%). Não existe avaliação do processo de limpeza em nenhum caso (100,0%). O processo de esterilização é realizado pelo método físico de vapor saturado sob pressão com autoclave gravitacional em cinco casos (45,5%) e o equipamento esterilizador não é identificado em seis (54,5%). A embalagem utilizada para a esterilização dos produtos é o papel crepado em dez CME (90,9%) e os pacotes esterilizados são identificados com o conteúdo do material e a data do processamento em seis casos (54,5%). A data de validade da esterilização é baseada segundo o tempo de utilização dos produtos em todos os CME (100,0%).

O monitoramento dos parâmetros físicos, químicos e biológicos do processo de esterilização das UBS está descrito na Tabela 4.

Inexistem monitoramentos físico e químico do processo de esterilização em todos os casos e o monitoramento biológico é realizado semanalmente em cinco CME (45,4%). Em nenhum CME estudada é realizada a qualificação térmica anual do equipamento esterilizador, nem existe rastreabilidade dos produtos esterilizados.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos acerca das práticas de processamento dos produtos para a saúde dos CME avaliados revelaram inadequações em todas as variáveis independentes estudadas, descritas a seguir.

Em relação à estrutura física, a maioria dos CME (72,7%) possui barreira física entre as atividades de limpeza e secagem dos artigos contaminados (sala cujas atividades são consideradas “sujas”) e atividades de preparo, desinfecção e esterilização de produtos (salas com atividades “limpas”).

Existe sala de recepção dos produtos destinados à limpeza e sala de preparo e esterilização em 81,8% dos serviços, requisitos físicos desnecessários para CME existentes em unidades de atenção primária à saúde (APS), serviços esses que não reprocessam produtos complexos (aqueles com lúmens, fundo cego, tubulares). Portanto, seus CME são classificados pela RDC nº 15, de 15 de março de 2012 da Anvisa¹⁷, como de classe I, cuja exigência é de “barreira técnica” e não “barreira física” entre essas

atividades. Identificou-se também ausência de climatização central em todas os CME (100,0%) e inexistência da sala de desinfecção química em nove casos (81,8%), requisitos obrigatórios e de grande importância para a prevenção da exposição ocupacional dos trabalhadores durante as atividades de processamento de produtos. Observa-se, portanto, falha do projeto da estrutura física desses CME, com destinação inadequada tanto de espaços físicos, quanto de alocação de recursos materiais.

As atividades de limpeza, desinfecção e esterilização de produtos são centralizadas nos CME das UBS estudadas em 73,7% dos casos e essas atividades são desempenhadas pelo “auxiliar de saúde bucal” na grande maioria (81,8%). Isso aponta para possíveis problemas técnicos, uma vez que esse profissional não possui qualificação para o desenvolvimento dessas atividades, podendo contribuir para práticas inadequadas de processamento de produtos. Ademais, essa situação pode ser caracterizada como um desvio de função e em desacordo com a Resolução do Conselho Federal de Enfermagem (Cofen) nº 424, de 19 de abril de 2012, que formaliza a competência do enfermeiro e sua equipe no processamento de produtos no nosso país²². Importante ressaltar que o Cofen é único Conselho Profissional a definir funções e responsabilidades técnicas acerca das atividades relacionadas com o processamento de produtos para a saúde e, portanto, consideramos que esse exercício é privativo da área da Enfermagem brasileira até então.

Os profissionais responsáveis pelo processamento de produtos estão imunizados contra Hepatite B, Difteria e Tétano em 90,9% dos casos, a despeito da ausência de protocolos para prevenção da exposição biológica durante as atividades laborais na maioria dos CME pesquisados (63,6%), sugerindo que essas imunizações originam de iniciativas individuais e não institucionalizadas, apontando falhas na política de biossegurança desses serviços.

A padronização dos protocolos das etapas do processamento de produtos foi identificada em apenas quatro CME (36,3%), o que denota a falta de planejamento das atividades nucleares para a reutilização de produtos na maioria desses serviços avaliados. O processo de limpeza, essencial para o sucesso das etapas posteriores do processamento de materiais, é bastante deficiente, dada a ausência de avaliação desse processo em todos os CME pesquisados, além da inexistência de critérios para avaliação do produto quanto à possibilidade de limpeza e, conseqüentemente, de processamento. A secagem dos materiais após limpeza é realizada com papel toalha em 36,3% dos serviços, prática inadequada e que pode gerar resíduos no produto limpo e comprometer o processo posterior de esterilização nesses casos.

O processo de esterilização dos produtos das UBS estudadas também apresenta fragilidades, a despeito de que, em todos os CME (100,0%), o método de esterilização para artigos críticos termorresistentes é o vapor saturado sob pressão, método considerado padrão-ouro para esterilização desses produtos. Entretanto, o tipo do equipamento esterilizador não é identificado em 54,5% dos CME, o que lança dúvidas acerca de como esse processo é realizado, uma vez que há um desconhecimento de como funciona o esterilizador, se por gravidade ou a alto-vácuo e quais seus controles específicos. Ademais, em nenhum CME estudado é realizada

Tabela 4. Caracterização dos Centros de Material e Esterilização das Unidades Básicas de Saúde segundo o monitoramento dos processos de esterilização e rastreabilidade dos produtos processados. Salvador, 2016.

| | Sim | Não |
|--|-----------|-------------|
| Monitoramento físico do processo de esterilização | 0 | 11 (100,0%) |
| Monitoramento químico do processo de esterilização | 0 | 11 (100,0%) |
| Monitoramento biológico do processo de esterilização | 5 (45,4%) | 6 (54,5%) |
| Qualificação térmica anual das autoclaves | 0 | 11 (100,0%) |
| Rastreabilidade dos produtos esterilizados | 0 | 11 (100,0%) |



a qualificação térmica anual da autoclave utilizada nos serviços, processo indispensável para o conhecimento da *performance* da máquina e do alcance eficaz dos parâmetros essenciais do processo de esterilização a vapor, além de crucial para a padronização dos ciclos de esterilização em relação ao tempo, à temperatura e à pressão a serem ajustados conforme resultado da qualificação. A ausência desse controle, portanto, significa que as autoclaves das UBS estudadas estão funcionando de modo empírico, sem controle dos parâmetros essenciais para o seu funcionamento.

A embalagem utilizada para a esterilização dos produtos é adequada em 90,9% dos casos, entretanto, a identificação dos produtos esterilizados é deficiente em 54,5%, com registro apenas do conteúdo do material e da data do processamento. A data de validade da esterilização é baseada segundo o tempo de utilização dos produtos em todos os CME (100,0%), configurando uma prática obsoleta, uma vez que a validade da esterilização está condicionada a um evento que pode contaminar a embalagem e, conseqüentemente, o produto esterilizado, e não relacionada com tempos definidos de esterilização^{18,19}.

Outro elemento a agravar negativamente o processo de esterilização dos CME estudados é a ausência de monitoramento físico (controles de tempo, temperatura e pressão de cada ciclo realizado) e químico do processo de esterilização em 100,0% dos casos. O monitoramento biológico é realizado uma vez por semana em apenas 45,4% dos CME, em total desacordo com a recomendação vigente que preconiza que esse controle deve ser diário. A ausência dos monitores físicos, químicos e biológicos da esterilização de produtos lança insegurança em relação à eficácia do processo esterilizador e conseqüentemente, desqualifica esse processo. Como utilizar um produto que requer a condição de esterilidade,

se não existe segurança de que o mesmo está estéril? Essa é uma questão sem resposta nos CME das UBS estudadas, realidade também identificada em UBS do interior do estado de São Paulo¹³.

Nenhum produto da lista negativa da Resolução Anvisa nº 2.605, de 11 de agosto de 2006²¹, é utilizado nos casos estudados e, nesse sentido, esses serviços atendem a essa normativa.

A Vigilância Sanitária fiscaliza no mínimo, anualmente, 72,7% dos CME pesquisados, mas a despeito dessas fiscalizações, as notificações desse órgão não apontam inadequações relacionadas com o processamento de produtos aqui descritas, nem existe uma tomada de decisão oriunda do controle sanitário, que possa ser revertida para a melhoria dos processos de trabalho nos CME estudados.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que a problemática que envolve o processamento dos produtos para a saúde em serviços hospitalares também é identificada em serviços de atenção primária à saúde, como os aqui estudados.

Observou-se que o processamento de produtos nos CME estudados é inadequado, com pontos de fragilidades em todas as etapas do processamento de produtos, especialmente nos processos de limpeza e esterilização, que contribuem para a falta de segurança sanitária do reúso de produtos nesses serviços.

Conclui-se, portanto, que as práticas de processamento de produtos das UBS pesquisadas configuram risco potencial para os usuários de produtos processados nos serviços de atenção básica estudados e que urge um controle sanitário efetivo desses serviços a fim de prevenir danos relacionados com o reúso de produtos para a saúde.

REFERÊNCIAS

1. Kraft M. Framework conditions and requirements to measure the technical functional safety of reprocessed medical devices. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 2008;3(3):Doc23
2. Grobkopf V, Jakel C. Legal framework conditions for the reprocessing of medical devices. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 2008;3(3):Doc24.
3. Kruger CM. Processing single-use medical devices for use in surgery: importance, status quo and potential. *GMS Krankenhaushyg Interdiszip* 2008;3(3):Doc21.
4. Costa EAM, Costa EA. Reutilização e reprocessamento de produtos médicos de uso único: risco aceitável? *Rev SOBECC*. 2011;16(2):50-6.
5. Costa EAM. Gerenciando risco em reprocessamento de produtos para saúde: uma metodologia para serviços hospitalares. *Rev SOBECC*. 2013;18(2):33-44.
6. Costa EAM, Costa EA, Graziano KU, Padoveze MC. Reprocessamento de produtos médicos: uma proposta de modelo regulatório para hospitais. *Rev Esc Enfer USP*. 2011;45(6):1459-65. <https://doi.org/10.1590/S0080-62342011000600026>
7. Costa EAM, Costa EA. Reprocessamento de produtos médicos: da política regulatória à prática operacional. *Cienc Saúde Coletiva*. 2011;16(12):4787-94. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232011001300027>
8. Costa EAM, Costa EA. Risco e segurança sanitária: análise do reprocessamento de produtos médicos em hospitais de Salvador, BA. *Rev Saúde Publica*. 2012;46(5):800-7. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102012000500006>
9. International Organization for Standardization - ISO. ISO 14971. Medical devices: application of risk management to medical devices. Genova: International Organization for Standardization; 2007.
10. GHTF Study Group 3. Implementation of risk management principles and activities within a Quality Management System: final document. [S.l.]: Global Harmonization Task Force; 2005.
11. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. NBR. ISO 14971:2009. Produtos para saúde: Aplicação de gerenciamento de risco a produtos para saúde. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2009.



12. World Health Organization - WHO. Global guidelines for the prevention of surgical site infection. Geneva: World Health Organization; 2016.
13. Roseira CE, Silva DM, Passos IPBD, Orlandi FS, Padoveze MC, Figueiredo RM. Diagnóstico de conformidade do processamento de produtos para saúde na Atenção Primária à Saúde. *Rev Latino-Am Enfermagem*. 2016;24:e2820. <https://doi.org/10.1590/1518-8345.1439.2820>
14. Costa LfV, Freitas MIP. Reprocessamento de artigos críticos em unidades básicas de saúde: perfil do operador e ações envolvidas. *Rev Bras Enferm*. 2009;62(6):811-9. <https://doi.org/10.1590/S0034-71672009000600002>
15. Passos IPBD, Padoveze MC, Roseira CE, Figueiredo RM. Adaptação e validação de indicadores para o processamento de produtos na atenção primária à saúde. *Rev Latino-Am Enfermagem*. 2015;23(1):148-54. <https://doi.org/10.1590/0104-1169.3518.2536>
16. Yin RK. Estudo de caso: planejamento e métodos. 3a ed. Porto Alegre: Bookman; 2005.
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução - RDC Nº 15, de 15 de março de 2012. Dispõe sobre o funcionamento de serviços que realizam o processamento de produtos para saúde e dá outras providências. *Diário Oficial União*. 16 mar 2012.
18. Rutala WA, Webwe DJ. Sterilization, high-level disinfection an environmental cleaning. *Infect Dis Clin N Am*. 2011;25(1):45-76. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.11.009>
19. World Health Organization - WHO. Decontamination and reprocessing of medical devices for health care facilities. Geneva: World Health Organization; 2016.
20. Rutala WA, Weber DJ. Guidelines for disinfection and sterilization in helathcare facilities, 2008. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention; 2008.
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução - RE Nº 2.605, de 11 de agosto de 2006. Estabelecer a lista de produtos médicos enquadrados como de uso único proibidos de ser reprocessados, que constam no anexo desta Resolução. *Diário Oficial União*. 14 ago 2006.
22. Conselho Federal de Enfermagem. Resolução COFEN Nº 424/2012, de 19 de abril de 2012. Normatiza as atribuições dos profissionais de enfermagem em Centro de Material e Esterilização e em empresas processadoras de produtos para saúde. *Diário Oficial União*. 24 abr 2012.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Estudos de palatabilidade de medicamentos: análise sensorial e aceitabilidade de formulações pediátricas

Palatability studies of oral formulations: an overview about drug acceptance in pediatrics

Marina dos Santos Garruti de Medeiros^{1,*}

Deborah dos Santos Garruti^{II}

RESUMO

Introdução: Crianças geralmente rejeitam medicamentos não palatáveis. Formulações pediátricas contêm edulcorantes e flavorizantes para mascarar o sabor desagradável e evitar problemas na administração e adesão. A avaliação do sabor é parte essencial do desenvolvimento de medicamentos líquidos orais. **Objetivo:** Este trabalho visa contextualizar a palatabilidade, sua avaliação e influência na aceitação de medicamentos pediátricos. **Método:** Revisão narrativa da literatura através das bases eletrônicas PubMed e Google Acadêmico. Excluíram-se artigos relacionados ao desenvolvimento de formulações, uso de língua eletrônica e resumos sem acesso ao trabalho completo. **Resultados:** O sabor é considerado um dos principais determinantes para a adesão em pediatria. O acesso a formulações pediátricas palatáveis e seguras pode ter um efeito substancial sobre a morbidade infantil. Adultos e crianças apreciam gostos de formas diferentes, então testes sensoriais em crianças são o método mais confiável para a avaliação do sabor de formulações para esse público. Estudos da percepção sensorial e aceitação de medicamentos já utilizados pelas crianças podem ser eticamente viáveis, dadas as preocupações acerca de pesquisas com crianças. **Conclusões:** Análises sensoriais devem ser realizadas sempre que se deseje introduzir no mercado uma nova formulação, destinada a diferentes faixas etárias e contextos culturais, a fim de avaliar a aceitabilidade do produto.

PALAVRAS-CHAVE: Preparações Farmacêuticas; Adesão à Medicação; Criança; Análise Sensorial; Aceitabilidade do Sabor

ABSTRACT

Introduction: Children often reject non-palatable medications. Pediatric formulations contain sweeteners and flavorings to mask the unpleasant taste and avoid problems in administration and adherence. Taste assessment is an essential part of the development of oral liquid medicines. **Objective:** This paper aims to contextualize assessment and influence of palatability on the acceptance of pediatric medicines. **Method:** Narrative review of the literature through the electronic databases PubMed and Google Scholar. Articles related to the development of formulations, use of electronic tongue, and abstracts without access to the complete work were not considered. **Results:** Flavor is considered one of the main determinants for medications' adherence in pediatrics. Access to palatable and safe pediatric formulations can have a substantial effect on infant morbidity. Adults and children appreciate flavors in different ways, so sensory testing with children is the most reliable method regarding formulations for this population. Studies of sensory perception and acceptance of medications already used by children may be ethically feasible, given the concerns about research with children. **Conclusions:** Sensory analyzes should be carried out whenever there is a new formulation to be introduced on the market, addressed to different age brackets and cultural contexts, in order to assess the product's acceptability.

^I Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil

^{II} Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Fortaleza, CE, Brasil

* E-mail: garruti.marina@gmail.com



INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, um medicamento ideal para crianças é aquele apropriado para a idade, condições fisiológicas e peso corporal da criança, e que está disponível em uma forma farmacêutica oral flexível, ou seja, que possa ser ingerida facilmente inteira, dissolvida em líquido ou misturada à comida¹, de maneira que se adapte às necessidades clínicas e capacidades ou preferências relativas às diferentes faixas etárias compreendidas entre a infância e a adolescência^{2,3}. Deve também ser facilmente produzido, utilizando quantidades mínimas de excipientes não tóxicos, resultando em uma formulação estável, comercialmente viável, de baixo custo e com sabor agradável. Ademais, é necessário causar mínimo impacto sobre o estilo de vida da criança e ter dados científicos que respaldem o preparo e a determinação do prazo de validade, além de ter estabilidade química, física e microbiológica comprovadas⁴.

A administração de um medicamento pediátrico é otimizada quando a formulação não demanda tempo no preparo da dose e é de fácil deglutição pela criança, como é o caso da maioria das preparações líquidas^{4,5}. Quando disponíveis, as formulações líquidas são quase sempre escolhidas para crianças⁶. Com o uso de dispositivos de medição adequados, como seringas para administração oral, por exemplo, é possível o ajuste de diferentes doses para administração em crianças com diferentes idades e pesos. Dessa forma, pode-se obter flexibilidade e precisão na medição da dose a partir de uma única formulação^{2,7}.

O termo “palatabilidade” significa qualidade do que é palatável, ou seja, agradável ao paladar^{7,8}. Substâncias de gosto amargo provocam determinados reflexos de rejeição inatos nos seres humanos⁹. Poucas horas após o nascimento, os bebês já percebem as diferenças de sabor das substâncias⁶. As papilas gustativas e receptores olfativos já estão bem desenvolvidos na infância¹⁰, havendo uma tendência natural nas crianças de preferir alimentos doces e rejeitar alimentos amargos. Ou seja, as crianças, de maneira geral, recusam qualquer coisa que para elas não tenha gosto ou cheiro bom, podendo ser extremamente difícil e desgastante administrar medicamentos a crianças, principalmente nos casos de doenças crônicas, quando precisam utilizar medicamentos diariamente por longos períodos. Isso explica, em parte, por que os pais muitas vezes utilizam açúcar ou mel para mascarar o sabor dos medicamentos e torná-los atrativos¹⁰.

Muitos fármacos têm intrinsecamente um gosto desagradável¹¹. Um medicamento palatável é aquele em que os atributos sensoriais aversivos foram minimizados, mascarados ou eliminados na sua formulação¹². O gosto amargo do princípio ativo é mais difícil de mascarar, pois deixa um gosto residual, aquele que permanece no paladar após a ingestão do medicamento¹³.

Um flavorizante é uma substância natural ou artificial que se adiciona à formulação para dar ou realçar o sabor e o aroma, já o edulcorante confere gosto doce à preparação¹⁴. O uso de edulcorantes e flavorizantes é de importância fundamental para melhorar a palatabilidade, pois geralmente ajudam a mascarar o sabor desagradável de um produto. Frequentemente, as propriedades

químicas e o sabor de um fármaco ditam a escolha do flavorizante, de tal forma que seja eficaz em mascarar o sabor sem afetar negativamente a sua estabilidade ou biodisponibilidade¹⁵.

A Análise Sensorial é definida como uma disciplina usada para provocar, medir, analisar e interpretar as reações produzidas pelas características de produtos de consumo como alimentos, cosméticos e medicamentos, e o modo como elas são percebidas pelos órgãos da visão, olfato, gosto, tato e audição¹⁶. Princípios do planejamento experimental e da análise estatística são aplicados para preparar as provas (sensoriais) e analisar os resultados da utilização dos sentidos nas avaliações dos produtos¹⁷.

O presente artigo visa contextualizar a importância da palatabilidade e da realização de análise sensorial de formulações de medicamentos destinados à população pediátrica, tendo em vista a aceitação, facilidade de administração e adesão aos tratamentos.

MÉTODO

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica do tipo revisão narrativa da literatura, apropriada para descrever e discutir o desenvolvimento ou o estado da arte de um determinado assunto, sob ponto de vista teórico ou contextual, sem, contudo, possuir sistematização que permita a reprodução do método. Consiste na busca de estudos na literatura publicada e análise crítica dos trabalhos encontrados¹⁸.

Os estudos foram buscados por meio das bases de dados eletrônicas PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) e Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br/>), sem delimitação temporal, restringindo-se aos idiomas inglês, espanhol, francês e português.

Foram feitas buscas de outubro de 2016 até abril de 2017, utilizando-se as palavras-chave: *Sensory analysis or Taste assessment or Palatability or Taste acceptability and Pediatric formulations or Children or Drug*, em inglês e em português.

Em um primeiro momento, os textos foram selecionados pelos títulos e resumos. Foram lidos integralmente apenas os artigos que abordavam a palatabilidade de formulações medicamentosas. Excluíram-se os artigos relacionados exclusivamente ao desenvolvimento de formulações, os artigos relatando o uso de língua eletrônica e os artigos aos quais não se teve acesso ao texto completo. Atenção especial foi dada às publicações que abordavam medicamentos pediátricos e estudos brasileiros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das buscas foram encontradas 91 publicações, das quais 48 foram incluídos no presente artigo, nas línguas inglesa, portuguesa e francesa, sendo sete publicações realizados no Brasil. Por não haver delimitação temporal, foi possível resgatar estudos de 1984 a 2017, de modo a podermos perceber a discussão dessa problemática no decorrer das últimas três décadas.



A partir da análise dos achados, de acordo com as temáticas que abordavam predominantemente, as publicações foram agrupadas, podendo um artigo abordar mais de uma temática. Dessa forma, foram obtidas quatro categorias, que abrangem a relação da palatabilidade na seleção e adesão de medicamentos, a análise sensorial de medicamentos, como a indústria se relaciona com essa prática e como ela é realizada com crianças, correspondendo às subseções a seguir.

Seleção, adesão e palatabilidade de medicamentos

Quando há alternativas similares de eficácia e segurança, outros fatores podem entrar em jogo para determinar qual o melhor medicamento em um dado contexto. Alguns desses fatores são a inclusão do medicamento em formulários terapêuticos, custo e fatores que influenciam na facilidade de administração, aceitação e adesão ao tratamento, como a duração do tratamento, o número de doses diárias necessárias e os atributos sensoriais do medicamento, tanto em crianças como em adultos^{19,20,21,22,23,24}.

A adesão em crianças é influenciada por diversos fatores, como eventos adversos e toxicidade, esquema posológico, duração e frequência do tratamento, características individuais, emocionais e cognitivas, estabilidade familiar, motivação dos cuidadores, instruções verbais e escritas detalhadas, apoio social, custo dos medicamentos, qualidade do sistema de saúde e a própria doença^{25,26}. Contudo, um sabor aceitável é especialmente crítico em pacientes pediátricos^{7,27}. Para que as crianças cumpram com um esquema de tratamento, além do empenho dos cuidadores, é importante que o sabor do medicamento seja aceitável, diminuindo, assim, a luta que enfrentam no momento da administração^{13,28,29}.

Lin et al.²⁵ realizaram um trabalho em que médicos canadenses, que atendem crianças e adolescentes (de zero a 18 anos) com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que responderam a um questionário com perguntas acerca da palatabilidade dos medicamentos que prescreviam, referindo-se a princípios ativos e não marca comercial. Todos os médicos responderam que as crianças detestavam ritonavir líquido. Apesar disso, houve uma tendência maior de prescrever ritonavir líquido como tratamento de primeira linha em comparação com outras formulações líquidas. Nelfinavir e amprenavir líquidos também foram classificados como não agradáveis para as crianças. O ritonavir líquido gerou a necessidade de mudança de tratamento devido à sua baixa palatabilidade em mais de 50% das vezes. Nesse estudo, o conhecimento e a percepção dos médicos sobre as preferências dos pacientes e a baixa palatabilidade de certos medicamentos raramente os impediu de prescrevê-los para as crianças, apesar de a palatabilidade ser um dos fatores de diferenciação que mais influenciam na adesão de crianças aos tratamentos medicamentosos, gerando melhores resultados e menos estresse familiar^{23,25}.

Em outra investigação, Gee et al.¹³ reuniram estudantes de medicina e farmácia, residentes de medicina e pediatras para provar 24 formulações de antimicrobianos e avaliaram as características sensoriais de cada um dos produtos. Na ocasião, foi discutido o sabor dos antibióticos e os efeitos que ele pode ter sobre o cumprimento dos tratamentos. Após um mês, foi realizada uma

entrevista com os participantes sobre como essas atividades afetaram seus hábitos de prescrição e aconselhamento, e 42% dos respondentes disseram ter percebido que seus hábitos haviam mudado. Entre as mudanças relatadas estavam: consideração do sabor e da textura da formulação na hora de prescrever, não prescrever medicamentos de reconhecido gosto ruim e prescrição de comprimidos triturados ao invés da formulação líquida com sabor desagradável. Embora a prescrição de comprimidos triturados seja desaconselhada quando existe alternativa adequada, essa atitude demonstra que os prescritores consideraram a importância da palatabilidade para o sucesso do tratamento. No entanto, muitos entrevistados relataram que seus hábitos de prescrição não tinham mudado, pois não havia outras opções equivalentes para alguns medicamentos, como a clindamicina e o metronidazol.

Um dos fatores mais importantes a serem considerados na seleção de medicamentos para crianças é o quanto as doses podem ser facilmente engolidas e retidas. Medicamentos com gostos ruins associados a doses de grande volume geram recusa e até vômito no momento da medicação²⁰. A palatabilidade mostrou ser um fator preponderante na preferência de medicamentos, seja no uso de antibióticos em serviços de base comunitária com atenção básica à saúde^{19,24}, no tratamento de crises agudas de asma^{20,21}, ou, principalmente, nos tratamentos crônicos, como, por exemplo, nas nefropatias²².

No estudo de Wollner et al.³⁰, os dois fatores que mais aumentaram a adesão foram o menor número de doses diárias e a aceitação do sabor. O sabor de uma formulação pediátrica é considerado por vários autores um dos principais determinantes para a adesão em pediatria^{13,21,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40}. Estudos têm demonstrado que as estratégias utilizadas para melhorar a adesão do paciente, tais como folhetos informativos sobre os medicamentos, calendários de automonitorização e lembretes por telefone não têm tanta influência sobre o cumprimento dos tratamentos em crianças quanto o sabor da formulação^{13,41}. Atenção especial deve ser dada aos casos em que os fármacos não estão disponíveis em formulações apropriadas para crianças, sendo necessário modificar a forma farmacêutica ou concentração do medicamento na formulação para adultos, o que, além de problemas de dosagem e estabilidade, gera dificuldades em relação à palatabilidade^{4,41}.

A resistência a tomar formulações líquidas amargas ou de sabor ruim pode motivar os pais a tentar, como alternativa, medicamentos em outras formas farmacêuticas, como, por exemplo, em comprimidos, que são muitas vezes triturados e misturados com alimentos⁶. Recorrer à combinação com alimentos, como suco de frutas e iogurtes, embora possa mascarar o gosto do medicamento, pode ter um efeito negativo sobre a biodisponibilidade, seja por interação medicamento-alimento ou por dosagens inexas⁴².

A literatura relata dificuldades de administração de medicamentos em crianças devido ao sabor. McCrindle et al.⁴³ relataram que uma das primeiras formulações disponíveis de resinas sequestradoras de ácidos biliares para tratamento de hipercolesterolemia era em forma de um pó para ser misturado com um volume de líquido da escolha do paciente. A palatabilidade dessa preparação não era boa, de modo que pacientes adultos e pediátricos



tinham problemas para cumprir o esquema posológico, levando à falha na adesão ao tratamento. Posteriormente, foram desenvolvidos comprimidos desses medicamentos para superar tais problemas. Contudo, os comprimidos eram relativamente grandes e pacientes pediátricos, com dificuldades para engolir esses comprimidos, continuavam com problemas de adesão ao tratamento.

Lucas-Bouwman et al.⁴⁴, em uma comparação do tratamento da asma aguda em crianças com prednisolona em duas formulações (solução oral ou comprimidos triturados), constataram que a solução oral foi melhor tolerada. Vômitos foram observados em 23% dos pacientes que utilizavam os comprimidos, e em nenhum dos pacientes utilizando a solução, provavelmente porque a solução apresenta excipientes como edulcorantes e flavorizantes que ajudam a mascarar o gosto do fármaco. Antes da disponibilidade de soluções orais de corticosteroides, os médicos recorriam aos comprimidos triturados, que muitas vezes não eram tolerados pelas crianças, o que os deixava com apenas uma alternativa, a administração parenteral do medicamento para tratamento da asma aguda grave⁴⁵. Gries et al.⁴⁵, em uma avaliação dos tratamentos de crianças com exacerbações leves a moderadas da asma com dose única de acetato de dexametasona via intramuscular ou com cinco dias com prednisona oral (suspensão ou comprimidos, conforme escolha do paciente), relataram que muitos pais preferiram a via intramuscular devido à luta que enfrentavam para administrar o medicamento oral durante cinco dias, apesar de crianças muitas vezes terem aversão a injeções.

Reconhecer a importância da palatabilidade no momento da prescrição faz parte da atenção centrada no paciente e pode melhorar a adesão, influenciando a evolução clínica²⁷. Segundo Gee e Hagemann¹³, é importante que os profissionais de saúde tenham conhecimento sobre as questões relacionadas com a adesão à terapia medicamentosa em pacientes pediátricos, das quais a palatabilidade desempenha um papel importante.

Análise Sensorial de medicamentos

A palatabilidade de medicamentos é assunto de muitos artigos publicados em periódicos científicos ao redor do mundo, abordados a seguir.

Em 1984, quando poucos estudos nessa área haviam sido publicados, Sjövall et al.³⁵ lançaram uma investigação na qual comparou-se dois métodos de avaliação da preferência em relação ao gosto de três formulações de bacampicilina em pacientes pediátricos. Observou-se que a utilização de escala hedônica foi o método mais adequado. Uhari, Eskelinen e Jokisalo³⁹ pesquisaram a aceitação de pacientes pediátricos a pares de formulações de fenoximetilpenicilina e eritromicina farmacologicamente idênticas, diferindo apenas quanto ao sabor e o fabricante, porém sem citar marcas. Utilizou-se o tempo necessário para a administração como critério para a avaliação da aceitação. Observou-se que uma das formulações de fenoximetilpenicilina tendeu a ser mais aceita, porém sem diferença significativa entre as duas, e que uma das formulações de eritromicina foi significativamente mais aceita que a outra.

Avaliações dos atributos sensoriais de medicamentos corticosteroides têm sido publicadas com diferentes populações de participantes. Gerson et al.⁴⁶ avaliaram três corticosteroides nasais em adultos. Diversos atributos sensoriais relacionados ao tipo de formulações em questão, *spray* nasal, foram avaliados, como odor, gosto, umidade, irritação e conforto, mostrando que, nos atributos odor e sabor, a triancinolona foi preferida sobre beclometasona e fluticasona. O estudo de Meltzer et al.²³, realizado por pesquisadores de uma indústria farmacêutica, analisou a preferência de pacientes adultos entre *sprays* nasais de fluticasona propionato e o mais recente, fluticasona furoato, produzidos pela indústria. Foram avaliados atributos sensoriais como odor, gosto, gosto residual, irritação, entre outros, além da preferência geral entre os dois medicamentos. O medicamento mais novo foi preferido.

Estudos que comparam medicamentos genéricos com os medicamentos de referência também têm sido publicados. Uma vez que os testes exigidos para que um medicamento genérico seja registrado e lançado no mercado não incluem aspectos sensoriais, a palatabilidade de um medicamento genérico pode ser bastante diferente do medicamento original, afetando drasticamente a adesão ao tratamento^{27,47,48}. Samulak, El-Chaar e Rubin⁴⁹ compararam o sabor de formulações pediátricas orais de antibióticos de referência com os seus genéricos em voluntários adultos. Para dois dos medicamentos estudados, as formulações de referência foram significativamente classificadas com melhor sabor do que os outros produtos testados, todavia, para outros três medicamentos, pelo menos uma apresentação genérica não apresentou diferença significativa no sabor com relação ao seu produto de referência.

Estudo semelhante foi realizado por El-Chaar et al.⁵⁰, com crianças de 3 a 14 anos em tratamento com os antibióticos, concluindo que as apresentações de referência não são necessariamente melhores do que os seus equivalentes genéricos. Apesar da preferência pelo sabor da apresentação de referência de trimetoprim-sulfametoxazol, as crianças neste estudo não fizeram distinção em relação à preferência dos demais medicamentos comparando-se apresentações de referência e seus genéricos. Ishizaka et al.⁴⁸, no Japão, compararam o sabor, a granulidade e a uniformidade da dose de 11 formulações genéricas de claritromicina com a de referência, e encontraram variações consideráveis na granulidade entre vários produtos. Na França, em 2009, Cohen et al.⁴⁷ observaram crianças em uso de formulações líquidas de antibióticos, genéricos e de referência, em casa, avaliando através dos pais, entre outros aspectos do tratamento, a aceitação e a palatabilidade. Foram encontradas diferenças na palatabilidade entre formulações genéricas e de referência de amoxicilina + clavulanato, mas não em formulações de amoxicilina somente. Os autores acreditam que essa diferença se dá devido ao gosto ruim intrínseco do clavulanato, que torna o gosto do medicamento difícil de ser melhorado⁴⁷.

Portanto, se o medicamento genérico for mais palatável, a sua escolha se torna ainda mais vantajosa. Se a adesão é significativamente maior com o medicamento de referência do que com formulações genéricas, a prescrição de produtos de referência mais caros pode ser justificada. No entanto, se a adesão é semelhante, o produto menos dispendioso deve ser utilizado^{49,51}.



Em 2013, foi publicada uma revisão sistemática da literatura⁵² que avaliou as ferramentas utilizadas no estudo da palatabilidade e facilidade de deglutição em ensaios clínicos com formulações pediátricas orais durante os anos de 2008 a 2013, na qual foram incluídos 27 artigos na análise final. Os autores destacaram as múltiplas abordagens que são utilizadas para avaliar palatabilidade em populações pediátricas. Concluíram que a palatabilidade de formulações é frequentemente avaliada em ensaios clínicos de formulações pediátricas através da utilização de escalas visuais, sem que haja uma metodologia estatística padrão para analisar os resultados. Contudo, essas escalas têm sido amplamente aceitas pela comunidade científica. Um exemplo de escala visual é a escala hedônica facial, adequada a crianças, na qual o provador expressa sua aceitação do produto seguindo categorias previamente estabelecidas que variam gradativamente, descritas por uma série de desenhos de expressões faciais ordenadas em uma sequência que mostra desde um sorriso, indicando a aprovação do produto, até uma face triste, que indica a reprovação do produto. Outro exemplo é a escala visual analógica, que consiste em uma linha contínua, ancorada nos extremos por termos que correspondem à intensidade baixa de algum atributo à esquerda, e à direita por termos que correspondem a intensidade alta do mesmo atributo, na qual o provador marca sua percepção em qualquer ponto da linha. Apesar da importância relatada da palatabilidade para a adesão terapêutica, nesse estudo foram identificadas evidências limitadas sobre a correlação entre ambas em pacientes pediátricos⁵².

Em 2017, outra revisão de literatura foi publicada⁵¹, dessa vez voltada para a aceitabilidade dos medicamentos pediátricos em diversas formas farmacêuticas, incluindo comprimidos, comprimidos dispersíveis e mastigáveis, minic comprimidos, cápsulas, minicápsulas, líquidos orais, pastilhas, entre outras. Foram identificadas 19 publicações focando especificamente a avaliação da palatabilidade de formulações orais para criança. Esse estudo destaca que mais informações são necessárias com respeito à influência de atributos sensoriais além do sabor (forma, tamanho e volume) na palatabilidade de formas farmacêuticas diferentes de líquidos orais (como minic comprimidos e pastilhas)⁵¹.

No Brasil, poucos foram os estudos encontrados na literatura relatando análise sensorial de produtos farmacêuticos, associados ao desenvolvimento de novas formulações. Fregonezi-Nery et al.⁵³ avaliaram três formulações de albendazol sujeitas a diferentes condições de armazenamento com 24 provadores treinados e encontraram diferenças entre amostras controle e de armazenamento, concluindo que a análise sensorial é uma importante ferramenta no controle de qualidade de um produto farmacêutico. No estudo de Leite⁵⁴ foram desenvolvidas quatro formulações de enxaguatório bucal com microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*, que, entre outras análises físico-químicas, foram submetidas à análise sensorial por teste de preferência e uma delas foi preferida entre as demais. Batista e Siqueira⁵⁵ avaliaram a eficácia de associações de flavorizantes e edulcorantes em mascarar o sabor amargo da ranitidina em 20 usuários voluntários. Verificou-se que, em formulações com sacarose, o flavorizante que

apresentou melhores resultados foi framboesa, mas frutose em associação com sacarina é mais eficaz para mascarar o sabor amargo da ranitidina, independentemente do flavorizante utilizado. Gonçalves, Srebernick e Souza, em 2011⁵⁶, desenvolveram e avaliaram uma formulação dermocosmética (uso tópico) à base de extrato de própolis quanto à estabilidade e às características sensoriais. Nesse estudo, conclui-se que a associação de extrato de própolis e acetato de tocoferila mostrou ser promissora, devido à preferência dos provadores e ao estudo de estabilidade.

Em 2012, Isaac et al.⁵⁷ apresentaram uma revisão crítica sobre a análise sensorial em cosméticos, bem como resultados de testes sensoriais obtidos pelo grupo de pesquisa, na qual consideraram que a análise sensorial é uma ferramenta útil no sentido de se obter produtos não só seguros e eficazes, mas também aceitáveis pelos consumidores.

Fonseca et al.⁵⁸, no desenvolvimento de formulação de praziquantel nanoencapsulado, realizaram análise sensorial com equipe treinada em dois momentos: imediatamente após a reconstituição e após 10 min de reconstituição. Na avaliação sensorial não foi percebido o sabor amargo do fármaco imediatamente após a reconstituição, devido ao encapsulamento e ao alto teor de edulcorantes. No entanto, o sabor amargo foi percebido 10 min após a dispersão do sólido liofilizado em água, o que indica a liberação rápida do medicamento. Os autores ponderaram a possibilidade de prolongar o tempo de liberação para evitar o desenvolvimento de sabor amargo na boca após a exposição ao medicamento.

Em 2016, Medeiros et al.⁵⁹ analisaram a aceitação de formulações extemporâneas de captopril e furosemida, flavorizadas em três sabores e edulcoradas, em crianças cardiopatas usuárias desses medicamentos. A avaliação foi realizada por duas abordagens: através das respostas dadas pelos cuidadores e da observação direta dos pesquisadores às reações das crianças, com o uso de uma escala hedônica. As suspensões nos sabores neutro e morango foram consideradas aceitas para ambos os medicamentos. Os resultados obtidos a partir das duas abordagens foram comparados por meio do coeficiente linear de Pearson, que mostrou correlação moderada entre os dois métodos para formulações de captopril, mas não mostrou correlação nos resultados das formulações de furosemida. Os resultados relativos ao sabor neutro mostraram que a adição de flavorizantes não influenciou na aceitação das suspensões, podendo ser evitada, nesse caso, uma vantagem em termos de segurança para bebês e neonatos. A avaliação através do responsável, com escala hedônica foi considerada o método mais discriminativo da aceitação em crianças pequenas.

A indústria farmacêutica e a Análise Sensorial

O desenvolvimento de formulações pediátricas palatáveis é um desafio considerável que a indústria farmacêutica ainda enfrenta para que preparações adequadas estejam disponíveis para todas as faixas etárias e acessíveis a toda a população³. As indústrias farmacêuticas investem tempo e recursos adotando várias técnicas de mascaramento de sabor para desenvolver produtos palatáveis⁶⁰. Para se alcançar esse objetivo, é essencial avaliar



o sabor da formulação no processo de desenvolvimento de uma nova formulação oral³⁴. No entanto, a análise sensorial de fármacos em fases precoces de seus desenvolvimentos é muito complexa, pois novas moléculas não podem ser experimentadas por seres humanos, devido à falta de dados toxicológicos adequados.

Informações sobre o sabor do produto podem surgir a partir de vários métodos, como a língua eletrônica, os modelos baseados em células ou animais e os ensaios com painel humano^{37,60}. Com o avanço das indústrias farmacêuticas e de alimentos nas técnicas de modificação do sabor, a importância da avaliação sensorial está aumentando continuamente³¹. É importante avaliar e classificar o sabor dos produtos de uma maneira cientificamente confiável³⁵. Certas técnicas de predição do gosto *in vitro* e em *in vivo*, como a tecnologia da língua eletrônica e modelos animais, mostram avanços, contudo, precisam ser eficientes e de baixo custo. Anand et al., em 2007⁶⁰, descreveram o *status* da época em relação aos métodos *in vitro* e *in vivo* para medir as características sensoriais de produtos farmacêuticos. Os autores afirmaram que a análise sensorial em humanos constitui a técnica mais utilizada para avaliar o sabor de medicamentos ou formulações em desenvolvimento, mas seu uso é limitado devido à subjetividade dos provadores, toxicidade potencial dos novos fármacos e questões éticas relacionadas ao recrutamento de provadores, principalmente crianças, uma tarefa particularmente difícil quando se trabalha com fármacos⁶⁰. Apesar disso, testes com consumidores são realizados rotineiramente com crianças, contudo os resultados desses estudos geralmente permanecem como propriedade das empresas que os encomendam⁶¹.

Segundo Anand et al.⁶⁰, as abordagens *in vitro* emergentes resultariam em uma diminuição da dependência dos testes com painéis humanos. Contudo, em artigo publicado posteriormente, em 2008³¹, os mesmos autores forneceram uma visão geral sobre realização de ensaios de avaliação sensorial em voluntários humanos, onde comentaram que, apesar das novas abordagens *in vitro*, ensaios de avaliação sensorial são e vão continuar sendo a abordagem padrão, preferível e mais confiável para a avaliação do sabor, uma vez que as novas abordagens *in vitro* ainda são dependentes dos ensaios com humanos para fins de validação. As abordagens *in vitro* surgiram como métodos auxiliares, mas não podem substituir ensaios com painel de provadores³¹.

Em artigo publicado em 2013⁶², revisando uma tecnologia de língua eletrônica e suas aplicações em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos, considerou-se que a avaliação da totalidade de gostos e sensações percebidas pelos humanos só é possível com a combinação de diferentes técnicas. Além disso, os seres humanos têm outras percepções como o odor, a textura, a aparência visual e os fatores baseados em conhecimentos culturais, como preferência, experiência e memórias, não captadas por técnicas *in vitro*⁶².

Na Europa, a agência reguladora *European Medicines Agency* (EMA) estabelece diretrizes para a execução de planos de investigação e desenvolvimento clínico com o objetivo de registrar medicamentos na faixa etária pediátrica, as quais realçam a importância de se ultrapassar os desafios relacionados

à palatabilidade dos medicamentos^{63,64}. Para a elaboração do plano, o requerente do registro do medicamento deve fornecer uma visão geral dos estudos realizados ou medidas previstas, incluindo os estudos de palatabilidade e melhoria do gosto da formulação²⁷. Como vimos até aqui, esses estudos têm particular relevância, tornando-se parte intrínseca e essencial do desenvolvimento e controle de qualidade do medicamento oral que é destinado a populações com necessidades especiais (pediatria, geriatria, pacientes que sofrem de transtornos mentais e pessoas com distúrbios da deglutição)^{7,31,37}. Para além dos benefícios para os pacientes, neste caso, crianças, o mascaramento do sabor indesejado proporciona ganhos comerciais para os laboratórios, devido ao maior sucesso comercial e maior demanda de produtos, à proteção de patentes para novas formulações de sabor mascarado e também, em alguns casos, a direitos de exclusividade de comercialização estendidos⁵².

Análise Sensorial de medicamentos com crianças

Resultados de avaliações sensoriais de formulações pediátricas em voluntários adultos sadios nem sempre são válidos para outras populações, particularmente crianças³⁵. Adultos e crianças apresentam diferenças na farmacocinética e na farmacodinâmica de medicamentos⁶⁵, mas existe outra diferença importante que muitas vezes é esquecida: as crianças preferem significativamente maiores concentrações de edulcorantes, quando comparados com os adultos^{6,66}. Além disso, algumas crianças são mais sensíveis ao gosto amargo do que os adultos, fazendo com que o gosto ruim de alguns medicamentos seja mais problemático para elas⁶.

As indústrias farmacêuticas procuram anunciar que o sabor de seus medicamentos é mais bem-aceito pelos pacientes pediátricos do que o dos seus concorrentes, mesmo quando as evidências de tais afirmações são frequentemente baseadas em estudos com um pequeno número de provadores adultos, não incluindo crianças nos estudos^{32,39}.

Assim, uma vez que um adulto e uma criança podem apreciar os gostos de forma muito diferente, a aceitabilidade do medicamento pediátrico deve ser avaliada em crianças^{7,10,19,32,39}, ou seja, os testes sensoriais em crianças são considerados como o método mais confiável para a previsão de como o sabor será aceito, uma vez que as crianças são a população alvo da maioria das formulações de sabor mascarado voltadas para essa população. Os métodos *in vitro* ainda não conseguem discriminar ou levar em consideração as diferenças nas preferências entre adultos e crianças^{31,34,37}.

Matsui et al.³⁴ avaliaram a palatabilidade de quatro suspensões de antibióticos em crianças e adultos (citando marcas) e os resultados foram comparados. Embora tenha havido semelhanças nas respostas sobre o sabor de três dos antibióticos e na seleção do antibiótico que apresentava melhor sabor (azitromicina), houve diferença significativa na proporção de crianças e adultos que escolheram cada um dos antibióticos como sendo o de pior sabor. As crianças tiveram tendência a não gostar da claritromicina e os adultos, a não gostar de eritromicina-sulfisoxazol. À vista disso, os autores concluem que a avaliação da palatabilidade de medicamentos destinados à utilização em pediatria deve ser realizada em crianças³⁴.



Além das divergências entre adultos e crianças, na população pediátrica, as preferências também podem diferir entre os subgrupos etários, bem como entre as diferentes regiões geográficas e culturais^{35,67}. Recém-nascidos e crianças mais novas tendem a preferir gostos e sabores que são para elas familiares⁶⁶. A diversidade étnica e cultural deve ser levada em consideração quando se determina o sabor favorável para um país ou comunidade específica¹⁰. O que é aceito como palatável é afetado pelos costumes e sabores de alimentos típicos em cada país⁴⁰. Além disso, a percepção do gosto dos medicamentos provavelmente difere entre crianças saudáveis e doentes⁶⁴.

Contudo, questões éticas com relação à realização de estudos com medicamentos em crianças saudáveis podem ser levantadas. Mesmo se tratando de fármacos conhecidos por terem um bom perfil de segurança e por evitarem que as crianças engulam os medicamentos ao provarem, pesquisas com crianças são sempre um assunto delicado e alvo de preocupações, pois se argumenta que crianças saudáveis também são vulneráveis, como as crianças com alguma doença ou condição especial, uma vez que não têm idade suficiente e competência para que consentam de maneira livre e autônoma⁶⁴. Seria extremamente útil que estudos de palatabilidade com adultos pudessem ser validados de maneira que fosse possível transferir os resultados para a população pediátrica, o que simultaneamente os tornaria aceitáveis pelas autoridades reguladoras e comitês de ética. Uma maneira de conseguir essa avaliação poderia ser identificar adultos com um paladar particular, mais parecido com o das crianças. Métodos para a identificação de provadores com capacidades sensoriais especiais são uma abordagem comumente usada na indústria alimentar e cosmética⁶⁴.

Avaliações da percepção sensorial e da aceitação de medicamentos já utilizados por crianças que possuam condições de saúde que

requerem a sua prescrição são encontradas na literatura, como é o caso de El-Chaar et al.⁵⁰, Cohen et al.⁴⁷, Martínez et al.⁶⁷, que avaliaram a aceitação de recém-nascidos relativamente a duas formulações de vitamina D3. De forma semelhante a esse estudo, em 2011, Lava et al.⁶⁸ compararam a aceitação de duas formulações de vitamina D3, administradas a bebês para as quais as mães classificaram a reação facial, método análogo ao utilizado por Medeiros et al.⁵⁹. Uma vez que a população alvo dos tratamentos e a população estudada desses estudos coincidem, os problemas com relação a questões éticas podem ser superados.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento de novas formulações de medicamentos voltadas para crianças deve sempre considerar a palatabilidade, de forma a evitar problemas futuros na sua administração e adesão à terapêutica. Formulações do mesmo fármaco, mas de diferentes fabricantes, com distintas composições, podem ter diferenças na aceitabilidade devido à palatabilidade. Por outro lado, a mesma formulação em diferentes contextos culturais pode ser percebida distintamente. Portanto, idealmente, análises sensoriais devem ser realizadas sempre que se introduza uma nova formulação de medicamento no mercado destinada a diferentes faixas etárias, populações e contextos culturais, a fim de avaliar a aceitabilidade do produto. Uma vez que um adulto e uma criança podem apreciar os gostos de forma muito diferente, em tese, a aceitabilidade do medicamento pediátrico deve ser avaliada em crianças.

Garantir o acesso de formulações pediátricas palatáveis, seguras e adequadas à população pediátrica pode ter um efeito substancial sobre a morbidade infantil, uma vez que contribuem para o uso correto e racional de medicamentos em pediatria.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization - WHO. Children's medicines: A situational analysis, Geneva: World Health Organization; 2011[acesso 6 de jan 2018]. Disponível em: http://www.who.int/childmedicines/progress/CM_analysis.pdf
2. Nunn AJ. Making medicines that children can take. *Arch Dis Child*. 2003;88(5):369-71. <https://doi.org/10.1136/adc.88.5.369>
3. Nunn T, Williams J. Formulation of medicines for children. *Br J Clin Pharmacol*. 2005 Jun;59(6):674-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2005.02410.x>
4. Costa PQ, Coelho HL, Lima JE. Prescrição e preparo de medicamentos sem formulação adequada para crianças: um estudo de base hospitalar. *Rev Bras Cienc Farmac*. 2009;45(1):57-66. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000100007>
5. Nahata MC, Allen LV Jr. Extemporaneous drug formulations. *Clin Ther*. 2008;30(11):2112-9. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2008.11.020>
6. Lipchock SV, Reed DR, Mennella JA. Relationship between bitter-taste receptor genotype and solid medication formulation usage among young children: a retrospective analysis. *Clin Ther*. 2012;34(3):728-33. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.02.006>
7. Davies EH, Tuleu C. Medicines for children: a matter of taste. *J Pediatr*. 2008;153(5):599-604. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.06.030>
8. Lawless TL, Heymann H. Sensory evaluation of food: principles and practices. 2a ed. New York: Springer; 1999.
9. Mennella JA, Pepino MY, Beauchamp GK. Modification of bitter taste in children. *Dev Psychobiol*. 2003;43(2):120-7. <https://doi.org/10.1002/dev.10127>
10. Pawar S, Kumar A. Issues in the formulation of drugs for oral use in children: role of excipients. *Paediatr Drugs*. 2002;4(6):371-9. <https://doi.org/10.2165/00128072-200204060-00004>
11. Bauer K, Garbe D, Surburg H. Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. John Wiley & Sons; 2008.
12. Zajicek A, Fossler MJ, Barrett JS, Worthington JH, Ternik R, Charkoftaki G et al. A report from the pediatric formulations task force: perspectives on the state of child-friendly oral dosage forms. *AAPS J*. 2013;15(4):1072-81. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9511-5>



13. Gee SC, Hagemann TM. Palatability of liquid anti-infectives: clinician and student perceptions and practice outcomes. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2007;12(4):216-23. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-12.4.216>
14. Katdare A, Chaubal MV, editors. *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery systems.* New York: Informa Healthcare; 2006.
15. Tolia V, Johnston G, Stolle J, Lee C. Flavor and taste of lansoprazole strawberry-flavored delayed-release oral suspension preferred over ranitidine peppermint-flavored oral syrup: in children aged between 5-11 years. *Paediatr Drugs.* 2004;6(2):127-31. <https://doi.org/10.2165/00148581-200406020-00006>
16. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. NBR 12806: análise sensorial de alimentos e bebidas: terminologia. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 1993.
17. Esteves E. *Introdução à análise sensorial.* Faro: Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve; 2014.
18. Rother ET. Revisão sistemática x revisão narrativa. *Acta Paul Enferm.* 2007;20(2):v-vi. <https://doi.org/10.1590/S0103-21002007000200001>
19. Angelilli ML, Toscani M, Matsui DM, Rieder MJ. Palatability of oral antibiotics among children in an urban primary care center. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2000;154(3):267-70. <https://doi.org/10.1001/archpedi.154.3.267>
20. Hendeles L. Selecting a systemic corticosteroid for acute asthma in young children. *J Pediatr.* 2003;142(2 Suppl):S40-4. <https://doi.org/10.1067/mpd.2003.25>
21. Isa JM, Wong GK, Teraoka SS, Sera MJ, Tsushima MM, Yamamoto LG. Parental pediatric corticosteroid preferences. *Am J Emerg Med.* 2001;19(1):29-31. <https://doi.org/10.1053/ajem.2001.20025>
22. Meier CM, Simonetti GD, Ghiglia S, Fossali E, Salice P, Limoni C et al. Palatability of angiotensin II antagonists among nephropathic children. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;63(5):628-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2006.02814.x>
23. Meltzer EO, Stahlman JE, Leflein J, Meltzer S, Lim J, Dalal AA et al. Preferences of adult patients with allergic rhinitis for the sensory attributes of fluticasone furoate versus fluticasone propionate nasal sprays: a randomized, multicenter, double-blind, single-dose, crossover study. *Clin Ther.* 2008;30(2):271-9. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2008.02.005>
24. Ramgoolam A, Steele R. Formulations of antibiotics for children in primary care: effects on compliance and efficacy. *Paediatr Drugs.* 2002;4(5):323-33. <https://doi.org/10.2165/00128072-200204050-00005>
25. Lin D, Seabrook JA, Matsui DM, King SM, Rieder MJ, Finkelstein Y. Palatability, adherence and prescribing patterns of antiretroviral drugs for children with human immunodeficiency virus infection in Canada. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2011;20(12):1246-52. <https://doi.org/10.1002/pds.2236>
26. Regan TD, Lewis D, Norton SA. Taste comparison of corticosteroid suspensions. *J Drugs Dermatol.* 2006;5(9):835-7.
27. Baguley D, Lim E, Bevan A, Pallet A, Faust SN. Prescribing for children - taste and palatability affect adherence to antibiotics: a review. *Arch Dis Child.* 2012;97:293-7. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2011-300909>
28. Jahnsen T, Thorn P. An acceptability study of two pivampicillin mixtures in children in general practice. *Scand J Prim Health Care.* 1987;5(4):241-3. <https://doi.org/10.3109/02813438709018102>
29. Zraggen L, Faré PB, Lava SA, Simonetti GD, Fossali EF, Amoroso C et al. Palatability of crushed β -blockers, converting enzyme inhibitors and thiazides. *J Clin Pharm Ther.* 2012;37(5):544-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2011.01330.x>
30. Wollner A, Lécuyer A, De La Rocque F, Sedletzki G, Derkx V, Boucherat M et al. Acceptabilité, compliance et rythme d'administration des antibiotiques oraux chez l'enfant, en ambulatoire. *Arch Pediatr.* 2011;18(5):611-6. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2011.02.010>
31. Anand V, Kharb V, Kataria M, Kukka V, Choudhury PK. Taste assessment trials for sensory analysis of oral pharmaceutical products. *Pak J Pharm Sci.* 2008 Oct;21(4):438-50.
32. Dagnone D, Matsui D, Rieder MJ. Assessment of the palatability of vehicles for activated charcoal in pediatric volunteers. *Pediatr Emerg Care.* 2002;18(1):19-21. <https://doi.org/10.1097/00006565-200202000-00006>
33. Hoppe JE, Blumenstock G, Grotz W, Selbmann HK. Compliance of German pediatric patients with oral antibiotic therapy: results of a nationwide survey. *Pediatr Infect Dis J.* 1999;18(12):1085-91. <https://doi.org/10.1097/00006454-199912000-00012>
34. Matsui D, Lim R, Tschen T, Rieder MJ. Assessment of the palatability of β -lactamase-resistant antibiotics in children. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1997;151(6):599-602. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1997.02170430065013>
35. Sjövall J, Fogh A, Huitfeldt B, Karlsson G, Nylén O. Methods for evaluating the taste of paediatric formulations in children: a comparison between the facial hedonic method and the patients' own spontaneous verbal judgement. *Eur J Pediatr.* 1984;141(4):243-7. <https://doi.org/10.1007/BF00572770>
36. Toscani M, Drehobl M, Freed J, Stool S. A multicenter, randomized, comparative assessment in healthy pediatric volunteers of the palatability of oral antibiotics effective in the therapy of otitis media. *Curr Ther Res.* 2000;61(5):278-85. [https://doi.org/10.1016/S0011-393X\(00\)80018-1](https://doi.org/10.1016/S0011-393X(00)80018-1)
37. Winzenburg G, Desset-Brêthes S. Industry perspective on palatability testing in children: two case studies. *Int J Pharm.* 2012;435(2):139-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.057>
38. Bradshaw H, Mitchell MJ, Edwards CJ, Stolz U, Naser O, Peck A et al. Medication palatability affects physician prescribing preferences for common pediatric conditions. *Acad Emerg Med.* 2016;23(11):1243-7. <https://doi.org/10.1111/acem.13020>
39. Uhari M, Eskelinen L, Jokisalo J. Acceptance of antibiotic mixtures by infants and children. *Eur J Clin Pharmacol.* 1986;30(4):503-4. <https://doi.org/10.1007/BF00607970>



40. Bunupuradah T, Wannachai S, Chuamchaitrakool A, Intasan J, Nuchapong T, Neiss W et al. Use of taste-masking product, FLAVORx, to assist Thai children to ingest generic antiretrovirals. *AIDS Res Ther.* 2006;3:30. <https://doi.org/10.1186/1742-6405-3-30>
41. Sadrieh N, Brower J, Yu L, Doub W, Straughn A, Machado S et al. Stability, dose uniformity, and palatability of three counterterrorism drugs-human subject and electronic tongue studies. *Pharm Res.* 2005;22(10):1747-56. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-6387-x>
42. Ernest TB, Elder DP, Martini LG, Roberts M, Ford JL. Developing paediatric medicines: identifying the needs and recognizing the challenges. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(8):1043-55. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.8.0001>
43. McCrindle BW, O'Neill MB, Cullen-Dean G, Helden E. Acceptability and compliance with two forms of cholestyramine in the treatment of hypercholesterolemia in children: a randomized, crossover trial. *J Pediatr.* 1997;130(2):266-73. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(97\)70353-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(97)70353-6)
44. Lucas-Bouwman ME, Roorda RJ, Jansman FG, Brand PL. Crushed prednisolone tablets or oral solution for acute asthma? *Arch Dis Child.* 2001;84(4):347-8. <https://doi.org/10.1136/adc.84.4.347>
45. Gries DM, Moffitt DR, Pulos E, Carter ER. A single dose of intramuscularly administered dexamethasone acetate is as effective as oral prednisone to treat asthma exacerbations in young children. *J Pediatr.* 2000;136(3):298-303. <https://doi.org/10.1067/mpd.2000.103353>
46. Gerson I, Green L, Fishken D. Patient preference and sensory comparisons of nasal spray allergy medications. *J Sens Stud.* 1999;14(4):491-6. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.1999.tb00129.x>
47. Cohen R, La Rocque F, Lécuyer A, Wollner C, Bodin MJ, Wollner A. Study of the acceptability of antibiotic syrups, suspensions, and oral solutions prescribed to pediatric outpatients. *Eur J Pediatr.* 2009;168(7):851-7. <https://doi.org/10.1007/s00431-008-0857-0>
48. Ishizaka T, Okada S, Tokuyama E, Mukai J, Uchida T. Quality of twelve clarithromycin dry syrup formulations- bitterness, grittiness and uniformity of drug loading. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2008;56(10):1389-94. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.1389>
49. Samulak KM, El-Chaar GM, Rubin LG. Randomized, double blind comparison of brand and generic antibiotic suspensions: I. A study of taste in adults. *Pediatr Infect Dis J.* 1996;15(1):14-7. <https://doi.org/10.1097/00006454-199601000-00003>
50. El-Chaar GM, Mardy G, Wehlou K, Rubin LG. Randomized, double blind comparison of brand and generic antibiotic suspensions: II. A study of taste and compliance in children. *Pediatr Infect Dis J.* 1996;15(1):18-22. <https://doi.org/10.1097/00006454-199601000-00004>
51. Mistry P, Batchelor H. Evidence of acceptability of oral paediatric medicines: a review. *J Pharm Pharmacol.* 2017;69(4):361-76. <https://doi.org/10.1111/jphp.12610>
52. Squires LL, Lombardi DP, Sjostedt P, Thompson CA. A systematic literature review on the assessment of palatability and swallowability in the development of oral dosage forms for pediatric patients. *Ther Innov Regul Sci.* 2013;47(5):533-41. <https://doi.org/10.1177/2168479013500288>
53. Fregonezi-Nery MM, Prudencio-Ferreira SH, Kedor EM, Baracat MM, Brinholi FF. Sensory evaluation of albendazole suspensions. *Braz Arch Biol Technol.* 2002;45(4):457-63. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132002000600009>
54. Leite MF. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxagatório bucal [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
55. Batista GD, Siqueira APNDF. Avaliação de diferentes associações de flavorizantes e edulcorantes para mascarar o sabor amargo do xarope de ranitidina. *Perquirere.* 2009;(6):87-95.
56. Gonçalves GM, Srebernich SM, Souza JA. Stability and sensory assessment of emulsions containing propolis extract and/or tocopheryl acetate. *Braz J Pharm Sci.* 2011;47(3):585-92. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000300016>
57. Isaac V, Chiari BG, Magnani C, Corrêa MA. Análise sensorial como ferramenta útil no desenvolvimento de cosméticos. *Rev Cienc Farm Basica Apl.* 2012;33(4):479-88.
58. Fonseca LB, Viçosa AL, Mattos AC, Coelho PM, Araújo N, Zamith HP et al. Desenvolvimento de um medicamento brasileiro nanoencapsulado para o tratamento da esquistossomose. *Vigil Sanit Debate.* 2013;1(4):85-91. <https://doi.org/10.3395/vd.v1i4.111pt>
59. Medeiros MDSG, Garruti DDS, Batista LAA, Cruz Fonseca SGD, Fernandes FP, Luna Coelho HL. Taste acceptance of captopril and furosemide extemporaneous oral pediatric formulations among hospitalized children. *Pharma Care Health Sys.* 2016;3(2):156. <https://doi.org/10.4172/2376-0419.1000156>
60. Anand V, Kataria M, Kukkar V, Saharan V, Choudhury PK. The latest trends in the taste assessment of pharmaceuticals. *Drug Discov Today.* 2007;12(5-6):257-65. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.01.010>
61. Guinard JX. Sensory and consumer testing with children. *Trends Food Sci Technol.* 2000;11(8):273-83. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00015-2)
62. Tahara Y, Toko K. Electronic tongues-a review. *IEEE Sens J.* 2013;13(8):3001-11. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2013.2263125>
63. União Europeia. Regulamento (CE) N° 1901/2006. Relativo a medicamentos para uso pediátrico e que altera o Regulamento (CEE) N° 1768/92, a Directiva 2001/20/CE, a Directiva 2001/83/CE e o Regulamento (CE) N° 726/2004. *Jornal Oficial União Europeia.* 12 dez 2006.
64. Cram A, Breitreutz J, Desset-Brèthes S, Nunn T, Tuleu C; European Paediatric Formulation Initiative (EuPFI). Challenges of developing palatable oral paediatric formulations. *Int J Pharm.* 2009;365(1-2):1-3. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.015>



65. Yewale VN, Dharmapalan D. Promoting appropriate use of drugs in children. *Int J Pediatr.* 2012;2012:906570. <https://doi.org/10.1155/2012/906570>
66. Mennella JA, Beauchamp GK. Optimizing oral medications for children. *Clin Ther.* 2008;30(11):2120-32. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2008.11.018>
67. Martínez JM, Bartoli F, Recaldini E, Lavanchy L, Bianchetti MG. A taste comparison of two different liquid colecalciferol (vitamin D3) preparations in healthy newborns and infants. *Clin Drug Investig.* 2006;26(11):663-5. <https://doi.org/10.2165/00044011-200626110-00006>
68. Lava SA, Caccia G, Osmetti-Gianini S, Simonetti GD, Milani GP, Falesi M et al. Acceptance of two liquid vitamin D₃ formulations among mothers with newborn infants: a randomized, single-blind trial. *Eur J Pediatr.* 2011;170(12):1559-62. <https://doi.org/10.1007/s00431-011-1477-7>

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Características dos Recursos Humanos e desafios no trabalho de coordenadores de Vigilância em Saúde no interior de Pernambuco

Characteristics of Human Resources and challenges in the Work of Surveillance coordinators of Health in the Inland of Pernambuco

RESUMO

Cleber Vinicius Brito dos Santos^{1,*}
Daniel Friguglietti Brandespim^{II}

Introdução: A formação e qualificação dos recursos humanos em saúde afetam, diretamente, a qualidade dos serviços ofertados à coletividade. **Objetivo:** Caracterizar o perfil de formação dos coordenadores de Vigilância em Saúde do interior de Pernambuco e identificar as principais fragilidades e potencialidades no cotidiano dos processos de trabalho. **Método:** A produção de informações ocorreu por meio de entrevista com auxílio de instrumento semiestruturado. **Resultados:** Os resultados revelaram uma variedade de fragilidades nos recursos humanos da Vigilância em Saúde na região, entre elas, a deficiência na formação acadêmica dos trabalhadores, condições de trabalho deficientes e ausência de recursos financeiros. Por outro lado, como ponto positivo, foi identificada uma grande oferta de ações de Educação Permanente em Saúde. **Conclusões:** Sugere-se aos gestores em saúde, a busca por alternativas que atendam à situação dos profissionais atualmente inseridos no sistema e minimizem os efeitos da formação deficiente, assim como a necessidade de discussões para revisão das Diretrizes Curriculares Nacionais dos cursos da área da saúde, fomentando a formação de profissionais para a promoção em saúde, além de distribuição adequada e melhorias na alocação de recursos para a Vigilância em Saúde.

PALAVRAS-CHAVE: Profissionais de Saúde; Recursos Humanos em Saúde; Vigilância Ambiental; Vigilância Epidemiológica; Vigilância Sanitária

ABSTRACT

Introduction: The professional qualification of human resources in health affects directly the quality of the services offered to the community. **Objective:** This study aimed to characterize the formation of managers of health surveillance in the inland of Pernambuco State, Brazil and identify the main fragilities and potentialities in the daily processes of work. **Method:** The data was collected by interview using a semi structured questionnaire. **Results:** The results revealed a variety of problems in human resources in health surveillance in the region, like the absence or incompatible education level, poorly work conditions and precarious financial resources. On the other hand, some positive points, was identified a good offer in actions of permanent education in health. **Conclusions:** Should find alternatives that meet the situation of professionals into the system and minimize the effects of lack of training and inadequate training, as well as the necessity to discuss the review of the national curricular guidelines of health sciences courses, promoting educational institutions to train professionals for health surveillance, as well promote the better distribution of financial resources.

^I Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^{II} Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil

*E-mail: cleber.vini@yahoo.com.br

Recebido: 21 ago 2017
Aprovado: 9 maio 2018

KEYWORDS: Health Professionals; Human Resources in Health; Environmental Surveillance; Epidemiological Surveillance; Health Surveillance



INTRODUÇÃO

A saúde, reconhecida e proclamada como direito fundamental da pessoa humana, é necessidade essencial de todos os indivíduos e coletividades¹. No Brasil, somente no final da década de 1980, com a constituição cidadã e as leis orgânicas da saúde, a saúde passou a configurar como um direito de todos e dever do estado^{2,3,4}.

A qualidade dos serviços de saúde é resultado de diversos fatores, sendo crescente o consenso entre os profissionais do Sistema Único de Saúde (SUS), em todas as suas esferas, que a formação e qualificação dos recursos humanos afetam, diretamente, a qualidade dos serviços oferecidos à coletividade^{5,6}.

No Brasil, as vigilâncias epidemiológica, sanitária, ambiental e em saúde do trabalhador possuem distintos graus de desenvolvimento e institucionalização. As duas primeiras foram originadas anteriormente à criação do SUS. Já a vigilância em saúde do trabalhador foi instituída pós Constituição de 1988, com o próprio SUS, e a vigilância ambiental é ainda a mais recente⁷.

Posteriormente, em 2003, foi criada a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) e, após 2006, os recursos financeiros que eram destinados às Vigilâncias passaram a compor o bloco financeiro “Vigilância em Saúde”⁸.

A Vigilância em Saúde tem por objetivo a observação e análise permanentes da saúde da população, articulando-se em um conjunto de ações destinadas a controlar determinantes, riscos e danos à saúde de populações que vivem em determinados territórios, garantindo-se a integralidade da atenção, o que inclui abordagens individuais e coletivas dos problemas de saúde⁹.

O Pacto pela Saúde, criado em 2006 pelo MS com o objetivo de superar os entraves que se acumularam no SUS, ressalta em sua dimensão de Gestão, uma preocupação no tocante a educação na saúde¹⁰. Prioriza a implementação da Política Nacional de Educação Permanente em Saúde (PNEPS), ao considerá-la como uma estratégia do SUS para a formação e o desenvolvimento de trabalhadores no setor. Porém, Matta e Morosini¹¹ afirmaram que a efetivação dessa política é um desafio e depende de uma estreita relação entre os atores envolvidos nesse processo, entre eles, o MS por formular a política nacional de desenvolvimento profissional e educação permanente dos trabalhadores da saúde; as Instituições de Ensino Superior por oferecerem o espaço de formação teórica, no qual os estudantes adquirem os conhecimentos que vão ser aplicados nas instituições de saúde; as Secretarias Estaduais de Saúde, que têm um papel inarredável de constituir a Rede de Gestão e de Atenção em Saúde, e desta forma, identificar necessidades de formação, mobilizar a capacitação em serviço e a produção e disseminação de conhecimento ascendente; e, por fim, os municípios, por serem responsáveis, a partir da descentralização, por gerir a saúde da população por si próprios.

De acordo com Miranda, Carvalho e Cavalcante¹², a partir do gradual processo de implantação e descentralização intergovernamental do SUS, são requeridas novas competências e responsabilidades para a gestão governamental, como, por exemplo, a competência da gestão em organizar e utilizar os sistemas de

monitoramento e avaliação de informações propícias para subsidiar processos decisórios, de planejamento e de prospecção logística. Os autores ainda enfatizam a lacuna na produção de estudos e pesquisas direcionados a processos e práticas de monitoramento e avaliação orientados para a gestão governamental em saúde, particularmente no âmbito municipal.

Ações recentes de reorientação da formação profissional vêm sendo delineadas em instâncias loco-regionais do SUS, como os Colegiados de Gestão Regional, relacionando-se mais efetivamente ao processo de regionalização e descentralização da política nacional de saúde, contribuindo para uma melhoria na qualidade dos recursos humanos dos trabalhadores em saúde¹³, entretanto não há produção científica na área que caracterize o perfil dos profissionais vinculados à Vigilância em Saúde.

Peduzzi¹⁴ assinalou as lacunas científicas no campo da abordagem de recursos humanos no trabalho em saúde, visto que tal investigação é necessária para adensar e consolidar a abordagem do Trabalho e Educação na Saúde, além de enfatizar que tais abordagens são promissoras no sentido de proporcionar o conhecimento para o fortalecimento e consolidação das práticas de saúde no SUS.

Dessa forma, questionamos se os coordenadores de Vigilância em Saúde apresentam formação acadêmica e/ou qualificações necessárias para atender às exigências que lhes competem, além das principais dificuldades que afetam seus processos de trabalho, para que as informações possam incitar a discussão entre a comunidade acadêmica e gestores e gerar, conseqüentemente, em melhorias na oferta de serviços aos usuários do SUS, visto que não há relatos na literatura sobre o tema em questão, analisando os desafios dos processos de trabalho dos coordenadores de Vigilância em Saúde, tratando-se de um estudo inédito. Acredita-se, portanto, devido aos escassos dados de pesquisas anteriores, que os profissionais da Vigilância em Saúde possuem formação acadêmica deficitária, podendo isso afetar a qualidade do serviço prestado.

Esse estudo teve por objetivo caracterizar e analisar a formação acadêmica e qualificação profissional, bem como identificar as dificuldades encontradas pelos coordenadores de Vigilância em Saúde no interior de Pernambuco, Brasil.

MÉTODO

Foi realizado um estudo de abordagem quantiquantitativa. A produção de informações ocorreu por meio de entrevista individual e aplicação de um instrumento semiestruturado, seguindo-se a metodologia proposta por Minayo¹⁵, que foi adaptada aos objetivos do estudo. A entrevista era composta por questões fechadas (ou estruturadas) e abertas, possibilitando ao entrevistado discorrer sobre o tema proposto, sem respostas ou condições pré-estabelecidas pelo entrevistador. Buscou-se, além da descrição do caso individual, a compreensão das especificidades dos grupos e a garantia da comparabilidade das especificidades loco-regionais.



Os sujeitos de pesquisa foram os coordenadores da Vigilância em Saúde dos 21 municípios da região do Agreste Meridional do Estado de Pernambuco que compõem a V Gerência Regional de Saúde (V Geres) do Estado de Pernambuco, Brasil.

O questionário foi organizado em três blocos temáticos, com as seguintes variáveis: bloco I - Formação: questões relativas à formação profissional (escolaridade, curso de graduação e pós-graduação, participação em cursos de curta e média duração e ações de educação permanente em saúde); bloco II - Questões referentes ao serviço (tipo de vínculo trabalhista, tempo de vínculo, carga horária, atuação em mais de uma coordenação de vigilância, duplicidade de vínculos trabalhistas) e bloco III - Questões relacionadas às condições de trabalho (maiores problemas enfrentados e que afetam o desempenho do serviço).

A coleta de dados foi realizada entre os meses de setembro de 2015 e abril de 2016, com contato inicial via telefone e e-mail para agendamento de visita. Caso não fossem localizados na primeira tentativa de contato, eram realizadas mais duas tentativas, antes de serem excluídos da pesquisa. As entrevistas foram gravadas em áudio, posteriormente transcritas e os áudios descartados.

Os dados obtidos foram digitados em um banco de dados no Excel, que foi posteriormente exportado para o *Statistical Package for Social Sciences for Windows Version 23*¹⁶ e submetidos à análise descritiva.

A pesquisa foi realizada com a anuência da Secretaria Estadual de Saúde, devidamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Universidade de Pernambuco, por meio do Parecer nº 48031315.4.0000.5207, e respeitando-se os preceitos éticos contidos na Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, previamente à entrevista e ao preenchimento do questionário, os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os entrevistados e a situação distinta dos coordenadores de Vigilância em Saúde

No total, aceitaram participar do estudo 26 (26/28) coordenadores de Vigilância em Saúde de 14 (14/21) municípios, tendo alguns abdicado de participar devido à ocorrência constante de reuniões técnicas e cursos de capacitação relacionados à epidemia de chikungunya, dengue e zika que acometia Pernambuco no período da pesquisa.

Cabe ressaltar que, em 78,57% (11/14) dos municípios visitados, não havia um serviço estruturado de Vigilância em Saúde do Trabalhador, e nos municípios onde ela se faz presente, não havia um coordenador exclusivo para a gerência, ficando a vigilância do trabalhador sob a responsabilidade dos coordenadores das outras vigilâncias, em razão do processo inicial de funcionamento da Vigilância em Saúde do Trabalhador na região.

Formação profissional

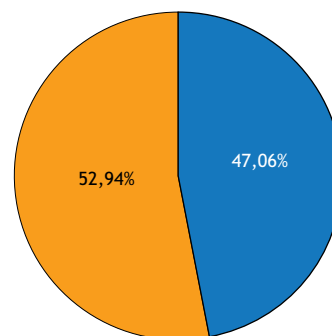
Em relação à formação acadêmica dos profissionais, observou-se que 61,54% (16/26) dos coordenadores possuíam ensino superior completo e, desses, 53,07% (9/16) realizaram algum curso de pós-graduação, na área de atuação (por exemplo: Saúde Coletiva, Saúde Pública e Epidemiologia), conforme Tabela 1. Os resultados desses dados estratificados por município estão exibidos na Figura. No que se refere à área de formação, 81,20% (13/16) são formados em cursos de ciências da saúde e 18,80% (3/16) são formados em cursos de outras áreas (por exemplo: Marketing, História e Pedagogia).

No que se refere à realização de cursos de curta e média duração e atividade de educação permanente, 96,10% (25/26) dos

Tabela 1. Caracterização da formação profissional dos coordenadores de Vigilância em Saúde da V Gerência Regional de Saúde (Geres), Pernambuco, 2016.

| Variáveis | Nº | % |
|-------------------------------|----|-------|
| Escolaridade | | |
| Ensino médio completo | 8 | 30,77 |
| Ensino superior incompleto | 2 | 7,69 |
| Ensino superior completo | 16 | 61,54 |
| Pós-graduação | | |
| Saúde coletiva | 3 | 17,76 |
| Saúde pública | 4 | 23,55 |
| Epidemiologia | 2 | 11,76 |
| Não realizou | 7 | 47,05 |
| Cursos curta duração | | |
| Sim | 25 | 96,10 |
| Não | 1 | 3,90 |
| Quando realizou o último | | |
| < 1 ano | 18 | 72,00 |
| 1-5 anos | 7 | 28,00 |
| Fomento para curso | | |
| Próprio | 3 | 12,00 |
| Secretaria Municipal/Estadual | 22 | 88,00 |

Fonte: Os autores.



- Municípios com todos coordenadores com ensino superior completo
- Municípios com pelo menos um coordenador sem ensino superior

Fonte: Os autores.

Figura. Distribuição dos municípios em relação ao nível de formação dos coordenadores de Vigilância em Saúde, V Gerência Regional de Saúde (Geres), Pernambuco, 2016.



entrevistados relataram participar de cursos de capacitação, atualização, participar de congressos, entre outras atividades, sendo que a maioria (72,00%) desses relatou ter participado de pelo menos uma das atividades a menos de um ano, dos quais, em 88,00% dos casos, os cursos foram realizados ou financiados pelas Secretarias Municipal ou Estadual de Saúde (Tabela 1).

Estes dados refletem a execução de uma política local de educação permanente dos profissionais de saúde, com abordagem integrada nos eixos da clínica, vigilância, promoção e gestão, como preconizado nas Diretrizes Nacionais de Vigilância em Saúde, em que a integração entre a Vigilância em Saúde e a Atenção Primária à Saúde é condição obrigatória para a construção da integralidade na atenção e para o alcance dos resultados, com desenvolvimento de um processo de trabalho condizente com a realidade local⁹.

Observou-se que a formação acadêmica e/ou experiência profissional não foram pré-requisitos para a contratação e atuação dos coordenadores de Vigilância em Saúde em grande parte dos municípios, tendo em vista que a Portaria que regulamenta as responsabilidades e define diretrizes para execução das ações de Vigilância em Saúde pela União, Estados, Distrito Federal e Municípios, relativos ao Sistema Nacional de Vigilância em Saúde e Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, não fazem referência à esta exigência relacionada a formação acadêmica e/ou experiência na área da saúde^{17,18} e também ainda não há uma política nacional clara e definida implantada no país para a formação dos profissionais que atuam na Vigilância em Saúde.

Portanto, atualmente, não há um consenso sobre os perfis curriculares exigidos para coordenadores de Vigilância em Saúde e uma definição pelo Ministério da Saúde de uma política nacional para os profissionais que atuam nos sistemas de vigilância, porém, de acordo com a Norma Operacional Básica de Recursos Humanos para o SUS (NOB/RH- SUS), o concurso público deve ser a única forma de ingresso de profissionais na carreira da saúde e no serviço público. Entretanto as Diretrizes Nacionais da Vigilância em Saúde e a Portaria nº 1.378, de 9 de julho de 2013, que define as diretrizes para execução e financiamento das ações em Vigilância em Saúde, deixam a cargo das prefeituras municipais a forma de contratação e uso do piso financeiro para contratação dos profissionais componentes da vigilância^{9,18}.

A flexibilidade jurídica reflete-se na contratação de profissionais por meio de cargos comissionados e indicações políticas, resultando na indicação de pessoas que não possuem a devida formação e preparação necessária para atuação em um cargo de coordenação de Vigilância em Saúde, seja esta ambiental, epidemiológica ou sanitária.

Os achados do nosso estudo também corroboram com o diagnóstico de recursos humanos realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no qual, além das profissões da área da saúde, existem trabalhadores com formações em diversas áreas do conhecimento, como, por exemplo, advogados, zootecnistas, pedagogos, engenheiros, físicos e geógrafos, entre outros, também em municípios como menos de 20.000 habitantes, como os

municípios visitados neste estudo, há um predomínio de trabalhadores de nível médio e apenas 50,3% dos profissionais com nível superior possuem algum tipo de especialização^{6,19}.

Vale ressaltar a importância dessa multi, inter e transdisciplinaridade das atividades e da formação das equipes de Vigilância em Saúde, que contribuem imensuravelmente para a produção teórica e técnica na área, com benefícios à saúde da população. Vide os exemplos do incidente com o Césio-137, em Goiânia-GO, e da hemodiálise, em Caruaru-PE, que revelou e elevaram aspectos antes não debatidos na construção das práticas da Vigilância em Saúde e, em particular, do sistema de vigilância sanitária como a inserção de diversas categorias profissionais²⁰.

Positivamente, destacam-se a disponibilidade e a rotina de encontros e cursos de média e curta duração oferecidos pelas esferas municipal e estadual, corroborando com as diretrizes da PNEPS, que objetiva a transformação das políticas institucionais, a melhoria na qualidade da atenção e da assistência em saúde e melhoria das relações nas e entre equipes de trabalho, e com as Diretrizes para a Gestão da Educação em Vigilância Sanitária e na Política de Educação Permanente do SUS. No entanto, tais políticas não têm como objetivo, substituir a formação a nível acadêmico e não devem se constituir como a única fonte de qualificação profissional dos gestores^{21,22,23,24}.

Situação de trabalho

No tocante ao vínculo profissional, apenas 30,80% dos coordenadores possuem vínculo há mais de 5 anos, sendo esses os únicos profissionais efetivos (Tabela 2). Sobre a jornada de trabalho, verificou-se que somente 7,70% deles têm vínculo inferior a 30 horas semanais, mas 38,45% coordenavam mais de uma vigilância e 11,54% atuavam em mais de um município (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização do vínculo profissional dos coordenadores de Vigilância em Saúde da V Gerência Regional de Saúde (Geres), Pernambuco, 2016.

| Variáveis | Nº | % |
|--|----|-------|
| Vínculo | | |
| Contrato (temporário) | 18 | 69,23 |
| Efetivo (concurso) | 8 | 30,77 |
| Tempo de vínculo | | |
| < 1 ano | 6 | 23,08 |
| 1,5 ano | 12 | 46,15 |
| > 5 anos | 8 | 30,77 |
| Carga horária (horas/semana) | | |
| 15 h | 2 | 7,70 |
| 30 h | 9 | 34,61 |
| 40 h | 15 | 57,69 |
| Nº vigilâncias que coordena | | |
| 1 | 16 | 61,54 |
| 2 | 6 | 23,07 |
| 3 | 4 | 15,38 |
| Duplicidade de vínculo (outros municípios) | | |
| Sim | 3 | 11,54 |
| Não | 23 | 88,46 |

Fonte: Os autores.



Resultados semelhantes aos verificados neste estudo já foram relatados no Censo Nacional dos Trabalhadores de Vigilância Sanitária, no qual foi constatada a diversidade de vínculos e multiplicidade de escalas salariais entre municípios e estados, revelando a existência de servidores públicos estatutários, celetistas, terceirizados e servidores cedidos por outras instituições, trabalhando em jornadas de 20, 30 ou 40 horas semanais^{6, 19}.

Frequentemente se observam modalidades de vínculos que, além de precárias, se encontram fora dos limites legais, resultando em prejuízos na qualidade e continuidade da assistência oferecida, no comprometimento dos profissionais e integridade jurídica dos estados e municípios²⁵.

A estruturação dos Planos de Cargos, Carreiras e Salários (PCCS) no SUS, é a única saída para evitar a alta rotatividade, duplicidade de vínculo sobrecarga dos profissionais e, conseqüente insatisfação dos trabalhadores. Essa tem sido a principal causa de reivindicações de servidores, que ainda não foi alcançada graças a restrições fiscais e administrativas²⁶.

Além disso, mesmo com o evidente avanço da NOB/RH-SUS, recomenda-se a sua discussão e revisão. Apesar da sua importância como referencial de RH para o SUS, é evidente a impossibilidade de se estabelecer uma política única para todo o país, desconsiderando as diversidades loco-regionais existentes ao longo do país²⁷.

Principais dificuldades declaradas

A maior dificuldade citada pelos entrevistados foi o cumprimento de metas relativas a atividades de rotina, principalmente inspeções, devido, principalmente, à elevada demanda de tarefas. Foi dito que isso se deve principalmente à falta de veículos (92,30%) e oao baixo número de funcionários (80,77%).

O município é bom de trabalhar, as pessoas são prestativas e preocupadas, mas o que dificulta o serviço é a falta de carro, fica difícil visitar e dar assistência em áreas afastadas”;

Apesar da cidade ser pequena, as condições de trabalho são ruins, e mesmo com a boa vontade da gente, é complicado trabalhar, o número de funcionários é pequeno e com a falta de veículo fica impossível cobrir toda a cidade de forma igual”.

Nas diretrizes nacionais da Vigilância em Saúde, são definidos os destinos dos recursos do piso financeiro do componente da Vigilância em Saúde, por meio do qual parte dos recursos devem ser destinados para despesas de custeio, como material de consumo (e.g., por exemplo: peças e materiais para revisão e manutenção de veículos, equipamento de proteção individual e material de escritório) e para despesas de capital, como compra de veículos e outros equipamentos/materiais permanentes (e.g., por exemplo: computadores, fax, câmera fotográfica)⁹. O que, de acordo com os relatos, não vem sendo administrados de forma correta pelas Secretarias de Saúde, revelando falhas na gestão dos recursos destinados à Vigilância em Saúde.

Também foi relatado, por boa parte dos coordenadores (53,84%), um forte sentimento de desvalorização frente a outros trabalhadores da saúde, como os da atenção básica. A insatisfação salarial foi citada por todos os entrevistados, o que resultava, segundo eles, na procura de outros vínculos trabalhistas:

O salário é baixo para a quantidade de serviço e, para piorar, sou somente eu para as três vigilâncias, aí já viu, né? Trabalho por três e recebo por um!

Além da insatisfação salarial, os entrevistados também citaram como pontos negativos, a falta de respaldo político e, em certos casos, até interferência política, principalmente no que se refere a medidas punitivas e ao uso do poder de polícia:

Existe muita interferência política no município, vocês precisam ver como fica aqui em dias de feira de gado e de alimentos ou nas festas de São João...

Um novo modelo de gestão do SUS, de acordo com Campos et al.²⁸, deve diminuir a rotatividade, motivar os trabalhadores em suas atividades, evitar a duplicidade de vínculos e contratações inadequadas e melhorar o desempenho dos processos de gestão em todas as esferas⁷. Entretanto as dificuldades citadas, demonstram o quão distante esse modelo se encontra da realidade existente na área de estudo. Resultados semelhantes foram relatados em Santa Catarina, onde os profissionais citaram dificuldades e sugeriram melhorias no quadro de profissionais, materiais e recursos, além da valorização profissional, equiparação salarial, melhorias nas condições de trabalho e na estrutura física²⁹.

CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo, que partem de um assunto altamente complexo, exigem ampla reflexão e discussão, de forma a encontrar alternativas que melhor atendam à situação dos profissionais atualmente inseridos no sistema e da população que usufrui do serviço. A escassez no quadro de profissionais e a precarização das relações de trabalho repercutem diretamente no processo de consolidação do SUS e na assistência. Mudanças na composição da força de trabalho, nos processos de regulação e formação profissional, nas formas de contratação e remuneração, consistem em desafios para a avaliação e o acompanhamento das políticas de recursos humanos na saúde, como, por exemplo, a discussão de tais pontos nas Conferências Estaduais de Vigilância de Saúde, que já foram realizadas e, futuramente na Conferência Nacional de Vigilância em Saúde, que será realizada em meados de 2018, visto que tais pontos não estão claros e nem definidos nas atuais Diretrizes da Vigilância em Saúde, dificultando a execução das ações descentralizadas, em sua práxis, nos municípios.

Após a análise, acredita-se que os profissionais da Vigilância em Saúde possuem formação acadêmica deficitária, o que pode afetar a qualidade do serviço prestado. A formação e educação de profissionais de saúde devem ser tratadas como um processo permanente, que se iniciando-se durante a graduação e sendo mantida durante a carreira profissional, por meio



de parcerias entre os serviços de saúde, as instituições de ensino superior, a comunidade e outros setores da sociedade civil.

Por fim, para enfrentar esses desafios e procurar soluções para as questões levantadas, sugere-se a inserção de fóruns de discussão de recursos humanos na agenda dos gestores, reconhecimento e revisão da NOB/RH-SUS, assim como a discussão do PCCS,

avaliando-se as diferentes estruturas e realidades estaduais e municipais existentes, como já vêm sendo realizadas, respectivamente, por meio das conferências estaduais e municipais de Vigilância em Saúde, nos últimos meses do ano de 2017, para posterior discussão a nível nacional, na Conferência Nacional de Vigilância em Saúde.

REFERÊNCIAS

1. Organização das Nações Unidas - ONU. Universal declaration of human rights. [acesso 6 fev 2017]. Disponível em: <http://www.un.org/en/universal-declaration-human-rights/>
2. Brasil. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF; 1988[acesso 22 jan 2016]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm
3. Brasil. Lei Nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial União. 20 set 1990a.
4. Brasil. Lei Nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990. Dispõe sobre a participação da comunidade na gestão do Sistema Único de Saúde (SUS) e sobre as transferências intergovernamentais de recursos financeiros na área da saúde e dá outras providências. Diário Oficial União. 31 dez 1990b.
5. Nogueira RP. Avaliação de tendências e prioridades sobre recursos humanos de saúde. In: Ministério da Saúde (BR). Política de recursos humanos em saúde: seminário internacional. Brasília, DF: OPAS; 2002. p. 31-44.
6. Brasil. Conselho Nacional de Secretários de Saúde - Conass. Sistema Único de Saúde. Brasília, DF: Conass; 2007a. (Coleção Progestores: Para entender a gestão do SUS, 1).
7. Mendes TKA, Oliveira SP, Delamarque EV, Seta MH. Reestruturação da gestão das vigilâncias em saúde em Alagoas: a precarização da formação e do trabalho. *Trab Educ Saúde*. 2016;14(2):421-43. <https://doi.org/10.1590/1981-7746-sip00109>
8. Seta, MH. A construção do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária: uma análise das relações intergovernamentais na perspectiva do federalismo [tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2007.
9. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Diretrizes nacionais de vigilância em saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2010.
10. Ministério da Saúde (BR). Portaria Nº 399, de 22 de fevereiro de 2006. Divulga o Pacto pela Saúde 2006 - Consolidação do SUS e aprova as Diretrizes Operacionais do referido Pacto. Diário Oficial União. 23 fev 2006.
11. Matta GC, Morosini MVG. Atenção Primária à Saúde. In: Pereira IB, Lima JCF, orgs. Dicionário da educação profissional em saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio; 2006. p. 308.
12. Miranda AS, Carvalho ALB, Cavalcante CGCS. Subsídios sobre práticas de monitoramento e avaliação sobre gestão governamental em Secretarias Municipais de Saúde. *Cien Saúde Colet*. 2012;17(4):913-20. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232012000400013>
13. Dias HS, Lima LD, Teixeira MA. A trajetória da política nacional de reorientação da formação profissional em saúde no SUS. *Cien Saúde Colet*. 2013;18(6):1613-24. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232013000600013>
14. Peduzzi, M. Trabalho e educação na saúde: ampliação da abordagem de recursos humanos. *Cien Saúde Colet*. 2013;18(6):1535-43. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232013000600005>
15. Minayo, MCS. O desafio do conhecimento: pesquisa qualitativa em saúde. 11a ed. Rio de Janeiro: Hucitec; 2008.
16. IBM Corp. IBM SPSS for Macintosh [computer program]. Version 23.0. Armonk: IBM; 2015.
17. Ministério da Saúde (BR). Conselho Nacional de Saúde. Princípios e diretrizes para a gestão do trabalho no SUS (NOB/RH - SUS). Brasília, DF: Conselho Nacional de Saúde; 2005c.
18. Ministério da Saúde (BR). Portaria Nº 1.378, de 9 de julho de 2013. Regulamenta as responsabilidades e define diretrizes para execução e financiamento das ações de Vigilância em Saúde pela União, Estados, Distrito Federal e Municípios, relativos aos Sistema Nacional de Vigilância em Saúde e Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial União. 10 jul 2013.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Censo Visa 2004. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2005b.
20. Costa EA. Vigilância sanitária: contribuições para o debate no processo de elaboração da Agenda de Prioridades de Pesquisa em Saúde. In: Ministério da Saúde (BR). Saúde no Brasil: contribuições para a agenda de prioridades de pesquisa. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2004. p. 127-55.
21. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Gestão do Trabalho na Saúde. Departamento de Gestão da Educação na Saúde. Política de educação e desenvolvimento para o SUS: caminhos para a educação permanente em saúde: pólos de educação permanente em saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2004.
22. Ministério da Saúde (DF). Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão da Educação na Saúde. A educação permanente entra na roda: pólos de educação permanente em saúde: conceitos e caminhos a percorrer. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2005.
23. Ministério da Saúde (BR). Portaria Nº 1.996, de 20 de agosto de 2007. Dispõe sobre as diretrizes para implementação da Política Nacional de Educação Permanente em Saúde. Diário Oficial União. 22 ago 2007b.



24. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Diretrizes para a gestão da educação em vigilância sanitária na política de educação permanente do Sistema Único de Saúde. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2011.
25. Seixas PHD. Os pressupostos para a elaboração da política de recursos humanos nos sistemas nacionais de saúde In: Ministério da Saúde (BR). Política de recursos humanos em saúde: seminário internacional. Brasília, DF: Opas; 2002. p. 100-13.
26. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação geral da política de recursos humanos. Política de Recursos Humanos para o SUS: balanço e perspectivas. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.
27. Cherchiglia ML, Belisário SA. Pressupostos para a Formulação de Políticas de Recursos Humanos nos Sistemas Nacionais de Saúde. In: Brasil, Ministério da Saúde, organizadores. Política de Recursos Humanos em Saúde: seminário internacional. Brasília, DF: Opas; 2002. p. 31-44.
28. Campos GWS, Minayo MCDS, Akerman M, Carvalho YM. Tratado de saúde coletiva. São Paulo: Hucitec; 2009.
29. Trindade LL, Ferraz L, Ferraboli SF, Rubini B, Saldanha CT, Bordignon M et al. A formação profissional na orientação da assistência aos grupos vulneráveis na atenção básica. Rev Enferm UFSM. 2015;5(2):368-78. <https://doi.org/10.5902/2179769213738>

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.
Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Análise de limite de galactosamina em hexosaminas totais em amostras injetáveis de heparina sódica suína

Galactosamine limit analysis in total hexosamines in injectable porcine sodium heparin samples

Andreza da Costa de Santana*
Anna Carolina Machado Marinho
Patrícia Condé de Lima
Ozéias de Lima Leitão
Debora Alves Fonseca
Raíssa Lamin Teixeira
Claudia Maria da Conceição
Silvana do Couto Jacob

RESUMO

Introdução: A pesquisa, uma das vertentes da vigilância sanitária, tem sua importância justificada pela busca de respostas aos diversos prejuízos relativos à saúde. A heparina, produto biológico com propriedades anticoagulantes e antitrombóticas, esteve relacionada com eventos adversos entre 2007 e 2008. Diante do ocorrido, os compêndios oficiais atualizaram a monografia para matéria-prima. No entanto, há uma deficiência de monografias para avaliação do produto final. **Objetivo:** Propor método físico-químico de análise de limite de galactosamina em hexosaminas totais a partir do produto acabado de heparina sódica suína. **Método:** Foi desenvolvido método analítico a partir da cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica e detecção amperométrica, com as devidas avaliações de adequação do sistema para posterior análise de três amostras de heparina sódica suína, as quais foram previamente submetidas ao protocolo de preparo de amostra através da coluna Micro Bio-Spin™. **Resultados:** As amostras foram comparadas com a solução de adequação do sistema e matéria-prima de heparina sódica suína, sendo possível detectar presença de galactosamina em uma das três amostras analisadas em quantidade inferior ao limite estipulado pela Farmacopeia Americana. **Conclusões:** Conclui-se que o método é eficiente para análise do produto acabado e, por isso, será sugerido à Farmacopeia Brasileira.

PALAVRAS-CHAVE: Heparina; Controle de Qualidade; Cromatografia Líquida de Alta Pressão; Vigilância Sanitária

ABSTRACT

Introduction: Research, one of the core areas of health surveillance, has its importance justified by its search for answers to various health problems. Heparin, a biological product with anticoagulant and antithrombotic properties, has been related to adverse events between the years 2007-2008. Because of that, the official compendiums updated the monograph for raw material. However, there is a lack of monographs that evaluate the final product. **Objective:** The goal of this study is to propose a physicochemical method of analysis of the limits of galactosamine in total hexosamine from the finished product of porcine sodium heparin. **Method:** We developed an analytical method from the ion-exchange high performance liquid chromatography with amperometric detection, with the appropriate evaluations of the system suitability for posterior analysis of three samples of porcine sodium heparin previously submitted to the sample preparation protocol through the Micro Bio-Spin column. **Results:** The samples were compared to the solution of the system suitability and raw material of porcine sodium heparin. We could detect the presence of galactosamine in one of the three analyzed samples in lower amounts than the limit stipulated by the American pharmacopeia. **Conclusions:** We concluded that the aforementioned method is efficient for the analysis of the finished product and that is the reason why it will be suggested to the Brazilian pharmacopeia.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: andreza.santos.costa07@gmail.com

Recebido: 04 set 2017
Aprovado: 13 abr 2018

KEYWORDS: Heparin; Quality Control; High Pressure Liquid Chromatography; Health Surveillance



INTRODUÇÃO

As funções da vigilância sanitária não se restringem apenas à fiscalização do cumprimento da legislação sanitária e repreensões. A pesquisa é uma vertente pouco difundida e investida, porém sua importância se justifica na articulação das ações intersetoriais a fim de que se produza conhecimento e na busca de respostas aos diversos prejuízos relativos à saúde¹. Quando um determinado produto tem sua credibilidade e reputação fragilizada, as instituições reguladoras direcionam sua atenção para o tema com a finalidade de pesquisar o dano sanitário estabelecido². É o caso do produto biológico heparina, um dos polissacarídeos lineares com estrutura mais complexa da família dos glicosaminoglicanos, que inclui também o sulfato de condroitina (SC) e o dermatan sulfato (DS)³. A heparina possui propriedades anticoagulantes e antitrombóticas amplamente difundidas há mais de seis décadas. A extração comercial ocorre a partir da mucosa intestinal de suínos ou do tecido pulmonar de bovinos, entretanto, não são fármacos equivalentes. No final de 2007 e início de 2008, a confiabilidade deste produto biológico foi comprometida depois dos episódios relatados pela *Food and Drug Administration* (FDA), em que cerca de 350 casos de eventos adversos, devido ao uso de heparina suína fabricada pela empresa *Baxter Healthcare Corporation* nos Estados Unidos, foram registrados⁴. A investigação da composição das amostras suspeitas concluiu que existia teor de 20% de condroitina supersulfatada (OSCS) e mais de 1% em peso de DS. Autores apontam que a exposição a determinados vírus suínos desencadeia a produção de pequenas quantidades de OSCS, mas nada comparado a grande quantidade encontrada nestes lotes^{5,6}. Por meio da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) foi elucidada a estrutura da OSCS, composta por unidades repetidas dissacarídicas de ácido D-glicurônico e N-acetilgalactosamina, ligadas da forma B (1 → 3), análoga ao sulfato de condroitina, porém com um padrão peculiar de sulfatação encontrado nas posições 2 e 3 do ácido glicurônico e em 4 e 6 da N-acetilgalactosamina⁷. Sabe-se que o SC é composto de ácido D-glicurônico ligado de forma B (1 → 3) à N-acetilgalactosamina, normalmente, sua estrutura possui um grupo sulfato nas posições 4 ou 6 na porção da N-acetilgalactosamina. Enquanto que o DS tem em sua estrutura ácido L-idurônico ligado B (1 → 3) à N-acetilgalactosamina, com grupos sulfatos presentes no carbono 2 do ácido urônico e no carbono 4 da N-acetilgalactosamina. A heparina é constituída principalmente de ácido L-idurônico e N-sulfoglicosamina ligados de forma B (1 → 4), altamente substituída com resíduos O-sulfato no carbono 6 dos resíduos de glicosamina e no carbono 2 dos resíduos de ácido urônico⁸. Na época, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) liberou um informe no qual a empresa *Baxter Healthcare Corporation* notificava que os lotes envolvidos nos casos americanos não haviam sido distribuídos ou comercializados no Brasil⁹. No entanto, ficou evidente a necessidade de procurar métodos seguros que pudessem atestar mais fielmente a qualidade do produto oferecido à população, levando os compêndios oficiais a atualizarem suas monografias de heparina. Neste contexto, a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. contém monografias para heparina cálcica¹⁰ e sódica¹¹, cujo princípio ativo e finalidade são os mesmos, mas as duas são destinadas para matéria-prima e não para o produto acabado. Observa-se que as monografias pertencentes à Farmacopeia Brasileira 5ª ed.^{10,11} são semelhantes à da Farmacopeia Europeia 8ª ed.^{12,13}, na qual há ausência de métodos para a forma injetável. Em contrapartida, a Farmacopeia Americana USP39-NF34 é mais abrangente a

respeito de monografias para heparinas com formas farmacêuticas distintas: matéria-prima¹⁴ e injetável¹⁵. Entre os métodos cromatográficos abordados para a matéria-prima, encontra-se a análise de limite de galactosamina em hexosaminas totais, técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna de troca iônica e detecção amperométrica pulsada, também estudado por Itoh et al.¹⁶. Enquanto que, para heparina injetável, na Farmacopeia Americana USP39-NF34¹⁵, há ausência de métodos cromatográficos preconizados. Este fato nos mostrou a importância de desenvolver métodos, a fim de que haja abrangência no controle de qualidade tanto na matéria-prima quanto no produto acabado. O produto acabado possui peculiaridades que precisam ser avaliadas, como, por exemplo, a composição dos excipientes. Neste caso, as amostras de heparina sódica suína possuem como excipientes cloreto de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, álcool benzílico e água para injeção, destes o sal é o mais problemático quando se trata de análise por cromatografia de troca iônica. Este excipiente pode concorrer pelo sítio de interação da fase estacionária com o analito, interferindo assim na análise, por isso as amostras necessitam passar por um tratamento de dessalinização a fim de que os sais presentes na formulação sejam removidos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos propor método de análise físico-química de limite de galactosamina em hexosaminas totais a partir do produto acabado de heparina sódica suína, bem como otimizar o preparo de amostra.

MÉTODO

Padrões e reagentes

Galactosamina e glicosamina fornecidas pela *United States Pharmacopeia* (USP). Acetato de sódio, grau para análise, ácido clorídrico 37% e solução de hidróxido de sódio 50%; fornecidos pela Merck. Hidróxido de Potássio, grau para análise fornecido pela Fluka. Água foi deionizada pelo sistema de purificação Milli-Q e filtrada em filtro Millipak® Express 40 (MPGP04001).

Condições cromatográficas

O equipamento consiste de um cromatógrafo líquido de alta eficiência contendo uma bomba quaternária modelo DIONEX ICS-5000 + SP com degaseificador acoplado, um detector amperométrico pulsado junto ao forno para colunas DIONEX ICS-5000 + DC, um injetor automático DIONEX-AS AP e *software* chromeleon versão 7.0, todos do fabricante *Thermo Fisher Scientific*. Adaptações nas condições cromatográficas de Itoh et al.¹⁶, em que a fase móvel era composta de 8 mM de hidróxido de sódio (Eluição isocrática por 11 min), a etapa de limpeza foi feita com 60% de 8 mM de hidróxido de sódio e 40% de 1 M de acetato de sódio, e a etapa de equilíbrio aconteceu com 10 min de fase de eluição entre as injeções, todas as etapas permanecendo em velocidade constante de 1,0 mL/min. As amostras foram eluídas com volume de 5 µL em um sistema composto por: Pré-coluna Amino-Trap™, com dimensões de 3 x 30 mm; Pré-coluna Borate-Trap™, com dimensões de 4 x 50 mm; Coluna de troca iônica CarboPac™ PA1, com dimensões de 4 x 250 mm, mantida a 30 °C. Coluna e pré-colunas fornecidas pela Dionex. A detecção amperométrica pulsada seguiu a programação da Tabela 1.



Tabela 1. Programação da célula amperométrica de prata/ouro específica para polissacarídeos.

| Nível | Tempo (min) | Potencial (V) | Integração |
|-------|-------------|---------------|------------|
| 1 | 0,00 | +0,1 | - |
| 2 | 0,20 | +0,1 | Começo |
| 3 | 0,40 | +0,1 | Final |
| 4 | 0,41 | -2,0 | - |
| 5 | 0,42 | -2,0 | - |
| 6 | 0,43 | +0,6 | - |
| 7 | 0,44 | -0,1 | - |
| 8 | 0,50 | -0,1 | - |

min: minutos; V: volts.

Amostras e matéria-prima

Foram utilizadas três amostras injetáveis e uma matéria-prima de heparina sódica suína adquiridas junto aos produtores, com o auxílio do Núcleo Técnico de Medicamentos Biológicos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Fundação Oswaldo Cruz. As amostras foram identificadas, catalogadas e armazenadas sob refrigeração entre 6 °C e 10 °C, até o momento dos ensaios.

Preparo de solução de adequação do sistema

Para o preparo da solução de adequação do sistema foram feitas duas soluções: Solução padrão USP de 1,6 mg/mL de glicosamina em 5 N de ácido clorídrico e solução padrão USP de 1,6 mg/mL de galactosamina em 5 N de ácido clorídrico. Volumes iguais das soluções de glicosamina e galactosamina foram vertidos em um tubo de rosca, e a esta solução final é dado o nome de solução de adequação do sistema. Por último, 5 mL da solução de adequação são hidrolisados por 6 h a 100 °C, que, após arrefecimento, foram diluídos com água purificada do Tipo I na proporção de 1:100.

Preparo da matéria-prima

Foram pesadas aproximadamente 2,4 mg de matéria-prima heparina sódica suína, que foram diluídas em 1,0 mL de HCl 5 N e hidrolisadas por 6 h a 100 °C e, após arrefecidas, foram diluídas com água purificada do Tipo I na proporção de 1:100.

Preparo da amostra

Protocolo de dessalinização

A coluna Micro Bio-Spin™ 6, utilizada para remoção de sais de uma determinada amostra, por reter moléculas que possuem massa molar inferior a 6 kDa, foi utilizada para o preparo das amostras injetáveis de heparina. A coluna acondicionada em tampão necessita de uma etapa de remoção desta solução e uma etapa de adição do analito para rinsar a coluna, a fim de que não haja contaminação com a amostra. Essa coluna satura com 75 µL de volume adicionado, desta maneira, o processo de dessalinização deve ocorrer no mínimo 11 vezes para que haja volume necessário para dar prosseguimento a análise.

Hidrólise da amostra

a solução previamente dessalinizada foram vertidos 100 µL para um recipiente e então a secagem foi realizada no SpeedVac por 4 h, sem

aquecimento, com vácuo de 0,1 vac e temperatura do trap de -90 °C. Após a secagem, os tubos utilizados foram pesados e a diluição aconteceu de forma a atender a proporção da Farmacopeia Americana USP39-NF34¹⁴, cuja relação é de 12,0 mg de heparina sódica para 5 mL de 5 N de ácido clorídrico. Estas soluções foram hidrolisadas por 6 h a 100 °C e, ao esfriarem à temperatura ambiente, foram filtradas em membrana Milipore Millex 0,22 mm, em seguida diluídas com água purificada do Tipo I na proporção de 1:100.

Adequação do sistema

Resolução (Rs)

Parâmetro definido como medida quantitativa da separação de dois picos sucessivos. Para o cálculo são necessários dois fatores: a distância entre seus tempos de retenção (Tr) e a largura da base (W)¹⁷ (Equação 1).

$$R_s = \frac{2(\text{Tr})_A - (\text{Tr})_B}{(W)_A + (W)_B} \quad \text{Equação 1}$$

Eficiência ou número de pratos teóricos (N)

Parâmetro definido como equilíbrio de distribuição do soluto entre as duas fases: móvel e estacionária. Mede-se o alargamento que o sinal sofre durante a passagem do analito pelo sistema, e é um valor constante para cada pico em um cromatograma com um determinado conjunto de condições operacionais. Este parâmetro é calculado conforme Equação 2, na qual Vn é o volume de eluição do pico e W é a largura do pico na linha de base¹⁸.

$$N = \left[16 \cdot \left(\frac{V_n}{W} \right) \right]^2 \quad \text{Equação 2}$$

Fator de assimetria do pico (As)

O parâmetro mede a assimetria do pico, pois este parâmetro é inversamente proporcional à exatidão da quantificação, dificultando determinar o tempo e a posição de início e término do pico¹⁸. A Equação 3 mostra o cálculo para fator de assimetria, no qual W_{0,05} é a largura do pico a 5% da altura e f é a distância da linha vertical do sinal máximo até a linha vertical e perpendicular à linha de base que intercepta o traço a 5% da altura.

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad \text{Equação 3}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de OSCS e o alto teor de DS em uma amostra de heparina indicam má qualidade e o seu consequente descarte. Para a avaliação da presença ou ausência de OSCS e DS, pode-se utilizar o método de limite de galactosamina em hexosaminas totais. Neste método, a amostra é hidrolisada e convertida em monossacarídeos e espera-se encontrar apenas glicosaminas provenientes da estrutura da heparina, pois a galactosamina advém de impurezas como o DS e adulterantes como a OSCS. De forma relativa consegue-se quantificar o teor de galactosamina presente na amostra, a partir do sinal de glicosamina. A separação cromatográfica ocorre pelo fenômeno da troca iônica e a detecção é realizada pelas reações de oxirredução ocorridas entre



o analito e a célula do detector amperométrico pulsado a partir de diferença de potencial empregado na análise. Cabe ressaltar que o padrão necessita passar pelo mesmo processo de hidrólise para que seja submetido as mesmas condições da amostra. O método contido na Farmacopeia Americana USP39-NF34 não obteve resultados que atendessem aos critérios de adequação do sistema do próprio compêndio, por isso eles não foram mostrados neste trabalho. O método abordado por Itoh et al.¹⁶ possui semelhanças com o da Farmacopeia Americana USP39-NF34¹⁴ em relação ao preparo da amostra, que, em ambos os casos, reporta-se à matéria-prima. A Tabela 2 reúne as principais diferenças entre os métodos, que envolvem basicamente, a fase móvel e a coluna cromatográfica.

As colunas cromatográficas em questão são indicadas para separações com alta resolução de monossacarídeos e são funcionalizadas com resina trocadora de ânions de sal de amônio, no entanto a Carbo Pac PA1¹⁹ possui comprimento, diâmetro e tamanho de partícula superior aos da Carbo Pac PA20²⁰. Ao se tratar de monossacarídeos extremamente substituídos, a interação com partículas maiores é mais estabilizada do que com as menores, facilitando assim a separação cromatográfica. Segundo o fabricante do cromatógrafo líquido *Thermo*

*Fisher Scientific*²¹, o qual reproduziu o método da Farmacopeia Americana USP39-NF34¹⁴, a substituição de hidróxido de potássio por hidróxido de sódio não causaria alterações nos resultados encontrados. Sendo assim, o sucesso deste método pode ser atribuído à coluna cromatográfica e à etapa de lavagem. A Figura 1 mostra a comparação entre cinco injeções da solução de adequação do sistema com o método adaptado de Itoh et al.¹⁶, no qual foram observados tempos de retenção de aproximadamente 7,75 e 9,50 min para galactosamina e glicosamina, respectivamente. Em algumas injeções, um sinal não identificado no tempo de 1,60 min pode ser detectado. Os dados foram tratados pelo Teste de Grubbs e a injeção 3 foi descartada por apresentar valores aberrantes ($\alpha = 0,05$).

Os parâmetros de adequação do sistema para o método em questão seguiram os abordados na Farmacopeia Americana, com a finalidade de avaliar se o sistema cromatográfico está adequado para a análise. A Tabela 3 resume os dados para avaliação.

Para todos os critérios avaliados, o método foi aprovado e, portanto, apto a ser testado para as amostras. A Figura 2 mostra a comparação entre branco, solução de adequação do sistema, matéria-prima e amostras analisadas, na qual pode ser observado que o pico referente ao tempo de 1,60 min continua a ser detectado, levantando a hipótese de que pode estar relacionado com o ácido clorídrico utilizado para a hidrólise, pois se encontra não só no padrão, matéria-prima e nas amostras, como também no branco. Este pico não é detectado no trabalho de Itoh et al.¹⁶, mas foram observados sinais próximos ao volume morto nos estudos da *Thermo Fisher Scientific*²¹ e de Restaino et al.²². Nos resultados da *Thermo Fisher Scientific*²¹, em que foi reproduzido o método da Farmacopeia Americana USP39-NF34¹⁴, assim como em Restaino et al.²², o qual estudou o comportamento cromatográfico de outras espécies de polissacarídeos hidrolisados, a hidrólise ocorreu nas mesmas condições deste trabalho,

Tabela 2. Principais diferenças entre os métodos para matéria-prima de heparina sódica presentes na Farmacopeia Americana e no trabalho de Itoh et al.¹⁶.

| Diferenças | Método de heparina sódica | |
|-----------------------|--|---|
| | Farmacopeia americana USP39-NF34 ¹⁴ | Trabalho de Itoh et al. ¹⁶ |
| Coluna cromatográfica | Carbo Pac PA20 | Carbo Pac PA1 |
| Fase de eluição | Hidróxido de potássio 14 mM | Hidróxido de sódio 8 mM |
| Etapa de limpeza | Hidróxido de potássio 100 mM | 60% de hidróxido de sódio 8 mM e 40% de acetato de sódio 1 mM |

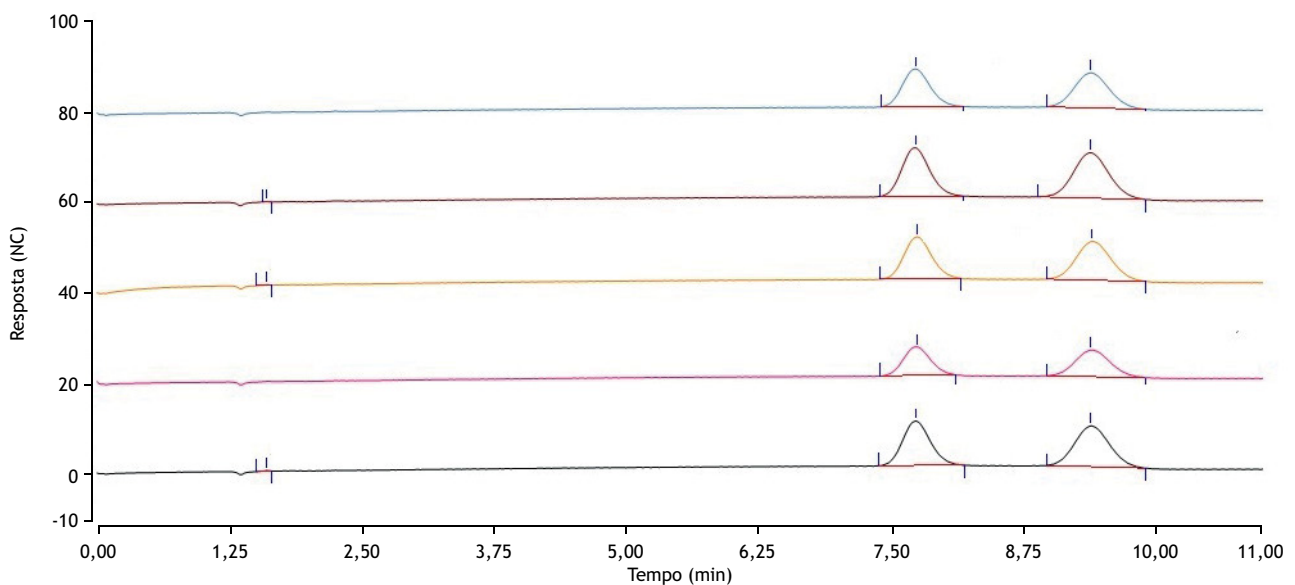


Figura 1. Resultado de cinco injeções de solução de adequação do sistema, onde o sinal em 7,75 min é referente a galactosamina e o sinal em 9,50 min referente a glicosamina.



Tabela 3. Resultado dos parâmetros de adequação do sistema para o método de limite de galactosamina em hexosaminas totais.

| Parâmetros de adequação do sistema | Critério de aceitação | Resultados obtidos para o método proposto | Observação |
|------------------------------------|--|---|------------|
| Resolução | ≥ 2 entre os picos de galactosamina e glicosamina | 3,01 | Aprovado |
| Número de pratos teóricos | ≥ 2.000 para o pico de glicosamina | 3.754 | Aprovado |
| Fator de assimetria | Entre 0,8 e 2,0 para os picos de galactosamina e glicosamina | 1,13 e 1,10 para galactosamina e glicosamina, respectivamente | Aprovado |

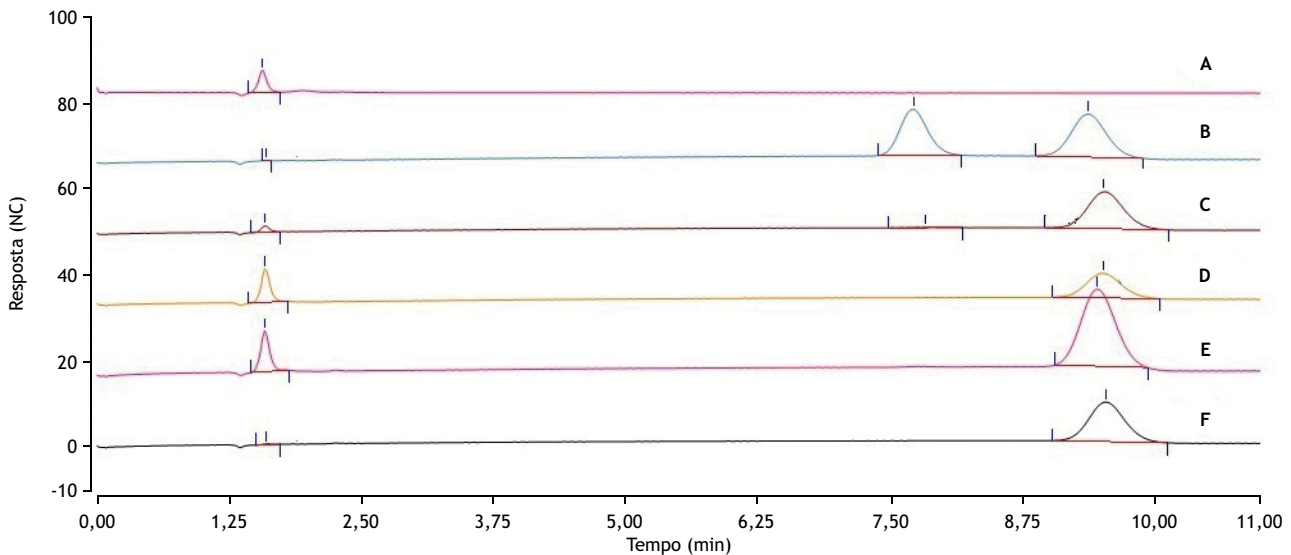


Figura 2. Comparação entre (A) Branco; (B) Solução de adequação do sistema; (C) Amostra 1; (D) Amostra 2; (E) Amostra 3; (F) Matéria-prima de heparina sódica suína.

por isso, a detecção de sinais próximos ao volume morto, como o visto em 1,60 min, pode incontestavelmente ser atribuída ao ácido clorídrico. O pico de glicosamina permanece no tempo de retenção de 9,5 min, aproximadamente, em todos os casos. Na amostra 1 foi detectado pico proveniente da galactosamina no tempo de 7,75 min e, nas amostras subsequentes, nenhum pico no tempo de retenção da galactosamina foi detectado, portanto não foi possível encontrar galactosamina dentro do limite de detecção do método que é de 0,01 mg/mL.

Seguindo o critério de aceitação visto na Farmacopeia Americana USP39-NF34¹⁴ de ≤ 1% de limite de galactosamina em hexosaminas totais, foi possível avaliar a amostra 1, na qual os resultados de cinco injeções foram tratados por teste de Grubbs ($\alpha = 0,05$) e nenhum valor aberrante foi encontrado. Os dados usados nas Equações 4 e 5 foram os resultados da média das injeções, sendo assim, $PGALACTOSAMINA/PGLICOSAMINA$ seria a razão entre a resposta de galactosamina e glicosamina na solução de adequação do sistema; $PA_{GALACTOSAMINA}$ é a área do pico de galactosamina da solução de adequação do sistema; $PM_{GALACTOSAMINA}$ é referente à massa de galactosamina da solução padrão; $PM_{GLICOSAMINA}$ seria a massa de glicosamina da solução padrão; $PA_{GLICOSAMINA}$ é a área do pico de glicosamina da solução de adequação do sistema; $AA_{GALACTOSAMINA}$ é referente à área do pico de galactosamina da solução da amostra e, por fim, $AA_{GLICOSAMINA}$ é igual à área do pico de glicosamina da solução da amostra.

$$PGALACTOSAMINA/PGLICOSAMINA = \left(\frac{PA_{GALACTOSAMINA}}{PM_{GALACTOSAMINA}} \right) \times \left(\frac{PM_{GLICOSAMINA}}{PA_{GLICOSAMINA}} \right) \quad \text{Equação 4}$$

$$\left(\frac{2,67}{0,8} \right) \times \left(\frac{3,17}{0,98} \right) = 3,38 \times 3,26 = 10,80$$

$$\text{Resultado} = \left\{ \left(\frac{AA_{GALACTOSAMINA}}{PGALACTOSAMINA/PGLICOSAMINA} \right) / \left(\frac{AA_{GALACTOSAMINA}}{PGALACTOSAMINA/PGLICOSAMINA} \right) \times AA_{GLICOSAMINA} \right\} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

$$\left\{ \left(\frac{0,03}{10,80} \right) / \left[\left(\frac{0,03}{10,80} \right) + 4,58 \right] \right\} \times 100 = 0,06\%$$

Portanto, pelo cálculo, pode-se afirmar que a amostra possui teor de galactosamina dentro do limite aceitável. De acordo com os resultados promissores vistos neste trabalho e da importância de se desenvolver métodos de análise físico-química para a heparina na forma injetável, podemos sugerir que um dos caminhos para a implementação em compêndios oficiais seria a proposta adaptada do trabalho de Itoh et al.¹⁶ para o produto acabado.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o método cromatográfico proposto para análise físico-química de amostras de heparina suína injetável possui parâmetros de adequação do sistema dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pela Farmacopeia Americana e a análise de três amostras de heparina sódica suína evidenciou a presença de galactosamina em apenas uma das apresentações, a qual obtinha teor abaixo do estabelecido pelo compêndio. Sendo considerado simples e econômico, o método será encaminhado para a Farmacopeia Brasileira como sugestão de monografia para o produto acabado.



REFERÊNCIAS

1. Fonseca EP. Novos rumos para a pesquisa em vigilância sanitária no Brasil. *Vigil Sanit Debate*. 2013;1(2):22-6.
2. Gemal AL, Teixeira CRRR, Carmo EH, Vital NC. (In) Definições sobre o componente laboratorial de vigilância sanitária no Brasil. *Vigil Sanit Debate*. 2016;4(4):5-12. <https://doi.org/10.22239/2317-269x.00772>
3. Rabenstein DL. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep*. 2002;19:312-31. <https://doi.org/10.1039/B100916H>
4. Cavalheiro Filho C, Chamone DAF, Rached RA, Maffei FH. Heparinas: momento atual. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(6):471-86. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302008000600001>
5. Kemsley, J. Tainted heparin's link to reactions. *Chem Eng News*. 2008[acesso 19 jul 2017];86(49):9. Disponível em: <http://cen.acs.org/articles/86/i49/Tainted-Heparins-Link-Reactions.html>
6. Keire DA, Trehy ML, Reepmeyer JC, Kolinski RE, Ye W, Dunn J et al. Analysis of crude heparin by ¹H NMR, capillary electrophoresis, and strong-anion-exchange-HPLC for contamination by over sulfated chondroitin sulfate. *J Pharm Biomed Anal*. 2010;51(4):921-6. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.10.017>
7. Guerrini M, Beccati D, Shriver Z, Naggi AM, Bisio A, Capila I et al. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotechnol*. 2008;26(6):669-75. <https://doi.org/10.1038/nbt1407>
8. Rosenfeld L, Prior MT, Girardi LM. Comparison of the separation of bovine heparin by strong anion exchange and by gel filtration chromatography. *Thromb Res*. 1991;64(2):203-11. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(91\)90119-H](https://doi.org/10.1016/0049-3848(91)90119-H)
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Heparina da Baxter retirada nos Estados Unidos não foi comercializada no Brasil: o medicamento foi retirado por estar relacionado a reações alérgicas. Informe SNVS/Anvisa/GFARM n° 2, de 19 de fevereiro de 2008[acesso 19 abr 2018]; Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=401931&_101_type=content&_101_groupId=33868&_101_urlTitle=informe-snvs-anvisa-gfarm-n-2-de-19-de-fevereiro-de-2008&inheritRedirect=true
10. Heparina cálcica: heparinum calcium. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. *Farmacopeia brasileira*. 5a ed. Brasília, DF: Anvisa; 2010. v. 2, p. 1017-22.
11. Heparina sódica: heparinum natricum. In: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. *Farmacopeia brasileira*. 5a ed. Brasília, DF: Anvisa; 2010. v. 2, p. 1022-27.
12. Heparina cálcica: heparinum calcium. In: Council of Europa. *European pharmacopoeia: suplemente 8.5*. 8a ed. Strasbourg: Council of Europe; 2016. p. 4339-40.
13. Heparina sódica: heparinum natricum. In: Council of Europa. *European pharmacopoeia: suplemente 8.5*. 8. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2016. p. 4341-3.
14. Heparin sodium. In: U.S. Pharmacopeia. *The United States Pharmacopeia 39*. National Formulary 34. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeia; 2016. v. 2, p. 4188-93.
15. Heparin sodium injection. In: U.S. Pharmacopeia. *The United States Pharmacopeia 39*. National Formulary 34. Rockville, MD: U.S. Pharmacopeia, 2016. v.2, p. 4188-93.
16. Itoh S, Hiruta Y, Hashii N, Fujita N, Natsuga T, Hattori T et al. Determination of galactosamine impurities in heparin sodium using fluorescent labeling and conventional high-performance liquid chromatography. *Biologicals*. 2013;41(6):355-63. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.06.002>
17. Lanças FM. *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE*. Campinas: Átomo; 2009.
18. Pallastrelli MB. *Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e sotalol [dissertação]*. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013.
19. Thermo Fisher Scientific. *Dionex™ CarboPac™ PA20 Carbohydrate Column*. 2017[acesso 19 jul 2017]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/060142>
20. Thermo Fisher Scientific. *Dionex™ CarboPac™ PA1 Carbohydrate Column*. 2017[acesso 19 jul 2017]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/057178>
21. Hurum D, Rohrer J. Determination of galactosamine-containing organic impurities in heparin by HPAE-PAD. *Application Note*. 2016;233.
22. Restaino OF, Finamore R, Diana P, Marseglia M, Vitiello M, Casillo A et al. A multi-analytical approach to better assess the keratan sulfate contamination in animal origin chondroitin sulfate. *Anal Chim Acta*. 2017;958:59-70.

Agradecimentos

À estrutura cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Ao auxílio financeiro proporcionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Validação de método analítico para o monitoramento de vitamina A em leites do Programa Viva Leite

Validation of analytical method for monitoring of vitamin A in milks from *Programa Viva Leite*

Lucile Tiemi Abe-Matsumoto^{1,*}

Angela Sueko Mikaro¹

Simone Alves da Silva^{II}

Fabiana Dognani Castro¹

Meiry Mayumi Takeda¹

Miriam Solange Fernandes Caruso^{III}

RESUMO

Introdução: A ocorrência de hipovitaminose A é evidente em determinadas populações. Com o intuito de combater essa deficiência no estado de São Paulo, foi criado um programa governamental com distribuição gratuita de leite pasteurizado enriquecido com vitaminas A, D e ferro para a população de baixa renda, com a finalidade de oferecer um complemento alimentar de alto valor nutritivo. **Objetivo:** Otimizar e validar uma metodologia analítica para determinação de vitamina A em leites fluidos, utilizando metodologia oficial da *Association of Official Analytical Chemistry (AOAC)* com modificações. **Método:** Foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência para avaliar os teores de vitamina A em 261 amostras de leites distribuídos pelo programa. **Resultados:** O método analítico validado se mostrou adequado para a determinação de vitamina A em leites fluidos na rotina do laboratório. Os resultados indicaram que 52% das amostras apresentaram concentrações de vitamina A acima do valor declarado na informação nutricional da rotulagem, enquanto 11% apresentaram teores abaixo do valor declarado. **Conclusões:** O monitoramento dos teores de vitamina A nestes leites deve ser contínuo para garantir a quantidade de micronutriente declarada no rótulo e atender os objetivos do programa.

PALAVRAS-CHAVE: Vitamina A; Validação; Leite; Programa Governamental

ABSTRACT

Introduction: There is an evidence of hypovitaminosis A in certain populations. In order to combat this deficiency in Sao Paulo State, a government program was created for free distribution of pasteurized milk enriched with vitamins A, D, and iron for the low income population for the purpose to offer a food supplement with high nutritional value. **Objective:** Optimization and validation of a methodology for the determination of vitamin A in fluid milk, using modified methodology of Association of Official Analytical Chemists (AOAC). **Method:** The high performance liquid chromatography with fluorescence detection was used to evaluate vitamin A contents in 261 milks of the program. **Results:** The validated analytical method was adequate for the determination of vitamin A in fluid milks in the laboratory routine. The results showed that 52% of the samples had vitamin A concentrations above the declared value in the nutrition facts label, while 11% presented lower content in comparison to the declared value. **Conclusions:** Monitoring of vitamin A levels in these milks should be continuous to ensure the amount of micronutrient declared on the label and to meet the objectives of the program.

KEYWORDS: Vitamin A; Validation; Milk; Governmental Program

^I Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

^{II} Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

^{III} Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

* E-mail: lucileabe@ial.sp.gov.br



INTRODUÇÃO

A vitamina A é um nutriente essencial para o funcionamento normal da visão, para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da integridade das células epiteliais, função imune e reprodução¹.

De acordo com o Ministério da Saúde (MS), a ingestão diária recomendada (IDR) de vitamina A é de 600 µg para adultos, entre 375 µg e 500 µg para lactentes e crianças, de acordo com a faixa etária, e de 800 µg e 850 µg, respectivamente, para gestantes e lactantes².

A deficiência de vitamina A é considerada uma das principais deficiências nutricionais dos países subdesenvolvidos, sendo a principal causa de cegueira evitável no mundo, estando também associada a 23% das mortes por diarreia em crianças³. No Brasil, a população infantil do Nordeste é a mais vulnerável ao problema, porém existem indicações da ocorrência de hipovitaminose A também em bolsões de pobreza na Região Sudeste^{4,5}. Com o intuito de reduzir essa deficiência, o Governo do Estado de São Paulo criou, em 1999, o Programa Viva Leite para distribuição gratuita de leite pasteurizado enriquecido com ferro e vitaminas A e D para a população de baixa renda. O programa fornece anualmente 75 milhões de litros de leite para crianças e idosos em situação de insegurança alimentar e vulnerabilidade social, atendendo atualmente cerca de 420 mil famílias⁶.

A Organização Mundial da Saúde recomenda o aleitamento materno exclusivo até os 6 meses de idade; após essa fase, alimentos complementares devem ser incluídos, mantendo o aleitamento materno pelo menos até os 2 anos de idade. O leite materno contém todas as proteínas, açúcares, gorduras, vitaminas e água que o lactente necessita para ser saudável⁷; além disso, apresenta determinados anticorpos e glóbulos brancos que oferecem imunidade neste período. Na fase adulta, o consumo de leite de vaca fornece parte desses nutrientes essenciais, suprimindo o organismo com energia, proteínas de alta qualidade e uma variedade de vitaminas e minerais, porém, o processamento térmico pode levar a perdas nutricionais, principalmente, a de vitaminas⁸.

O enriquecimento do leite com vitaminas está se tornando uma prática cada vez mais comum, e pode ser aplicado tanto para compensar as perdas nutricionais decorrentes do processamento ou para aumentar o seu valor nutritivo. O processo de enriquecimento do leite deve ser bem controlado, uma vez que a vitamina A pode ser facilmente degradada, pois é foto e termossensível, de fácil oxidação e instável em pH abaixo de 4,5. Assim, para a fortificação de alimentos, as vitaminas nas formas de ésteres, como o acetato ou o palmitato de retinol, são as mais utilizadas por serem mais estáveis em relação à sua forma livre⁹.

A padronização de metodologia analítica para a quantificação de vitaminas em alimentos é dificultada devido à diversidade de procedimentos descritos na literatura e à complexidade das matrizes existentes. Atualmente, as técnicas mais utilizadas são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores ultravioleta/visível (UV-VIS), detector de arranjo de diodos (DAD) e de fluorescência (FLU), com fases normal ou reversa^{10,11}. Nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas como a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao espectrômetro

de massas tem apresentado diversas vantagens como redução no tempo de análise, utilização de menor quantidade de solventes e maior eficiência, porém, para a maioria dos laboratórios públicos, ainda é uma técnica de alto custo¹².

A análise dos teores de vitamina A nos leites do Programa é de extrema importância para comprovar se as usinas de beneficiamento estão realizando o enriquecimento adequado do produto. Entretanto, para que os resultados sejam confiáveis, o método analítico deve ser validado seguindo uma norma oficial como a estabelecida pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro)¹³.

Os objetivos deste trabalho foram apresentar as etapas da otimização e validação da metodologia para a determinação de vitamina A em leite fluido por CLAE-FLU, bem como aplicar o método para avaliação dos leites enriquecidos do Programa Viva Leite.

MÉTODO

Amostras

As amostras de leite pasteurizado integral e leite *ultra high temperature* (UHT) desnatado utilizadas na validação do método foram adquiridas no comércio local da cidade de São Paulo.

O monitoramento do Programa Viva Leite foi realizado em 261 amostras colhidas pela Vigilância Sanitária em 12 municípios do estado de São Paulo. Os resultados de vitamina A obtidos nas análises foram comparados com os valores declarados na informação nutricional da rotulagem.

Padrões e reagentes

Para a validação da metodologia foram utilizados padrões de *all-trans*-retinol e palmitato de retinol, marca Sigma-Aldrich (St Louis, EUA), e os seguintes reagentes (grau PA): éter de petróleo e álcool etílico (96%), de marca Synth (Rio de Janeiro, Brasil); hidróxido de potássio (KOH), ácido ascórbico, pirogalol e butil hidroxil tolueno (BHT), de marca Merck (Darmstadt, Alemanha). Metanol e isopropanol, ambos de grau cromatográfico, foram obtidos da marca Carlo Erba (Milão, Itália).

Otimização da metodologia

Inicialmente, foram avaliadas as condições cromatográficas de separação e de detecção do padrão de *all-trans*-retinol por CLAE-FLU. O método da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC)¹⁴ estabelece o sistema de cromatografia líquida em fase normal, porém optou-se pelo sistema de fase reversa devido à utilização de solventes menos tóxicos. Assim, foram testadas fases móveis compostas de metanol com diferentes proporções de água até a obtenção de um pico com boa resolução. As condições de saponificação também foram otimizadas, avaliando-se diferentes temperaturas e tempos de saponificação na tentativa de redução deste tempo estabelecido pelo método da AOAC (18 h). Foi ainda otimizado o processo de extração, utilizando-se menor volume de amostra e, conseqüentemente,



menor consumo de solventes orgânicos em relação ao método da AOAC. Além disso, verificou-se o uso dos antioxidantes BHT, pirogalol e ácido ascórbico com o objetivo de selecionar o mais eficiente, avaliando-se a porcentagem de recuperação do padrão de *all-trans*-retinol adicionado na amostra de leite pasteurizado integral.

Metodologia proposta

A metodologia utilizada fundamentou-se na descrita pela AOAC¹⁴, com as modificações descritas anteriormente, de acordo com as seguintes etapas:

Saponificação e extração: Em tubos de polietileno com capacidade para 25 mL, foram pipetados 2 mL de amostra, 3 mL de KOH (3,8 mol.L⁻¹), 2 mL de álcool etílico e 1 mL de BHT (0,1% em álcool etílico). Os tubos foram agitados por 2 min em agitador do tipo vórtex (modelo QL-901, marca Biomixer, Ribeirão Preto, Brasil) e colocados em repouso por 16 h ao abrigo da luz, para completa saponificação dos ésteres. Após a saponificação, adicionou-se 10 mL de éter de petróleo, 10 mL de água, agitou-se por 30 s em agitador tipo vórtex; após a agitação, 1 mL de etanol foi acrescentado. Os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm por 10 min (centrífuga modelo NT 812, marca Novatécnica, Piracicaba, Brasil), a fase etérea foi transferida para um frasco de vidro com auxílio de micropipeta e o processo de extração foi repetido por mais duas vezes, com exceção da adição de água. O solvente foi completamente evaporado em concentrador de amostras (modelo TE-019-E3, marca Tecnal, São Paulo, Brasil) com aquecimento máximo até 45°C sob fluxo de nitrogênio. As amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol, filtradas em membranas PTFE de 0,45 µm (Millipore Corp., Bedford, MA, EUA), transferidas para *vial* âmbar e analisadas no mesmo dia por CLAE.

Análise cromatográfica: A determinação de vitamina A foi realizada em cromatógrafo a líquido marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto de bomba LC-20AT, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20A e detector de fluorescência RF-10AXL (comprimentos de onda de excitação 325 nm e de emissão 480 nm). Foi utilizada coluna de fase reversa LiChrospher 5 RP18 (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm) com coluna de guarda LiChrospher 5 RP18 (25 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), marca Varian (Palo Alto, EUA); como fase móvel foi empregado 100% de metanol, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático; o volume de injeção foi de 20 µL e temperatura do forno (coluna) de 28°C.

Uma solução estoque do padrão foi preparada na concentração aproximada de 5.000 ng.mL⁻¹ em isopropanol; a correção do valor da concentração foi realizada por análise espectrofotométrica, com leitura da absorbância a 324,5 nm (Espectrofotômetro UV/Vis modelo 8453, Hewlett Packard, Palo Alto, EUA), utilizando a Lei de Lambert-Beer, representada pela seguinte fórmula:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Onde:

A = absorbância da vitamina A no comprimento de onda de 324,5 nm
ε = absorvidade molar da vitamina A (ε = 5.460 L.mol⁻¹.cm⁻¹)¹⁴
b = caminho óptico (1 cm)
c = concentração molar da vitamina A na solução (mol.L⁻¹)

Validação da metodologia

A validação da metodologia foi realizada de acordo com o documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos, da Coordenação Geral de Acreditação, Inmetro¹³. Foram determinados os seguintes parâmetros de desempenho:

Seletividade: Amostras de leite pasteurizado e leite UHT desnatado foram fortificadas com o padrão de *all-trans*-retinol em três níveis de concentração: 594,3; 1.816,4; 3.527,3 ng.mL⁻¹ (leite pasteurizado) e 284,3; 1.137,1; 3.411,5 ng.mL⁻¹ (leite UHT). Foram comparados os resultados obtidos das matrizes fortificadas com a solução padrão de *all-trans*-retinol preparada em metanol. As curvas analíticas dos três grupos foram construídas e o efeito das matrizes leite pasteurizado e leite UHT desnatado foram verificados através da comparação visual da inclinação das retas e pelo teste t de Student.

Linearidade e faixa de trabalho: O estudo da linearidade foi realizado com seis níveis de concentração, entre 200 e 5.000 ng.mL⁻¹, utilizando-se padrão de *all-trans*-retinol. As soluções padrão foram preparadas em metanol, em triplicata, para a obtenção da equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Foi aplicado o teste de Grubbs em cada nível para verificar valores aberrantes e o teste de Cochran para avaliar a homogeneidade das variâncias ou homocedasticidade dos resíduos.

Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ): O primeiro ponto da curva de calibração foi estabelecido como o limite de quantificação. Uma vez estabelecido o LQ, esse valor foi confirmado por meio da análise de amostras independentes no mesmo nível de concentração, com seis replicatas de leite UHT desnatado fortificadas com padrão de *all-trans*-retinol. O teste de Grubbs foi aplicado para avaliar resultados aberrantes. O LD foi estabelecido a partir do LQ utilizando-se a fórmula: LD = LQ/3,3.

Exatidão: A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação dos padrões adicionados nas matrizes leite integral pasteurizado e leite UHT desnatado. As análises foram realizadas em triplicata com o padrão de *all-trans*-retinol, em três níveis de concentração: 594,3; 1.816,4; 3.527,3 ng.mL⁻¹ (leite pasteurizado) e 284,3; 1.137,1; 3.411,5 ng.mL⁻¹ (leite UHT). O critério de aceitação para a recuperação foram valores entre 95% e 105%.

Precisão: Para a repetitividade, foram utilizados os resultados obtidos no ensaio de exatidão para amostras fortificadas, calculando-se o desvio-padrão para cada nível de concentração e o desvio-padrão relativo (RSD). Valores de RSD inferiores a 10% atenderam ao critério de repetibilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização da metodologia

A otimização foi iniciada pelas condições cromatográficas de separação e de detecção do padrão de *all-trans*-retinol por CLAE-FLU. Inicialmente, utilizou-se fase móvel metanol:água



(95:5, v/v), porém, nestas condições, o pico cromatográfico do retinol apresentou uma cauda. Ao utilizar 100% de metanol como fase móvel, os resultados mostraram-se satisfatórios, com boa eficiência do pico cromatográfico (Figura 1). Para manter a eficiência da coluna, foi realizada semanalmente uma limpeza no sistema cromatográfico utilizando solução composta por metanol:acetonitrila:ácido acético 2% (35:35:30, v/v/v), com fluxo de 1 mL.min⁻¹ durante 45 min.

A extração de vitamina A em alimentos normalmente requer uma etapa adicional de saponificação antes da extração com solvente orgânico. O processo de saponificação permite o rompimento das ligações dos ésteres na matriz lipoproteica, com liberação de ácidos graxos, glicerol, fosfolipídeos e outras moléculas. As vitaminas lipossolúveis como a vitamina A encontram-se nas frações insaponificáveis e, com este procedimento, as formas esterificadas da vitamina A são convertidas em formas alcoólicas livres, permitindo a quantificação. Por outro lado, pode ocorrer degradação destas vitaminas, dependendo das condições de saponificação, ou ainda, pela presença de impurezas nos solventes utilizados na extração¹⁵. De acordo com o método descrito na AOAC¹⁴, recomenda-se 18 h, à temperatura ambiente, para a saponificação dos ésteres de vitamina A. Por ser um período de tempo relativamente longo, foram realizadas tentativas de redução do tempo com o aumento

da temperatura: foram avaliados cinco diferentes tempos (30, 45, 60, 90 e 120 min) a 45°C, utilizando-se amostras de leite pasteurizado integral enriquecidos com padrão de palmitato de retinol. Os resultados de vitamina A foram comparados com os valores obtidos pela saponificação em temperatura ambiente durante 16 h. Quanto maior a área do pico cromatográfico do palmitato de retinol, menor a conversão deste para a sua forma livre, ou seja, menor a eficiência da condição estabelecida para a saponificação. Comparando-se as áreas dos picos cromatográficos de retinol livre e do palmitato de retinol, verificou-se que apenas na amostra saponificada por 16 h houve conversão do palmitato para a forma livre numa proporção superior a 99%.

Foram ainda avaliados os antioxidantes BHT, pirogalol e ácido ascórbico, ao se realizar análises de recuperação do padrão de *all-trans*-retinol adicionado na amostra de leite pasteurizado integral, após 16 h de saponificação, e verificar a atividade de proteção da vitamina A. A maior recuperação foi observada no ensaio utilizando-se o BHT (98%), seguido do ácido ascórbico (85%) e, por último, o pirogalol (80%). O uso do ácido ascórbico ocasionou efervescência da amostra durante a agitação, favorecendo a perda do analito e, assim como o pirogalol, ambos não ofereceram proteção adequada da vitamina A, provavelmente por apresentarem características hidrossolúveis¹⁵.

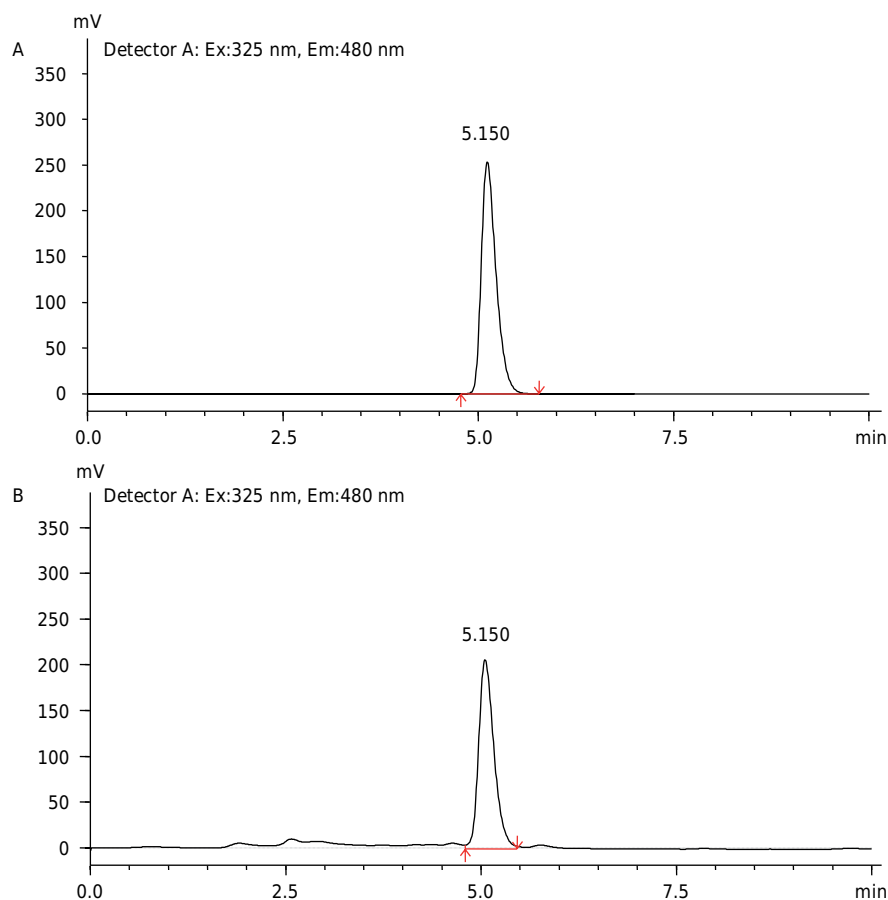


Figura 1. Cromatogramas da solução padrão de *all-trans*-retinol a 1.800 ng.mL⁻¹ em metanol (A) e do extrato de amostra de leite pasteurizado enriquecido com vitamina A em metanol (B). Condições cromatográficas: coluna C18 (250 mm x 4,6 mm; 5µm); fase móvel: 100% metanol; fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático.



Validação

Seletividade: A análise visual das inclinações das retas dos resultados obtidos com as matrizes (leite pasteurizado e leite UHT desnatado) fortificadas com o padrão de *all-trans*-retinol indicou que, aparentemente, não havia interferência de matriz; isto foi confirmado estatisticamente pelo teste *t* de *Student* para os coeficientes angulares. Os valores de *t* calculados ($t_{\text{calc leite UHT}} = 0,362$ e $t_{\text{calc leite pasteurizado}} = 1,014$) foram menores do que os tabelados ($t_{\text{tab leite UHT e pasteurizado}} = 2,069$), com confiança de 95%.

Como os resultados mostraram que não existia interferência de matriz, os cálculos para estudos de linearidade, LD e LQ, precisão e exatidão foram realizados usando a curva de calibração sem a matriz.

Linearidade e Faixa de Trabalho: Em cada nível de concentração, foi aplicado o teste de *Grubbs* e foi verificada a ausência de valores aberrantes.

Na curva de calibração, foi possível avaliar a dispersão das medidas em função da concentração; uma vez que a condição de variância seja uniforme, é chamada homocedasticidade. Para verificar se o sistema é homocedástico (variâncias iguais) ou heterocedástico (variâncias diferentes), foi aplicado o teste de *Cochran*. O valor de C_{calc} foi de 0,50 para um C_{tab} de 0,61 (triplicata em seis níveis de concentração, com confiança de 95%), confirmando que o sistema é homocedástico, ou seja, possui variâncias semelhantes ao longo da faixa de trabalho. O gráfico de resíduos da curva analítica de calibração apresentou distribuição aleatória, livre de tendências.

O coeficiente de determinação (R^2) forneceu um indicativo de quanto a reta pode ser considerada como modelo matemático, uma vez que o valor encontrado foi de 0,9997, próximo de 1, indicando que o método foi linear dentro da faixa de trabalho proposta.

LD e LQ: O primeiro ponto da curva de calibração ($215,0 \text{ ng.mL}^{-1}$) foi estabelecido como o limite de quantificação. Os resultados das análises das seis replicatas de leite UHT desnatado fortificadas com padrão de *all-trans*-retinol neste nível de concentração não apresentaram valores aberrantes, pois, no teste de *Grubbs*, valores de *G* calculados (1,685 e 1,045) foram menores do que o tabelado (2,126, com 95% de confiança). O RSD foi inferior a 10%, indicando que o método possui precisão adequada, ou seja, é repetitivo. O limite de detecção foi calculado pela fórmula $LD = LQ/3,3$, resultando em um valor de $65,1 \text{ ng.mL}^{-1}$.

Exatidão: Os resultados dos ensaios de recuperação de vitamina A adicionada nas matrizes estão apresentados na Tabela, e as porcentagens de recuperação da adição de *all-trans*-retinol em todos os níveis apresentaram-se dentro do critério estabelecido, com valores entre 95% e 110%, indicando uma recuperação adequada.

Precisão: Para o estudo da repetibilidade, foram utilizados os resultados obtidos no teste de recuperação de amostras fortificadas, calculando-se o desvio-padrão para cada nível de

concentração e o desvio-padrão relativo. Concluiu-se que o método atende ao critério de repetibilidade estabelecido em toda a faixa de trabalho, apresentando RSD inferiores a 10% (Tabela).

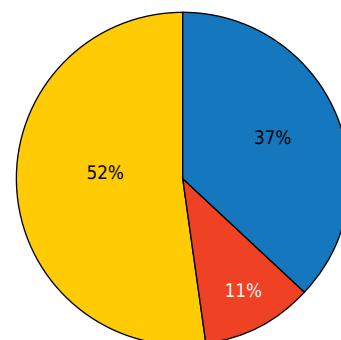
Análise de vitamina A em leites enriquecidos

O teor de vitamina A declarado na informação nutricional da rotulagem das amostras de leite pasteurizado é $120 \mu\text{g}$ equivalentes de retinol (ER) em 200 mL, porção correspondente a um copo. Segundo a Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/MS (Anvisa/MS), referente à informação nutricional de alimentos embalados, admite-se uma tolerância de 20% com relação aos valores declarados no rótulo, tornando aceitáveis resultados analíticos de vitamina A entre 96 e $144 \mu\text{g}$ ER na porção¹⁶. A Figura 2 representa as porcentagens das amostras com teores de vitamina A em conformidade, acima e abaixo dos valores declarados na informação nutricional da rotulagem.

Tabela. Ensaios de recuperação e desvio-padrão relativo (RSD) da vitamina A em leites pasteurizado integral e ultra high temperature (UHT) desnatado.

| Matriz (Vitamina A em ng.mL^{-1}) | Padrão adicionado (ng.mL^{-1}) | Recuperação (%) | RSD (%) |
|---|---|-----------------|---------|
| Leite pasteurizado integral (768,9)* | 594,3 | 101,1 | 5,2 |
| | 1.816,4 | 100,3 | 5,6 |
| | 3.527,3 | 104,5 | 5,1 |
| Leite UHT desnatado (53,7)* | 284,3 | 107,9 | 2,4 |
| | 1.137,1 | 105,3 | 3,3 |
| | 3.411,5 | 100,2 | 6,2 |

* Concentrações de vitamina A analisadas nas matrizes sem adição de padrão; análises realizadas em triplicata, em cada nível de fortificação, com adição de padrão de *all-trans*-retinol.



- Amostras em conformidade com a legislação 37%
- Amostras com teores de vitamina A abaixo dos valores declarados 11%
- Amostras com teores de vitamina A acima dos valores declarados 52%

Figura 2. Porcentagens das amostras de leite pasteurizado analisadas, com teores de vitamina A em conformidade, acima e abaixo dos valores declarados na informação nutricional da rotulagem.



Das 261 amostras analisadas, 136 (52%) apresentaram teores de vitamina A acima do valor declarado, sendo que, em 51% delas, os valores estavam entre 144 e 200 µg ER, em 48% entre 200 e 300 µg ER e uma amostra apresentou teor acima de 300 µg ER na porção.

Observou-se uma quantidade significativa de amostras com teores de vitamina A acima do valor declarado, o que provavelmente ocorre porque o leite já possui naturalmente uma quantidade da vitamina. Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo (TBCA-USP)¹⁷, a concentração de vitamina A em leite integral pasteurizado situa-se entre 42 e 54 µg ER em 100 mL. Essas concentrações podem variar de acordo com a alimentação, raça e qualidade genética dos animais, além das condições ambientais em que os animais se desenvolvem¹⁸. Muitas usinas beneficiadoras provavelmente ignoram a quantidade de vitamina pré-existente no leite e adicionam o micronutriente com o intuito de obter um valor próximo ao declarado na rotulagem.

A Resolução RDC nº 360/2003 da Anvisa/MS estabelece que, para produtos que contenham micronutrientes em quantidade superior à tolerância de 20%, a empresa responsável deve manter a disposição os estudos que justifiquem tal variação¹⁶. A mesma observação em relação à sobredosagem de micronutrientes é verificada na Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998, da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do MS: Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais¹⁹. Sendo assim, seria permitida uma sobredosagem de vitamina A, pois esta é suscetível à degradação quando exposta à luz, a altas temperaturas e ao oxigênio¹⁵. Esta sobredosagem de vitamina A encontrada nas amostras analisadas provavelmente tem como objetivo garantir as concentrações do micronutriente declaradas até o prazo final de validade do produto, prevenindo sua possível degradação.

A RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005, da Anvisa/MS, estabelece os valores de ingestão diária recomendada considerando a necessidade de orientar consumidores e produtores de alimentos sobre os valores recomendados de proteínas, vitaminas e minerais². A IDR corresponde à quantidade de nutrientes a serem consumidos diariamente para atender as necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia e foram estabelecidos com base nas referências da *Food and Agriculture Organizations of the United Nations* (FAO) e do *Institute of Medicine* (IOM)^{2,20,21}. Além das recomendações de ingestão, o IOM estabelece ainda o limite superior tolerável de ingestão (*tolerable upper intake level* - UL) para alguns micronutrientes. O UL é o valor mais alto de ingestão diária continuada de um nutriente que aparentemente não oferece risco de efeito adverso à saúde para a maioria dos indivíduos de um determinado grupo²¹.

Os níveis de vitamina A acima do valor declarado observados nestes leites provavelmente não representam riscos à saúde, pois o limite superior tolerável de vitamina A é de 3.000 µg ER por dia para um adulto saudável, de acordo com o IOM²¹. Dificilmente se alcançaria esta dose limite de vitamina A com o consumo dos leites pasteurizados, pois a população que se beneficia deste Programa é de baixa renda, na maioria dos casos, sem acesso a uma alimentação nutricionalmente adequada.

A quantidade de vitamina A estabelecida para os leites deste Programa (120 µg ER por porção) corresponde a 20% da IDR de vitamina A para um adulto saudável e cerca de 24% para crianças¹⁹. O intuito deste Programa é oferecer um alimento nutritivo para uma população com tendência à desnutrição, portanto a vitamina A deve ser adicionada no leite na quantidade mínima estabelecida.

Em relação às amostras que apresentaram concentrações de vitamina A abaixo do valor declarado, o menor valor encontrado foi de 63,0 µg ER na porção. Baixos teores de vitamina A podem ser decorrentes da falta de homogeneização durante o processo de incorporação do *mix* de nutrientes, ou pela ausência de enriquecimento do produto, ou mesmo pela sua degradação.

CONCLUSÕES

O método analítico otimizado e validado estabelecido para a determinação de vitamina A em leites fluidos demonstrou possuir seletividade, precisão e exatidão, permitindo obter resultados confiáveis nas análises laboratoriais de rotina.

A aplicação do método na análise dos leites pasteurizados enriquecidos indicou que 52% das amostras apresentaram sobredosagem de vitamina A, porém, estes níveis não representam riscos à saúde do consumidor, tendo em vista que este leite é distribuído para a população de baixa renda com tendência à desnutrição.

Os resultados das análises de vitamina A abaixo do valor declarado observados nas amostras podem indicar ausência de enriquecimento ou falta de controle durante o processo. A falta de enriquecimento por parte das usinas é um fato alarmante e deve ser tratado com atenção pelos órgãos de Vigilância Sanitária, pois isto compromete o objetivo do programa do governo, que visa reduzir a deficiência de vitamina A na população carente.

A vitamina A é essencial ao sistema imunológico, visual e para a manutenção das funções celulares. Logo, o monitoramento dos teores desta vitamina em leites enriquecidos deve ser constante, incluindo ações corretivas para sanar as eventuais falhas no processo de enriquecimento e garantir a oferta de um produto adequado para a população beneficiada pelo Programa.

REFERÊNCIAS

1. Mahan LK, Escott-Stump S. Krause alimentos, nutrição e dietoterapia. 12a ed. São Paulo: Elsevier; 2010.
2. Ministério da Saúde (BR). Resolução RDC Nº 269, de 22 de setembro de 2005. A Agência Nacional de Vigilância

Sanitária aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Diário Oficial União. 23 set 2005.



3. Queiroz D, Paiva AA, Pedraza DF, Cunha MA, Esteves GH, Luna JG et al. Deficiência de vitamina A e fatores associados em crianças de áreas urbanas. *Rev Saúde Pública*. 2013;47(2):248-56. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047002906>
4. Pedraza DF, Rocha ACD. Deficiências de micronutrientes em crianças brasileiras assistidas em creches: revisão da literatura. *Cienc Saúde Coletiva*. 2016;21(5):1525-44. <https://doi.org/10.1590/1413-81232015215.20712014>.
5. Chiu M, Dillon A, Watson S. Vitamin A deficiency and xerophthalmia in children of a developed country. *J Paediatr Child Health*. 2016;52(7):699-703. <https://doi.org/10.1111/jpc.13243>
6. Secretaria de Desenvolvimento Social (São Paulo). Programas da Secretaria de Desenvolvimento Social: Viva leite. 2017[acesso 25 ago 2017]. Disponível em: <http://www.desenvolvimentosocial.sp.gov.br/portal.php/vivaleite>
7. World Health Organization - WHO. The optimal duration of exclusive breastfeeding: Report of the expert consultation. Geneva: World Health Organization; 2001.
8. Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. A importância do consumo de leite no atual cenário nutricional brasileiro. [S.l.]: Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição; 2015[acesso 22 ago 2017]. Disponível em: <http://bit.ly/2k4gyZ6>
9. Marques MF, Marques MM, Xavier ER, Gregório EL. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. *HU Revista*. 2012;38(1-2):29-36.
10. Yeh EB, Barbano DM, Drake M. Vitamin fortification of fluid milk. *J Food Sci*. 2017;82(4):856-64. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13648>
11. Woolard DC, Bensch A, Indyk H, McMahon A. Determination of vitamin A and vitamin E esters in infant formulae and fortified milk powders by HPLC: use of internal standardization. *Food Chem*. 2016;197(Pt A):457-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.077>
12. Plozza T, Trenerry VC, Caridi D. The simultaneous determination of vitamins A, E and B-carotene in bovine milk by high performance liquid chromatography: ion trap mass spectrometry (HPLC-MSⁿ). *Food Chem*. 2012;134(1):559-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.121>
13. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro. DOQ-CGCRE-008 revisão 05: Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; 2016[acesso 06 mar 2018]. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf
14. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 18 ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists; 2005.
15. Ball GFM. Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability. Boca Raton: CRC Press; 2006.
16. Ministério da Saúde (BR). Resolução RDC Nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados tornando obrigatória a rotulagem nutricional. *Diário Oficial União*. 26 dez 2003.
17. Tabela brasileira de composição de alimentos: Versão 5.0, 2008[acesso 25 jul 2017]. Disponível em: http://www.fcf.usp.br/tabela/buscar_alim.asp
18. Faria GHF, Vieira DAP, Machado SS. Comparação da composição do leite em diferentes espécies: uma revisão. *Cad Educ Tecnol Soc*. 2008;1(1):104-8. <https://doi.org/10.14571/cets.v1i1.134>
19. Ministério da Saúde (BR). Portaria Nº 31, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais, constante do anexo desta Portaria. *Diário Oficial União*. 16 jan 1998.
20. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, World Health Organization - WHO. Human vitamin and mineral requirements. Rome: Food and Nutrition Division; 2001.
21. The National Academies of Sciences Engineering Medicine. Dietary reference intakes tables and application. Washington, DC: National Academy of Sciences; 2017[acesso 22 ago 2017]. Disponível em: <http://www.nationalacademies.org/DRIs>

Agradecimentos

À Célia Maria Gaudêncio e à Roberta Francese Paiva, pelo auxílio técnico prestado na execução deste trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada. Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Sistemas microfisiológicos compostos por organoides humanos em dispositivos microfluídicos: avanços e desafios

Microphysiological systems composed of human organoids in microfluidic devices: advances and challenges

RESUMO

Talita Miguel Marin*

Eduardo Pagani

Introdução: Modelos com maior capacidade preditiva e que produzam resultados a custos mais baixos e em prazos menores são necessários para o desenvolvimento de fármacos. Os sistemas microfisiológicos (SMF) que cultivam tecidos humanos em histoarquitetura tridimensional (3D) apresentam-se como alternativas promissoras para esses objetivos. **Objetivo:** Este trabalho de revisão tem por objetivo abordar o estado da arte mundial do desenvolvimento dos SMF e ilustrar a experiência brasileira inicial com essa tecnologia. **Métodos:** A pesquisa e coleta de dados abrangendo a temática “Sistemas Microfisiológicos”, e os subtemas “Dispositivos Microfluídicos” e “Cultura 3D de Células Humanas”, foi baseada em busca eletrônica no Portal de Periódicos Capes, nas bases de dados científicas Scopus, PubMed e *Science Direct* e utilizando a ferramenta de busca Google Scholar. **Resultados:** Dentre os sistemas microfisiológicos existentes, os que são caracterizados pelo cultivo de tecidos humanos organizados em histoarquitetura tridimensional em dispositivos microfluídicos foram recentemente introduzidos, como sendo os mais promissores. Além disso, entre os anos 2000-2017, registramos aumentos de aproximadamente 12, 985 e 380 vezes no número de publicações acadêmicas relacionadas às áreas de Microfluídica, *Organ-on-a-Chip* e SMF respectivamente, ilustrando o impacto dessa tecnologia atualmente. **Conclusões:** Essa tecnologia relativamente recente tem alto potencial para superar as limitações dos modelos experimentais *in vitro* atuais.

PALAVRAS-CHAVE: *Human-On-a-Chip*; Organoides; *Disease-on-a-Chip*; iPSC; Sistemas Microfisiológicos

ABSTRACT

Introduction: Models with higher predictive capacity and able to produce results at lower costs and in shorter times are needed for drug development. The microphysiological systems (MPS) that cultivate human tissues in three-dimensional histoarchitecture (3D) are promising alternatives for these objectives. **Objective:** This review work aims to address the state of the art of SMF development and illustrate the initial Brazilian experience with this technology. **Method:** The research and data collection covering the theme “Microphysiological Systems”, and the subtopics “Microfluidic Devices” and “3D Culture of Human Cells”, was based on electronic search in Capes Journals Portal, scientific databases Scopus, PubMed and Science Direct and with the Google Scholar search tool. **Results:** Among the existing microphysiological systems, those that are characterized by the culture of human tissues organized in three-dimensional histoarchitecture in microfluidic devices were recently introduced, as being the most promising ones. In addition, between the years 2000-2017, we recorded approximately increases of 12, 985 and 380 times in the number of academic publications related to the areas of Microfluidics, *Organ-on-a-Chip* and MPS respectively, illustrating the impact of this technology today. **Conclusions:** This relatively recent technology has high potential to overcome the limitations of current *in vitro* experimental models

Centro Nacional de Pesquisa em
Energia e Materiais (CNPem),
Campinas, SP, Brasil

*E-mail: talita.marin@lnbio.cnpem.br

Recebido: 30 set 2017
Aprovado: 25 abr 2018

KEYWORDS: Human-on-a-Chip; Organoids; Disease-on-a-chip; iPSC; Microphysiological Systems



INTRODUÇÃO

Os testes pré-clínicos na pesquisa médica/biológica e no desenvolvimento de fármacos frequentemente não predizem com acurácia as respostas observadas em seres humanos, levando a altas taxas de atrito¹. A agência federal americana *Food and Drug Administration* (FDA) estima que 92% dos medicamentos aprovados em testes com animais falham em seres humanos. Os modelos animais garantem acesso à fisiologia sistêmica incluindo a distribuição e metabolização em vários tecidos, à resposta do sistema imune, à influência dos microambientes e das barreiras e interações órgão-órgão, bem como às respostas comportamentais. No entanto, já foi demonstrado que a distância filogenética entre humanos e animais (por exemplo: ilustrada por alterações ou diferenças proteômicas) diminuem seu poder preditivo^{2,3,4,5,6}. Portanto, é clara a necessidade de modelos com maior capacidade preditiva e que também reduzam o tempo e os custos do desenvolvimento de substâncias ou produtos pertencentes a diversos setores industriais tais como fármacos, produtos alimentícios, cosméticos, sanitizantes e produtos agropecuários para citar alguns exemplos.

Atualmente, a quase totalidade dos testes de segurança exigidos pelas autoridades regulatórias para fármacos é realizada em animais. As poucas exceções não são suficientes ao cumprimento da regulamentação exigida^{7,8}. Os métodos *in silico* (simulações computacionais) já estão disponíveis no Brasil com o apoio da Rede Nacional de Métodos Alternativos⁹ (RENAMA). Esses métodos são úteis para a avaliação de viabilidade, mas insuficientes para o desenvolvimento e registro de produtos inovadores, exigindo métodos experimentais *in vivo* ou o desenvolvimento de alternativas *in vitro*. Os dispositivos microfluídicos ou *chips*, que combinam tecidos humanos em um arranjo tridimensional e condições estáveis de homeostase, podem se tornar a solução para esse problema¹⁰. Na maioria das vezes, células humanas cultivadas em duas dimensões não conseguem recapitular de forma adequada e nem abranger todos os aspectos funcionais dos tecidos, bem como das interfaces tecido-tecido e da dinâmica dos órgãos do corpo humano^{11,12,13,14,15}. Tecidos modelados a partir de células humanas em microdispositivos podem melhorar a acurácia preditiva de estudos pré-clínicos de eficácia e segurança de medicamentos, cosméticos e outras substâncias ou produtos relacionados ao uso em humanos^{11,12,15,16}.

O princípio dos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*) foi desenvolvido em 1959 por Russell e Burch¹⁷, propiciando a consolidação dos métodos alternativos. O termo “métodos alternativos” pode ser definido como abordagens que tenham um ou mais dos seguintes desfechos: 1) métodos que induzam a redução do número de animais experimentais usados em determinado procedimento ou redução para o mínimo necessário. 2) refinamento da metodologia que culmine com a redução significativa da dor ou desconforto sofrido pelos animais. 3) métodos que não utilizem animais - substituição completa de animais em determinado procedimento ou avaliação¹⁸.

A crescente pressão ética e política sobre a implementação de ações que objetivassem a substituição do uso de animais de experimentação deu origem à adoção, em 2009, pela União Europeia, do requisito regulamentar que prevê a avaliação de

segurança de ingredientes cosméticos através de testes que não usem animais¹⁹. Em 2013, a União Europeia banuiu oficialmente o uso de animais para pesquisas de desenvolvimento de cosméticos - ingredientes e produtos acabados - comercializados no bloco²⁰.

Essas ações representaram um grande incentivo ao desenvolvimento e à adoção de métodos alternativos no mundo e no Brasil. O empenho e compromisso brasileiros com a promoção, a implementação, o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos ao uso de animais propiciou a criação da RENAMA, em julho de 2012 pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) e em setembro de 2012, do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), uma parceria entre a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz). Estas foram as primeiras parcerias na América Latina com o intuito de coordenar ações que pudessem propiciar a redução, refinamento ou substituição do uso de animais de experimentação no Brasil²¹. Neste sentido, o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), um dos três Laboratórios Centrais da RENAMA (LNBio, Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia [Inmetro] e INCQS) iniciou em 2015 o projeto *Human-on-a-Chip* visando a implementação e nacionalização da tecnologia baseada em sistemas microfisiológicos (SMF), com perspectivas de futuros desdobramentos que possam vir ao encontro do princípio dos 3Rs.

Este trabalho de revisão aborda o estado da arte mundial do desenvolvimento dos SMF, com ênfase nos que cultivem organoides humanos sob microfluídica, e ilustra a experiência brasileira inicial com essa tecnologia.

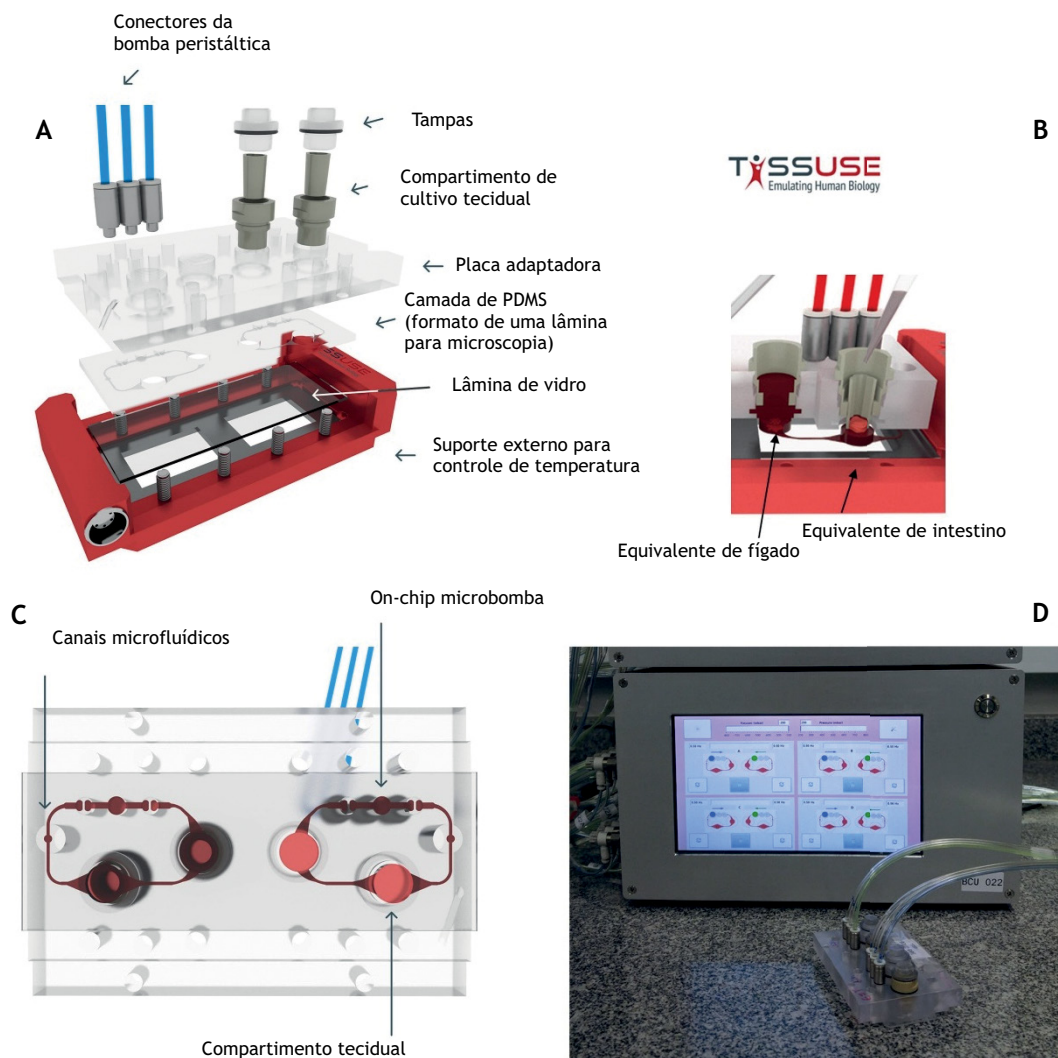
MÉTODO

A pesquisa e coleta de dados que abrangeu o tema “Sistemas Microfisiológicos”, bem como os subtemas “Dispositivos Microfluídicos” e “Cultura 3D de Células Humanas” (3D = tridimensionais), foi realizada eletronicamente no Portal de Periódicos Capes, nas bases de dados científicas Scopus, PubMed e *Science Direct* e de forma auxiliar com a ferramenta de busca *Google Scholar*. Este artigo objetivou revisar e reunir de forma crítica as principais informações e atualizações sobre os tópicos previamente citados. A busca e a coleta abrangeram publicações realizadas a partir de 2003, ano em que o desenvolvimento e os estudos na área de engenharia tecidual e microfluídica tornaram-se mais robustos, até os principais trabalhos publicados recentemente na área de SMF. As buscas também compreenderam o uso de palavras-chave ou termos, tais quais: “métodos alternativos ao uso de animais em laboratório”, “poder preditivo de métodos *in vitro* para testes de substâncias”, *Human-on-a-Chip*, *Body-on-a-Chip*, *Organ-on-a-Chip*, iPSC (*induced Pluripotent Stem Cells*), organoides humanos, *Disease-on-a-Chip*, sistemas microfisiológicos e microfluídica. Adicionalmente, essa revisão foi complementada com um breve relato, que visa ilustrar a experiência do LNBio até o momento, no desenvolvimento, proficiência e implementação da tecnologia de SMF no Brasil em parceria com a empresa alemã TisUse. A plataforma é operada por uma



unidade controladora acoplada a uma bomba de vácuo, e combina um sistema de canais de microfluídica, com dois compartimentos de cultura de tecidos, cada um do tamanho do poço das placas de 96 poços (fígado) ou de 24 poços (intestino), como demonstrado na Figura 1. O modelo construtivo do dispositivo microfluídico de 2-OC (*Two-Organ-Chip*) da TissUse possui dois compartimentos distintos por circuito de cocultivo celular (Figura 1). Os 2-OC foram fabricados aplicando litografia suave padrão e moldagem de réplicas de polidimetilsiloxano (PDMS) (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA). Esse dispositivo consiste de uma lâmina de PDMS, contendo as disposições dos canais, das microbombas e as aberturas para os compartimentos de cultivo celulares, permanentemente ligada a uma lâmina de vidro (75 x 25 mm) para microscopia, por oxidação de plasma de baixa pressão (Femto - Diener electronic, Ebhausen, Germany). Essa ligação permanente dá origem a uma única peça que possui microcanais com altura de 100 μm . As três bombas

peristálticas *on-a-chip* (construídas na lâmina de PDMS) têm a espessura de 500 μm . Esse microdispositivo para dois organoides (2-OC) proporciona duas características que melhoram sua funcionalidade: acoplamento mecânico e comunicação “humoral” entre os tecidos²². O volume para cultivar dois tecidos (fígado e intestino por exemplo) é de 900 μl por circuito. O volume extracelular total é de cerca de 1000 μl por circuito. A microbomba propicia um fluxo pulsátil estável do fluido ou meio de cultura. As superfícies superior e inferior das placas são transparentes e permitem a visualização e a caracterização morfológica dos organoides em tempo real. O sentido do fluxo perfusor dentro dos compartimentos do *chip*, bem como a frequência do fluxo, são determinados de acordo com os tipos de tecidos e experimentos. No caso do 2-OC Intestino + Fígado, o sentido do fluxo foi do intestino para o fígado (emulando a absorção intestinal e o direcionamento do que foi absorvido ao fígado pelo sistema porta) e a frequência estabelecida foi a de 0,8 Hz²².



A) Desenho esquemático do modelo construtivo do dispositivo microfluídico TissUse. B) Vista de um corte longitudinal do 2-OC mostrando os compartimentos de cultivo de equivalentes de intestino e fígado. C) Vista inferior do 2-OC com destaque para os canais microfluídicos que interconectam os compartimentos de cultivo tecidual. D) Plataforma 2-OC instalada e em operação no LNBio - Unidade controladora (bomba peristáltica) conectada ao 2-OC.

Fonte: Adaptado de <https://www.tissuse.com/en/products/2-organ-chip/> e de Maschmeyer et al. (2015).

Figura 1. Plataforma *Two-Organ-Chip* da empresa TissUse.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Organoides humanos

A emulação da histoarquitetura existente *in vivo* é essencial para a obtenção de respostas de relevância fisiológica dos modelos de órgãos humanos *in vitro*. A tridimensionalidade e a comunicação intercelular são características fundamentais à plena expressão fenotípica e funcional da maioria dos tecidos²³. Não menos importante é o contato entre diferentes tipos celulares. O microambiente complexo tridimensional no qual as células se organizam *in vivo* possibilita a interação entre diferentes tipos celulares e entre as células e a matriz extracelular (MEC)^{24,25,26}.

Organoides são estruturas artificiais, que representam fragmentos funcionais de órgãos, criadas para estudos *in vitro* capazes de exercer as funções primordiais *in vivo* do órgão correspondente²⁷. Sua concepção conceitual parte das unidades morfofuncionais dos respectivos órgãos. Por exemplo, os lóbulos hepáticos representam as unidades morfofuncionais do fígado, que possui cerca de 1 milhão de lóbulos. Cada lóbulo contém cerca de 1 milhão de células de 20 diferentes tipos, principalmente hepatócitos. O formato do lóbulo é aproximadamente hexagonal com a veia hepática no centro e as tríades hepáticas (veia porta, artéria hepática e duto biliar) nos vértices. Uma rede complexa de vasos sanguíneos (sinusoide) as irriga²⁸. Unidades morfofuncionais similares podem ser identificadas em cada órgão do corpo humano²⁹.

Normalmente, os organoides são estruturas tridimensionais constituídos por diferentes tipos celulares organizados em um arranjo determinado (microestrutura). Um tipo de microestrutura muito popular é o esferoide. A confecção de organoides esferoidais possui vários aspectos benéficos que os tornam um modelo atrativo: são fáceis de produzir e manusear, seu tamanho e composição podem ser controlados de forma relativa (pois as células continuam a proliferar após a formação da esfera) e não necessitam de molde para a sua formação. Esta última característica permite que as células se arranjam de forma espontânea durante o processo de agregação, aumentando as chances de apresentarem um fenótipo organotípico^{30,31}, além do fato de estarem livres da necessidade de aderência a qualquer tipo de superfície não fisiológica. Ainda, a possibilidade da utilização de diferentes tipos celulares no mesmo organoide esferoidal permite o surgimento de contatos intercelulares heterotípicos, conferindo avanço adicional nos aspectos de funcionalidade e diferenciação teciduais^{23,27}.

Outros modelos teciduais tridimensionais confeccionados *in vitro*, também muito convenientes e utilizados, são os organoides de barreira, dos quais pode-se citar a barreira intestinal, barreira renal constituída de células epiteliais do túbulo proximal ou por podócitos glomerulares, córnea, pele, barreira hemoencefálica.

Dispositivos microflúídicos

Apesar de haver uma grande diversidade de SMF, a maioria deles é baseada em dispositivos microflúídicos que buscam mimetizar o ambiente celular de um ou mais órgãos humanos³². O termo microflúídica diz respeito ao fluxo de líquidos em canais de dimensões micrométricas, ou seja, menores do que 1 mm em pelo menos

uma dimensão³³. Dispositivos microflúídicos são formados por conjuntos de microcanais interconectados que podem ser divididos em duas categorias: 1) sistema microflúídico passivo com fluxo determinado pela força da gravidade e 2) sistema microflúídico ativo com fluxo determinado pela ação de uma bomba que pode ou não ser parte de uma unidade controladora. A rede de microcanais entalhados no *chip* pode ser acessada através de aberturas (entradas e saídas) que conectam o interior ao exterior. É através desses orifícios que os tecidos humanos, substâncias e meio de cultura são integrados ou retirados do dispositivo microflúídico, com o uso de tubos, adaptadores de seringas, pipeta etc. Também por essas aberturas os *chips* são conectados aos sistemas ativos externos (controle de pressão, seringa ou bomba peristáltica) ou formas passivas (por exemplo, pressão hidrostática).

Ao se projetar um SMF é essencial estabelecer o regime de fluxo a ser adotado no dispositivo microflúídico.

A escolha dos materiais para a construção dos dispositivos microflúídicos deve levar em conta seus possíveis impactos no cultivo celular e também as propriedades das substâncias a serem testadas. Diversos materiais são atualmente usados, tais como: polímero (PDMS), silicone, cerâmica, vidro e metais. A construção de cada um envolve processos específicos: deposição eletrônica, corrosão, moldagem por injeção, gravação em relevo e litografia suave em PDMS. Os sistemas mais complexos são geralmente confeccionados com mais de um tipo de material.

O polímero PDMS é provavelmente o material mais utilizado para a confecção dos dispositivos, pois é muito conveniente para o cultivo celular. Trata-se de um elastômero transparente, permeável a gases, biocompatível, de baixo custo e fácil manipulação. Porém, o PDMS tem a desvantagem de poder adsorver e absorver pequenas moléculas com propriedades hidrofóbicas^{34,35,36}, fato que impacta de forma significativa na acurácia de predições envolvendo o uso de tais substâncias. Como alternativa pode-se fazer uso de polímeros termoplásticos como o policarbonato (PC), polimetilmetacrilato (PMMA) e copolímero olefino cíclico (COC) que não adsorvem pequenas moléculas²³.

Sistemas Microfisiológicos: *Organ-on-a-Chip* e *Human-on-a-Chip* (*Body-on-a-Chip*)

Diferentes, as Plataformas Microflúídicas de Cultivo Celular ou SMF são atualmente uma tecnologia que se encontra em fase de desenvolvimento, demandando ainda considerável avanço em bioengenharia. Os avanços realizados na última década na criação de modelos *in vitro* de culturas biomiméticas, baseadas em microtecnologia, fomentaram um interesse mundial crescente no desenvolvimento de plataformas que combinem tecidos humanos com microflúídica, dando origem ao termo *Organ-on-a-Chip*. Neste caso, a palavra *chip* deriva do inglês e refere-se a um dispositivo fino e de pequenas dimensões (podendo ou não conter elementos eletrônicos). Dependendo do número de órgãos e do desenvolvimento de diferentes microambientes celulares, pode-se ainda utilizar os termos *Human-on-a-Chip* ou *Body-on-a-Chip*. Com essa tecnologia, espera-se mimetizar *in vitro* a funcionalidade de órgãos humanos *in vivo*, com intuito de prever melhor os efeitos



de substâncias no corpo humano. O estímulo de cisalhamento conferido pelo fluxo é importante para diversos aspectos funcionais dos tecidos cultivados. Por isso, garantir o fluxo fisiológico e adequado a cada caso é crítico para o estabelecimento dos SMF.

Os projetos de SMF devem ser balizados na otimização dos processos de confecção e cultivo dos tecidos humanos, de maneira que a ação do sistema microfluídico ou do sistema de perfusão propicie estímulo mecânico de cisalhamento em níveis capilar e intersticial dentro de parâmetros fisiológicos. Além de permitir a remoção de substâncias secretadas ou metabólitos e possibilitar a interação de células localizadas em compartimentos ou tecidos diferentes, promove a criação de microambientes com gradientes biomoleculares e presença de *shear stress* controlado²³.

Tendo em vista que há uma grande diversidade de tipos de SMF (baseados em cultura 2D ou 3D, em organoides parenquimatosos ou de barreira, em fluxo passivo ou ativo, contendo ou não elementos eletrônicos, tais quais sensores, eletrodos etc.) e que, como já mencionado, o microambiente tridimensional *in vivo* no qual as células apresentam relações entre si, com diferentes tecidos e com a MEC, impactam diretamente na diferenciação e função de cada órgão, consideramos que os SMF constituídos de dispositivos microfluídicos para cultivo de tecidos humanos 3D *in vitro* em um ambiente controlado de estímulos mecânicos e eletrofisiológicos proporcionam as melhores condições possíveis de emulação²³.

Organ-on-a-Chip

O termo *Organs-on-Chips* são sistemas microengenheirados biomiméticos que contêm canais microfluídicos que veiculam meio de cultura com nutrientes e extraem catabólitos dos tecidos em cultivo. Podem ser definidos alternativamente como modelos de órgãos humanos em microescala (de 10^{-6} até 10^{-4} em relação ao tamanho original)^{37,38}.

Os sistemas *Organ-on-a-Chip* buscam produzir níveis de funcionalidade de tecidos e/ou organoides não alcançados pelo cultivo celular estático, além de também possibilitar a análise em tempo real de parâmetros bioquímicos e metabólicos^{15,29}, tais como albumina, lactato desidrogenase (LDH), glicose, O_2 , concentração de Glutathione (GSH), estado funcional de mitocôndrias, estrutura e morfologia do núcleo celular, estado redox, concentração de ATP etc. Esses parâmetros são monitorados por meio de biossensores internos ou externos, através de imagens microscópicas e análises do fluido coletado do sistema^{39,40,41}.

Os modelos *Organ-on-a-Chip* equipados com acessórios de monitoramento e de detecção (biossensores) podem conferir vantagens importantes relacionadas à economia de tempo e melhora da reprodutibilidade dos dados produzidos. Além do mais, a possibilidade de monitoramento contínuo *in situ* de respostas biológicas induzidas por fármacos durante um longo intervalo de tempo é crucial para adequada investigação dos parâmetros farmacológicos e, por consequência, para o aumento do poder preditivo dos SMF. A empresa Emulate, Inc., do Wyss Institute, alocado na Universidade de Harvard, desenvolveu microdispositivos que possuem eletrodos embutidos para mensuração de Resistência Elétrica Transepitelial (TEER), com intuito de monitorar de forma não

invasiva a formação e a integridade de diferentes modelos *in vitro* de órgãos de barreira, tais como o pulmão ou intestino⁴².

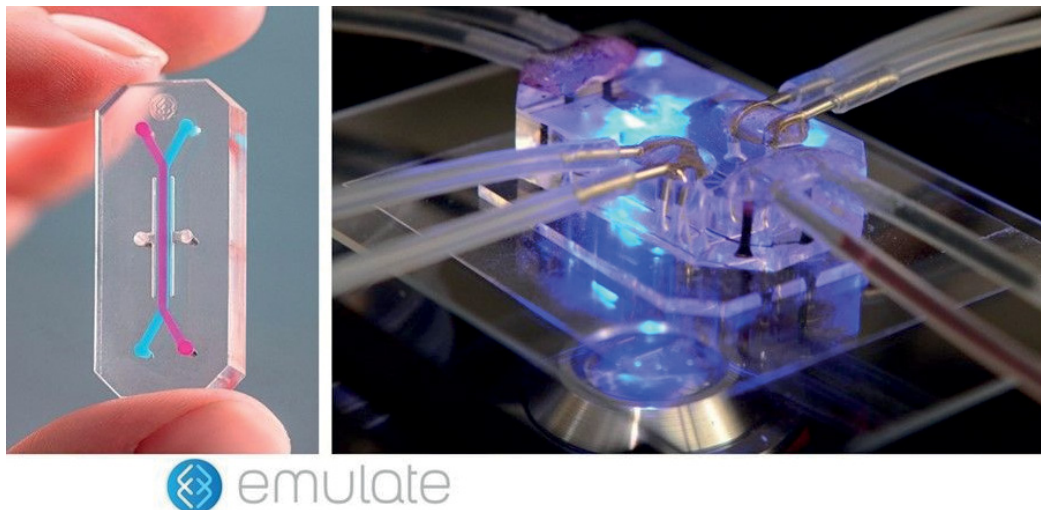
Outro exemplo vem do Centro de Pesquisa e Inovação em Biomateriais da Escola de Medicina da Universidade de Harvard, que desenvolveu todo um sistema de monitoramento contínuo e automatizado, em uma plataforma modular, integrada e equipada com multi-biossensores com capacidade de detecção biofísica e bioquímica, integrados a módulos de *Organ-on-a-Chip*. O sistema conta com uma bomba peristáltica, um módulo de controle do fluxo microfluídico, módulos contendo sensores biofísicos para O_2 , pH, temperatura e contração de células cardíacas, módulo contendo sensores bioquímicos para proteínas hepáticas (por exemplo: Glutathione S-Transferase alfa, albumina), proteínas cardíaca (Creatina quinase), um mini-microscópio para monitoramento da morfologia dos organoides, além de um módulo de captura para bolhas do sistema⁴³.

Assim esses SMF permitem emular de forma mais acurada as condições do meio interno incluindo as condições de pressão e temperatura, difusão de nutrientes (glicose, aminoácidos e lipídeos), além de fatores humorais tróficos e de crescimento¹⁰, bem como a remoção mais eficaz de catabólitos. Os SMF possuem vias de difusão microfluídicas que permeiam os tecidos à semelhança dos capilares sanguíneos e permitem o cultivo tridimensional com contato intercelular e tração mecânica ou *shear stress*, responsáveis em parte pela morfologia tissular. Essas características proporcionam a emulação das condições *in vivo* e supostamente levam a um padrão de resposta da preparação mais semelhante ao de um organismo vivo^{15,44,45,46} como já discutido anteriormente. Dessa maneira conclui-se que o advento da tecnologia *Organ-on-a-Chip* vem ao encontro do reconhecimento de que a morfogênese celular, as interações célula-célula, o ambiente biomecânico são tão importantes quanto são as células em si^{47,48,49,50,51,52}. Como exemplos podemos citar a orientação topográfica⁵³, definição espacial da cultura^{44,54,55,56}, o estímulo de cisalhamento e outros tipos de estímulo mecânico (estiramento, compressão etc.)^{57,58,59}, e gradiente bioquímico^{60,61}.

Essa tecnologia representa uma alternativa ao uso de animais em aplicações farmacêuticas, químicas e ambientais¹⁵.

Outros importantes exemplos de *Organ-on-Chip* vem mais uma vez da empresa Emulate. Os organoides humanos cultivados isoladamente até o momento incluem: pulmão (células endoteliais microvasculares pulmonares com interface com células epiteliais alveolares)⁶², vias áreas inferiores (células humanas primárias diferenciadas em epitélio mucociliar)^{44,63}, intestino (linhagem celular humana CaCo2)⁶⁴, rim (células epiteliais do túbulo proximal humanas)⁶⁵, e medula óssea (células de rato)⁶⁶. A Figura 2 ilustra o modelo de *Chip* da Emulate. Nessa tecnologia, cada organoide mimetiza as interfaces celulares de seu respectivo órgão, assim como algumas de suas características fundamentais, por exemplo o movimento peristáltico do intestino.

Em 2016 o Fórum Econômico Mundial selecionou especificamente a tecnologia *Organ-on-a-Chip* como uma entre as dez mais emergentes do mundo⁶⁷. Neste sentido, o campo de estudos relacionado a sistemas microfluídicos, *Organ-on-a-Chip* e SMF experenciou um grande salto no concernente ao número de publicações acadêmicas relacionadas ao longo das últimas duas décadas. Entre



Fonte: Adaptado de Emulate (<https://emulatebio.com/>).

Figura 2. Exemplo de sistema *Organ-on-a-Chip* da empresa Emulate.

os anos 2000-2014 houve um aumento de aproximadamente 12 vezes, 985 vezes e 380 vezes do número de publicações acadêmicas relacionadas às áreas de microfluídica, *Organ-on-a-Chip* e SMF respectivamente (Gráfico). O aumento das publicações exemplifica a atividade e o interesse crescentes nessa tecnologia.

As palavras-chave “microfluídica” (*microfluidics* em Inglês), “*Organ-on-a-Chip*” e sistemas microfisiológicos (*Microphysiological systems* em inglês) foram buscadas pelo Google Scholar. Os números de publicações encontradas por essa busca para cada um dos oito intervalos de dois anos e para o intervalo de três anos estão representados no Gráfico a partir do ano de 1998 até o ano de 2017.

Human-on-a-Chip

Os SMF baseados em cocultivo de dois ou mais órgãos interconectados em um dispositivo de microfluídico são comumente chamados de *Multi-Organ-Chips*. Atualmente são as plataformas precursoras das futuras *Human-on-a-Chip* ou *Body-on-a-Chip* que estão em fase de desenvolvimento e projetam acima de dez órgãos interconectados⁶⁸ já para o ano de 2018.

Um bom exemplo ilustrativo desses tipos de SMF vem da empresa alemã TissUse GmbH, uma empresa derivada do Instituto de Biotecnologia da Universidade *Technische* de Berlim, na Alemanha.

Os primeiros protótipos consistiram de dispositivos para dois órgãos interconectados sob um fluxo regulável gerado por uma bomba externa alojada dentro de uma unidade controladora computadorizada (Figura 1). Nestes dispositivos, chamados de *2-Organ-Chip* ou *2-OC*, foram feitos estudos com duplas de organoides, tais quais biópsia de pele humana e esferoides hepáticos^{22,69}, pele humana e folículo capilar⁷⁰, barreira intestinal reconstruída *in vitro* e esferoides hepáticos²², neuroesferas e esferoides hepáticos⁷¹.

Mais recentemente, foi incorporado o cultivo de células endoteliais que recobrem a área luminal dos canais microfluídicos e a área dos poços de cultivo tecidual, mimetizando a interface

vascular entre os tecidos e o fluxo (circulação) dentro do dispositivo⁷². Também foi desenvolvido um modelo de medula óssea construído sobre molde cerâmico de óxido de zircônio revestido com hidroxiapatita Sponceram® 3D (*Zellwerk GmbH*, Alemanha), que hospedou a cocultura de células mesenquimais estromais (MSC) e células-tronco hematopoiéticas derivadas do sangue do cordão umbilical (HSPC) viáveis por até 28 dias no *2-OC*⁷³.

Posteriormente, a TissUse também desenvolveu dispositivos para quatro órgãos (*4-Organ-Chip* ou *4-OC*) que deu origem à publicação que mostra o cultivo e manutenção de equivalentes de fígado, intestino, pele e rim interconectados neste dispositivo⁷⁴. Este novo dispositivo *4-OC* possui dois compartimentos de microfluídica separados: um simula a circulação sanguínea e outro que emula o circuito excretor, para a drenagem do fluido (análogo à urina) secretado pelo equivalente de rim.

Os SMF que contemplam dois ou mais órgãos têm grande potencial de aplicação em estudos de farmacocinética os quais envolvem análises dos perfis de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMETox) de uma substância ou de fármaco, além de também poder simular doenças humanas *in vitro*. O estudo das propriedades farmacocinéticas de uma substância ou candidato a fármaco é uma das aplicações possíveis e promissoras dos SMF, sendo uma etapa crítica no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Os modelos tradicionais de células humanas reproduzem de maneira não satisfatória as propriedades ADMETox observadas *in vivo*, apresentando uma modificação do nível de exposição (quando comparado ao verificado em humanos) e prejudicando, portanto, a avaliação toxicológica pela razão da maioria das respostas celulares avaliadas dependerem justamente e diretamente do nível de exposição do tecido à droga testada^{74,75,74,76,77,78,79,80,81}.

Dessa maneira, um SMF que contemple a integração de modelos de intestino e fígado humanos *in vitro*, os dois órgãos críticos para respostas de biodisponibilidade e exposição sistêmica,

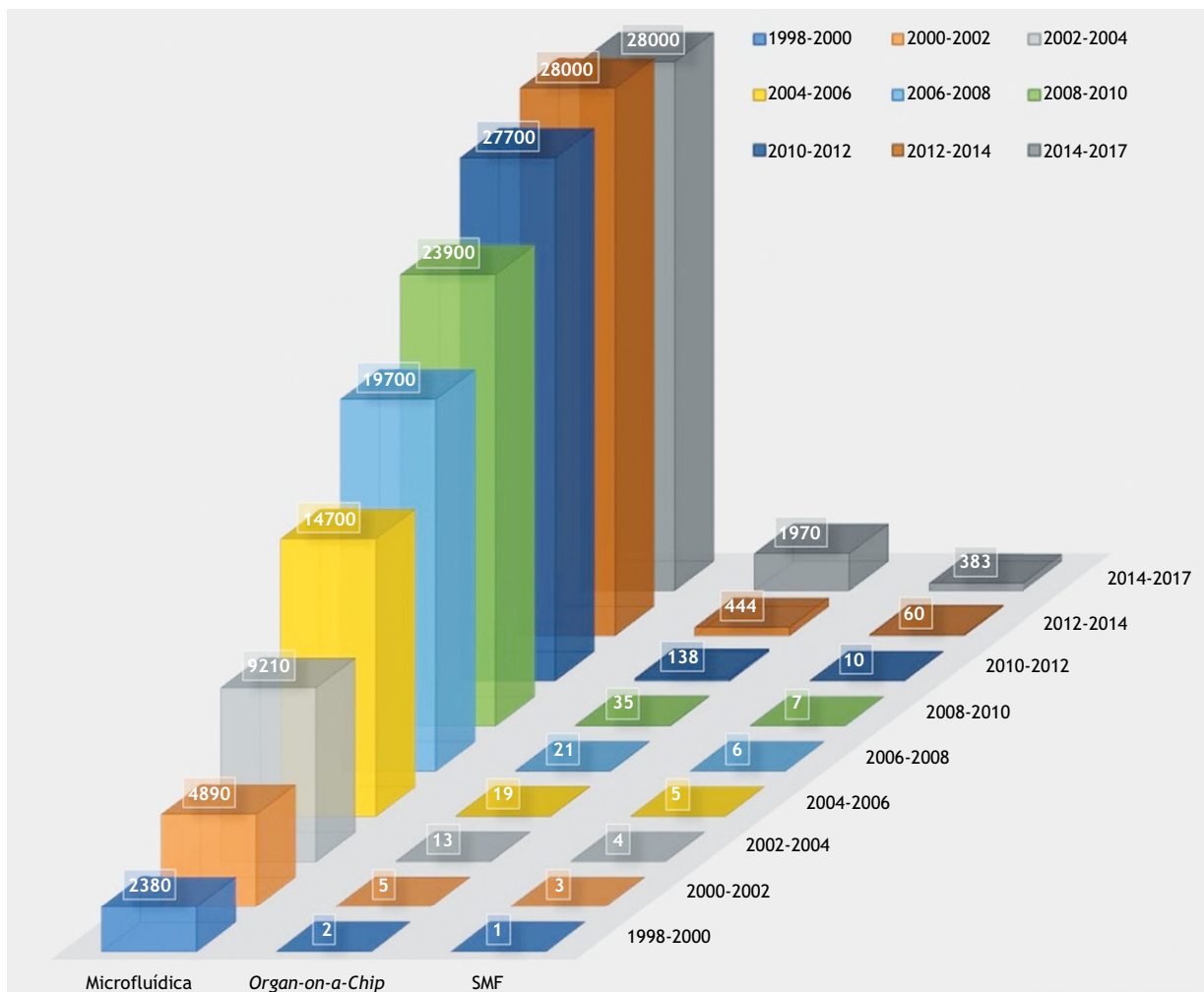


Gráfico. Evolução numérica do número de publicações.

tem significativa relevância⁸², e pode representar uma evolução no concernente ao poder preditivo, em relação aos modelos de cultura de células humanas estáticos e não integrados. Um exemplo de SMF para estudos farmacocinéticos foi o desenvolvido pelo grupo de Murat Cirit do Departamento de Engenharia Biológica do Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT)⁸². O SMF consistiu de uma plataforma microfluídica (microdispositivo + bomba de perfusão) na qual foram integrados modelos de intestino e fígado humanos desenvolvidos *in vitro*, os quais foram mantidos sob comunicação contínua para a investigação simultânea dos valores de parâmetros farmacocinéticos tais como absorção e metabolização, após a administração oral de um dado composto (no caso dos SMF que contenham intestino e fígado, a emulação da administração oral é feita pela aplicação da substância teste no compartimento intestinal, ao passo que a mimetização da administração intravenosa é feita através da aplicação diretamente no compartimento hepático). Os autores demonstraram a possibilidade de obtenção de parâmetros intrínsecos como permeabilidade e *clearance* hepática, através da derivação dos dados obtidos no SMF por modelagem mecanística. Também sugeriram neste estudo que a comunicação entre os órgãos propiciada pelo SMF impactou positivamente na capacidade metabólica do modelo de fígado.

Outro exemplo de modelo de SMF otimizado para investigações farmacocinéticas vem do Laboratório de Biomecânica e Bioengenharia da Universidade de Tecnologia de Compiègne, em Picardia, na França. O grupo desenvolveu um SMF contendo os modelos de intestino e fígado humanos confeccionados *in vitro* e mantidos acoplados sob fluxo para a investigação do metabolismo intestinal e hepático de primeira passagem do fármaco paracetamol⁸³. Esta abordagem foi também combinada a um modelo matemático visando estimar parâmetros intrínsecos *in vitro* e possibilitar a extrapolação para os processos *in vivo*. O trabalho também mostrou a identificação de metabólitos como o sulfato de paracetamol que foi identificado através da atividade sinérgica entre os modelos de intestino e fígado ocorrida no SMF. Ambos os grupos afirmam nos estudos supracitados, a importância e a grande potencialidade que pode ter a aplicação de SMF em investigações farmacocinéticas, bem como a integração das abordagens *in silico* e *in vitro* baseada em SMF.

Disease-on-a-Chip

Os modelos *in vitro* Disease-on-a-Chip são uma variação ou adaptação dos Multi-Organ-Chips destinados à emulação de condições patológicas. Um dos exemplos ilustrativos é o modelo desenvolvido



pelo grupo do Instituto Federal de Tecnologia de Zurique (ETH). O modelo em questão utilizou o cultivo de tecido tumoral colorretal e tecido hepático murino e permitiu avaliar a eficácia do tratamento com ciclofosfamida com prévia bioativação em tecido hepático murino, no tratamento do tumor colorretal *in vitro*⁸⁴. Além de apresentar um modelo bem-sucedido de *Disease-on-a-Chip*, este grupo demonstrou a importância do cultivo simultâneo e integrado de mais de um tecido propiciado pelo SMF. Foi observada inibição do crescimento tumoral somente nos experimentos realizados em dispositivos microfluídicos, ou seja, em presença de fluxo. Não houve efeito antitumoral com a ciclofosfamida em ensaios sem fluxo, como a transferência descontínua via pipetagem, de sobrenadante das culturas estáticas de tecidos de fígado tratados com ciclofosfamida para as culturas também estáticas de tecido tumoral colorretal⁸⁴.

Neste trabalho fica explícito o impacto positivo da utilização de SMF sobre a resposta obtida no teste, que foi completamente distinta da resposta obtida na situação de ensaio realizada fora do SMF.

Outro grupo cultivou células de adenocarcinoma ductal pancreático em 3D sob fluxo e mostrou resposta à cisplatina mais fisiológica quando comparada aos modelos *in vitro* de cultivo tradicionais⁸⁵. As células tumorais, em geral, comportam-se diferentemente e apresentam fenótipo distinto quando cultivadas fora do corpo humano em 2D, ou mesmo quando cultivadas em 3D. Os sistemas *in vitro* de cultura celular 2D tradicionais ou sob insertos tipo *Transwell*[®], bem como modelos de esferoides por exemplo, usados na tentativa de mimetizar o microambiente tumoral (MT), têm mostrado limitado poder preditivo de eficácia terapêutica de várias drogas candidatas a fármaco⁸⁶.

O MT exerce grande influência no comportamento celular, principalmente no concernente à sobrevivência, proliferação, invasividade e sensibilidade ao tratamento com compostos^{87,88}. Tipicamente, os tumores são formados por células cancerígenas e estromais (fibroblastos e células imunes) nutridas pela rede vascular. O entendimento dessa intrincada inter-relação dos diferentes tipos celulares, bem como da inter-relação das células com componentes da matriz extracelular, é crítico para o avanço das estratégias de tratamento do câncer⁸⁹. Nos casos de modelos de tumores *in vitro* tradicionais isto é, não baseados em SMF, o desafio é maior devido à ausência da interação entre as células tumorais e a matriz extracelular e diferenças nas condições de gradiente de pH intratumoral, oxigenação e nutrição encontradas *in vivo*. Neste sentido, a aplicação dos modelos de SMF na investigação do comportamento e respostas de células tumorais pode ser vantajoso, na medida em que, ao propiciar condições mais aproximadas de MT encontradas no organismo humano, os SMF podem induzir nas células tumorais um padrão de comportamento mais próximo das condições *in vivo*. Através do avanço de técnicas de microfabricação, atualmente é possível desenvolver dispositivos microfluídicos cuja organização espacial por compartimentalização das células e controle sobre a difusão de fatores solúveis críticos às homeostases do sistema viabilizem a reconstrução de modelos complexos de cultura celular que contemplem a necessária integração entre os diferentes tipos celulares e entre células e componentes do microambiente⁹⁰.

O trabalho de Albanese et al.⁹¹, baseado em modelo de *tumor-on-a-chip*, demonstrou a reprodução bem-sucedida *in vitro* do efeito

de permeabilidade e retenção (EPR). Vários tumores sólidos possuem características estruturais que incluem hipervascularização, arquitetura vascular defeituosa, e drenagem linfática prejudicada, caracterizando o conhecido efeito de EPR, descrito para moléculas específicas⁹², tipicamente compostos macromoleculares, lipossomos e nanopartículas, que tendem a acumular muito mais no tecido tumoral do que no tecido normal⁹³. Alabnese et al. mostraram que a penetração e a acumulação de nanopartículas em esferoides de células tumorais integrados ao dispositivo microfluídico foram significativamente influenciadas pela presença de fluxo e de MEC no entorno. O estudo verificou a importância da região de interface formada pela MEC, fluido e superfície do tecido; essa região de interface emulada no SMF mostrou-se necessária à reprodução *in vitro* do efeito EPR, comportando-se como um reservatório de interface fluido-tecido, no qual as nanopartículas se acumulam e difundem-se progressivamente para o tecido. Esse transporte passivo, a partir do reservatório de interface, impacta diretamente o número de partículas a serem difundidas para o tecido e parece poder prever a extensão da acumulação de nanopartículas dentro do tumor *in vivo*.

O trabalho evidenciou a importância da mimetização do MT e o potencial uso do *tumor-on-a-chip* no desenvolvimento e padronização de carreadores medicamentosos, incrementando a investigação dos mecanismos de transporte de nanopartículas através de um tecido sob condições de fluxo fisiológico e acoplamento com MEC.

Há ainda outros exemplos de doenças emuladas nos SMF. O modelo desenvolvido baseado em microcanais revestidos por células endoteliais mimetizando a camada íntima de vasos sanguíneos, também se mostrou bem-sucedido em mimetizar as condições patológicas *in vitro*⁹⁴. Neste, observou-se expressão do fator de von Willebrand em resposta à estenose dos microcanais emulando o efeito da placa de ateroma (formação composta de gordura, cálcio e células inflamatórias, localizada na parede das artérias). A aplicação de SMF na investigação de doenças tem se mostrado promissora. Já existem desenvolvimentos de SMF para doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson⁹⁵, para doenças infecciosas ou potencial de infecção de determinado tecido⁹⁶, doenças vasculares como a trombose^{63,97}, doenças de vias aéreas^{62,63}, entre outras.

A experiência brasileira

No LNBio, um dos quatro laboratórios nacionais alocados no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), está sob desenvolvimento o projeto “*Human-on-a-Chip*”. A primeira etapa do projeto foi baseada no desenvolvimento de modelos de organoides humanos cultivados nos dispositivos de microfluídica, fabricados e vendidos pela empresa TissueUse GmbH, dispositivo esse denominado de *Two-Organ-Chip* ou 2-OC (Figura 2).

Os microdispositivos fabricados pela TissueUse são compostos por três tipos de materiais: policarbonato que compõe a placa adaptadora, PDMS no qual estão as válvulas e canais microfluídicos e uma lâmina de vidro que recobre o PDMS (Figura 1A). O modelo de SMF proposto pela TissueUse oferece acesso aos poços de cultivo celular, ao mesmo tempo que mantém os microcanais isolados e protegidos, possibilitando a confecção e maturação dos organoides



externamente, sua colocação nos *chips* e sua posterior retirada para histologia. Também permite o uso de maior variedade de tecidos humanos, como materiais de biópsias por exemplo.

No LNBio já acontece a confecção e o cultivo no 2-OC bem-sucedidos de organoides de fígado, coração e intestino, além do rim que está em fase de desenvolvimento.

Células e tecidos

Embora células primárias, provenientes de doadores vivos ou cadáveres, apresentem melhor funcionalidade, são de obtenção complicada e incerta, podendo produzir resultados inconsistentes devido ao fato de serem originadas de doadores diferentes na maioria dos casos. A depender da origem do tecido e do doador, não apresentam sobrevida necessária para realização de testes de duração mais longa.

Por isso, optamos por células de linhagens expansíveis e/ou células iPSC. A funcionalidade destas é geralmente menor, mas podemos controlar parâmetros importantes de maneira mais efetiva.

Equivalente barreira intestinal humana

Para produzir organoides que emulam a barreira intestinal, utilizamos células da linhagem CaCo2 (ATCC HTB-37) (Figura 3A) associadas à linhagem HT29-MTX (ATCC HTB-38) (Figura 3B). Ambas são linhagens epiteliais de adenocarcinoma de colo retal que possuem a maioria das características morfológicas e funcionais de células absorptivas do intestino delgado, incluindo enzimas digestivas e receptores. As células da linhagem HT29-MTX também possuem a capacidade de secretar mucina e outros compostos que formam o muco intestinal que auxilia a capacidade absorptiva^{98,99,100}. A barreira foi construída durante 21 dias em inserto *Transwell*® cuja membrana microporosa recebeu a semeadura da cocultura das duas linhagens intestinais supracitadas (Figura 3C).

O inserto, além de fazer as vezes de suporte para o cultivo celular, ainda teve a função de separar o organoide em dois compartimentos ou lados fisicamente distintos mimetizando as regiões intestinais intraluminal (compartimento superior ou lado apical) e intersticial/corrente sanguínea (compartimento inferior ou lado basolateral) (Figura 3D).

Equivalente fígado humano

Para os esferoides de fígado, utilizamos a linhagem de células HPR101 diferenciada em HepaRG®, associada à linhagem HHS-teC (*Human Hepatic Stellate Cells* #5300, Sciencell) (Figura 4). A primeira provém de um doador portador de carcinoma hepatocelular com concomitante infecção pelo vírus da Hepatite C.

As HepaRG® são células hepáticas progenitoras capazes de dar origem a hepatócitos e colangiócitos adultos completamente diferenciados. Possuem níveis significativos de funcionalidade hepática como a expressão estável de enzimas da família da CYP450 e de enzimas que atuam na conjugação de fármacos (fase 2) e de suportar o ciclo completo replicativo do vírus da hepatite B¹⁰¹. A segunda produz células do tecido conectivo intralobular que apresentam fenótipo semelhante aos miofibroblastos ou lipócitos. Estas células

participam da homeostase da matriz extracelular e dos processos de reparo, regeneração e fibrose do fígado. A proliferação e migração destas células, juntamente com a expressão de quimiocinas, estão envolvidas na patogênese da inflamação hepática e na fibrogênese.

De maneira geral a cultura de hepatócitos como esferoides tem demonstrado resultados positivos com respeito à função hepática, devido ao estabelecimento dos contatos homo e heterotípicos célula-célula e a presença de componentes-chaves de MEC dentro e nos arredores dos agregados⁶⁹. A Figura 3 mostra as células hepáticas sob cultivo 2D (Figura 3E e 3F), e a respectiva cocultura na histoarquitetura esferoidal (Figura 3G e 3I) integradas no 2-OC (Figura 3H). Os equivalentes de intestino e fígado foram mantidos sob cocultivo no 2-OC por 14 dias.

Os cardiomiócitos humanos usados para confecção da cardioesfera foram gerados a partir da reprogramação de células sanguíneas (eritroblastos) obtidas de um indivíduo saudável de 38 anos de idade, do sexo masculino. As iPSC foram diferenciadas em cardiomiócitos adultos. A empresa brasileira *PluriCell Biotech* forneceu os cardiomiócitos já diferenciados, usados para a confecção dos organoides no LNBio. Após formadas, as esferas (Figura 4C) foram integradas à plataforma 2-OC e cultivadas para realização de experimentos pilotos. Análises baseadas em microscopia eletrônica de transmissão de cortes de cardioesferas permitiram identificar estruturas celulares compatíveis com uma célula cardíaca sadia, tais quais unidades sarcoméricas, *GAP junctions*, mitocôndrias íntegras, depósitos de glicogênico, membranas e compartimentos membranosos intactos (Figura 4 A e B).

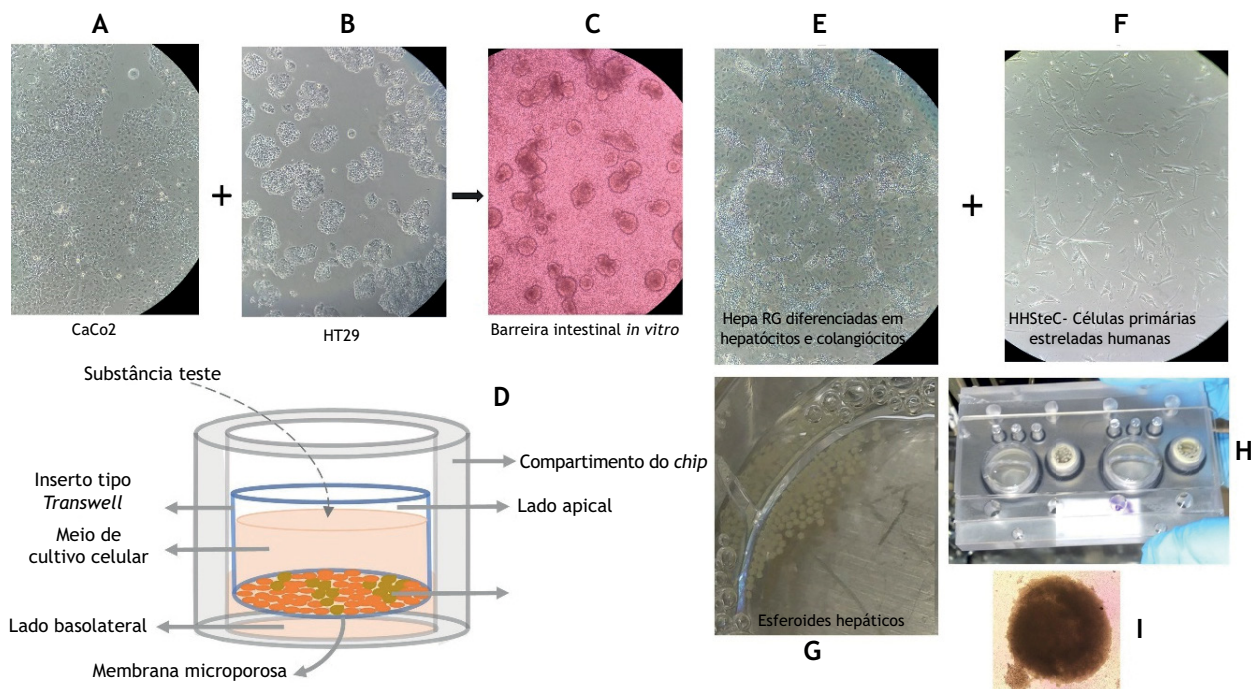
Interessantemente, o trabalho de Luni et al. mostrou que o processo de reprogramação de células somáticas humanas em iPSC é tremendamente influenciado pelo ambiente microfluídico (uma melhoria de 50 vezes em relação à reprogramação mais eficiente relatada usando células humanas sem modificações genéticas), sendo possível a diferenciação direta em hepatócitos e cardiomiócitos funcionais na mesma plataforma sem passo de expansão adicional¹⁰².

Perspectivas futuras e desafios

Apesar dos grandes avanços já obtidos, a engenharia de tecidos humanos em três dimensões (3D) para confecção de equivalentes de órgãos (em diferentes escalas e com diversos objetivos), bem como os dispositivos microfluídicos, estão em fase de desenvolvimento. Os avanços no manejo das células-tronco embrionárias e iPSC já contribuíram bastante e podem acelerar ainda mais o progresso deste campo, ao fornecerem acesso a diversas linhagens celulares para confecção de organoides.

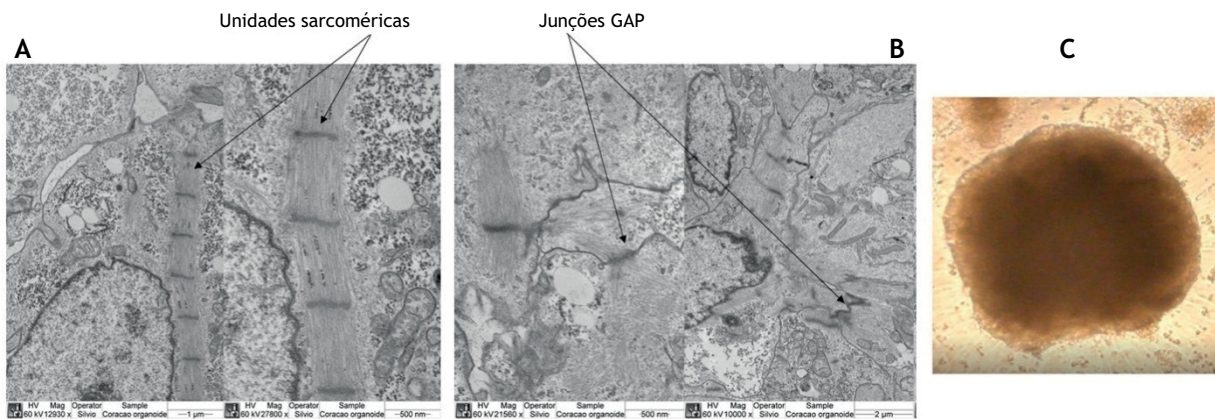
Vastas perspectivas se encontram também no campo da medicina personalizada com a possibilidade de culturas celulares “paciente-específica”^{103,104}. As iPSC são obtidas a partir de células primárias do corpo humano, tais como, células sanguíneas (por exemplo: eritroblasto), fibroblastos (obtidos de pele), células epiteliais do trato urinário (obtidas da urina), que passam por processo de desdiferenciação e em teoria podem ser rediferenciadas artificialmente em qualquer tipo celular¹⁰⁵.

Células de origem primária, apesar de apresentarem a funcionalidade superior, são desvantajosas em aspectos de logística de



A) Imagem microscópica das células CaCo2, com ampliação de 10 x. B) Imagem microscópica das células HT29-MTX, com ampliação de 10 x. C) Cocultura das células CaCo2 e HT29-MTX, com ampliação de 10x. D) Desenho esquemático do modelo equivalente de barreira intestinal feito no LNBio. E) Imagem de microscopia de luz de células HepaRG em 2D diferenciadas, com ampliação de 10 x. F) Imagem de microscopia de luz de células estreladas humanas em cultivo 2D, com ampliação de 10 x. G) Fotografia de esferoides hepáticos formados e coletados. H) Esferoides hepáticos integrados ao dispositivo 2-OC - TissUse GmbH. I) Imagem de microscopia de luz de um esferoide hepático, com ampliação de 4 x.

Figura 3. Organoides de intestino e de fígado humanos - equivalente à barreira intestinal humana.



A-B) Imagens de microscopia eletrônica de cortes histológicos cardioesferas ou equivalentes de coração humano. A) Destaque para a sequência de unidades sarcoméricas, mitocôndrias e depósitos de glicogênio no sarcoplasma. B) Destaque para as junções tipo GAP. C) Imagem de microscopia de luz de uma cardioesfera, com ampliação de 4X.

Figura 4. Organoide humano de coração - equivalente ao coração.

obtenção complexa, variabilidade genética (que pode ser benéfica somente em algumas situações) e instabilidade fenotípica/fisiológica *in vitro*. As células provenientes de linhagens imortalizadas têm a vantagem do acesso e manuseio simples, mas sua funcionalidade neste momento é menor que a das células primárias. Apesar do fato de ser a adoção de boas práticas de laboratório o fator mais crítico para assegurar que o cultivo celular seja livre de contaminantes diversos, as células de linhagens

apresentam maior risco de contaminação por *Mycoplasma*¹⁰⁶ e/ou contaminações inter e intraespécie e instabilidade genética^{107,108}.

Por isso, a disponibilidade de tipos celulares, capacidade de adaptação e a escolha mais adequada da fonte celular para a confecção de organoides cada vez mais realísticos e estáveis nos SMF são desafios encontrados para o estabelecimento da tecnologia *Human-on-a-Chip*.



Adicionalmente, é importante considerar a necessidade do desenvolvimento de um meio de cultura cuja formulação/composição seja otimizada para atender às necessidades dos diferentes tipos celulares cocultivados em SMF multiórgãos. A escolha do meio é feita em função de cada tipo celular, com intuito de melhorar a aderência à matriz extracelular, viabilidade pós-descongelamento, crescimento, replicação. Situações onde um tipo celular sobrevive e cresce perfeitamente em um meio no qual outro tipo celular não vai bem são muito comuns.

Esses fatores tornam a formulação do meio de cultura adequada a diferentes tecidos muito desafiadora. Isto posto, importante para todos os tipos de cultivo celular (incluindo as 2D, sem fluxo, sem acoplamento tecidual etc.), e muitas vezes limitante para o cultivo integrados de dois ou mais tecidos, é o desenvolvimento de uma formulação do meio de cultivo universal um dos gargalos para o avanço da tecnologia dos SMF. Trabalho de Oleaga et al., publicado em 2016, abriu uma perspectiva bastante animadora ao demonstrar em SMF o cultivo simultâneo, bem-sucedido por 14 dias, de modelos de fígado, coração, músculo esquelético e tecido neuronal em um meio de cultura circulante e livre de SFB⁷⁵.

A variação que ocorre entre lotes de soros animais, principalmente de soro fetal bovino (SFB) é crítica e pode interferir em testes de desenvolvimento de fármacos, por exemplo²³. Fatores tais como o desconhecimento da composição exata do SFB, a ocorrência de variabilidade sazonal e geográfica lote-a-lote¹⁰⁹ e interação não intencional com substâncias de teste^{110,111} podem levar a resultados inconsistentes, preocupações em relação à segurança do pessoal de laboratório em termos de risco à saúde por contato acidental com endotoxinas, micoplasma e contaminantes virais ou proteínas priônicas^{112,113,114}; escassez inesperada na disponibilidade global^{115,116}, bem como preocupações éticas sobre o sofrimento fetal¹¹⁷. Neste sentido, pesam em favor da substituição ou abolição do uso de SFB, os aspectos de segurança, científica e ética, em outras palavras, a busca pela otimização dos sistemas de teste *in vitro*, bem como o comprometimento com os princípios dos 3Rs são incentivos para o desenvolvimento e adoção de formulações de meio de cultura livres de SFB sejam eles quimicamente definidos ou com adoção de componentes substitutivos¹¹⁸. Recentemente, lisados de plaquetas humanas demonstraram ser uma alternativa promissora ao SFB^{116,119, 120, 121,122}.

Outro aspecto importante a ser considerado, é que o estudo do perfil farmacocinético deve preceder estudos toxicológicos e farmacodinâmicos. Isso porque em todos os casos, deve-se relacionar a exposição ao efeito e a exposição somente será conhecida por meio de estudos farmacocinéticos. Para isso, é fundamental conhecer a partição de drogas nos órgãos, distâncias de difusão, taxas metabólicas com intuito de emular a comunicação *in vivo* entre os órgãos¹²³. Isto posto, um fator primordial para se obter sucesso é o escalonamento proporcional dos diferentes organoides de maneira a refletir a relação que ocorre no corpo humano. A escolha e aplicação de um método apropriado de escalonamento garantirá que um fármaco atinja os órgãos em concentrações semelhantes à que se espera nos pacientes.

Por isso, determinar os princípios e as regras para o dimensionamento dos diferentes SMF é um dos passos mais críticos para o desenvolvimento dos SMF com grande impacto no uso futuro em estudos de desenvolvimento de fármacos^{123,124}. O correto escalonamento também garantirá que fatores parácrinos alcancem outros órgãos em concentrações fisiológicas mantendo a correta razão de acoplamento órgão-órgão nos SMF.

Existem diversos tipos de escalonamento com diferentes focos ou métodos dos quais podemos citar: o escalonamento alométrico (a escala entre o organoide e seus homólogos humanos e cada um com o outro), mais comumente usados^{125,126}, o escalonamento funcional¹²⁷ e multifuncional¹²⁸ (considera parâmetros como a compartimentação dos organoides em circuitos fluidicos, o fluxo, as vias de administração/excreção) e ainda o escalonamento baseado no volume do órgão e no tempo de residência do fluxo sanguíneo¹²⁹. O problema é que abordagens mais usadas para o dimensionamento como a miniaturização direta e escalonamento alométrico são baseadas em tamanho físico apenas¹²⁸. Para um estudo mais aprofundado, estão disponíveis revisões sobre métodos de escalonamento no contexto *Human-on-a-chip*^{14,123,130,131,132,133}.

Para cumprir o desafio de cocultivar de forma bem-sucedida, diferentes equivalentes de órgãos humanos *in vitro* interconectados em uma situação de homeostase autônoma, se faz necessário ultrapassar outros obstáculos como a ausência de sistemas linfático, nervoso, imunológico e vascular integrados sinergicamente. A vascularização é especialmente importante; normalmente a densidade volumétrica celular dos organoides em 3D não corresponde à encontrada no órgão *in vivo*, devido à pseudo-histoarquitetura e às limitações de entrega de oxigênio e nutrientes

A integração de um revestimento endotelial ao SMF é uma medida crítica na direção da melhora da performance fisiológica destes. A presença de uma rede de vasos que consiga penetrar e perfundir adequadamente um esferoide de 300 μm por exemplo, irá melhorar o suprimento de nutrientes, de oxigênio e auxiliar na remoção de metabólitos. Outros benefícios incluem a modulação da difusão de moléculas hidrofílicas para o interior do organoide e de tensões não fisiológicas que poderiam alcançar mais facilmente as células²³. Além disso, as células endoteliais possuem a capacidade de estabelecer um nicho vascular e propiciar organogênese *in vivo* e *in vitro*.

A combinação de emulação robusta com a possibilidade de realizar análises e obter dados eletrofisiológicos por meio de microeletrodos integrados ao SMF também abre grandes perspectivas. Os tecidos cardíaco, músculo-esquelético ou neuronal podem ser estudados dessa forma^{135,136}. A aferição da TEER em verificação de integridade da barreira em modelos de equivalentes de intestino¹³⁷, pele ou córnea também pode representar mais um benefício desta funcionalidade.

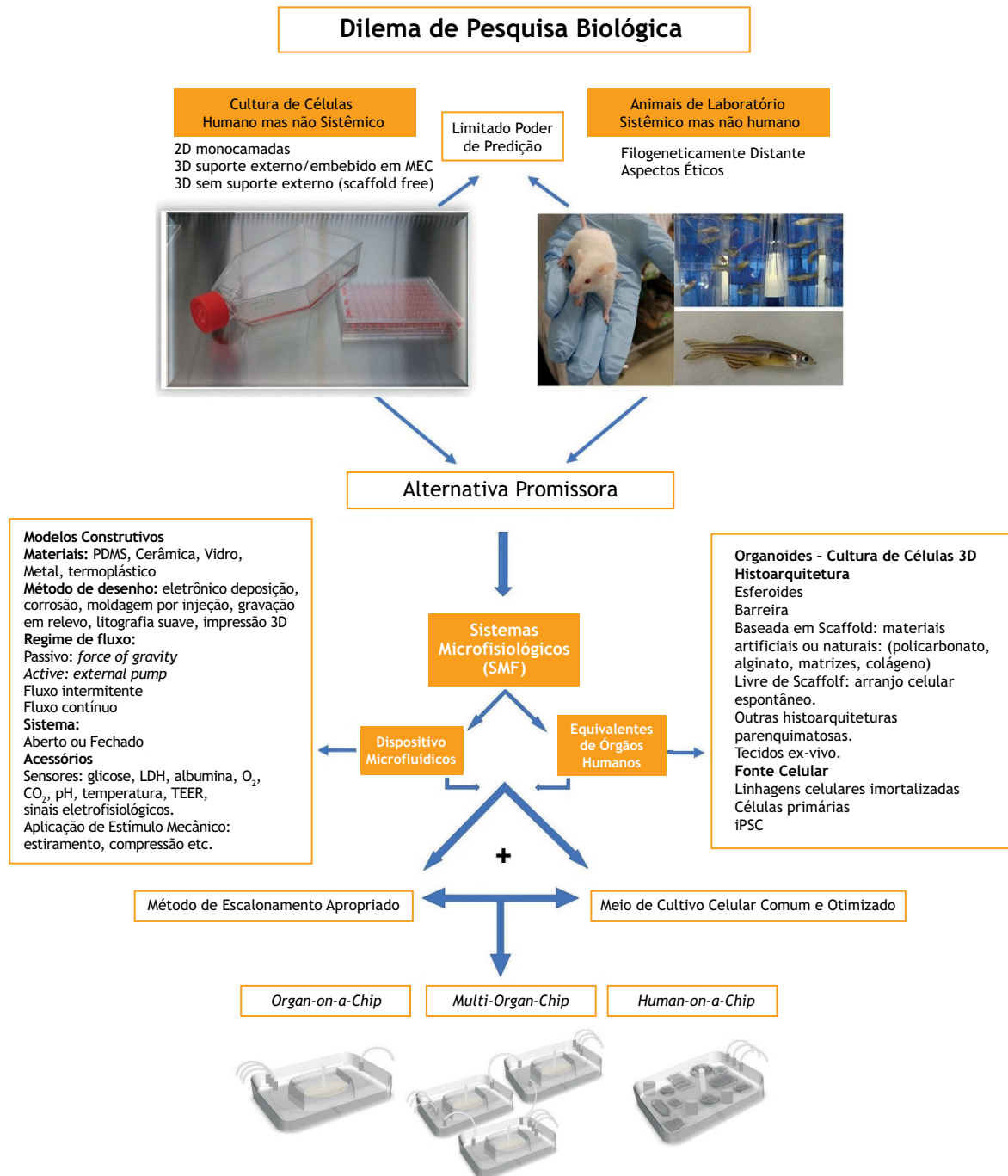
Adicionalmente, impressoras 3D podem ser de grande valia para a resolução de limitações dos atuais SMF. Ao propiciarem deposição precisa, ordenada e reprodutível de tipos celulares e materiais diversos, abrem a perspectiva de confecção de organoides



com complexa histoarquitetura. No caso dos rins ou do baço, a impressão de tecidos humanos em 3D é bastante conveniente, visto que não podem ser recriados de forma plena com a utilização das técnicas disponíveis atualmente¹³⁸. A empresa “Organovo” tem se destacado na área de impressão de tecidos humanos em 3D, oferecendo modelos de fígado (*ExVive™ 3D Bioprinted Human Liver Tissue Model*) e rim (*ExVive™ Human Kidney Tissue*) humanos¹³⁹. Além disso, as impressoras 3D abrem a perspectiva de otimização do processo de desenvolvimento e

fabricação dos dispositivos microfluidicos, que normalmente é laborioso e complexo, por necessitar de grandes investimentos e cuidados (sala limpa por exemplo e recursos humanos altamente especializados). A tecnologia de impressão 3D atual avançou a um ponto que permite a produção relativamente barata e rápida de sofisticados microdispositivos, configurando uma alternativa promissora aos protocolos atualmente empregados¹⁴⁰.

O fluxograma da Figura 5 ilustra uma proposta de abordagem para o desenvolvimento de SMF em centros de pesquisa, baseada



MEC: matriz extracelular; PDMS: polidimetilsiloxano; LDH: lactato desidrogenase; TEER: Resistência Elétrica Transepitelial; iPSC: *induced Pluripotent Stem Cells*.

Figura 5. Abordagem para o desenvolvimento e impacto dos Sistemas Microfisiológicos.



nos dados e informações aqui reunidos e interpretados. Contempla as razões que justificam o investimento na implementação dos SMF e os passos e aspectos críticos a serem considerados e ponderados nesse processo.

CONCLUSÕES

Apesar de todos os esforços e progressos realizados na direção do desenvolvimento de modelos experimentais que se aproximem o máximo possível da condição fisiológica humana, não é esse o fator mais crítico na relação SMF x corpo humano. Não obrigatoriamente os resultados ou dados obtidos dessas plataformas ou SMF devam ser realisticamente fisiológicos. O mais importante é que sejam comparáveis, transponíveis para o ser humano. Neste sentido, possuir e formalizar princípios de extrapolação que

permitam transpor de forma acurada os dados obtidos a partir dessas plataformas é tanto ou mais crítico do que a busca incessante pela emulação da fisiologia do organismo humano *in vitro*.

O progresso obtido até hoje nos projetos dos SMF sugerem o alto potencial dessa nova abordagem para superar as limitações dos modelos experimentais utilizados atualmente. Poderão, em prazo mais curto que se imagina, proporcionar a redução do uso de animais de laboratório e oferecer modelos com maior potencial preditivo aplicáveis à farmacologia, desenvolvimento de fármacos, emulação de doenças, avanço da medicina personalizada bem como o incentivo do desenvolvimento de melhores testes que contribuirão na melhoria de produtos e substâncias valiosos a ramos industriais tais quais os alimentício, cosmético e agropecuário.

REFERÊNCIAS

1. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(3):203-14. <https://doi.org/10.1038/nrd3078>
2. Bailey J, Thew M, Balls M. An analysis of the use of dogs in predicting human toxicology and drug safety. *Altern Lab Anim.* 2013;41(5):335-50.
3. Dragunow M. The adult human brain in preclinical drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(8):659-66. <https://doi.org/10.1038/nrd2617>
4. Hackam DG, Redelmeier DA. Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA.* 2006;296(14):1731-2. <https://doi.org/10.1001/jama.296.14.1731>
5. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(9):3507-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222878110>
6. Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V et al. Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med.* 2010;7(3):e1000245. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000245>
7. European Medicines Agency. Science Medicines Health. ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. London: European Medicine Agency; 2009.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2nd ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.
9. Laboratório Nacional de Biociências - LNBio, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM. Edital Nº 01 RENAMA - Testes *in silico*. [s.d.][citado 10 set 2017]. Disponível em: http://lnbio.cnpem.br/wp-content/uploads/2014/01/EDITAL-RENAMA_LNBio.pdf
10. Materne EM, Tonevitsky AG, Marx U. Chip-based liver equivalents for toxicity testing: organotypicalness versus cost-efficient high throughput. *Lab Chip.* 2013;13(18):3481-95. <https://doi.org/10.1039/c3lc50240f>
11. Huh D, Torisawa YS, Hamilton GA, Kim HJ, Ingber DE. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab Chip.* 2012;12(12):2156-64. <https://doi.org/10.1039/c2lc40089h>
12. Capulli AK, Tian K, Mehandru N, Bukhta A, Choudhury SF, Suchyta M et al. Approaching the in vitro clinical trial: engineering organs on chips. *Lab Chip.* 2014;14(17):3181-6. <https://doi.org/10.1039/C4LC00276H>
13. Hutson MS, Alexander PG, Allwardt V, Aronoff DM, Bruner-Tran KL, Cliffel DE et al. Organs-on-chips as bridges for predictive toxicology. *Appl Vitro Toxicol.* 2016;2(2):97-102. <https://doi.org/10.1089/avt.2016.0003>
14. Wikswo JP. The relevance and potential roles of microphysiological systems in biology and medicine. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(9):1061-72. <https://doi.org/10.1177/1535370214542068>
15. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 2011;21(12):745-54. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>
16. Zheng F, Fu F, Cheng Y, Wang C, Zhao Y, Gu Z. Organ-on-a-chip systems: microengineering to biomimic living systems. *Small.* 2016;12(17):2253-82. <https://doi.org/10.1002/sml.201503208>
17. Russell WM, Burche RI. The principles of humane experimental technique. London: UFAW; 1992.
18. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015;54(2):120-32.
19. European Parliament, Council Of The European Union. Regulation (EC) Nº 1223/2009. [Cosmetic products]. Off J. Eur Union. 22 dez 2009.
20. Palmer N. Global cosmetic compliance summit. In: Cosmetic Compliance Conference; 2015 Apr 24-26; New York, NY.



21. Laquieze L, Lorencini M, Granjeiro JM. Alternative Methods to animal testing and cosmetic safety: an update on regulations and ethical considerations in Brazil. *Appl Vitro Toxicol.* 2015;1(4):243-53. <https://doi.org/10.1089/aivt.2015.0008>
22. Maschmeyer I, Hasenberg T, Jaenicke A, Lindner M, Lorenz AK, Zech J et al. Chip-based human liver-intestine and liver-skin co-cultures: a first step toward systemic repeated dose substance testing in vitro. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;95(Pt A):77-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.002>
23. Dehne E-M, Hasenberg T, Marx U. The ascendance of microphysiological systems to solve the drug testing dilemma. *Futur Sci.* 2017;31;3(2):FSO185. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0002>
24. Bissell MJ. The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a "normal" cell in culture. *Int Rev Cytol.* 1981;70:27-100. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61130-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61130-4)
25. Bissell MJ, Hall HG, Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol.* 1982;99(1):31-68. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(82\)90388-5](https://doi.org/10.1016/0022-5193(82)90388-5)
26. Lee EY, Parry G, Bissell MJ. Modulation of secreted proteins of mouse mammary epithelial cells by the collagenous substrata. *J Cell Biol.* 1984;98(1):146-55. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.1.146>
27. Simian M, Bissell MJ. Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol.* 2017;216(1):31-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>
28. Junqueira LC. *Histologia básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; [s. d.].
29. Marx U, Walles H, Hoffmann S, Lindner G, Horland R, Sonntag F et al. 'Human-on-a-chip' developments: a translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man? *Altern Lab Anim.* 2012;40(5):235-57.
30. Kelm JM, Fussenegger M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol.* 2004;22(4):195-202. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.02.002>
31. Messner S, Agarkova I, Moritz W, Kelm JM. Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch Toxicol.* 2013;87(1):209-13. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0968-2>
32. El-Ali J, Sorger PK, Jensen KF. Cells on chips. *Nature.* 2006;442(7101):403-11. <https://doi.org/10.1038/nature05063>
33. Nature.com. *Microfluidics.* Nature. 2018[citado 20 jan 2018]. Disponível em: <https://www.nature.com/subjects/microfluidics>
34. Toepke MW, Beebe DJ. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab Chip.* 2006;6(12):1484-6. <https://doi.org/10.1039/b612140c>
35. Wang JD, Douville NJ, Takayama S, ElSayed M. Quantitative analysis of molecular absorption into PDMS microfluidic channels. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(9):1862-73. <https://doi.org/10.1007/s10439-012-0562-z>
36. Midwood PM, Janse A, Merema MT, Groothuis GMM, Verpoorte E. Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. 2012;84(9):3938-44. <https://doi.org/10.1021/ac300771z>
37. Shuler ML. Organ-, body- and disease-on-a-chip systems. *Lab Chip.* 2017;17(14):2345-6. <https://doi.org/10.1039/C7LC90068F>
38. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):760-72. <https://doi.org/10.1038/nbt.2989>
39. Cyprotex. Spontaneously beating cardiac spheroids: 3D combined hypertrophy and cardiotoxicity assay. Nether Alderley: Cyprotex, [s. d.].
40. Li L, Zhou Q, Voss TC, Quick KL, LaBarbera DV. High-throughput imaging: focusing in on drug discovery in 3D. *Methods.* 2016;96:97-102. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2015.11.013>
41. Letzsch S, Hänel F, Böttcher K, Kelm J. Cytotoxicity studies on 3D primary liver microtissues. Waltham: PerkinElmer; 2014. (Application note).
42. Henry OY, Villenave R, Crounce MJ, Leineweber WD, Benz MA, Ingber DE. Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function. *Lab Chip.* 2017;17(13):2264-71. <https://doi.org/10.1039/C7LC00155J>
43. Zhang YS, Aleman J, Shin SR, Kilic T, Kim D, Mousavi Shaegh SA et al. Multisensor-integrated organs-on-chips platform for automated and continual in situ monitoring of organoid behaviors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(12):E2293-302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612906114>
44. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Yuan Hsin H, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science.* 2010; 328(5986):1662-8. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>
45. Hartung T, Blaauboer BJ, Bosgra S, Carney E, Coenen J, Conolly RB et al. An expert consortium review of the EC-commissioned report "alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects - 2010". *ALTEX.* 2011;28(3):183-209. <https://doi.org/10.14573/altex.2011.3.183>
46. Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, Benthem J, Zuang V et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol.* 2011;85(5):367-485. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0693-2>
47. Bhana B, Iyer RK, Chen WL, Zhao R, Sider KL, Likhitpanichkul M et al. Influence of substrate stiffness on the phenotype of heart cells. *Biotechnol Bioeng.* 2010;105(6):1148-60. <https://doi.org/10.1002/bit.22647>
48. Parker KK, Tan J, Chen CS, Tung L. Myofibrillar architecture in engineered cardiac myocytes. *Circ Res.* 2008;103(4):340-2. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182469>



49. Lin YC, Kramer CM, Chen CS, Reich DH. Probing cellular traction forces with magnetic nanowires and microfabricated force sensor arrays. *Nanotechnology*. 2012;23(7):075101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/7/075101>
50. Fu J, Wang YK, Yang MT, Desai RA, Yu X, Liu Z et al. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods*. 2010;7(9):733-6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1487>
51. Legant WR, Miller JS, Blakely BL, Cohen DM, Genin GM, Chen CS. Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices. *Nat Methods*. 2010;7(12):969-71. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1531>
52. Zhang B, Xiao Y, Hsieh A, Thavandiran N, Radisic M. Micro-and nanotechnology in cardiovascular tissue engineering. *Nanotechnology*. 2011;22(49):494003. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/49/494003>
53. Chiu LL, Montgomery M, Liang Y, Liu H, Radisic M. Perfusable branching microvessel bed for vascularization of engineered tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(50):E3414-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210580109>
54. Khetani SR, Bhatia SN. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):120-6. <https://doi.org/10.1038/nbt1361>
55. Leng L, McAllister A, Zhang B, Radisic M, Günther A. Mosaic hydrogels: one-step formation of multiscale soft materials. *Adv Mater*. 2012;24(27):3650-8. <https://doi.org/10.1002/adma.201201442> PMID:22714644
56. Stevens KR, Ungrin MD, Schwartz RE, Ng S, Carvalho B, Christine KS et al. InVERT molding for scalable control of tissue microarchitecture. *Nat Commun*. 2013;4:1847. <https://doi.org/10.1038/ncomms2853>
57. Hirt MN, Sörensen NA, Bartholdt LM, Boeddinghaus J, Schaaf S, Eder A et al. Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(6):307. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0307-z>
58. Fink C, Ergün S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *FASEB J* 2000;14(5):669-79. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.5.669>
59. Zhang B, Peticone C, Murthy SK, Radisic M. A standalone perfusion platform for drug testing and target validation in micro-vessel networks. *Biomicrofluidics*. 2013;7(4):44125. <https://doi.org/10.1063/1.4818837>
60. Rodenhizer D, Gaude E, Cojocari D, Mahadevan R, Frezza C, Wouters BG et al. Erratum: A three-dimensional engineered tumour for spatial snapshot analysis of cell metabolism and phenotype in hypoxic gradients. *Nat Mater*. 2016;15(2):244. <https://doi.org/10.1038/nmat4515>
61. Allen JW, Bhatia SN. Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: application to liver zonation. *Biotechnol Bioeng*. 2003;82(3):253-62. <https://doi.org/10.1002/bit.10569>
62. Benam KH, Novak R, Nawroth J, Hirano-Kobayashi M, Ferrante TC, Choe Y et al. Matched-comparative modeling of normal and diseased human airway responses using a microengineered breathing lung chip. *Cell Syst*. 2016;3(5):456-466.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.10.003>
63. Jain A, Barrile R, Meer AD, Mammoto A, Mammoto T, De Ceunynck K et al. Primary human lung alveolus-on-a-chip model of intravascular thrombosis for assessment of therapeutics. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103(2):332-40. <https://doi.org/10.1002/cpt.742>
64. Kim HJ, Huh D, Hamilton G, Ingber DE. Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab Chip*. 2012;12(12):2165-74. <https://doi.org/10.1039/c2lc40074j>
65. Jang KJ, Mehr AP, Hamilton GA, McPartlin LA, Chung S, Suh KY et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr Biol*. 2013;5(9):1119-29. <https://doi.org/10.1039/c3ib40049b>
66. Torisawa YS, Spina CS, Mammoto T, Mammoto A, Weaver JC, Tat T et al. Bone marrow-on-a-chip replicates hematopoietic niche physiology in vitro. *Nat Methods*. 2014;11(6):663-9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2938>
67. Al-Rochan N. Organs-on-chips allow new views of human biology. *Sci Am* 2016 June 23.
68. Esch MB, Smith A, Prot JM, Sancho CO, Hickman J, Shuler ML. How multi-organ microdevices can help foster drug development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;69-70:158-69. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.003>
69. Wagner I, Materne EM, Brincker S, Süßbier U, Frädrieh C, Busek M et al. A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture. *Lab Chip*. 2013;13(18):3538-47. <https://doi.org/10.1039/c3lc50234a>
70. Ataç B, Wagner I, Horland R, Lauster R, Marx U, Tonevitsky AG et al. Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion. *Lab Chip*. 2013;13(18):3555-61. <https://doi.org/10.1039/c3lc50227a>
71. Materne EM, Ramme AP, Terraso AP, Serra M, Alves PM, Brito C et al. A multi-organ chip co-culture of neurospheres and liver equivalents for long-term substance testing. *J Biotechnol*. 2015;205:36-46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.002>
72. Schimek K, Busek M, Brincker S, Groth B, Hoffmann S, Lauster R et al. Integrating biological vasculature into a multi-organ-chip microsystem. *Lab Chip*. 2013;13(18):3588-98. <https://doi.org/10.1039/c3lc50217a>
73. Sieber S, Wirth L, Cavak N, Koenigsmark M, Marx U, Lauster R et al. Bone marrow-on-a-chip: long-term culture of human hematopoietic stem cells in a 3D microfluidic environment. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;12(2):479-89. <https://doi.org/10.1002/term.2507>
74. Maschmeyer I, Lorenz AK, Schimek K, Hasenberg T, Ramme AP, Hübner J et al. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab Chip*. 2015;15(12):2688-99. <https://doi.org/10.1039/C5LC00392J>



75. Oleaga C, Bernabini C, Smith AS, Srinivasan B, Jackson M, McLamb W et al. Multi-Organ toxicity demonstration in a functional human in vitro system composed of four organs. *Sci Rep.* 2016;6(1):20030. <https://doi.org/10.1038/srep20030>
76. Esch MB, Mahler GJ, Stokol T, Shuler ML. Body-on-a-chip simulation with gastrointestinal tract and liver tissues suggests that ingested nanoparticles have the potential to cause liver injury. *Lab Chip.* 2014;14(16):3081-92. <https://doi.org/10.1039/C4LC00371C>
77. Materne EM, Maschmeyer I, Lorenz AK, Horland R, Schimek KM, Busek M et al. The multi-organ chip: a microfluidic platform for long-term multi-tissue coculture. *J Vis Exp.* 2015;(98):e52526. <https://doi.org/10.3791/52526>
78. Esch MB, Ueno H, Applegate DR, Shuler ML. Modular, pumpless body-on-a-chip platform for the co-culture of GI tract epithelium and 3D primary liver tissue. *Lab Chip.* 2016;16(14):2719-29. <https://doi.org/10.1039/C6LC00461J>
79. Sung JH, Kam C, Shuler ML. A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip. *Lab Chip.* 2010;10(4):446-55. <https://doi.org/10.1039/b917763a>
80. Viravaidya K, Sin A, Shuler ML. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity. *Biotechnol Prog.* 2004;20(1):316-23. <https://doi.org/10.1021/bp0341996>
81. Sin A, Chin KC, Jamil MF, Kostov Y, Rao G, Shuler ML. The design and fabrication of three-chamber microscale cell culture analog devices with integrated dissolved oxygen sensors. *Biotechnol Prog.* 2004;20(1):338-45. <https://doi.org/10.1021/bp034077d>
82. Tsamandouras N, Chen WL, Edington CD, Stokes CL, Griffith LG, Cirit M. Integrated gut and liver microphysiological systems for quantitative in vitro pharmacokinetic studies. *AAPS J.* 2017;19(5):1499-512. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0122-4>
83. Prot JM, Maciel L, Bricks T, Merlier F, Cotton J, Paultier P et al. First pass intestinal and liver metabolism of paracetamol in a microfluidic platform coupled with a mathematical modeling as a means of evaluating ADME processes in humans. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(10):2027-40. <https://doi.org/10.1002/bit.25232>
84. Kim JY, Fluri DA, Marchan R, Boonen K, Mohanty S, Singh P et al. 3D spherical microtissues and microfluidic technology for multi-tissue experiments and analysis. *J Biotechnol.* 2015;205:24-35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.003>
85. Beer M, Kuppala N, Stefanini M, Becker H, Schulz I, Manoli S et al. A novel microfluidic 3D platform for culturing pancreatic ductal adenocarcinoma cells: comparison with in vitro cultures and in vivo xenografts. *Sci Rep.* 2017;7(1):1325. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01256-8>
86. Young EW. Cells, tissues, and organs on chips: challenges and opportunities for the cancer tumor microenvironment. *Integr Biol.* 2013;5(9):1096-109. <https://doi.org/10.1039/c3ib40076j>
87. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22(1):287-309. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315>
88. Villasante A, Vunjak-Novakovic G. Tissue-engineered models of human tumors for cancer research. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(3):257-68. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1009442>
89. Ahn J, Sei YJ, Jeon NL, Kim Y. Tumor Microenvironment on a Chip: The Progress and Future Perspective. *Bioengineering (Basel).* 2017;4(3):E64. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030064>
90. Domenech M, Yu H, Warrick J, Badders NM, Meyvantsson I, Alexander CM et al. Cellular observations enabled by microculture: paracrine signaling and population demographics. *Integr Biol.* 2009;1(3):267-74. <https://doi.org/10.1039/b823059e>
91. Albanese A, Lam AK, Sykes EA, Rocheleau JV, Chan WC. Tumour-on-a-chip provides an optical window into nanoparticle tissue transport. *Nat Commun.* 2013;4:2718. <https://doi.org/10.1038/ncomms3718>
92. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986;46(12 Pt 1):6387-92.
93. Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. *Clin Cancer Res.* 1999;5(1):83-94.
94. Westein E, Meer AD, Kuijpers MJ, Frimat JP, Berg A, Heemskerk JW. Atherosclerotic geometries exacerbate pathological thrombus formation poststenosis in a von Willebrand factor-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(4):1357-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209905110>
95. Fernandes JT, Chutna O, Chu V, Conde JP, Outeiro TF. A novel microfluidic cell co-culture platform for the study of the molecular mechanisms of Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Front Neurosci.* 2016;10:511. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00511>
96. Villenave R, Wales SQ, Hamkins-Indik T, Papafragkou E, Weaver JC, Ferrante TC et al. Human gut-on-a-chip supports polarized infection of coxsackie B1 virus in vitro. *PLoS One.* 2017;12(2):e0169412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169412>
97. Jain A, Meer AD, Papa AL, Barrile R, Lai A, Schlechter BL et al. Assessment of whole blood thrombosis in a microfluidic device lined by fixed human endothelium. *Biomed Microdevices.* 2016;18(4):73. <https://doi.org/10.1007/s10544-016-0095-6>
98. Chen XM, Elisia I, Kitts DD. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010;61(3):334-42. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.004>



99. Imura Y, Asano Y, Sato K, Yoshimura E. A microfluidic system to evaluate intestinal absorption. *Anal Sci.* 2009;25(12):1403-7. <https://doi.org/10.2116/analsci.25.1403>
100. Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, Zucco F, Felsani A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol In Vitro.* 2012;26(8):1243-6. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.009>
101. Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I et al. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(24):15655-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.232137699>
102. Liu Y, Du J, Choi JS, Chen KJ, Hou S, Yan M et al. A high-throughput platform for formulating and screening multifunctional nanoparticles capable of simultaneous delivery of genes and transcription factors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55(1):169-73. <https://doi.org/10.1002/anie.201507546>
103. Yamanaka S. A fresh look at iPSC cells. *Cell.* 2009;137(1):13-7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.034>
104. Soldner F, Jaenisch R. Medicine. iPSC disease modeling. *Science.* 2012;338(6111):1155-6. <https://doi.org/10.1126/science.1227682>
105. Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(11):713-26. <https://doi.org/10.1038/nrm3448>
106. Olarerin-George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(5):2535-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv136>
107. Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques.* 2007;43(5):575-86. <https://doi.org/10.2144/000112598>
108. Kleensang A, Vantangoli MM, Odwin-DaCosta S, Andersen ME, Boekelheide K, Bouhifd M et al. Erratum: genetic variability in a frozen batch of MCF-7 cells invisible in routine authentication affecting cell function. *Sci Rep.* 2016;6(1):33011. <https://doi.org/10.1038/srep33011>
109. Baker M. Reproducibility: respect your cells! *Nature.* 2016;537(7620):433-5. <https://doi.org/10.1038/537433a>
110. Groothuis FA, Heringa MB, Nicol B, Hermens JL, Blaauboer BJ, Kramer NI. Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro-in vivo dose extrapolations. *Toxicology.* 2015;332:30-40. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.08.012>
111. Kramer NI, Hermens JL, Schirmer K. The influence of modes of action and physicochemical properties of chemicals on the correlation between in vitro and acute fish toxicity data. *Toxicol In Vitro.* 2009;23(7):1372-9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.029>
112. Dormont D. Transmissible spongiform encephalopathy agents and animal sera. *Dev Biol Stand.* 1999;99:25-34.
113. Wessman SJ, Levings RL. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Dev Biol Stand.* 1999;99:3-8.
114. Hawkes PW. Fetal bovine serum: geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresour Bioprocess.* 2015;2(1):34. <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0063-7>
115. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffel H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX.* 2010;53-62. <https://doi.org/10.14573/altex.2010.1.53>
116. Gstraunthaler G, Rauch C, Feifel, Lindl T. Preparation of platelet lysates for mesenchymal stem cell culture media. *J Stem Cells Res Rev Rep.* 2015;2(1):1021.
117. Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G et al. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro.* 2004;18(1):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.08.009>
118. Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J et al. Fetal Bovine Serum (FBS): past - present - future. *ALTEX.* 2018;35(1):99-118. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>
119. Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus Med Hemother.* 2013;40(5):326-35. <https://doi.org/10.1159/000354061>
120. Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev.* 2013;27(2):77-89. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2013.02.001>
121. Hemeda H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2014;16(2):170-80. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.004>
122. Shih DT, Burnouf T. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *N Biotechnol.* 2015;32(1):199-211. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.06.001>
123. Abaci HE, Shuler ML. Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling. *Integr Biol.* 2015;7(4):383-91. <https://doi.org/10.1039/C4IB00292J>
124. Zhang B, Radisic M. Organ-on-a-chip devices advance to market. *Lab Chip.* 2017;17(14):2395-420. <https://doi.org/10.1039/C6LC01554A>
125. Iori E, Vinci B, Murphy E, Marescotti MC, Avogaro A, Ahluwalia A. Glucose and fatty acid metabolism in a 3 tissue in-vitro model challenged with normo- and hyperglycaemia. *PLoS One.* 2012;7(4):e34704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034704>
126. Guzzardi MA, Domenici C, Ahluwalia A. Metabolic control through hepatocyte and adipose tissue cross-talk in a multicompartmental modular bioreactor. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(11-12):1635-42. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0541>
127. Wikswo JP, Block FE 3rd, Cliffel DE, Goodwin CR, Marasco CC, Markov DA et al. Engineering challenges for



- instrumenting and controlling integrated organ-on-chip systems. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2013;60(3):682-90. <https://doi.org/10.1109/TBME.2013.2244891>
128. Maass C, Stokes CL, Griffith LG, Cirit M. Multi-functional scaling methodology for translational pharmacokinetic and pharmacodynamic applications using integrated microphysiological systems (MPS). *Integr Biol.* 2017;9(4):290-302. <https://doi.org/10.1039/C6IB00243A>
129. Miller PG, Shuler ML. Design and demonstration of a pumpless 14 compartment microphysiological system. *Biotechnol Bioeng.* 2016;113(10):2213-27. <https://doi.org/10.1002/bit.25989>
130. Wikswa JP, Curtis EL, Eagleton ZE, Evans BC, Kole A, Hofmeister LH et al. Scaling and systems biology for integrating multiple organs-on-a-chip. *Lab Chip.* 2013;13(18):3496-511. <https://doi.org/10.1039/c3lc50243k>
131. Sung JH, Srinivasan B, Esch MB, McLamb WT, Bernabini C, Shuler ML et al. Using physiologically-based pharmacokinetic-guided “body-on-a-chip” systems to predict mammalian response to drug and chemical exposure. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(9):1225-39. <https://doi.org/10.1177/1535370214529397>
132. Moraes C, Labuz JM, Leung BM, Inoue M, Chun TH, Takayama S. On being the right size: scaling effects in designing a human-on-a-chip. *Integr Biol.* 2013;5(9):1149-61. <https://doi.org/10.1039/c3ib40040a>
133. Sung JH, Esch MB, Prot JM, Long CJ, Smith A, Hickman JJ et al. Microfabricated mammalian organ systems and their integration into models of whole animals and humans. *Lab Chip.* 2013;13(7):1201-12. <https://doi.org/10.1039/c3lc41017j>
134. Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z et al. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature.* 2010;468(7321):310-5. <https://doi.org/10.1038/nature09493>
135. Ahadian S, Ramón-Azcón J, Ostrovidov S, Camci-Unal G, Hosseini V, Kaji H et al. Interdigitated array of Pt electrodes for electrical stimulation and engineering of aligned muscle tissue. *Lab Chip.* 2012;12(18):3491-503. <https://doi.org/10.1039/c2lc40479f>
136. Johnstone AF, Gross GW, Weiss DG, Schroeder OH, Gramowski A, Shafer TJ. Microelectrode arrays: a physiologically based neurotoxicity testing platform for the 21st century. *Neurotoxicology.* 2010;31(4):331-50. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.04.001>
137. Ferrell N, Desai RR, Fleischman AJ, Roy S, Humes HD, Fissell WH. A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial electrical resistance (TEER) measurement electrodes for evaluation of renal epithelial cells. *Biotechnol Bioeng.* 2010;107(4):707-16. <https://doi.org/10.1002/bit.22835>
138. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773-85. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
139. Organovo Holdings INC. ExVive™ human tissue models & services for research. San Diego: Organovo; 2018.
140. Amin R, Knowlton S, Hart A, Yenilmez B, Ghaderinezhad F, Katebifar S et al. 3D-printed microfluidic devices. *Biofabrication.* 2016;8(2):022001. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/2/022001>

Agradecimentos

À Célia Maria Gaudêncio e à Roberta Francese Paiva, pelo auxílio técnico prestado na execução deste trabalho.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Perspectivas e desafios regulatórios no uso de células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais

Perspectives and regulatory challenges for the application of stem cells in alternative methods to animal testing

Cintia Delai da Silva Horinouchi
Ana Paula Ressetti Abud
Ariane Caroline Paschoal
Crisciele Kuligosvisk
Thamile Luciane Reus
Bruno Dallagiovanna Muniz
Alessandra Melo de Aguiar*

RESUMO

Introdução: Utilizar células-tronco para avaliações toxicológicas parece ser uma estratégia promissora para permitir uma maior predição de efeitos em humanos. Entretanto, no Brasil, não existe legislação específica que regulamente o uso de células-tronco para fins não terapêuticos de desenvolvimento tecnológico, diagnóstico ou como método alternativo ao uso de animais. **Objetivo:** Revisar a literatura e fundamentar um panorama da situação atual do uso não terapêutico de células-tronco no Brasil e no mundo. **Método:** Realizado levantamento bibliográfico não sistemático reunindo artigos científicos e legislação. **Resultados:** Essa revisão traz a abordagem atual da literatura científica e da legislação brasileira e discorre brevemente sobre abordagens regulatórias internacionais no que concerne ao uso não terapêutico de células-tronco. Em contrapartida, a legislação brasileira é bastante abrangente e madura na regulamentação de sangue e hemoderivados e pode servir de modelo para o uso não terapêutico de células-tronco ou outros materiais de origem humana. **Conclusões:** O incentivo do debate pelos órgãos e entidades interessadas é o primeiro passo para iniciar o desenvolvimento de uma legislação específica que permita o desenvolvimento científico-tecnológico do Brasil de maneira a acompanhar os avanços biotecnológicos mundiais.

PALAVRAS-CHAVE: Células-tronco; Biotecnologia; Legislação Sanitária; Regulamentação; Métodos Alternativos

ABSTRACT

Introduction: The use of stem cells for toxicological evaluations seems to be a promising strategy since it allows a greater prediction of human effects. However, in Brazil, there is no specific legislation regulating the use of stem cells for non-therapeutic purposes, technological development, diagnosis or as an alternative method to animal testing. **Objective:** To review the literature and to provide an overview of the current situation of the non-therapeutic use of stem cells in Brazil and in the world. **Method:** A non-systematic bibliographic survey was carried out bringing together scientific articles and legislation. **Results:** This review brings the current approach of Brazilian legislation regarding the non-therapeutic use of human material and briefly discusses international regulatory approaches that allow the non-therapeutic use of stem cells. On the other hand, the Brazilian legislation for use of blood and blood products is quite broad and mature and could serve as a model for the non-therapeutic use of stem cells or other materials of human origin. **Conclusions:** The encouragement of the debate by the interested bodies and entities is the first step to initiate the development of specific legislation that could allow the scientific and technological development of Brazil in order to follow the world's biotechnological advances.

Laboratório de Biologia Básica de
Células-Tronco, Instituto Carlos
Chagas, Fiocruz-Paraná, Curitiba,
PR, Brasil

* E-mail: alessandra.aguiar@fiocruz.br

Recebido: 23 out 2017
Aprovado: 25 abr 2018

KEYWORDS: Stem Cells; Biotechnology; Health Legislation; Regulation; Alternative Methods



INTRODUÇÃO

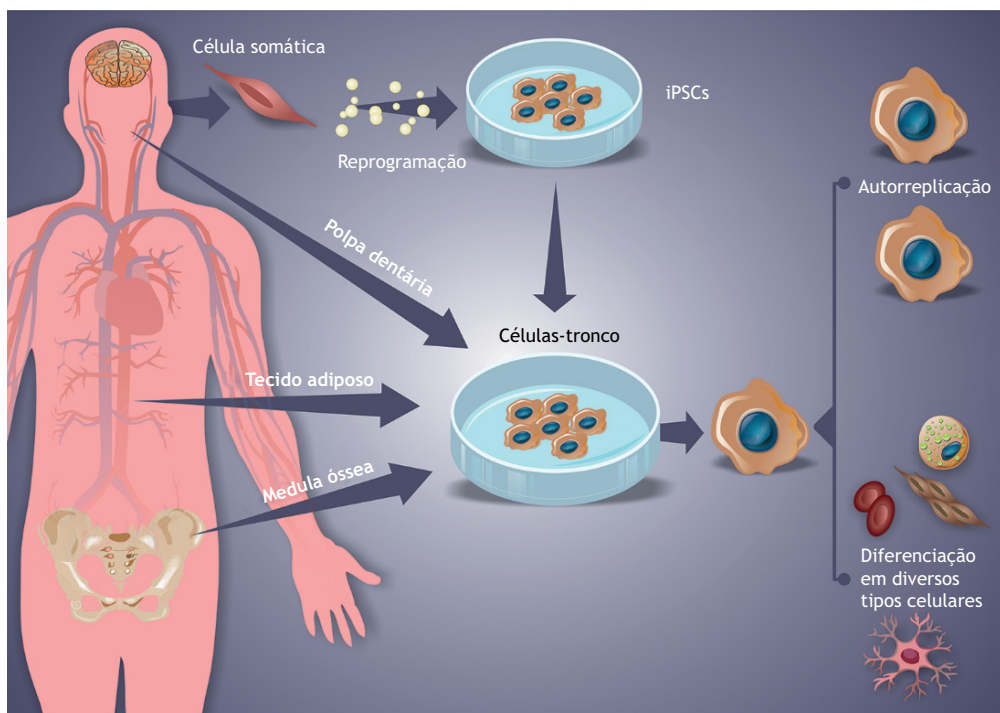
As células-tronco distinguem-se dos demais tipos celulares por duas principais características: o potencial de autorrenovação e o estado indiferenciado que permite a maturação em diversos tipos celulares (Figura 1). A capacidade de replicação das células-tronco faz com que estas células, não especializadas, possam se renovar por meio de divisão celular, mesmo após longos períodos de inatividade¹. Além disso, sob certas condições fisiológicas ou experimentais, essas células podem ser induzidas à diferenciação em células específicas de tecidos ou órgãos². Em alguns órgãos, as células-tronco residentes e tecido-específicas como no intestino, pele e a medula óssea, entre outros, dividem-se regularmente para manter o órgão ou tecidos em condições fisiológicas. Entretanto, em órgãos mais complexos, como o pâncreas e o coração, esses potenciais de autorreplicação e diferenciação celular são reduzidos e ocorrem apenas sob condições especiais³.

As células-tronco têm papel crucial na formação dos órgãos e tecidos durante o desenvolvimento e ao longo do crescimento humano, dividindo-se e diferenciando sempre que necessário para substituir células mortas, contribuindo para a homeostase tecidual⁴.

O potencial de diferenciação das células-tronco varia de acordo com sua fase de desenvolvimento e está diretamente relacionado com sua ontogenia. As células-tronco totipotentes aparecem nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário (na fase de

mórula) e são capazes de se diferenciar e formar todo o organismo, incluindo os anexos extraembrionários, como a placenta⁵. Já as células-tronco embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto e, por serem pluripotentes, possuem a capacidade de dar origem a tipos celulares dos três folhetos embrionários, exceto os anexos extraembrionários^{5,6}. Já as células-tronco somáticas derivadas de tecidos adultos são chamadas multipotentes, oligopotentes ou unipotentes e apresentam capacidade de diferenciação mais restrita, geralmente nos tipos celulares de seu órgão de origem⁷.

A pluripotência das células-tronco embrionárias é uma característica de grande interesse pela sua potencialidade de aplicação na busca de tratamentos para diversas doenças, além de representar um excelente modelo de estudo na investigação de novos fármacos⁵, estudos toxicológicos ou métodos alternativos ao uso de animais^{8,9}. Entretanto, estudos demonstram que o uso de células-tronco embrionárias pode estar relacionado à rejeição tecidual e ao risco de formação de tumores, devido a sua alta capacidade de diferenciação e proliferação¹⁰. Além disso, questões éticas associadas à sua forma de obtenção, que envolve o uso e a destruição de embriões humanos, são bastante relevantes. Não há consenso mundial e a legislação varia em cada país, conforme revisto¹¹. No Brasil, seu uso deve ser realizado de acordo com o que rege a Lei n° 11.105, de 25 de março de 2005, conhecida como Lei de Biossegurança¹².



Fonte: Elaborada pelos autores, a partir da revisão da literatura.

Figura 1. O que são células-tronco? Representação esquemática dos principais tecidos de onde podem ser extraídas células-tronco mesenquimais (CTM) como medula óssea, tecido adiposo e polpa dentária, não menosprezando outras fontes como cordão umbilical e sangue menstrual. Além disso, células somáticas podem ser reprogramadas a fim de obter células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). Uma vez obtidas, as células-tronco de ambas as fontes podem ser mantidas em cultivo através de sua característica de autorreplicação ou induzidas a se diferenciarem em diversos tipos celulares, de acordo com as potencialidades de cada tipo de célula-fonte e os indutores utilizados.



Em busca de alternativas ao uso de células-tronco embrionárias, em 2006, os pesquisadores Kazutoshi Takahashi e Shinya Yamanaka apresentaram uma nova fonte de células-tronco pluripotentes humanas, com o desenvolvimento das células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cell* - iPSC) a partir de células adultas diferenciadas. Alterando os níveis de expressão de quatro fatores de transcrição (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf-4), foi possível induzir a reprogramação de uma célula somática adulta de forma que ela retornasse ao seu estado indiferenciado¹⁰. Essa descoberta inovadora permite a obtenção de células-tronco pluripotentes geradas a partir de células adultas do próprio paciente com grande potencial de aplicação na terapia celular e medicina regenerativa, tendo como principais vantagens: a tolerância imunológica, uma vez que podem ser derivadas de células do próprio paciente, bem como a ausência de questões éticas associadas ao uso de embriões^{13,14}. Além disso, as iPSC derivadas de pacientes portadores de patologias ainda não totalmente elucidadas podem servir como um modelo eficaz na pesquisa da fisiopatologia dessas doenças e ainda como ferramenta biotecnológica na triagem de fármacos¹⁵. A descoberta e a possibilidade de reprogramação geraram tamanho impacto que, em 2012, os pesquisadores Shinya Yamanaka e John B. Gurdon compartilharam o Prêmio Nobel de Medicina¹⁶.

Entretanto, o processo de geração de iPSC envolve tecnologias que, até o momento, não parecem ser ideais para a aplicação terapêutica. Inicialmente foram utilizados retrovírus e/ou lentivírus para transduzir os genes de interesse, contudo essa abordagem permite a ocorrência de mutações de inserção e transformações potencialmente malignas no cromossomo do hospedeiro ou a indução de respostas imunológicas indesejadas^{17,18}. Novas metodologias envolvendo plasmídeos¹⁹, ácidos ribonucleicos (RNA) sintetizados²⁰ e proteínas²¹ têm sido desenvolvidas e testadas demonstrando resultados promissores. No entanto, os riscos de danos genéticos e de crescimento celular descontrolado ainda não podem ser totalmente descartados, assim como não se pode prever com certeza o destino dessas células quando aplicadas *in vivo*²².

As células-tronco adultas, embora não sejam pluripotentes, e sim multipotentes, oligopotentes ou unipotentes, são capazes de originar um número significativo de tipos celulares específicos, o que as tornam atrativas como ferramenta terapêutica e/ou tecnológica²³. Entre as células-tronco adultas, podemos destacar as células-tronco mesenquimais (CTM), que formam uma população heterogênea de células estromais que apresentam a vantagem de poderem ser isoladas de diversos tecidos adultos²⁴. Essas células são progenitoras, autorrenováveis e com potencial de diferenciação para células de origem mesodermal, como adipócitos, osteócitos e condrócitos⁶. Na maioria dos tecidos, a capacidade de autorrenovação das CTM está diretamente relacionada com a capacidade de regeneração tecidual¹. Acredita-se que, além da capacidade de diferenciação, essas células atuam na modulação das respostas de reparo tecidual de maneira parácrina ao liberar fatores de crescimento e outros mediadores interagindo com o nicho tecidual^{24,25,26}.

As CTM podem ser isoladas praticamente de qualquer tecido (Figura 1) e, embora sejam mais comumente isoladas da medula óssea²⁷, estudos demonstram o isolamento efetivo de CTM de outras fontes, como tecido adiposo²⁸, placenta²⁹, polpa dentária³⁰ e cordão umbilical^{31,32}.

Essas fontes apresentam a vantagem de configurarem material de fácil obtenção, que na maioria das vezes é descartado e normalmente não requer procedimentos invasivos adicionais para obtenção.

As CTM derivadas da medula óssea são as mais estudadas e utilizadas atualmente, entretanto, essas células são geralmente coletadas da crista ilíaca de doadores voluntários e, portanto, o processo de obtenção é considerado invasivo e de baixo rendimento³³. A polpa dentária é considerada uma fonte promissora de CTM para reconstruções ortopédicas e maxilofaciais, pois podem gerar tecido mineralizado, matriz extracelular e outros tecidos conjuntivos³⁴. As células derivadas da placenta e do cordão umbilical apresentam como vantagem uma maior capacidade de autorrenovação quando comparadas às CTM da medula óssea³⁵. O tecido adiposo, por sua vez, tem sido considerado uma das fontes mais abundantes e de fácil acesso para coleta de CTM, as quais apresentam as mesmas características multipotentes das CTM isoladas de outras fontes^{36,37}.

Considerando o uso de células-tronco humanas para finalidades não terapêuticas, no processo de seleção do tipo de célula-tronco a ser utilizado, devem ser avaliadas características como potencial de diferenciação celular (multipotência ou pluripotência) e também a conveniência de obtenção do tecido fonte dessas células, por exemplo, tecidos de descarte ou provenientes de procedimentos não invasivos tendem a ser mais interessantes.

Embora as células-tronco representem uma ferramenta biotecnológica bastante promissora, essa aplicação ainda não é uma realidade concreta em nosso país. Nesta revisão, fazemos uma breve descrição das potencialidades não terapêuticas das células-tronco no desenvolvimento de metodologias de avaliação de toxicidade e métodos alternativos ao uso de animais e descrevemos a situação regulatória atual no país para esse tipo de aplicação. Além disso, citamos modelos regulatórios internacionais para o uso de material humano e a legislação nacional que rege o uso de sangue e hemoderivados como exemplos que possam fundamentar a discussão e o desenvolvimento de regulamentação específica que respalde o uso não terapêutico de células-tronco no Brasil.

MÉTODO

O presente estudo foi desenvolvido em formato de revisão de literatura narrativa. Para tanto, o levantamento bibliográfico foi realizado de maneira não sistemática reunindo artigos científicos e documentos da legislação que pudessem fundamentar um panorama da situação atual do uso não terapêutico de células-tronco no Brasil e no mundo.

A busca pelas referências bibliográficas foi realizada por consulta às bases de dados PubMed e *Google Scholar* empregando palavras-chaves como: *stem cells* (células-tronco), *regulation* (regulamentação), *alternative methods* (métodos alternativos). A legislação brasileira foi consultada através das publicações no Diário Oficial da União e dos portais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Além disso, sempre que necessário, algumas referências (publicações na mídia, artigos e revisões científicas) foram buscadas de maneira direcionada para complementar a discussão dos assuntos abordados.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais

O uso de células-tronco em terapias celulares tem sido considerado um grande marco no avanço e desenvolvimento da medicina humana e a regulamentação de seu uso no cenário nacional foi recentemente revista³⁸. Outra grande possibilidade de aplicação, ainda não tão explorada mas muito promissora, é o uso de células-tronco no desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais, com o foco na aplicação do princípio dos 3Rs: redução, refinamento e substituição³⁹; e também no desenvolvimento de ensaios de avaliação e predição de toxicidade com maior relevância para humanos⁸.

Apenas na Europa estima-se que mais de 12 milhões de animais foram utilizados em experimentação animal em 2005⁴⁰ e estima-se que entre 50 e 100 milhões de animais são utilizados em experimentação animal mundialmente a cada ano⁴¹. Existe uma demanda mundial urgente pela redução e refinamento do uso de animais nas atividades de pesquisa e desenvolvimento. No Brasil, essa realidade tornou-se mais notória após a criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) em 2012 e do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) em 2013. Além disso, com a publicação da Resolução Normativa (RN) nº 17, de 3 de julho de 2014, pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), que dispunha sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa no Brasil⁴², e no mesmo ano, com a publicação da RN nº 18, de 24 de setembro de 2014, 17 métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa foram reconhecidos e deverão obrigatoriamente ser aplicados em substituição aos métodos originais em até 5 anos⁴³. Em 2016, uma nova resolução, a RN nº 31, de 18 de agosto de 2016, adicionou outros sete métodos alternativos reconhecidos à lista original⁴⁴.

Uma das áreas de maior demanda para a introdução de métodos alternativos ao uso de animais é a toxicologia, uma vez que análises do potencial toxicológico são cruciais tanto na fase de desenvolvimento quanto durante os processos regulatório e de validação de novos produtos. Além das questões éticas envolvendo o uso de animais de experimentação, existe um grande apelo econômico para o desenvolvimento de novos testes que tenham maior previsibilidade, uma vez que estudos demonstram que substâncias aparentemente não tóxicas em modelos não humanos podem apresentar alta toxicidade quando aplicadas em humanos, durante testes clínicos⁴⁵. Um exemplo clássico é o caso da talidomida, que durante anos de pesquisa não apresentou qualquer toxicidade reprodutiva em camundongos, mas, ao ser administrada em humanos, promoveu efeitos teratogênicos devastadores na década de 1950^{46,47}. Essa disparidade dos efeitos de uma substância entre humanos e animais ocorre devido à grande diversidade genética, metabólica e fisiológica presente entre espécies, mesmo que possuam proximidade evolutiva⁴⁸.

Portanto, estudos envolvendo células e tecidos humanos se fazem fundamentais na tentativa de suprir essa demanda. Dentro deste contexto, em 2012, Meganathan et al. realizaram um estudo avaliando o efeito da talidomida em células-tronco

embrionárias humanas (hESC). A talidomida apresentou efeitos tóxicos nestas células durante a indução da diferenciação. Desta forma, os autores propuseram este modelo como uma alternativa para a detecção de efeitos teratogênicos de drogas⁴⁹. Esta mesma abordagem foi proposta por outros autores através da avaliação da teratogenicidade da talidomida e de substâncias como o etanol, cafeína, ácido retinoico e lítio⁵⁰.

Já em 1959, Russell e Burch indicavam como alternativa aos testes com animais, modelos celulares para a avaliação de toxicidade. Desde então, muitos ensaios *in vitro* foram desenvolvidos e testados, e atualmente existem vários modelos celulares utilizados em toxicologia. Esses modelos utilizam tanto células primárias quanto células transformadas, sendo que ambas apresentam algum tipo de limitação como baixa taxa proliferativa e acúmulo de mutações gênicas, respectivamente⁴⁸.

As células-tronco são consideradas alvos para o desenvolvimento de modelos com alto potencial de aplicação em ensaios toxicológicos devido as suas características de autorrenovação e de diferenciação⁵¹. Devido a sua capacidade de diferenciação, apresentam potencial para originar uma grande variedade de tecidos o que poderia substituir ou complementar modelos animais, evitando diferenças interespecie. Dessa maneira, essas células têm sido extensivamente avaliadas quanto a sua empregabilidade no desenvolvimento de modelos de toxicidade. Para esse fim, as células-tronco podem ser utilizadas tanto em seu estado indiferenciado, quanto diferenciado e, por isso, apresentam um leque maior de aplicação, o que confere diversas vantagens quando comparadas a outros tipos celulares⁵².

Ensaio toxicológicos baseados em células-tronco são classificados em três categorias: avaliação da toxicidade aguda através da determinação da viabilidade/sobrevivência celular (citotoxicidade); avaliação do efeito inibitório sobre a diferenciação celular (ensaio toxicológicos de desenvolvimento); e avaliação de efeitos inibitórios/estimulatórios sobre funções celulares específicas (ensaio funcionais). Dessa maneira, muitos modelos para avaliação toxicológica podem ser desenvolvidos através da aplicação de células-tronco em cultura⁵³.

Células-tronco pluripotentes induzidas e ensaios de predição da toxicidade *in vitro*

Atualmente existe um único ensaio de toxicidade validado com células-tronco, o *Embryonic Stem Cell Test* (EST). Esse ensaio utiliza células-tronco embrionárias murinas como substrato e avalia tanto a viabilidade celular em comparação com células da linhagem BALB/c 3T3 quanto o processo de diferenciação a cardiomiócitos após exposição a substâncias testes (ECVAM nº 113)⁵⁴. Entretanto, as células utilizadas são provenientes de camundongos e esse método contempla apenas o processo de diferenciação cardiomiogênica. Dessa maneira, faz-se essencial o desenvolvimento e a validação de novos métodos utilizando células-tronco como substrato⁵⁴. Após a publicação do EST, alguns grupos desenvolveram aprimoramentos desse protocolo, visando maior acurácia na avaliação toxicológica. Esses aprimoramentos são bastante promissores para uma melhor avaliação preditiva



de toxicidade, pois possibilitam a análise da expressão de moléculas envolvidas no processo de diferenciação celular^{54,55,56}.

O potencial de diferenciação das células-tronco pluripotentes permite a avaliação toxicológica em diversas linhagens celulares, possibilitando a avaliação de funções celulares específicas como secreção de albumina e armazenamento de glicogênio, bem como capacidade de metabolização de substâncias durante a diferenciação em hepatócitos, causas moleculares das arritmias durante a diferenciação cardíaca e disfunções durante a diferenciação neurogênica^{53,57}. A pluripotencialidade é uma grande vantagem, mas não se deve deixar de considerar que a padronização de processos de diferenciação em diferentes linhagens celulares ainda é objeto de estudo de muitos grupos. Linhagens de células pluripotentes podem apresentar maior ou menor grau de facilidade para a diferenciação. As iPSC possuem como característica manter marcas epigenéticas da célula de origem, o que poderá facilitar ou dificultar o processo de diferenciação em determinada linhagem^{58,59}. Devido a esses desafios, muitos pesquisadores nacionais e internacionais concentram esforços para desvendar e melhor compreender os mecanismos que levam ao processo de diferenciação celular^{60,61,62,63,64}. As células pluripotentes podem se manter em cultura durante longos períodos, o que permite a sua utilização para estudos toxicológicos de doses repetidas *in vitro*, aproximando-se do que é testado no modelo *in vivo* e caracterizando um grande avanço em testes não animais⁶⁵. A desvantagem dessa célula é o valor investido na cultura celular. Os preços dos meios utilizados ainda são altos, o que resulta em uma cultura bastante dispendiosa quando se compara à das células-tronco adultas. Devido a isso, algumas empresas já desenvolveram meios de cultura mais acessíveis e que apresentam a mesma eficiência dos meios tradicionais. Apesar das desvantagens mostradas, o uso das células-tronco pluripotentes, em particular as iPSC^{10,66}, representa um grande avanço para o desenvolvimento de ensaios toxicológicos, podendo servir como modelos para a avaliação de patologias de cunho genético, sem as questões éticas associadas à derivação e uso de hESC mas propiciando a possibilidade da toxicologia e farmacologia personalizadas^{47,57}.

Em 2014, Pistollato et al. realizaram um estudo comparativo utilizando células-tronco embrionárias e iPSC para a avaliação de neurotoxicidade. O estudo demonstrou resultados semelhantes entre os dois tipos celulares, comprovando que as células reprogramadas também representam um modelo promissor na avaliação de toxicidade⁶⁷.

As iPSC podem ser originadas de vários indivíduos, os quais apresentam *backgrounds* genéticos distintos, devido sua origem e seu estilo de vida. Dessa maneira, abre portas para a visualização de uma ação toxicológica mais abrangente, pois uma célula derivada de um único indivíduo não poderá capturar essa grande diversidade genética e epigenética que ocorre na dinâmica das populações. Essas células também podem permitir uma análise toxicológica personalizada, uma vez que podem ser originadas tanto de pessoas saudáveis, quanto de portadores de patologias. Em 2013, Liang et al. avaliaram a cardiotoxicidade em células reprogramadas de pacientes com distúrbios cardíacos hereditários, comparando com indivíduos saudáveis. Através deste estudo, foi possível

observar que células derivadas dos dois grupos de indivíduos exibiram susceptibilidades diferentes a drogas cardiotoxícas, indicando a possibilidade da medicina e toxicologia personalizadas⁶⁸. Atualmente já existem bancos de iPSC que podem ser utilizados para a verificação do perfil genético das populações e também para testes toxicológicos, indicando como a substância atuaria na população como um todo^{69,70}. As iPSC consistem, portanto, em um modelo muito promissor para a toxicologia.

Células-tronco mesenquimais e métodos alternativos ao uso de animais

Além das células-tronco pluripotentes, as células-tronco adultas também representam uma importante fonte de células a serem aplicadas na toxicologia. Scanu et al. avaliaram células-tronco derivadas de medula óssea como substrato para o Método OECD TG 129, ensaio que avalia a viabilidade celular através da captação do corante vermelho neutro pelas células viáveis, e que é recomendado pelo *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM)^{71,72}. Esse mesmo grupo investigou a ação citotóxica de nanopartículas de cobre sobre esse mesmo tipo celular⁷³. Recentemente nosso grupo demonstrou que células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo, submetidas ao ensaio de citotoxicidade preconizado pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), OECD TG 129, representam um tipo celular adequado para a avaliação do potencial citotóxico do painel de substâncias referenciadas pelo ICCVAM⁷¹. Nesse trabalho, as células-tronco adultas demonstraram padrão de resposta semelhante ao apresentado pela célula de referência BALB/c 3T3⁷⁴, mas com a vantagem de serem de origem humana o que aumenta a previsibilidade da toxicidade dessas substâncias em humanos. Em outro estudo do nosso grupo que corrobora o dado acima citado, foi realizada a avaliação comparativa de células-tronco adultas derivadas de diferentes fontes como substrato para avaliação toxicológica. Os resultados mostraram que as células se comportam de maneira semelhante⁷⁵. Além disso, outra vantagem apontada é que os tecidos utilizados como fontes dessas células correspondem a material de descarte, que poderiam ser aproveitados em ensaios toxicológicos. Contudo um dos grandes desafios para aplicação regulatória de células-tronco adultas é a falta de marco legal que verse sobre o uso não terapêutico de células-tronco no Brasil.

Recentemente, Xu et al. realizaram um estudo avaliando a citotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio utilizando células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo e as induzindo à diferenciação adipogênica. Os resultados demonstraram que baixas concentrações destas nanopartículas foram capazes de promover alterações na diferenciação celular. Desta forma, concluíram que ensaios de citotoxicidade baseados em funções celulares especializadas, como por exemplo, a diferenciação celular, proporcionam maior sensibilidade e revelam efeitos indetectáveis por técnicas de avaliação tradicionais, como quantificação de espécies reativas de oxigênio e proliferação celular⁷⁶.

As células-tronco também são uma excelente ferramenta na identificação de substâncias que causem alterações epigenéticas como, mudanças nos níveis de metilação do DNA ou acetilação



de histonas, variantes durante o processamento do mRNA ou modificações pós-traducionais indesejadas, que poderiam transformar as células, fazendo com que perdessem o controle dos seus processos fundamentais como, proliferação, diferenciação, apoptose e senescência^{68,77}. Esse tipo de teste, que avalia alterações funcionais ou da expressão gênica, teria o poder de indicar efeitos ainda mais prejudiciais do que os observados em células diferenciadas, destacando-se a importância do modelo como uma ferramenta mais sensível na avaliação toxicológica.

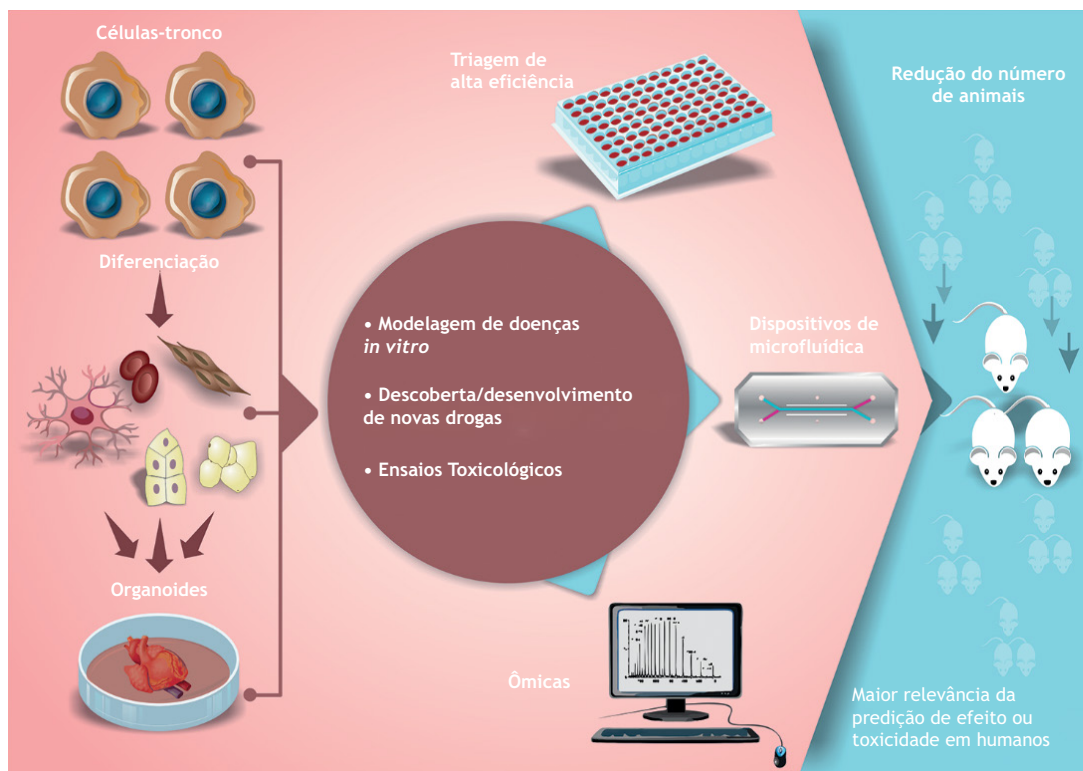
Desenvolvimento de métodos alternativos com maior relevância fisiológica

Apesar das vantagens apresentadas, modelos que utilizam a cultura celular bidimensional tradicional são limitados e criticados, pois não apresentam capacidade de mimetizar as condições reais de um organismo vivo. Embora seja possível observar vários processos celulares que ocorrem nos tecidos humanos, as interações entre as células, matriz, tecidos e órgãos não são consideradas. Procurando suprir essa lacuna, nos últimos anos foram desenvolvidos sistemas que integram vários tipos celulares *in vitro*, utilizando técnicas de perfusão através da microfluídica. Esses sistemas permitem o cultivo tridimensional de miniórgãos, além do cocultivo de diferentes células e estruturas, proporcionando a melhor

simulação das condições fisiológicas em comparação ao modelo tradicional⁷⁸. O cultivo em sistema de microfluídica em plataformas do tipo *organ-on-a-chip*, na qual diferentes sistemas fisiológicos estão interconectados, possibilita a verificação da ação de uma substância em diferentes órgãos simultaneamente⁷⁹. Por possibilitar a utilização de células humanas, esses sistemas deverão prever melhor os resultados que ocorreriam em testes clínicos.

As iPSC são sistemas celulares vantajosos para serem aplicados nas plataformas de microfluídica, pois propiciam o desenvolvimento de órgãos e sistemas paciente-específicos, tornando possível a avaliação toxicológica personalizada⁸⁰. Além disso, permitem a análise toxicológica sobre doenças raras, para as quais não existem modelos de estudo adequados, possibilitando triagem e testes de substâncias em modelos de doenças de difícil tratamento, possibilitando a seleção de substâncias eficazes específicas e a determinação de doses não tóxicas de maneira personalizada^{80,81}.

Considerando os avanços observados no uso de células-tronco como substrato em testes de avaliação toxicológica (Figura 2), as vantagens da utilização dessas células são inúmeras. A toxicologia que utiliza células-tronco como substrato permite a determinação de diferentes formas de toxicidade como: aguda, embrionária, de desenvolvimento, reprodutiva e funcional. Os testes



Fonte: Elaborada pelos autores, a partir da revisão da literatura.

Figura 2. Uso não terapêutico de células-tronco como método alternativo ao uso de animais. Células-tronco humanas, com base em suas características de autorreplicação ou diferenciação celular, ou mesmo a formação de organoides derivados de células-tronco, podem ser utilizadas em diferentes abordagens não terapêuticas para modelagem de doenças, estudo de novas drogas e também ensaios toxicológicos. Diversas abordagens podem ser utilizadas para a avaliação dos dados, entre elas ensaios de triagem em larga escala, abordagens com a utilização de dispositivos de microfluídica ou análises de expressão gênica, de proteínas ou metabólitos, como análises de transcriptoma, proteoma e metabolômica, entre outras. Os principais resultados esperados com o emprego de células-tronco em abordagens não terapêuticas são a redução do uso de animais de laboratório e geração de dados com maior relevância para a predição do efeito ou da toxicidade em humanos.



realizados com células-tronco podem, portanto, ser bastante abrangentes e responder não apenas uma, mas diversas perguntas no processo de desenvolvimento ou regulação de uma nova substância, através por exemplo de abordagens em larga escala que envolvem as “ômicas”, como transcriptoma ou mesmo a toxicogenômica⁸, contribuindo para a melhoria da saúde humana ao mesmo tempo que reduz a utilização do modelo animal⁴⁷. Apesar de promissor, os sistemas de microfluídica são onerosos e em sua maioria experimentais ou em desenvolvimento, não existindo ainda dispositivos validados, embora estudos de validação dos dispositivos já estejam em andamento⁸².

Não há regulamentação brasileira para o uso não terapêutico de células-tronco ou de seus bioprodutos

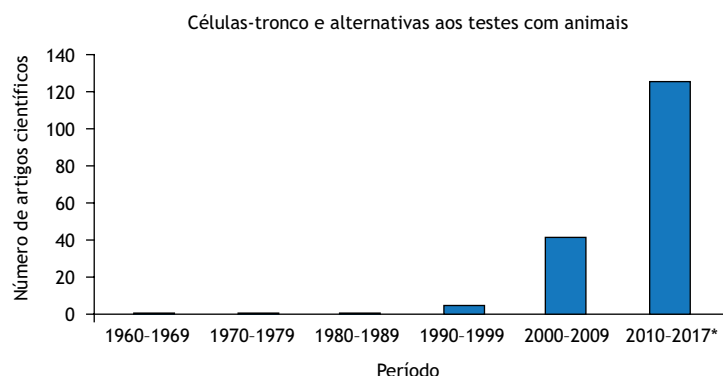
Atualmente é de comum senso que o potencial uso de células-tronco vai muito além de aplicações terapêuticas. As últimas décadas foram marcadas por um desenvolvimento acelerado de técnicas de biotecnologia que trouxeram junto a elas um maior entendimento da fisiologia das células-tronco, tornando possível o emprego cada vez mais efetivo dessas células em terapias celulares e abrindo novas possibilidades de aplicações biotecnológicas. A crescente compreensão de como modular a atividade e manter essas células em condições ideais tem beneficiado áreas biotecnológicas de desenvolvimento de novas drogas, pesquisas fisiopatológicas e diagnósticas, nas quais as células-tronco têm se mostrado ferramentas promissoras com diversas potencialidades para o desenvolvimento técnico-científico⁸³. Esse novo olhar para as células-tronco segue uma tendência mundial em que materiais de origem humana como fluidos, tecidos e células são cada vez mais considerados fontes valiosas de recursos para a pesquisa e desenvolvimento de metodologias diagnósticas e terapêuticas⁸⁴.

Embora os benefícios em se utilizar material humano no desenvolvimento da ciência médica sejam notórios, não se pode negar que esse tipo de atividade traz preocupações éticas, legais e técnicas, uma vez que o Brasil não possui legislação específica que regula a coleta, o armazenamento e o uso de material humano para

fins de desenvolvimento tecnológico, diagnóstico ou mesmo para o uso como método alternativo ao uso de animais⁸⁴. A legislação brasileira parece não ter acompanhado o desenvolvimento científico-tecnológico com a mesma velocidade em que este ocorre. Parece haver uma lacuna entre o marco regulatório e o desenvolvimento científico-tecnológico nesta área e não há legislação brasileira relacionada às práticas que envolvem a aplicação de material de origem humana, como as células-tronco em diagnóstico, desenvolvimento de drogas e ensaios toxicológicos. Na época da promulgação da Constituição Federal de 1988⁸⁵, por exemplo, a aplicação de células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais nem era relatada na literatura, entretanto o interesse acerca dessa abordagem foi crescente ao longo do tempo. Nos últimos sete anos, o número de publicações sofreu um aumento de pelo menos três vezes em relação à década anterior, indicando o crescente desenvolvimento científico no uso de células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais (Figura 3). Desta forma, é inegável que a evolução do conhecimento científico deva ser considerada para fins regulatórios.

Adicionalmente, a falta de clareza e a ausência de regulamentação específica criam barreiras para a aplicação não terapêutica das células-tronco e sua aceitação para fins regulatórios. Essa questão tem ganhado cada vez mais importância e visibilidade, sendo pauta de discussão entre a comunidade científica, acadêmica, indústria, e órgãos regulamentadores e legisladores⁸⁶. Uma regulamentação consistente que permita a evolução da medicina, da ciência e da tecnologia ao mesmo tempo em que proteja a integridade humana é de interesse da comunidade, de profissionais da saúde, acadêmicos, legisladores, pesquisadores, empresas de biotecnologia, ciências da saúde e outras organizações, uma vez que traz benefícios imensuráveis⁸⁷.

Atualmente, a legislação brasileira regulamenta de maneira satisfatória, dentro do que hoje é tecnologicamente possível e disponível, o uso de células-tronco hematopoieticas humanas para transplantes e terapias celulares. Conforme revisado por Narahashi et al., a legislação ampara através de uma série de resoluções e



Fonte: Elaborada pelos autores, a partir da revisão da literatura.

Figura 3. Evolução temporal do número de artigos científicos disponíveis na base de dados PubMed relacionando os termos células-tronco (*stem-cells*) e métodos alternativos ao uso de animais (*alternative methods to animal testing*). Foi considerado o número de artigos científicos publicados a cada década, desde 1960 até 30 de setembro de 2017. Observou-se que até 1989 não havia publicação na área. Entretanto, nos últimos sete anos, o número de publicações sofreu um aumento de pelo menos três vezes em relação à década anterior, indicando o crescente desenvolvimento científico no uso de células-tronco em métodos alternativos ao uso de animais.



normas técnicas a utilização de células-tronco hematopoiéticas para transplantes e tratamento de uma série de doenças do sangue e pesquisas clínicas, garantindo a segurança do paciente, ao regulamentar a coleta, processamento, acondicionamento, armazenamento, testes de controle de qualidade, descarte e liberação para uso e transporte dessas células. Entretanto, essas normas não contemplam CTM e muito menos o uso de células-tronco para o desenvolvimento tecnológico e fins diagnósticos³⁸.

Ao buscar informações sobre o uso regulatório de células-tronco humanas para fins não terapêuticos na legislação brasileira, o que se encontra é bastante restrito em relação às células-tronco embrionárias, conforme regulamenta a Lei de Biossegurança. Nela estão descritos os limites e as condições para o uso de células-tronco embrionárias na pesquisa básica. Nada é descrito, entretanto, a respeito de células-tronco adultas¹², ou mesmo para a aplicação biotecnológica de células-tronco.

Na ausência de regulamentação específica para CTM, podemos considerar essas células como material biológico de origem humana de maneira geral, e verificar o que diz a legislação em relação ao uso não terapêutico desse tipo de material. Embora a Resolução nº 441, de 12 de maio de 2011⁸⁸, regulamente o estabelecimento e funcionamento de biobancos, ela prevê apenas o uso do material de origem humana para fins terapêuticos e pesquisas básicas acerca da fisiopatologia de doenças ainda não bem compreendidas. Não há, entretanto, regulamentação que considere o uso desse material no desenvolvimento tecnológico ou para fins diagnóstico, onde esse material não irá gerar conhecimento, mas sim, será uma ferramenta metodológica utilizada na rotina médico-hospitalar ou na descoberta ou desenvolvimento de novos fármacos ou produtos⁸⁴.

A Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Ministério da Saúde⁸⁹, que discorre sobre pesquisa envolvendo seres humanos, sustentada na Resolução nº 441/2011⁸⁸, que estabelece regras para a criação de biobancos, biorrepositórios e uso de material biológico proveniente desses bancos, regulamenta a utilização de biomateriais de origem humana. De acordo com essas normas, o uso deve ser restrito ao que for previamente aprovado em projeto de pesquisa específico e sempre após consentimento do doador do material. Assim, doador e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Comitê de Ética em Pesquisa (Conep/CEP) necessitam ser notificados e aprovar qualquer utilização distinta da previamente estabelecida e aprovada no projeto inicial^{88,89}. Infelizmente, tais normas não versam sobre o uso desse material como ferramenta tecnológica em kits diagnósticos, ensaios de toxicidade ou demais tecnologias envolvidas na triagem de novas drogas para fins regulatórios. A legislação ainda não acompanha a necessidade regulatória das novas intervenções tecnológicas e científicas trazendo diversos desafios regulatórios para o uso de materiais de origem humana na pesquisa⁸³.

Ao considerar as limitações regulatórias que envolvem células-tronco, os equívocos podem estar já vinculados ao termo “célula-tronco” que atualmente é considerado bastante genérico e gera confusão. O termo é geralmente primordialmente vinculado às células-tronco embrionárias e a tudo que essas trazem de questões éticas e legais, conforme revisto por Diniz e Avelino¹¹.

Entretanto, devemos considerar outras células-tronco como as iPSC, que parecem não envolver tantas questões éticas, e as células-tronco adultas, como as células-tronco hematopoiéticas por exemplo, que há muito tempo têm sido utilizadas na terapia celular⁹⁰ ou para obtenção de hemoderivados seguindo legislação própria, Lei nº 10.205, de 21 de março de 2001⁹¹. Uma vez que se trata de células diferentes com características e principalmente aplicações distintas, os meios de regulamentação do uso dessas células também precisam ser distintos e específicos.

Exemplos internacionais de abordagens regulatórias para o uso não terapêutico de células-tronco

Embora a legislação internacional esteja vários passos à frente da brasileira no quesito “uso de material de origem humana”, refletindo um distanciamento menor entre o estado da técnica e o marco regulatório, a pesquisa com células-tronco e sua aplicação na modelagem de doenças ou na descoberta de drogas, ainda gera discussões éticas e legais no mundo todo. As questões que ainda não estão claras envolvem, por exemplo, as iPSC e células-tronco adultas que podem ter aplicações que vão muito além da pesquisa e terapia celular, fato que parece ser negligenciado nas legislações vigentes⁹⁰. As questões éticas e legais envolvendo a pesquisa com células-tronco não se restringem a destruição ou não do embrião⁹², que parece ser a principal preocupação da população e talvez por isso seja um dos principais pontos contemplados nas legislações atuais. Por exemplo, as iPSC são derivadas de células somáticas adultas que podem ser doadas legalmente para pesquisa e não envolvem o uso de embriões. Entretanto, uma vez transformadas em linhagens celulares que serão armazenadas em bibliotecas e possivelmente utilizadas como biomateriais para fins não terapêuticos, questões relacionadas a privacidade do doador, consentimento e propriedade vão se tornando mais complexas e sem precedentes^{90,93}.

Embora a comercialização de órgãos e tecidos humanos seja proibida na maior parte do mundo, vários países já permitem a comercialização de material de origem humana para fins não terapêuticos, como fruto da atualização da legislação em resposta ao desenvolvimento biotecnológico⁸⁴. Na Europa, o uso de células-tronco para fins não terapêuticos é permitido e sustentado pela Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency - EMA*) que entende que esses produtos se classificam como Medicamentos de Terapia Avançada para uso humano, categoria que inclui produtos de terapia gênica, engenharia tecidual e terapia com células somáticas³⁸. Mesmo assim, ainda existem questões obscuras na regulamentação desse tipo de aplicação. As principais incertezas são acerca do montante e da importância da propriedade intelectual adicionado a um material humano necessários para que esse material se torne um bem comercializável. Alguns países europeus entendem que o dispêndio associado à coleta, processamento e estocagem do material configura propriedade intelectual substancial que justifica o tratamento do material como produto. Isso não quer dizer que não haja ainda preocupação com o sigilo, privacidade e consentimento dos doadores. Esses itens são seriamente considerados e regulamentados pelos códigos de ética que buscam a proteção e integridade do voluntário⁹⁵.



Inicialmente, a regulamentação europeia era mais restritiva, permitindo apenas biobancos conectados a hospitais, o que significava o uso de materiais de origem humana apenas para fins terapêuticos. Entretanto, o crescente desenvolvimento biotecnológico e a pressão da indústria impulsionaram os órgãos legisladores a promoverem alterações nas leis. Em 2008, uma nova regulamentação (EC nº 1.394/2007, de 13 de novembro de 2007)⁹⁶ entrou em vigor para facilitar a comercialização de produtos de engenharia tecidual de origem humana. Uma das principais mudanças que essa nova regulamentação trouxe foi a discriminação entre órgãos e tecidos humanos, ao estabelecer que tecidos humanos, ao contrário dos órgãos, seriam bens comercializáveis. Essa legislação deixa, entretanto, a cargo de cada país-membro da união europeia a regulamentação das questões éticas e legais envolvidas na utilização de material humano para fins não terapêuticos. Assim, cada país tem estabelecido suas próprias regras, e embora a venda de material humano seja proibida de maneira geral, isso não impede que materiais que tenham sido isolados, purificados e minimamente alterados sejam patenteados e comercializados⁹⁴.

Os Estados Unidos (EUA), embora em moldes distintos dos da Europa, também possuem uma legislação que acompanha o desenvolvimento industrial e tecnológico e permite a comercialização de produtos terapêuticos e biotecnológicos provenientes de bioengenharia de tecidos e células humanas⁹⁷. O Ato de Serviço de Saúde Pública (*Public Health Service Act* - PHSA) distingue o uso de células-tronco de acordo com duas classificações: as células que são largamente manipuladas são consideradas produtos biológicos, drogas e dispositivos médicos e reguladas como tais; enquanto que as não manipuladas são consideradas “produtos minimamente manipulados” e tidas como tecnologias de menor risco não exigindo nem aprovação para comercialização³⁸. Além disso, nos EUA, os bancos de tecidos podem retribuir monetariamente pelo recrutamento de doadores (incluindo cadáveres), pela coleta, processamento e armazenamento de materiais de origem humana, incluindo também sangue e gametas. Conforme destacado por Pirnay et al., embora os materiais sejam sempre produtos de doação, hoje se discute a legitimidade de um processo que torna doações voluntárias em um negócio rentável⁹⁴.

Embora a legislação norte-americana possa parecer muito aberta e permissiva, enquanto a europeia ainda não seja homogênea e necessite ajustes, as medidas internacionais, mesmo que imperfeitas, garantem que cidadãos europeus e norte-americanos tenham acesso a terapias inovadoras com maior agilidade⁹⁷ ou, em última análise, não impõem tantas barreiras para o uso biotecnológico de material humano ou desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais.

Exemplo da regulamentação de sangue e hemoderivados - uma perspectiva para uso de células-tronco para fins não terapêuticos no Brasil?

A doação de sangue é uma prática bastante difundida no Brasil. Além do uso terapêutico direto, o sangue, um material humano proveniente de doadores voluntários, é utilizado inclusive para a obtenção de hemoderivados⁹⁸. Talvez uma análise cuidadosa e a compreensão de como esse material é, muitas vezes, entendido

como um insumo, possam nortear as discussões e trazer perspectivas para o uso não terapêutico de células-tronco, principalmente daquelas células que possam ser obtidas de material de descarte ou através de métodos não invasivos como, por exemplo, através da coleta de urina.

Em um olhar mais detalhado na legislação, a Constituição Federal Brasileira de 1988⁸⁵ é a base norteadora de toda a legislação do país, e na Seção II - Saúde, em seu Art. 199 § 4º, diz:

A lei disporá sobre as condições e os requisitos que facilitem a remoção de órgãos, tecidos e substâncias humanas para fins de transplante, pesquisa e tratamento, bem como a coleta, processamento e transfusão de sangue e seus derivados, sendo vedado todo tipo de comercialização.

A regulamentação desse item da Constituição Federal no que diz respeito ao sangue e hemoderivados foi posteriormente efetivada pela instauração da Lei nº 10.205/2001. Entre outras questões, o artigo 14 do capítulo II que versa sobre Princípios e Diretrizes aborda a doação voluntária de sangue, o veto a comercialização, a permissão da remuneração de custos de insumos, reagentes, materiais descartáveis, entre outros, utilizados no processamento das amostras, além de questões relativas tanto a segurança dos doadores quanto a qualidade das amostras⁹¹. Talvez as diretrizes nacionais relativas ao sangue e hemoderivados possam ser analisadas pelo menos em parte como exemplos, de maneira a servir como ponto de partida para a criação de uma legislação e regulamentação do uso não terapêutico de células-tronco, como por exemplo, no desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais. Essa abordagem também já foi sugerida por Carias et al., quando os autores fizeram uma revisão da legislação brasileira à época relativa à regulamentação do artigo 199, parágrafo 4º, da Constituição Federal, entre outras, e propuseram que se discutisse um modelo legal semelhante ao gerenciamento de excedente de sangue e hemoderivados para materiais biológicos de origem humana, citando além da aplicação em pesquisa ou em terapia, também seu uso em ensaios toxicológicos⁹⁸.

A determinação dos tipos de material humano que podem ser considerados para o uso biotecnológico das células-tronco também é um ponto favorável à sua utilização. No que se refere às CTM adultas, estas podem ser obtidas de materiais de descarte, que normalmente são resíduos de serviços de saúde. Geralmente, esses resíduos têm como destinação final a destruição e descarte. Entre esses materiais podemos citar tecido adiposo²⁸ proveniente de lipoaspiração ou dermolipectomia, polpa dentária⁹⁹, cordão umbilical^{31,32}, para os quais nenhum outro procedimento invasivo para a obtenção das células é realizado no doador a não ser o que ele inicialmente se dispôs. Ao invés de serem destinados à destruição e eliminação, esses materiais de descarte poderiam ser doados e destinados a laboratórios onde as células-tronco podem ser isoladas. O fácil acesso também é uma vantagem dos tecidos que podem dar origem às células pluripotentes, como é o caso do sangue¹⁰⁰ e até mesmo da urina¹⁰¹. Esses tecidos ou fluidos humanos excedentes, sem valor terapêutico, devem ser considerados de maneira diferenciada, considerando sua fonte e forma de obtenção com a finalidade de serem destinados ao isolamento ou indução de células-tronco pluripotentes.



As informações acima levantadas podem servir como base norteadora aos legisladores quanto aos avanços da ciência e a necessidade de evolução da regulamentação. É fundamental que a ciência e a legislação andem no mesmo passo, a fim de que os progressos da ciência e do desenvolvimento tecnológico possam beneficiar a sociedade com seus avanços. Contudo, não existe uma regulamentação nacional sobre o uso de células-tronco, ou bioprodutos de origem humana para fins de diagnóstico, processos biotecnológicos ou mesmo para substituição do uso de animais, embora, a legislação seja bastante abrangente e madura no tema relativo ao uso de sangue e hemoderivados⁹⁸, e pode, portanto, servir de modelo para as questões ainda não contempladas.

Nos últimos anos, as pesquisas científicas com foco em métodos alternativos ao uso de animais têm buscado não apenas fomentar um uso mais racional de modelos animais, mas também fornecer dados de maior relevância para a saúde humana⁸. As células-tronco de origem humana são apontadas como ferramentas promissoras para atender a essas duas questões principais. Muitos modelos *in vitro* utilizando células-tronco vêm sendo desenvolvidos e apresentam relevância científica⁸, sendo, portanto, necessária e urgente a discussão sobre a possível aplicação e regulamentação do uso desses modelos no cenário nacional, sob o ônus de não acompanhar os esforços mundiais na redução do uso de animais e a oferta de métodos com maior potencial de predição de toxicidade para humanos.

CONCLUSÕES

Existe um consenso de que a comercialização de tecidos humanos seja proibida para que haja a manutenção da integridade do indivíduo, como rege a Constituição Federal Brasileira. Entretanto, a maioria dos países já conseguiu estabelecer uma legislação no sentido de permitir que produtos de bioengenharia de origem humana possam ser utilizados para fins não terapêuticos, permitindo inclusive que, em determinadas situações, nas quais tenham sido modificados a ponto de agregar propriedade intelectual suficiente, sejam considerados bens comerciáveis. Outra alternativa é a utilização da regulamentação para uso de sangue e hemoderivados como base da legislação para aplicação de células-tronco para fins não terapêuticos, em que não há comercialização, mas sim um ressarcimento dos custos associados aos procedimentos associados a coleta, processamento, estocagem e distribuição. Para que o Brasil não se distancie tanto das tendências mundiais no desenvolvimento da ciência e da tecnologia, é importante que um amplo debate seja iniciado com todos os atores envolvidos com essa temática a fim de definir quais medidas devem ser tomadas para que a prática regulatória do uso de material humano, como as células-tronco, principalmente para a aplicação em métodos alternativos ao uso de animais, possibilite que o país atinja patamares internacionais de redução, refinamento e substituição do uso de animais e que possa empregar ensaios com maior relevância para predição de toxicidade em humanos.

REFERÊNCIAS

1. Fuchs E, Chen T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep.* 2013;14(1):39-48. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.197>
2. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000;100(1):157-68. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81692-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X)
3. EuroStemCell. Types of stem cells and their uses. [S.l.]: EuroStemCell; 2017[acesso 10 nov 2017]. Disponível em: <http://www.eurostemcell.org/types-stem-cells-and-their-uses>
4. National Institutes of Health - NIH. Stem cell information. Bethesda: National Institutes of Health; 2016[acesso 10 nov 2017]. Disponível em: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/6.htm>
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
6. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell.* 2000;100(1):143-55. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81691-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81691-8)
7. Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaillie CM. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(9):726-37. <https://doi.org/10.1038/nrm1713>
8. Eskes CW, Whelan M, editores. Validation of alternative methods for toxicity testing. New York, NY: Springer; 2016.
9. Picanço-Castro V, Moreira LF, Kashima S, Covas DT. Can pluripotent stem cells be used in cell-based therapy? *Cell Reprogram.* 2014;16(2):98-107. <https://doi.org/10.1089/cell.2013.0072>
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
11. Diniz D, Avelino D. International perspective on embryonic stem cell research. *Rev Saude Publica.* 2009;43(3):541-7. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102009000300019>
12. Brasil. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança - PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. *Diário Oficial União.* 28 mar 2005.
13. Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell.* 2009;137(1):13-7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.034>



14. Bhartiya DN, Sriraman K, Shaikh A. An overview of pluripotent stem cells. In: Bhartiya D, editor. Pluripotent stem cells. London: InTechOpen; 2013.
15. Lazaro I, Yilmazer A, Kostarelos K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? J Control Release. 2014;185:37-44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.011>
16. Nobel de Medicina premia cientistas por trabalhos com células-tronco. G1 9 out 2012[acesso 19 out 2017]. Disponível em: <http://g1.globo.com/bemestar/noticia/2012/10/nobel-de-medicina-premia-cientistas-por-trabalho-com-celulas-tronco.html>
17. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature. 2007;448(7151):313-7. <https://doi.org/10.1038/nature05934>
18. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. Nature. 2011;474(7350):212-5. <https://doi.org/10.1038/nature10135>
19. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science. 2008;322(5903):949-53. <https://doi.org/10.1126/science.1164270>
20. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell Stem Cell. 2010;7(5):618-30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
21. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell. 2009;4(6):472-6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>
22. Hirschi KK, Li S, Roy K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. Annu Rev Biomed Eng. 2014;16(1):277-94. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105108>
23. Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. J Transl Med. 2010;8(1):131. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-131>
24. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008;8(9):726-36. <https://doi.org/10.1038/nri2395>
25. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005;105(4):1815-22. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>
26. Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. Front Physiol. 2012;3:359. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00359>
27. Gneocchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. Methods Mol Biol. 2009;482:281-94. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-060-7_18
28. Gruber HE, Deepe R, Hoelscher GL, Ingram JA, Norton HJ, Scannell B et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: direction to a phenotype sharing similarities with the disc, gene expression profiling, and coculture with human annulus cells. Tissue Eng Part A. 2010;16(9):2843-60. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0709>
29. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells. 2004;22(7):1338-45. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0058>
30. Ponnaiyan D, Bhat KM, Bhat GS. Comparison of immuno-phenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. Int J Immunopathol Pharmacol. 2012;25(1):127-34. <https://doi.org/10.1177/039463201202500115>
31. Bieback K, Klüter H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. Curr Stem Cell Res Ther. 2007;2(4):310-23. <https://doi.org/10.2174/157488807782793763>
32. McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, McLean WH. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. Biochem Soc Trans. 1991;19(1):295. <https://doi.org/10.1042/bst019029s>
33. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. Nat Protoc. 2009;4(1):102-6. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.221>
34. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: a review. Stem Cells Int. 2016;2016:4709572. <https://doi.org/10.1155/2016/4709572>
35. Jeon YJ, Kim J, Cho JH, Chung HM, Chae JI. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, placenta, and adipose tissue as sources of cell therapy. J Cell Biochem. 2016;117(5):1112-25. <https://doi.org/10.1002/jcb.25395>
36. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. Exp Biol Med (Maywood). 2008;233(7):901-13. <https://doi.org/10.3181/0712-RM-356>
37. Tremolada C, Colombo V, Ventura C. Adipose tissue and mesenchymal stem cells: state of the art and Lipogems® technology development. Curr Stem Cell Rep. 2016;2(3):304-12. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0053-5>
38. Narahashi LDC ACC, De Aaraujo HP. Regulamentação das terapias celulares no Brasil. Vigil Sanit Debate. 2015;3(3):19-24. <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00274>
39. Russell WMS, Burhel RL. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
40. Liebsch M, Grune B, Seiler A, Butzke D, Oelgeschläger M, Pirow R et al. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. Arch Toxicol. 2011;85(8):841-58. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0718-x>



41. Badyal DK, Desai C. Animal use in pharmacology education and research: the changing scenario. *Indian J Pharmacol.* 2014;46(3):257-65. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.132153>
42. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa Nº 17, de 3 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. *Diário Oficial da União.* 4 jul 2014.
43. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014, e dá outras providências. *Diário Oficial da União.* 25 set 2014.
44. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa Nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. *Diário Oficial União.* 19 ago 2016.
45. Knight A. Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor contributions toward human healthcare. *Rev Recent Clin Trials.* 2008;3(2):89-96. <https://doi.org/10.2174/157488708784223844>
46. Ordi-Ros J, Cosiglio FJ. [Current therapeutic indications of thalidomide and lenalidomide]. *Med Clin (Barc).* 2014;142(8):360-4. Spanish. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2013.04.038>
47. Faiola F, Yin N, Yao X, Jiang G. The rise of stem cell toxicology. *Environ Sci Technol.* 2015;49(10):5847-8. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01549>
48. Jennings P. "The future of in vitro toxicology". *Toxicol in Vitro.* 2015;29(6):1217-21. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.08.011>
49. Meganathan K, Jagtap S, Wagh V, Winkler J, Gaspar JA, Hildebrand D et al. Identification of thalidomide-specific transcriptomics and proteomics signatures during differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2012;7(8):e44228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044228>
50. Mayshar Y, Yanuka O, Benvenisty N. Teratogen screening using transcriptome profiling of differentiating human embryonic stem cells. *J Cell Mol Med.* 2011;15(6):1393-401. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01105.x>
51. Nadig RR. Stem cell therapy: hype or hope? A review. *J Conserv Dent.* 2009;12(4):131-8. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.58329>
52. Liu W, Deng Y, Liu Y, Gong W, Deng W. Stem cell models for drug discovery and toxicology studies. *J Biochem Mol Toxicol.* 2013;27(1):17-27. <https://doi.org/10.1002/jbt.21470>
53. Mori H, Hara M. Cultured stem cells as tools for toxicological assays. *J Biosci Bioeng.* 2013;116(6):647-52. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.028>
54. Seiler AE, Spielmann H. The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro. *Nat Protoc.* 2011;6(7):961-78. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.348>
55. Seiler A, Visan A, Buesen R, Genschow E, Spielmann H. Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test. *Reprod Toxicol.* 2004;18(2):231-40. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2003.10.015>
56. Buesen R, Genschow E, Slawik B, Visan A, Spielmann H, Luch A et al. Embryonic stem cell test remastered: comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity in vitro. *Toxicol Sci.* 2009;108(2):389-400. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp012>
57. Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(11):713-26. <https://doi.org/10.1038/nrm3448>
58. Seiler K, Tsuneto M, Melchers F. Experimental limitations using reprogrammed cells for hematopoietic differentiation. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:895086. <https://doi.org/10.1155/2011/895086>
59. Nishizawa M, Chonabayashi K, Nomura M, Tanaka A, Nakamura M, Inagaki A et al. Epigenetic variation between human induced pluripotent stem cell lines is an indicator of differentiation capacity. *Cell Stem Cell.* 2016;19(3):341-54. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.019>
60. Yamamoto T, Takenaka C, Yoda Y, Oshima Y, Kagawa K, Miyajima H et al. Differentiation potential of pluripotent stem cells correlates to the level of CHD7. *Sci Rep.* 2018;8(1):241. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18439-y>
61. Ikuno T, Masumoto H, Yamamizu K, Yoshioka M, Minakata K, Ikeda T et al. Correction: efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176238>
62. Ikuno T, Masumoto H, Yamamizu K, Yoshioka M, Minakata K, Ikeda T et al. Efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173271. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173271>
63. Higuchi A, Suresh Kumar S, Ling QD, Alarfaj AA, Munusamy MA, Murugan K et al. Polymeric design of cell culture materials that guide the differentiation of human pluripotent stem cells. *Prog Polym Sci.* 2017;65:83-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.09.002>
64. Alisson-Silva F, Rodrigues DC, Vairo L, Asensi KD, Vasconcelos-dos-Santos A, Mantuano NR et al. Evidences for the involvement of cell surface glycans in stem cell pluripotency and differentiation. *Glycobiology.* 2014;24(5):458-68. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu012>
65. Suter-Dick L, Alves PM, Blaauboer BJ, Bremm KD, Brito C, Coecke S et al. Stem cell-derived systems in toxicology assessment. *Stem Cells Dev.* 2015;24(11):1284-96. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0540>



66. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
67. Pistollato F, Louise J, Scelfo B, Mennecozzi M, Accordi B, Basso G et al. Development of a pluripotent stem cell derived neuronal model to identify chemically induced pathway perturbations in relation to neurotoxicity: effects of CREB pathway inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;280(2):378-88. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.08.007>
68. Liang P, Lan F, Lee AS, Gong T, Sanchez-Freire V, Wang Y et al. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. *Circulation*. 2013;127(16):1677-91. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001883>
69. Tofoli FA, Dasso M, Morato-Marques M, Nunes K, Pereira LA, Silva GS et al. Increasing the genetic admixture of available lines of human pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2016;6(1):34699. <https://doi.org/10.1038/srep34699>
70. Wheeler HE, Wing C, Delaney SM, Komatsu M, Dolan ME. Modeling chemotherapeutic neurotoxicity with human induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells. *PLoS One*. 2015;10(2):e0118020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118020>
71. U.S. Department of Health and Human Services. National Toxicology Program. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - ICCVAM. Recommended test method protocol: BALB/c 3T3 NRU cytotoxicity test method. [S.l.]: Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods; 2006[acesso 03 out 2017]. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_tmter.htm
72. Scanu M, Mancuso L, Cao G. Evaluation of the use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests. *Toxicol in Vitro*. 2011;25(8):1989-95. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.07.006>
73. Mancuso L, Scanu M, Pisu M, Concas A, Cao G. Experimental analysis and modelling of in vitro HUVECs proliferation in the presence of various types of drugs. *Cell Prolif*. 2010;43(6):617-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2010.00711.x>
74. Abud AP, Zych J, Reus TL, Kuligovski C, Moraes E, Dallagiovanna B et al. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;73(3):992-8. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.015>
75. Corrêa NCR, Kuligovski C, Paschoal ACC, Abud APR, Rebelatto CLK, Leite LMB et al. Human adipose-derived stem cells (ADSC) and human periodontal ligament stem cells (PDLSC) as cellular substrates of a toxicity prediction assay. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018;92:75-82. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.11.004>
76. Xu Y, Hadjiargyrou M, Rafailovich M, Mironava T. Cell-based cytotoxicity assays for engineered nanomaterials safety screening: exposure of adipose derived stromal cells to titanium dioxide nanoparticles. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):50. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0285-2>
77. Davila JC, Cezar GG, Thiede M, Strom S, Miki T, Trosko J. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci*. 2004;79(2):214-23. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh100>
78. Busek M, Gruenzner S, Steege T, Schmieder F, Klotzbach U, Sonntag F. Design, characterization, and modeling of microcirculation systems with integrated oxygenators. *J Sens Sens Syst*. 2016;5(1):221-8. <https://doi.org/10.5194/jsss-5-221-2016>
79. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol*. 2011;21(12):745-54. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>
80. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:2. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00002>
81. Low LA, Tagle DA. Microphysiological systems (“organs-on-chips”) for drug efficacy and toxicity testing. *Clin Transl Sci*. 2017;10(4):237-9. <https://doi.org/10.1111/cts.12444>
82. Zhang B, Radisic M. Organ-on-a-chip devices advance to market. *Lab Chip*. 2017;17(14):2395-420. <https://doi.org/10.1039/C6LC01554A>
83. Penido H. Células-tronco: limitações éticas e jurídicas à pesquisa e manipulação. *Âmbito Jurídico*. com.br; 2006[acesso 10 out 2017]. Disponível em: http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=972
84. Marodin G SJ, Motta MdL, Santos LMP. Diretrizes nacionais para biorrepositório e biobanco de material biológico humano. *Rev Assoc Med Bras*. 2013;59(1):72-7. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302013000100014>
85. Senado Federal (BR). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado Federal; 1988.
86. Alves G. Leis do Brasil travam desenvolvimento de alternativas aos testes em animais. *Folha de São Paulo*. 17 maio 2017[acesso 11 out 2017]. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/2017/05/1884667-leis-do-brasil-travam-desenvolvimento-de-alternativas-aos-testes-em-animais.shtml>
87. Martinho AM, Turner L. Stem cells in court: historical trends in US legal cases related to stem cells. *Regen Med*. 2017;12(4):419-30. <https://doi.org/10.2217/rme-2017-0002>
88. Ministério da Saúde (BR), Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 441, de 12 de maio de 2011. Aprovar diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores. *Diário Oficial União*. 18 jul 2011.
89. Ministério da Saúde (BR), Conselho Nacional de Saúde. Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprovar diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial União*. 13 jun 2013.
90. King NM, Perrin J. Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(4):85. <https://doi.org/10.1186/scrt474>



91. Brasil. Lei Nº 10.205, de 21 de março de 2001. Regulamenta o § 4º do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências. Diário Oficial União. 22 mar 2001.
92. Sugarman J. Human stem cell ethics: beyond the embryo. *Cell Stem Cell*. 2008;2(6):529-33. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.05.005>
93. Caulfield T, Rachul C, Zarzeczny A. The evolution of policy issues in stem cell research: an international survey. *Stem Cell Rev*. 2012;8(4):1037-42. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9404-5>
94. Pirnay JP, Baudoux E, Cornu O, Delforge A, Delloye C, Guns J et al. Access to human tissues for research and product development: from EU regulation to alarming legal developments in Belgium. *EMBO Rep*. 2015;16(5):557-62. <https://doi.org/10.15252/embr.201540070>
95. West CC, Murray IR, González ZN, Hindle P, Hay DC, Stewart KJ et al. Ethical, legal and practical issues of establishing an adipose stem cell bank for research. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014 Jun;67(6):745-51. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2014.01.030>
96. Regulation (EC) Nº 1394/2007 of the European Parliament and of The Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004, (2007).
97. Chabannon CC, Caunday-Rigot C, Faucher C, Slaper-Cortenbach I, Calmels B, Lemarie C et al. Accreditation and regulations in cell therapy. *ISBT Sci Ser*. 2016;11 S1:271-6. <https://doi.org/10.1111/voxs.12205>
98. Carias R, Borojevic R, Granjeiro JM. Obtenção de células humanas certificadas: um desafio da biometrologia. *Vigil Sanit Debate*. 2014;2(3):2-12. <https://doi.org/10.3395/vj.0.0.311>
99. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
100. Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, Maetzel D, Hanna J, Sommer CA et al. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7(1):20-4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.002>
101. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc*. 2012;7(12):2080-9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.115>

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do CNPq, da Capes e da Fundação Araucária. BD é bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq, APRA é bolsista do Programa Nacional de Pós-doutorado - Capes (UFPR), TLR é bolsista de doutorado da Capes e ACCP é bolsista de mestrado da Fundação Araucária.

Agradecemos também a Wagner Nagibe de Souza Birbeire pelo *design* visual das Figuras 1 e 2.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.

Risk Analysis: A generalized Hazop methodology state-of-the-art, applications, and perspective in the process industry

Análise de Risco: estado da arte da metodologia Hazop generalizada, aplicações e perspectivas na indústria de processos

ABSTRACT

Miguel Angel de la O Herrera^{1,II,*}

Aderval Severino Luna^I

Antonio Carlos Augusto da Costa^I

Elezer Monte Blanco Lemes^{II}

Introduction: The Hazard and Operability Study is considered a feasible tool to assess risks, where complex technologies, require new strategies to guarantee efficiency, safety, and quality of products. **Objective:** To perform a Hazop publications review, to establish the state of the art, current procedures and perspectives in the pharmaceutical industry. **Method:** Hazop methodology and improvements to satisfy actual needs were structured. Subsequently, its application and integration with other risk tools, and experts systems, were analyzed to define the current approach and future perspectives. **Results:** The review allowed the understanding where models, simulations and specialized software offered adequate support to assess risk in current complex processes. In addition, an efficient definition of causes and consequences depends of expert systems, where simulations acquire experience through the creation of databases, reducing the need of specific process knowledge, which is a typical limitation of the conventional Hazop methodology. **Conclusions:** A review of the Hazop state-of-the-art highlighted the importance to assess risks within the process industry. However, the use of new technologies designed to meet regulatory affairs to guarantee safety and quality principles would require the ongoing improvement of the Hazop methodology, restricting the dependence of specialists, and increasing the use of expert systems.

KEYWORDS: Hazop; Risk Assessment; Process Hazard Analysis; Deviation; Hazard

RESUMO

Introdução: O Estudo de Perigos e Operabilidade (Hazop) é considerado uma ferramenta para avaliação de riscos, na qual tecnologias complexas exigem novas estratégias para garantir a eficiência, a segurança e a qualidade dos produtos. **Objetivo:** Realizar uma revisão de publicações do Hazop, para estabelecer o estado da arte, os procedimentos e as suas perspectivas na indústria farmacêutica. **Método:** O procedimento Hazop e suas adequações para satisfazer as necessidades atuais foram estruturados. Posteriormente, aplicações e integração com outras ferramentas de risco e sistemas expertos foram analisadas para definir a abordagem atual e perspectivas futuras. **Resultados:** A revisão permitiu a compreensão de que modelos, simulações e *software* especializado oferecem suporte para avaliar riscos em processos complexos. Adicionalmente, a correta definição de causas e consequências depende do uso de sistemas expertos, cujas simulações adquirem experiência através da criação de bancos de dados, reduzindo a necessidade de conhecimento específico do processo, que é uma limitação da metodologia Hazop convencional. **Conclusões:** A revisão do estado da arte do Hazop destacou a importância de avaliar riscos dentro da indústria de processos. No entanto, novas tecnologias utilizadas para atender quesitos regulatórios de segurança e qualidade precisam da melhoria contínua da metodologia Hazop, reduzindo a dependência de especialista por meio do uso de sistemas especializados.

^I Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^{II} Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

* E-mail: miguel.angel@bio.fiocruz.br



INTRODUCTION

The fact that the pharmaceutical industry follows one of the highest standards of regulations at national and international levels, because of the impact its products have on human health, is well known. In this case, regulations are used to guarantee the prevention, diagnosis, treatment or cure of a disease, so, levels of safety and efficacy are crucial for obtaining an optimal result under the appropriate treatment scheme¹. Thus, the pharmaceutical industry has been a major player in the traditional industry, in order to successfully meet the new requirements, with a decisive factor being the promotion of regulatory agencies towards the adoption of new technologies and production methodologies. Analysis and control aimed at reducing the possible negative impact of a nonconforming product on the health of the patient or final user. Considering that health surveillance is the science and activities related to the detection, evaluation, understanding and prevention of adverse events or any other problem related to drugs from the production process to its commercialization, it allows the determination of the safety profile of the drugs being marketed. In this way, adverse reactions, inappropriate uses, therapeutic failures and undetected complications during the drug research stage and production process can be detected. There are several methodologies with the potential to be used in order to guarantee quality of products², however, regarding to production process, it is necessary to establish a potential tool that could lead to a feasible process risk analysis. Over the last decade, the process industry has been considerably aided by the use of complex technology, which is responsible for the transformation of raw materials into products. Nevertheless, it is a fact that technological improvement is usually related to unexpected failures, which were not considered during risk assessment in previous or similar processes. In addition, such failures could be ignored and underestimated due to the lack of knowledge or by the incipient application of risk analysis methodologies³. Thus, risk management specialists agree that to prevent failures in manufacturing processes is demanding to reduce and eliminate (when it is possible) factors leading to failures. Consequently, the identification and address of failures during the conception and design of projects has become a mission for risk specialists⁴. Defining hazards as the result of the unexpected interaction of components, or operation methods in exceptional conditions, only the integration of specialists' knowledge involved in the project, will guarantee that undesired events in new plant will be avoided⁵. The implementation of control measures is also a common strategy used to guarantee that a process will operate as desired, even if the conjunction of circumstances could lead to failures⁶. This is the main reason they are applying professional experience to analyze particular aspects of a project to assess failures in early stages of projects more frequently⁷. The promotion of effective prevention actions in the design of industrial process facilities follows the application and constant monitoring of international regulations, where international and local standards and Good Engineering Practices (GEP) can be powerful

allies. As the structure of these regulatory issues is supported by technical knowledge and wide experience of deeply involved professionals from the process industry⁸. However, the application of such standards is not an easy task to carry out, because only process engineers and managers involved directly in the process or similar facilities can understand the scope and fundament of such regulations and the impact on their processes when applied⁹.

Therefore, this is how the hazard and operability studies (Hazop) provides to the group of specialists a structured procedure to develop a risk analysis systematically and comprehensively¹⁰. Hazop methodology can be defined as a structured and systematic process analysis, which can be applied in early stages of the project such as conception and basic steps until operational and post-operation stages. This methodology is widely used in the process industry to identify and assess failures that may lead to potential hazards for the personnel and equipment involved in the process, as well as to failures that prevent an efficient operation or are responsible for abnormal operations.

The brief history of the hazard and operability study

A group of engineers in the ICI's division of Heavy Organic Chemicals was in charge to develop a preliminary version of the Hazop (HAZard and OPerability) methodology in the mid-1960s¹¹. However, it was not until 1974 when the Flixborough disaster in North Lincolnshire, England caused by an explosion at a chemical plant close to the village, in which 28 people died, and at least 36 were injured, ushered the use of risk prevention techniques¹². Then, a safety course offered by the Institution of Chemical Engineers (IChemE) at the Teesside Polytechnic (now Teesside University), included simple Hazop procedure to support and possibly determine failures that led to the Flixborough incident. As a result, the very first publication considering the Hazop study appeared in the same year¹³, and finally the Chemical Industries Association published a first Hazop guide in 1977. Until then, the term Hazop was not used in formal publications.

The major supporter of the Hazop methodology was Trevor Kletz¹⁴. To perform his work Kletz took advantage of the IChemE course notes (revised and updated) and structured a standard Hazop methodology, which has been used up to recent days.

Thus, the concept which states that the Hazop methodology is a basic technique to identify risks that may occur to the personnel, equipment, the environment and/or the objectives of the organization began to gain strength¹⁵. Thereby, the technical background that characterized the hazard and operability studies had become an expected part of chemical engineering degree courses in countries like the United Kingdom and the United States of America¹⁶. Moreover, although this method was initially developed to analyze chemical process systems, later spread to practically any knowledge area.



Application of the Hazop methodology

The Multidisciplinary Team

The execution of an accurate Hazop study requires several technical documents and specific process information. After the data collection, a multidisciplinary team has the responsibility to analyze and design operation documents, such as Piping and Instrumentation Diagrams (P&ID), Process Flow Diagrams (PFD), material flow diagrams, and operating manuals (among others) describing the system under study¹⁷.

Depending on the scope and depth of analysis, a basic multidisciplinary Hazop study team must consider: a) a study leader, responsible for defining the extent of the analysis, define Hazop specialist team, plan and lead the Hazop meetings. b) Project manager, responsible for the design of an Hazop schedule, book meetings, analyze documents and elaborate the Hazop report, follow actions, and monitoring control measurements. c) Process engineer, process specialist in charge of the process under study; d) instrument engineer; e) operation or commissioning engineer. Therefore, the multidisciplinary team should have the specific knowledge of the process and be able to perform identification of potential deviations. This group should also be able to define causes and consequences for all possible deviations from a normal operation that could arise in a unit of the plant and propose actions aiming to reduce the impact of deviations¹⁸. This is the main reason the multidisciplinary team must have extensive knowledge of design, operation, and maintenance in process plant¹⁹.

The Hazop procedure

After analyzing technical data, the multidisciplinary team should establish the “primary guide words” better known as process parameters. In addition, the experience of past events in similar systems is required to justify the identification of “secondary guide words” or deviations, and their effect on the system under study^{20,21}. After the identification of risks, severity and probability of events, indexes allow to calculate the level of risk of each deviation. An example of a matrix of the most common process parameters and their deviation is shown in Table 1.

Once the identification of unacceptable consequences or risks is completed, a list of recommendations and actions may be required to improve the process or avoid hazards²². In Figure 1, the traditional process of the Hazop study considering the relationship between process information and risks identification is shown²³. Authors followed this process to support the identification of deviations in critical elements to establish priority points for qualification in a facility for recombinant biomass production. The definition of critical points for qualification was performed in response to regulatory requirements created by Brazilian regulatory agencies²⁴.

As mentioned, the correct application of the Hazop methodology requires a dedicated multidisciplinary team and the discussion meetings usually are a time-consuming process. According to this, a structured procedure must be followed to maintain focus and objectivity along the study. Ericson²³ recommended an easy procedure to follow in order to apply the Hazop methodology:

Table 1. Example matrix of parameters and guide words as the most common deviations.

| Parameter | Guide Words | | | | | | |
|--------------|-------------|------|------|---------|---------|------------|------------|
| | More | Less | None | Reverse | Part of | As well as | Other than |
| Flow | . | . | . | . | . | . | . |
| Temperature | . | . | . | . | . | . | . |
| Pressure | . | . | . | . | . | . | . |
| Liquid level | . | . | . | . | . | . | . |
| Volume | . | . | . | . | . | . | . |
| Mixing | . | . | . | . | . | . | . |
| Composition | . | . | . | . | . | . | . |
| Reaction | . | . | . | . | . | . | . |
| pH | . | . | . | . | . | . | . |

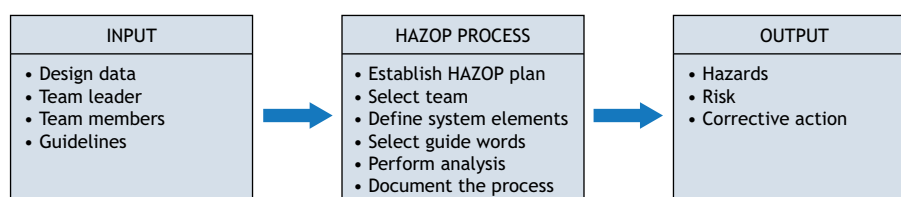


Figure 1. Risk identification procedure using the Hazop methodology.



- a. *System Definition*. The first step is to define scope and boundaries of the system.
- b. *Planning*. Establish objectives of the Hazop analysis; establish worksheets, schedule, *et caetera*. Divide the system into smaller units for analysis. Items to analyze must be defined.
- c. *Multidisciplinary team actions*. Identify a team leader and establish responsibilities for all members. Each member must be a specialist in a technical area related to the process.
- d. *Acquire information*. All technical information related to the process or unit must be collected and used for the analysis (P&ID, PFD, manuals, technical descriptions, *et caetera*).
- e. *Hazop execution*. Identify items to be evaluated, identify parameters, define a guide word (deviation), establish causes, effects, and recommendations.
- f. *Responsibilities*. Assign responsibility to implement actions to reduce risk levels.
- g. *Monitoring*. Review the Hazop proposed measures to ensure that actions are implemented.
- h. *Document*. Make records of the Hazop process to be used in further analysis.

Finally, the Hazop report should be done, including each of the elements of the methodology, describing the analysis performed by the multidisciplinary team. In Table 2 standard model of the Hazop report is shown.

METHOD

The Hazop methodology in the last decade

Procedure of search and analysis of publications focusing on the methodology

Science Direct is an important bibliographic database of multidisciplinary content from the Elsevier group, providing articles from more than 2,500 scientific journals, and articles from over 11,000 books. In January 2010, more than 9.5 million documents of high scientific quality were accounted, and recently, it was

estimated that there are more than 15 million documents, highlighting topics such as Physical Sciences and Engineering, Life Sciences, Health Sciences, Social Sciences and Humanities, among others. Document search is a very powerful and sophisticated tool, which allows to retrieve a large amount of relevant information depending on the terms used in the search. Based on the scope and multidisciplinary of the platform, we restrict the material used for our research considering exclusive articles of Science Direct. In this way, to perform this work, we first define what would be the *keywords* that we would use as input in the search engine. The consensus of the group concluded that we should use in addition to the main word (Hazop), words related directly to “Processes” “New Trends”, “Applications”, “Procedures”, “Health Science”, “Pharmaceutical Industry”, and “Biotechnology”. Finally, the Science Direct system has the ability to filter results considering the relevancy and date of publication. It is important to emphasize that only articles and publications were considered in which the main research topic is the Hazop methodology. As it was observed that several publication mentioned this tool as one of the possible methodologies that could be used, without deepening in its potential application or improvement.

RESULTS AND DISCUSSION

A Hazop retrospective

Since it was created in the mid-1970s, the Hazop methodology has been widely employed in the process industry as a reliable tool for risk assessment. That is why a large number of published papers describing case studies and referring to this methodology have been issued. Swann and Preston²⁵ described the historical evolution of the Hazop methodology. In their work is presented the use of this methodology since the late 1960's until 1995, being the first paper making this type of research. However, it was not the only work mentioning the historical evolution of publications referring to the Hazop methodology. As a second example, Marhaviilas et al.²⁶ conducted a research on risk analysis and assessment methodologies during a decade, starting in early 2000 until the end of 2009. Finally, Dunjó et al.²⁷ conducted one of the most intensive research of publications where the Hazop methodology was applied within the process industry since it was conceived (the 1960's) until early 2009.

Table 2. Hazop report layout for risk characterization.

| Report No. | | | | | | | | | | |
|------------------------|-----------|-----------|-------------------|----------|-------------------|----------|-----------|------------|---------|-------------|
| Company | | | Process | | Related Equipment | | | Date: | | |
| Multidisciplinary team | | | Process Objective | | | | | | | |
| Node No. | | | | | | | | | | |
| ID | Parameter | Deviation | Causes | Controls | Effects | Severity | Frequency | Risk Level | Actions | Responsible |
| 1 | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | |
| . | | | | | | | | | | |
| . | | | | | | | | | | |
| n | | | | | | | | | | |



Hazop methodology applications in the last decade

At the end of 2016, an idea of carrying out a review of publications of the Hazop methodology in the last ten years was conceived, aiming to establish its state-of-the-art and perspectives within the process industry. For this reason, the period considered in this work included the decade between 2005 and 2015.

As can be observed in Table 3, 55 articles describing the Hazop methodology as a risk assessment tool were published for this period. Although the number of publications has remained constant through the years, the number of publications increased substantially in the year 2012. A possible explanation of such increase is the use of computer tools and development of simulation models performed by risk specialists aiming to simplify its application and reduce time and resources for its execution. Therefore, it is possible to notice that most of the Hazop publications refer to modeling and simulations that were designed to make easier the process of implementation of the methodology by data processing and automated decision-making. Completing the retrospective of the last decade, in the same Table, the knowledge areas responsible for generating more papers about this subject are shown. It is possible to notice that chemical engineering, computer science, engineering, energy and environmental areas published more papers about the Hazop

methodology than the other technological areas²⁸. This is not surprising, once this methodology is commonly described as a technique used to detect unsafe situations in industrial plants originated by deviations in equipment and abnormal process operations. Finally, in the same Table are displayed possible applications in not engineering related areas, like business and education, where the use of the methodology helped the identification of deviations, measure risk impacts and promote control actions to reduce the adverse effects of events.

The application of Hazop methodology in industrial processes has not changed its procedure significantly over the years, because most of the Hazop methodology applications aimed to assess risks in critical systems, or when is needed to analyze systems looking for a continuous improvement.

As an example, Hashemi-Tilehnoee et al.²⁹ identified deviations and proposed measures to reduce risks in a reactor cooling following the traditional methodology procedure. In a similar case, Jose et al.³⁰ applied the methodology and identified deviations and possible effects during the operational staff performance in an electrical discharge machining process. Added to this, their proposed new approach, which is integrating human and equipment risk evaluation, made possible to preserve the integrity of a system through risk analysis. Johnson³¹ suggested in his work that risk

Table 3. Journal publications of Hazop methodology as a subject of study from 2005 to 2015.

| 2005 | Papers | 2011 | Papers |
|---|--------|---|--------|
| <i>Process Safety and Environmental Protection</i> | 4 | <i>Education for Chemical Engineers</i> | 1 |
| 2006 | | <i>Process Safety and Environmental Protection</i> | 2 |
| <i>Computer Aided Chemical Engineering</i> | 1 | <i>Journal of Loss Prevention in the Process Industries</i> | 1 |
| <i>Journal of Loss Prevention in the Process Industries</i> | 1 | <i>Fuel Cells Bulletin</i> | 1 |
| 2007 | | 2012 | |
| <i>Computer Aided Chemical Engineering</i> | 1 | <i>Computer Aided Chemical Engineering</i> | 4 |
| <i>Tsinghua Science & Technology</i> | 1 | <i>Procedia Engineering</i> | 4 |
| <i>Journal of Loss Prevention in the Process Industries</i> | 1 | <i>Journal of Loss Prevention in the Process Industries</i> | 2 |
| 2008 | | <i>Process Safety and Environmental Protection</i> | 2 |
| <i>Computer Aided Chemical Engineering</i> | 2 | <i>Computers & Chemical Engineering</i> | 1 |
| 2009 | | <i>Reliability Engineering & System Safety</i> | 1 |
| <i>Process Safety and Environmental Protection</i> | 1 | 2013 | |
| <i>Computer Aided Chemical Engineering</i> | 1 | <i>Computer Aided Chemical Engineering</i> | 1 |
| <i>Computers & Chemical Engineering</i> | 1 | <i>Process Safety and Environmental Protection</i> | 1 |
| <i>Journal of Loss Prevention in the Process Industries</i> | 1 | <i>International Journal of Hydrogen Energy</i> | 1 |
| <i>Systems Engineering - Theory & Practice</i> | 1 | <i>Journal of Loss Prevention in the Process Industries</i> | 2 |
| 2010 | | <i>Fusion Engineering and Design</i> | 1 |
| <i>Computer Aided Chemical Engineering</i> | 1 | 2014 | |
| <i>Journal of Hazardous Materials</i> | 1 | <i>Reliability Engineering & System Safety</i> | 1 |
| <i>Computers & Chemical Engineering</i> | 1 | <i>Journal of Natural Gas Science and Engineering</i> | 1 |
| <i>Annals of Nuclear Energy</i> | 1 | 2015 | |
| <i>Process Safety and Environmental Protection</i> | 1 | <i>Procedia Earth and Planetary Science</i> | 1 |
| <i>Journal of Loss Prevention in the Process Industries</i> | 1 | <i>Journal of Loss Prevention in the Process Industries</i> | 4 |
| | | <i>Engineering Applications of Artificial Intelligence</i> | 1 |



reduction could be easily achieved if the impact and frequency parameters are established considering the particular order of magnitude. Through its proposal, a better-assessed risks and the reduction to an acceptable level to attend regulatory requirements was achieved. Mohammadfam et al.³² presented another case where the application of the hazard and operability study in a fatty acid unit of an oil company allowed assessing environmental health and safety hazards. As a result of their work, authors established a fast and efficiently procedure to identify deviations and promote the implementation of mitigation measures.

Hazop methodology use in early stages of projects (conceptual and basic design preferably) could bring the opportunity to avoid risks and propose response actions in cases where only low levels of risk can be accepted or when economic resources are restricted. It is the case of Hu et al.³³ in which a multi-component systems analysis was used to identify risks. This strategy made possible to conclude that failures in preventive maintenance procedures for critical elements in a multi-component system were easily detected, simplifying the promotion of measures to reduce risks in the equipment involved. The frequency control of events is another common approach to assessing risks. Duisings et al.³⁴ performed a risk analysis in port plugs of a Hot Cell Facility to identify the weak points of the current maintenance procedures. The specialist group also established design and operational recommendations aiming to prevent risks by reducing the possibility to occur. In an Hazop analysis within the infrastructure of an oil production facility, Pérez-Marín and Rodríguez-Toral³⁵ showed the general criteria to accept risks for the oil and gas industry in Mexico. Authors also demonstrated that risk behavior is usually ranked in acceptable levels, increasing, in this case, the reliability of the system. They also concluded that the best way to establish risk prevention measures is by analyzing it according to a qualitative methodology. Silvainita et al.³⁶ also applied the conventional Hazop methodology as a preliminary strategy to investigate the risk-based on decision making of mooring systems. They concluded that after assessing risks, it was possible to identify critical risks and easily propose measures to prevent deviations in order to guarantee the safety of floating structures commonly used in oil and gas industries. The initiative to use the Hazop methodology in a failure analysis of a thermal process of H₂ production facility in silica membrane reactor via methanol steam reforming presented by Ghasemzadeh et al.³⁷, made possible to determine critical elements of the process. This analysis also allowed perceiving the need to install control devices at key points in the equipment, aiming to increase the detection of failures. Kriaa et al.³⁸ used the methodology as support to identify critical security related deviations from the intended behavior in digital control systems, maintaining confidentiality, integrity, availability, and authenticity. For Necci et al.³⁹ the application of an Hazop study was essential to identify the risk of undesirable events in nearby industrial facilities. They also were able to promote actions if such events lead to a “*domino effect*” that could have a negative influence on more than a single process facility.

Considering that risk, specialists commonly agree that the use of more than a single risk assessment tool could lead to a better risk

identification and in most cases PHA tools are complementary. In addition, it is possible to notice a rising number of researchers comparing the effectiveness of methodologies. According to the last fact, Rebelato et al.⁴⁰ developed a comparative study of the Hazop methodology and the Failure mode and effects analysis (FMEA). The comparison of both methodologies helped to define the most reliable tool in a bioethanol production facility. The team also analyzed the technical benefits of both methodologies, concluding that the Hazop methodology was more efficient to detect technical deviations than the FMEA method.

For most specialists, Hazop methodology is the most feasible tool for identifying risks in chemical facilities. Nonetheless, Baybutt⁴¹ performed a review of the Hazop methodology, establishing the weaknesses of this method that usually risk specialists ignore. Among the major failures, the dependency of profound and specific knowledge about the process that is required by the personnel involved in Hazop studies makes almost impossible the probability to create a multidisciplinary group to assess risks using the Hazop methodology in several and different processes. Kidam et al.⁴² also defined the difficulties to apply the methodology in projects during the preliminary design phase. They concluded that initially, the main obstacle to overcome is the lack of technical information about the process that is considered the base to perform Hazop studies.

Therefore, they recommended gathering any available information about similar processes, like documents and recorded data before applying an Hazop methodology. They also remark that the absence of process flow diagrams (which are usually generated only at the basic engineering and detailed engineering phases) are an impediment to applying this methodology in a traditional way. Because the common procedure is based on technical descriptions and recommendations should normally be implemented before the project components started to be built.

Improving the Hazop methodology procedure

The principal advantage of using the Hazop methodology in the design stage of projects is the opportunity to apply risk reduction measures without generating considerable costs for the company. It could be achieved by proposing and implementing measures to reduce impacts on the system before the execution stage (construction), however, risk analysis can also perform an important role during commissioning steps⁴³. The process industry has focused lately on the task of establishing parameter selection criteria to guarantee useful definition of the Hazop nodes.

The strategy of select nodes based on their functionality is the new approach that could attend to this premise.

In recent studies, Rossing et al.⁴⁴ analyzed the functionality of key elements of a Vapor Recompression Distillation Pilot Plant. The node identification was performed through the analysis of pipe and instrument diagrams (P&ID) in which the specialist team defined four main functional nodes. In another analysis, Wu et al.⁴⁵ proved that multilevel flow models (MFM) lead to a



fast identification of nodes in a liquid residues treatment plant. According to Mingda et al.⁴⁶, this approach was also reliable to analyze system components separately in a dehydration system of Oldfield United station. As a result, it was easy to perform a structured and accurate node identification model, making easier the deviation analysis process.

The Boonthum et al.⁴⁷ proposal, establishes a structural model using a matrix from heat and mass balances to define the relationship among all the variables of a system. The creation of this model simplified the identification of existing deviations and the identification of potential risks that were not considered beforehand in previous risk analysis. In highly complex systems like bioreactors used in the biomass generation to produce pharmaceutical supplies, the identification of nodes can be challenging, because of the high number of components that comprise it. O Herrera et al.²⁴ applied the concept of functional nodes, which a group of process elements used to perform the same final function or objective like pH control, heating, cooling, etc., in the fermentation line used for recombinant biomass production. These elements were grouped as a single node and subsequently analyzed aiming to reduce the required time for risk assessment. The result of this process leads to the conclusion that most of the deviations identified in the system were caused by external factors. In this pharmaceutical facility, the supply of utilities and raw materials that do not meet the required parameters of operation is the primary source of deviations. On the contrary, the high automation of the system allowed taking corrective actions almost immediately in case the deviations may appear and even to take actions to prevent events when abnormal parameter behavior is detected. However, for Sauk et al.⁴⁸, determining the optimal order of identification of nodes can be a difficult task because of the lack of experience or when a logical sequence of analysis is not followed. In their work, they used the matrix process flow behavior to determine the sequence of nodes selection and treatment. Finally, they conclude that a linear and continuous flow throughout the process should be followed; this will ensure the management of documents and understanding of the relationship between the critical elements of the system.

Integration of Hazop and Process Hazard Analysis tools

The Hazop methodology is essentially a qualitative method, which is commonly complemented by other Process Hazard Analysis (PHA) tools. Quantitative Risk Assessment (QRA) has been used in the chemical industry to support decision-making to set arrangements and promote mitigation measures to treat risks related to chemical processes, transportation and storage of dangerous substances⁴⁹.

Recently, a large number of researchers use risk management methodologies as support to increase the reliability of Hazop studies. Johnson³¹ proved the benefits of using Hazard and Operability Studies, Layer of Protection Analyses (LOPA) and Safety Integrity Level (SIL). The main objective of this integration was to sort risk scenarios through the estimation of the risk's order of magnitude, making easier to apply risk reduction measures.

Liu et al.⁵⁰ also executed a similar work highlighting the importance of using Hazop, SIL LOPA to establish risk acceptance limits for life extension management in oil platform systems. In the study led by Giardina and Morale⁵¹, the integration of FMECA and Hazop methodologies, avoided the omission of failures in a regasification plant. It was achieved by establishing failure modes and identifying hazards through analyzing causes and effects of deviations in process parameters following the normal application procedure. Mohammadfam and Zarei⁵² established the risk study for a hydrogen production plant using a combination of Hazop and a Preliminary Risk Analysis (PRA) as qualitative methods.

After that, a Quantitative Risk Assessment (QRA) tool was used to quantify risk, thus increasing the depth and coverage of the analysis. It is a fact that the Hazop methodology could be complemented not only with conventional PHA procedures. Specialized techniques can be used in conjunction with the operability studies to increase the robustness of security programs designed to protect people, facilities, and the environment. It is the case of Process Safety Engineering (PSE) and Fire Protection Engineering (FPE) tools proposed by Chen et al.⁵³. Both techniques were used to increase the number of elements to be considered during risk identification to ensure safety and take advantage of the benefits of these programs when integrated with conventional risk assessment techniques.

New trends of application of Hazop studies using modeling, simulations, and computer aided tools

Recently, a new strategy has been used in the process industries to implement successfully the Hazop analysis methodology, however, it is necessary to comply with the following premises.

1. Firstly, the Installation must be properly designed, in relation to the experience, knowledge of the processes involved, and the application of the regulatory standards and codes.
2. On the other hand, the materials of construction must be adequate and the construction and assembly have been carried out correctly (installations in operation).

In the first case, new processes are historically dependent of experience; this issue has been considered as the greatest limitation of the methodology. Thus, this is the reason why computer systems are currently widely used, aiming to avoid the dependence and subjectivity of experience on the part of the specialists.

For this reason, a recent approach to Hazop methodology included the use of computer simulations better known as expert systems. According to Sharvia and Papadopoulos⁵⁴, the traditional application of Hazops becomes a challenge because of the higher complexity of modern systems and the potential human error of manual processes. That is why the use of computational systems provides a faithful support for decision making through the "learning" of data generated from simulations in case studies.

As mentioned by Chung et al.⁵⁵ the amount of data generated in the engineering and routine operation stage of projects could



be extensive, in this way, it is mandatory to have automated tools to analyze and process efficiently the large amount of information. In response to this demand, the authors state that the HAZID software is a feasible tool that allows identification of risks through the qualitative analysis of the main and/or more critical units that are represented in diagrams P&ID. Subsequently the HAZID software is able to correlate causes and consequences of potential failures between units that comprise the entire system or process⁵⁶. The need to develop contingency plans for responding to failures in a sulfur recovery unit was the motivation for Alaei et al.⁵⁷ to use the Hazop methodology. In order to achieve this, they used expert systems to facilitate the analysis process and help in determining measures that may be taken by the personnel involved in the operation to prevent incidents and reduce the impact of these deviations. The development of computer system simulation applied to Hazop studies has been present in the last years. For example, Švandová et al.⁵⁸ demonstrated that tools initially designed for the model and to simulate chemical reactors allowed to establish a new methodology for identifying hazards when integrating to models and hazard and operability studies. The conversion model of hydrolysis of propylene oxide into mono propylene glycol helped to conclude that the integration of simulations and risk assessment tools granted a fast identification of deviations and possible consequences. The model also led to establishing actions to reduce the impact and frequency of undesired events.

From the early 2000s commercial software for performing Hazop like the HAST software has been used for risk management in production plants⁵⁹, including several “*intelligent*” Hazop software developed to aid Hazop analysis such as the PHASUITE. Zhao et al.⁶⁰ performed an analysis in a pharmaceutical process using this intelligent software as a case study. As a result, this software could identify dangerous situations that could be easily avoided when corrective actions are applied. Moreover, the integration of mathematical modeling into the Hazop study may potentially lead to the detection of unexpected aleatory deviations. Nevertheless, they concluded that in particular situations the extreme amount of information could be extensive, causing losing of objectivity and could be responsible for the lack of corresponding knowledge to promote measures needed to face undesirable deviations. They also established that too much information could lead to the promotion of non-viable solutions, or even worse, to propose too many options to reduce risks, turning the process of eliminating risks a difficult task to realize.

Eizenberg et al.⁶¹ in a similar work established a model to perform Hazop analysis in a semi-batch reactor where an exothermic reaction takes place. The model was exported to popular mathematical simulators like MATLAB, and abnormal conditions (previously identified) were used as data in an Hazop procedure. Labovský et al.⁶² used the same modeling concept to establish a mathematical model in a tubular reactor design for ethylene oxide production. They also developed a computer algorithm called DYNHAZ to identify hazards in similar production systems. In a further research, Labovský et al.⁶³ applied the same

algorithm to perform a steady-state analysis and perform a detail safety analysis for a relatively complex process. A methyl tertiary-butyl ether (MTBE) production unit was chosen as a case study to demonstrate this methodology, due to the complexity and extensity of the Hazop analysis.

The development and use of specialized software designed to simplify risk analysis in complex installations are a new trend that is being followed by risk specialists. Zhao et al.⁶⁴ designed a specific expert system called Petrohazop, which can help automate “non-routine” Hazop analysis due to the software capacity of learning. Therefore, Hazop analysis can be continuously improved through experience stored in databases. As an example, Cui et al.⁶⁵ developed an intelligent software called HASILT, by integrating the Hazop, LOPA, Safety Requirements Specification (SRS) and SIL techniques. In this case, this integration not only allows to make easier the execution of risk assessment studies, the software also facilitates the promotion of potential solutions based in the experience gained in similar events. Another common tool for hazard identification is the ExpHazop⁶⁶, this expert system was designed to identify hazards and suggesting mitigation measures in a process facilities. This software is well known because its friendly interface, enhanced graphical user interface, methods to identify a study nodes, dynamic knowledge-base, failure propagation algorithm, report generation, etc. All these features make this expert system one of the most used support tools for Hazop analysis.

In another case, Wang et al.⁶⁷ designed and tested a computer program called HELPHAZOP in a processing system for residuum hydrotreating. This software works with databases of incidents, considerations, risk parameters, *et caetera*, and serves as a guide to reducing human errors originated by the lack of experience about the process. The creation of databases from process parameters and treatment procedures has become usual within the process industry. Databases are stored in computer systems and made available to guide in the resolution of abnormal situations. It was shown in the work by Wang et al.⁶⁸, in a plant producing ethylene glycol.

A new structured approach to Hazop modeling and simulation is the signed direct graph (SDG) theory. This theory provides algorithms and methods that can be applied directly to the chemical process^{69,70}. The SDG analysis can validate models and is a basis for the development of software simulation environment to make possible the automation of validation activities^{71,72,73}.

Trying to find all the possible logical paths in the SDG model Lü and Wang⁷⁴ used signed directed graphs (SDG). The SDG models integrated to Hazop methodologies, made possible to determine more certain deviations and consequences, saving time, human resources, and expenses than the conventional Hazop. Wang et al.⁷⁵ also used SDG and proved the effectiveness to identify the most likely operating mistakes that may cause process variable deviations in a polyvinyl chloride (PVC) plant. Kwamura et al.⁷⁶ proposed an intelligent Hazop support system that integrates a Dynamic Flow Diagram (DFD). After performing a simulation, the resulting information could be used in



conjunction with specialized software to identify risks in real-time during operation. The model also can propose feasible solutions to prevent damage to infrastructure, procedures and all personnel involved in the process.

According to Adhitya et al.⁷⁷, Dynamic Simulations previously defined by Haug⁷⁸, were used to identify deviations in different supply chain parameters. Dynamic Simulations were also applied to identify possible causes, consequences, safeguards, and mitigating actions using a systematic framework for risk management. The simultaneous hazard analysis in multi-node systems with different failure modes could be a time-consuming task if there were no models to simplify this process. Hu et al.⁷⁹ established the fact that it is possible to solve practical safety-related problems in the industry. Such problems included a significant information loss and the difficulty of safety system decision-making during the traditional computer-aid Hazop analysis by the fuzzy information fusion theory⁸⁰. However, it was noticed that the resulting model must be modified practically in each phase of the system lifecycle; this process resulted in more time and resources to conduct studies every time that was necessary to apply adjustments. As mentioned above, the methodology Hazop analyzes P&ID diagrams to define deviations in plants design with the only intention to detect failures in a system before it has been constructed. Cui et al.⁸¹ developed specialized software for Hazop analysis, and they also propose the integration with SMART Plant software to assist in troubleshooting during a plant design, as well as reducing the effort and time required for this analysis. It is a fact that the use of computer simulators, not only will decrease the implementation of the Hazop methodology, it can also be a valuable tool for fast decision-making. Jeerawongsuntorn et al.⁸² proposed the implementation of an automatic Hazop analysis integrated into a human-machine interface (HMI). The purpose of this analysis was to monitor a biodiesel production system and reducing the response time to implement actions to reduce frequency and impact of risks. It was concluded that undesirable situations could lead to a complete lack of effectiveness of the analysis as stated by Wang and Gao⁸³. Nevertheless, they propose with success a new database construction method based on Hazop analysis, which could guide the operator to act fast when facing deviations and to prevent potential damages within the system.

Bayesian networks (BNs), also known as belief networks (or Bayes nets for short), belong to the family of probabilistic graphical models (GMs). These graphical structures are used to represent knowledge about a variable domain. In particular, each node in the graph represents a random variable, while the edges between the nodes represent probabilistic dependencies among the corresponding random variables⁸⁴. These conditional dependencies in the graph are often estimated by using known statistical and computational methods. Hence, BNs combine principle from graph theory, probability theory, computer science, and statistics⁸⁵.

Operational risks include a variety of types of failures which quantification is not easy because the lack of data is a fundamental feature⁸⁶. Making risks databases is an essential requirement

in process risk assessment. These databases consist of detailed functional procedures and equipment characteristics. However, in specific cases, due to their low availability, it will be necessary to access external information sources of validation or deviation data. Unfortunately, the opinion of experts and subjective probability definitions are commonly the only source of such information. Nonetheless, a Bayesian approach is capable to process and validate such information due its capacity to analyze accumulated data and consequently improve its quality⁸⁷. Thus, Bayesian Networks are being used as a method to calculate probabilities of events⁸⁸ and as a tool for decision making in expert systems during implementation of the Hazop methodology.

BN also support decision-making in situations where it is necessary to evaluate gains and costs versus risks⁸⁹. Hu et al.⁹⁰ presented a model that uses the integration of the Hazop methodology and a dynamic Bayesian network. This model was developed aiming to aid in quantification of deviation level through the relationship analysis between parameters in complex processes.

Limitations of expert systems to support Hazop studies

Although the expert systems provide the necessary support to facilitate the process of applying the Hazop methodology, these tools present some limitations that must be considered during their use to challenge the results^{91,92}.

Sense: An Expert System lacks common sense, which is essential to specify based in knowledge, each and every one of the conditions and circumstances of the context and environment. For the Hazop methodology, even the most simple decision based on common sense, is not considered by the system, since the interpretation of acquired data along the time creates data bases, without applying criteria for specific cases.

Natural language: Just as a human uses a language in order to maintain communication with another individual, an Expert System uses a programming language, which prevents the possibility of informal conversation. Thus, users most conform to the system language, leading to limitations to state ideas, causes, consequences and particular expressions.

Provision for learning: The ability of a person to learn from mistakes is relatively high and rapid. Designing an Expert System that offers these conditions is very complex.

Ability to prioritize: For human experts, it is not very difficult to differentiate between the relevant topics of an issue from the irrelevant ones, which for an Expert System is not so trivial, and requires complex databases of events, and usually demands upgrades of the programing to achieve this objective.

Sensory aptitude: An Expert System, unlike a human being, is not able to perceive any of the five senses, which limits its capacity of perception.

Nevertheless, each day, new technologies are being developed, and in a near future it is expected that a decision making will be feasible for expert systems.



An Hazop methodology perspective

As seen above, the use of models and simulations will be the base for risk identification and it will provide a guide for decision-making in risk management. However, although it is well known that computer systems will give support to risk specialists and perhaps such systems will reduce the need for an extensive multidisciplinary team in a long term; what are the immediate future and potential uses of the Hazop methodology?

It is a fact that the hazard and operability methodology will continue to be employed in the process industry for a long time. Since it makes easier systems analysis in early stages of design by analyzing deviations in abnormal system behavior, when processing raw materials into products. That is the reason why it will become more common to see new potential areas of application of this methodology, such as, informatics, business, medical educational, and processes that may include process parameters.

Potential application areas, should consider that deviations could also be responsible for affecting not only mechanical devices but also computer systems, regulatory issues, or even those elements involved directly or indirectly in this process as the environment and critical infrastructure⁹³. However, as seen in this paper, the fast growing technological evolution of the industrial infrastructure may turn the conventional Hazop methodology obsolete. Applying Hazop procedures could not be feasible when the increase of some components and complexity of possible deviations that may occur during the operation will require the additional effort of those responsible for the risk assessment. Not to mention the highly cost of resources and time needed to perform a risk analysis to identify and apply control measurements. Therefore, now it is common to see that this Hazop methodology is being adapted and is suitable to meet the needs of new processes. Thus, the risk management specialists agree that automating procedures of Hazop application will be in a near future, the only practical approach to deal with highly complex analysis if adopted.

Applications in the pharmaceutical industry

Capacity and complexity of upcoming industrial facilities must be fundamental criteria when risk assessment tools are being used. Industrial risk assessment using the Hazop methodology require a complete understanding of components function and their relationship with the whole system. Nowadays the industrial infrastructure in several sectors needs to be updated, aiming to meet quality requirements. As a special case, it is possible to notice that the pharmaceutical and biopharmaceutical industry are remarkably evolving in recent years. Both industries are responsible for producing health supplies, which in some cases the final product could be the same; however, the technological difference is the production platform.

The conventional pharmaceutical industry commonly use chemical synthesis for generating health products, requiring expensive

raw materials to perform processes. Meanwhile, the generation of biotech products (as its name suggests) requires biological platforms, such as bacteria, mammalian or insect cells, and more recently the use of plants to produce therapeutic proteins, bacterial and viral vaccines, etc. However, the biological platform requires improved technological facilities and expensive equipment like bioreactors, when working with genetically modified organisms (GMO).

As consequence of current regulations like the FDA^{94,2}, required equipment must meet high specifications and complex operational procedures. At this point, the Hazop methodology provides the necessary risk assessment support. Accordingly, the biotechnological systems responsible for material transforming operations into products are built of some components that could be considered as Hazop nodes. In Figure 2 an example of node identification in a stainless steel tank used for bacterial culture dilution is shown.

In this case, the node identification seems to be an easy procedure to follow, however, Figure 3 illustrates the complexity of a bioreactor for bacteria used in the process. In this case, the node identification could represent a challenge for the multidisciplinary team, because each line representing utilities, solutions, media, gas exhaustion, etc., should be considered as a node. It must be considered too that whether the lack of a single element required for the process, or a deviation of the function of consents will have negative impacts on the product or to the system itself.

Thus, the new approach to nodes selection through the functionality may be the answer to reducing the number of components considered as nodes, by component groups with the same function within the process. This strategy will simplify the procedure of identifying, process and treat of deviations, allowing a simultaneous analysis of several variables at the same time as it was demonstrated by O Herrera et al²⁴.

Also, the multidisciplinary group experience needed in risk analysis that uses this methodology can be reduced if specialized software tool that enables the acquisition of information and generates databases can be used as a basis for decision-making.

CONCLUSIONS

- a. The Hazop methodology is one of the most PHA tools used by specialists in risk management. As it was seen in this paper, it will continue to be employed in the process industry for a long time. However, to address new challenges within the current process industry, the methodology has to be improved aiming to attend its implementation in high complex facilities. Upgrades of this methodology will allow its fast adaptation to current or even future process requirements as it was seen in recent publications.
- b. This review made possible to notice that most of the consulted authors consider the Hazop methodology a reliable tool



- c. Hazop studies are designed to promote measures to eliminate risk, and propose controls to reduce the impact of risks when cannot be avoided. However, most of the authors mentioned in this paper, converge on the premise that the identification and characterization of deviation using Hazop methodology databases are not the only information source, and requires a wide and deep experience of those involved in the risk assessment.

- d. Current processes are being built using the most recent technology, making systems more complex than they were in the past. That is the main reason why the conventional application of the Hazop methodology cannot meet the requirements of subsequent processes risk assessment. Nevertheless, the new trend that has been followed by Hazop specialists is the design and application of intelligent Hazop studies. The creation of models, simulations, and use of the specialized software will simplify the procedure for dealing with deviations, making the hazard and operability studies a fast and low-cost tool for risk assessment. Although the systems are not infallible, it is expected that in the near future, the need of human experience to support expert systems, will become increasingly less or even unnecessary.

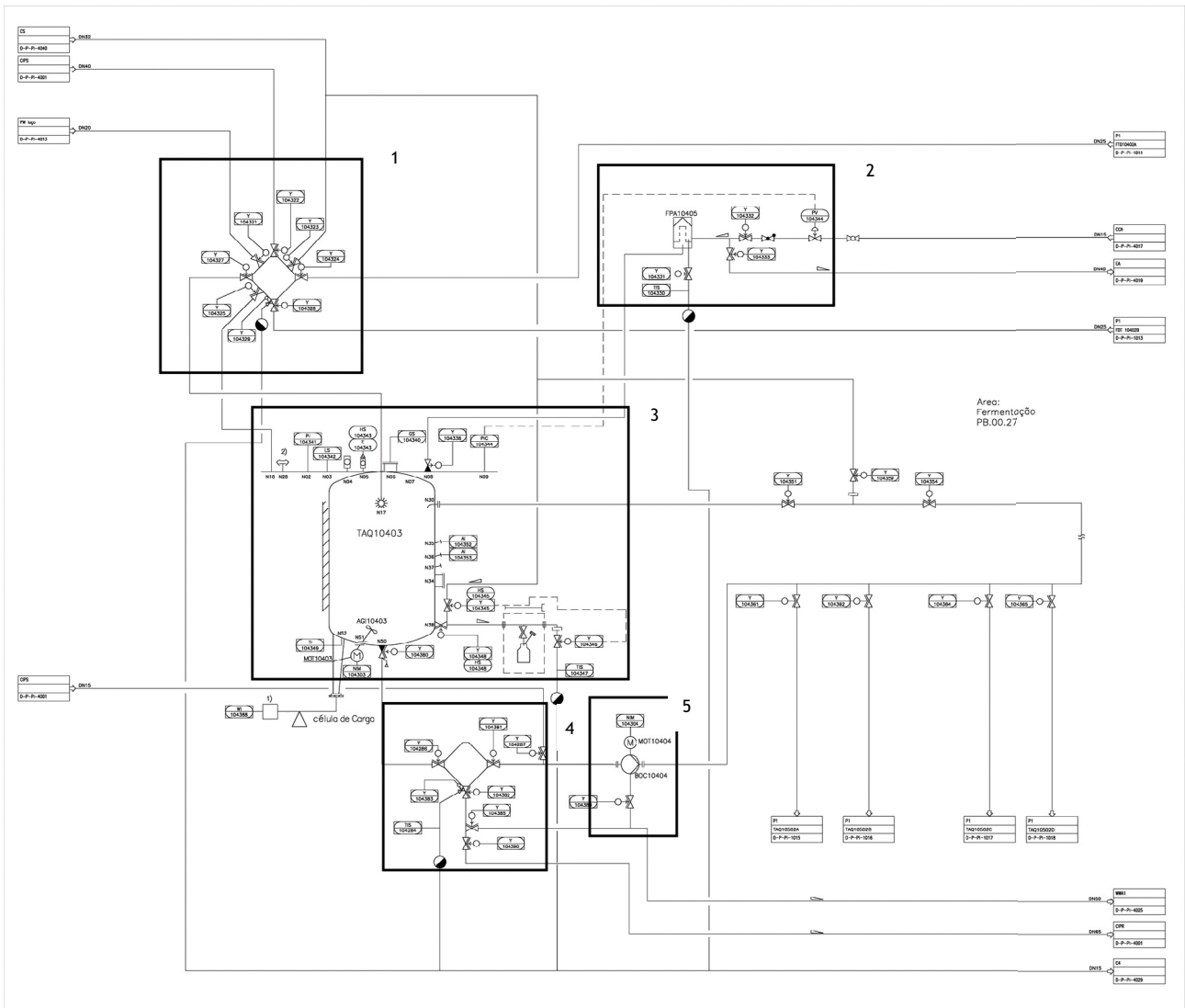


Figure 2. Node identification in bacterial culture dilution tank. M+W, 2014.

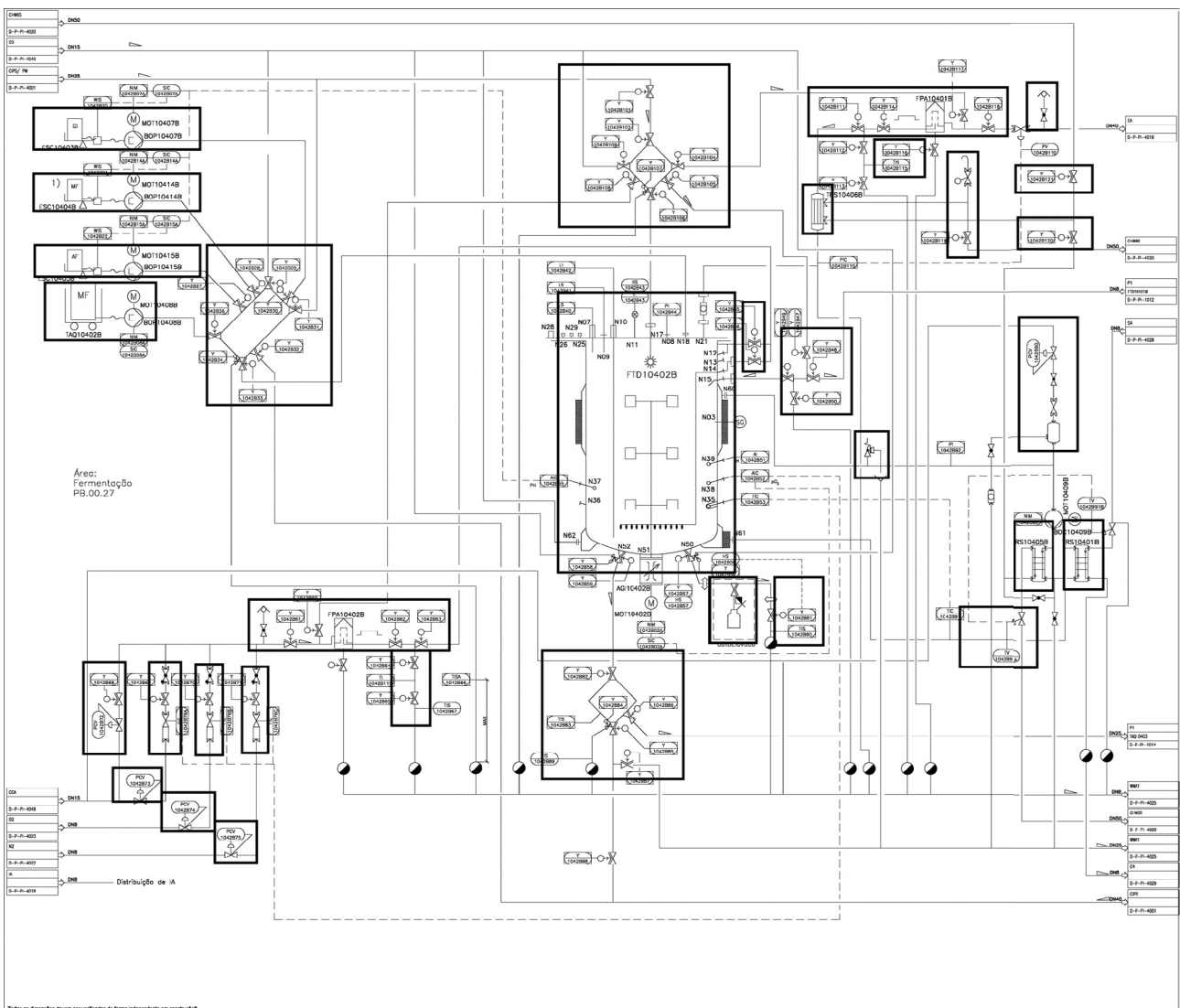


Figure 3. Node identification in complex bioreaction system. GE, 2015.

REFERENCES

1. Choi BC. The past, present, and future of public health surveillance. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:875253. <https://doi.org/10.6064/2012/875253>
2. ICH. Harmonised Tripartite Guideline Quality Risk Management - Q9, Current Step 4, version 9, November 2005.
3. Fischi J, Nichiani R. Complexity based risk evaluation in engineered systems. *Procedia Comput Sci*. 2015;44:31-41. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2015.03.044>
4. Cheng M, Lu Y. Developing a risk assessment method for complex pipe jacking construction projects. *Autom Construct*. 2015;58:48-59. <https://doi.org/10.1016/j.autcon.2015.07.011>
5. Berg PH. Risk management: procedures, methods and experiences. *Risk Manage*. 2010;1(17):79-95.
6. Yang X, Haugen S. Classification of risk to support decision-making in hazardous processes. *Saf Sci*. 2015;80:115-26. <https://doi.org/10.1016/j.ssci.2015.07.011>
7. Crawley F, Tyler B. HAZOP: Guide to best practice: Guidelines to best practice for the process and chemical industries. 3rd ed. Waltham: Elsevier Science; 2015.
8. Díaz López FJ, Montalvo C. A comprehensive review of the evolving and cumulative nature of eco-innovation in the chemical industry. *J Clean Prod*. 2015;102:30-43. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.04.007>
9. Burgess JA. Design assurance-a tool for excellence. *Eng Manage Int*. 1998;5(1):25-30. [https://doi.org/10.1016/0167-5419\(88\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0167-5419(88)90023-3)



10. Nolan DP. Application of HAZOP, PHA, and What-if reviews. safety and security review for the process industries. 2nd ed. New York: William Andrew; 2008.
11. McKay G. Process safety management and risk hazard analysis: HAZOP study analysis course. department of chemical and biomolecular engineering. Hong Kong: University of Science and Technology; 2011.
12. Heino P. Fluid property reasoning in knowledge-based hazard identification [Thesis]. Espoo: Technical Research Centre of Finland; 1999.
13. Lawley HG. Operability studies and hazard analysis. Chem Eng Prog. 1974;70(4):45-56.
14. Kletz TA. What went wrong? Case histories of process plant disasters and how they could have been avoided. 5th ed. Massachusetts: Butterworth-Heinemann/ICHEME; 1983. Chapter 18, Reverse flow, other unforeseen deviations, and hazop; p. 297-311.
15. Ayyup BM, Beach JE, Sarkani S, Asskkaf IA. Risk analysis and management for a marine system. Nav Eng J. 2002;114(2):181-206. <https://doi.org/10.1111/j.1559-3584.2002.tb00130.x>
16. Ziauddin A, Mandal P, Kumar KD, Karthikeyan M. HAZOP for propylene recovery plant at HOC ambalamugal. Int J OHSFE-Allied Sci. 2014;1(1):9-13.
17. Kletz TA. ICI's contribution to process safety. Rugby: IChemE; 2009. (Symposium series, Vol. 155).
18. Hoepffner L. Analysis of the HAZOP study and comparison with similar safety analysis systems. Gas Sep Purif. 1989;3(3):148-51. [https://doi.org/10.1016/0950-4214\(89\)80027-1](https://doi.org/10.1016/0950-4214(89)80027-1)
19. Khan FI, Abbasi SA. OptHAZOP: an effective and optimum approach for HAZOP study. J Loss Prevent Proc. 1997;10(3):191-204. [https://doi.org/10.1016/S0950-4230\(97\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S0950-4230(97)00002-8)
20. Poulouse SM, Madhu G. Hazop study for process plants: a generalized approach. Int J Emerg Technol Adv Eng. 2012;2(7):293.
21. Kidam K, Hurme M. Analysis of equipment failures as contributors to chemical process accidents. Process Saf Environ. 2013;91(1-2):61-78. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2012.02.001>
22. Dunj3 J, Fthenakis VM, Darbra RM, Vilchez JA, Arnaldos J. Conducting HAZOPs in continuous chemical processes: Part I. Criteria, tools, and guidelines for selecting nodes. Process Saf Environ. 2011;89(4):214-23. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2011.03.001>
23. Ericson CA. Hazard analysis techniques for system safety. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2015.
24. O Herrera MA, Luna AS, Costa ACA, Blanco Lemes EM. A structural approach to the HAZOP and Hazard and operability technique in the biopharmaceutical industry. J Loss Prevent Proc. 2015;35:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2015.03.002>
25. Swann CD, Preston ML. Twenty-five years of HAZOPs. Loss Preven Proc. 1995;8(6):349-53. [https://doi.org/10.1016/0950-4230\(95\)00041-0](https://doi.org/10.1016/0950-4230(95)00041-0)
26. Marhavalas PK, Koulouriotis D, Gemeni V. Risk analysis and assessment methodologies in the work sites: on a review, classification and comparative study of the scientific literature of the period 2000-2009. Loss Preven Proc. 2011;24(5):477-523. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2011.03.004>
27. Dunj3 J, Fthenakis V, Vilchez JA, Arnaldos J. Hazard and operability (HAZOP) analysis: a literature review. J Hazard Mater. 2010;173(1-3):19-32. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.076>
28. ScienceDirect. Surch for Hazop. (n.d.)[access 2015 Sep 20]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/search?q=HAZOP&authors=&pub=&vol=ume=&issue=&page=&origin=home&zone=qSearch>
29. Hashemi-Tilehnoee M, Pazirandeh A, Tashakor S. HAZOP-study on heavy water research reactor primary cooling system. Ann Nucl Energy. 2010;37(3):428-33. <https://doi.org/10.1016/j.anucene.2009.12.006>
30. Jose M, Sivapirakasam SP, Surianarayanan M. Analysis of aerosol emission and hazard evaluation of electrical discharge machining (EDM) process. Ind Health. 2010;48(4):478-86. <https://doi.org/10.2486/indhealth.MS1127>
31. Johnson RW. Beyond-compliance uses of HAZOP/LOPA studies. J Loss Prevent Proc. 2010;23(6):727-33. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2010.05.009>
32. Mohammadfam I, Sajedi A, Mahmoudi S, Mohammadfam F. Application of hazard and operability study (HAZOP) in evaluation of health, safety and environmental (HSE) hazards. Int J Occup Hyg. 2012;4(2):69-72.
33. Hu J, Zhan L, Liang W. Opportunistic predictive maintenance for complex multi-component systems based on DBN-HAZOP model. Process Saf Environ. 2012;90(5):376-88. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2012.06.004>
34. Duisings LP, Van Til S, Magielsens AJ, Rondan DM, Elzendoorn BS, Heemskerk CJ. Applying HAZOP analysis in assessing remote handling compatibility of ITER port plugs. Fusion Eng Des. 2013;88(9-10):2688-93. <https://doi.org/10.1016/j.fusengdes.2012.12.002>
35. P3rez-Mar3n M, Rodr3guez-Toral MA. HAZOP: local approach in the Mexican oil & gas industry. J Loss Prevent Proc. 2013;26(5):936-40. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2013.03.008>
36. Silvianita, Khamidi MF, Rochani I, Chamelia DM. Hazard and operability analysis (HAZOP) of mobile mooring system. Procedia Earth Planet Sci. 2010;14:208-12. <https://doi.org/10.1016/j.proeps.2015.07.103>
37. Ghasemzadeh K, Morrone P, Iulianelli A, Liguori S, Babaluo AA, Basile A. H2 production in silica membrane reactor via methanol steam reforming: modeling and HAZOP analysis. Int J Hydrogen Energy. 2013;38(25):10315-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.06.008>



38. Kriaa S, Pietre-Cabacedes L, Bouissou M, Halgand Y. A survey of approaches combining safety and security for industrial control systems. *Reliab Eng Syst Saf.* 2015;139:156-78. <https://doi.org/10.1016/j.ress.2015.02.008>
39. Necci A, Cozzani V, Spadoni G, Khan F. Assessment of a domino effect: state of the art and research needs. *Reliab Eng Syst Saf.* 2015;143:3-18. <https://doi.org/10.1016/j.ress.2015.05.017>
40. Rebelato MG, Madaleno LL, Ferrari GB, Marize A. Comparative study between Hazop and fmea methods applied to the production of bioethanol. *Rev Gest Ind.* 2015;11(1):1-23.
41. Baybutt P. A critique of the Hazard and Operability (HAZOP) study. *J Loss Prevent Proc.* 2015;33:52-8. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2014.11.010>
42. Kidam K, Sahak HA, Hassim MH, Hashim H, Hurme M. Method for identifying errors in chemical process development and design base on accidents knowledge. *Process Saf Environ.* 2015;94:49-60. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2015.06.004>
43. Cagno E, Caron F, Mancini M. Risk analysis in plant commissioning: the Multilevel Hazop. *Reliab Eng Syst Saf.* 2002;77(3):309-23. [https://doi.org/10.1016/S0951-8320\(02\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0951-8320(02)00064-9)
44. Rossing NL, Lind M, Jensen N, Jørgensen SB. A goal-based methodology for HAZOP analysis. *Int J Nuc Saf Simul.* 2010;1(2):134-42.
45. Wu J, Zhang J, Liang W, Hu J. A novel failure mode analysis model for gathering system based on multilevel flow modeling and HAZOP. *Process Saf Environ.* 2013;91(1-2):54-60. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2012.02.002>
46. Mingda W, Guoming C, Jianmin F, Weijun L. Safety analysis approach of MFM-HAZOP and its application in the dehydration system of oilfield united station. *Procedia Eng.* 2012;43:437-42. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.08.075>
47. Boonthum N, Mulalee U, Srinophakun T. A systematic formulation for HAZOP analysis based on the structural model. *Reliab Eng Syst Saf.* 2014;121:152-63. <https://doi.org/10.1016/j.ress.2013.08.008>
48. Sauk R, Markowski AS, Moskal F. Application of the graph theory and matrix calculus for optimal HAZOP nodes order determination. *J Loss Prevent Proc.* 2015;35:377-86. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2015.01.007>
49. Milazzo MF, Aven T. An extended risk assessment approach for chemical plants applied to a study related to pipe ruptures. *Reliab Eng Syst Saf.* 2012;99:183-92. <https://doi.org/10.1016/j.ress.2011.12.001>
50. Liu H, Shi X, Chen X, Liu Y. Management of life extension for topsides process system of offshore platforms in Chinese Bohai Bay. *J Loss Prevent Proc.* 2015;35:357-65. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2014.12.002>
51. Giardina M, Morale M. Safety study of an LNG regasification plant using an FMECA and HAZOP integrated methodology. *J Loss Prevent Proc.* 2015;35:35-45. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2015.03.013>
52. Mohammadfam I, Zarei E. Safety risk modeling and major accidents analysis of hydrogen and natural gas release: A comprehensive risk analysis framework. *Int J Hydrogen Energy.* 2015;40(39):13653-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.07.117>
53. Chen H, Pittman WC, Hatanaka LC, Harding BZ, Boussof A, Moore DA et al. Integration of process safety engineering and fire protection engineering for better safety performance. *J Loss Prevent Proc.* 2015;37:74-81. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2015.06.013>
54. Sharvia S, Papadopoulos Y. Integrating model checking with HiP-HOPS in model-based safety analysis. *Reliab Eng Syst Saf.* 2015;135:64-80. <https://doi.org/10.1016/j.ress.2014.10.025>
55. Chung PW, Brugh J, McDonald J, Madden J. Process plant safety information repository and support for safety applications. *J Loss Prevent Proc.* 2012;25(5):788-96. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2012.04.004>
56. Palmer C, Chung PW. An automated system for batch hazard and operability studies. *Reliab Eng Syst Saf.* 2009;94(6):1095-106. <https://doi.org/10.1016/j.ress.2009.01.001>
57. Alaei R, Mansoori SA, Moghaddam AH, Mansoori SM, Mansoori N. Safety assessment approach of hazard and operability (HAZOP) for sulfur recovery unit Claus reaction furnace package; blower; heat exchanger equipment in South Pars gas processing plant. *J Nat Gas Sci Eng.* 2014;20:271-84. <https://doi.org/10.1016/j.jngse.2014.07.007>
58. Švandová Z, Jelemenský L, Markoš J, Molnár A. Steady states analysis and dynamic simulation as a complement in the Hazop study of chemical reactors. *Process Saf Environ.* 2015;83(5):463-71. <https://doi.org/10.1205/psep.04262>
59. Cocchiara M, Bartolozzi V, Picciotto A, Galluzzo M. Integration of interlock system analysis with automated HAZOP analysis. *Reliab Eng Syst Saf.* 2001;74(1):99-105. [https://doi.org/10.1016/S0951-8320\(01\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0951-8320(01)00074-6)
60. Zhao C, Bhushan M, Venkatasubramanian V. Phasuite: an automated HAZOP analysis tool for chemical processes part II: implementation and case study. *Process Saf Environ.* 2005;83(6):533-48. <https://doi.org/10.1205/psep.04056>
61. Eizenberg S, Shacham M, Brauner N. Combining HAZOP with dynamic simulation: applications for safety education. *J Loss Prevent Proc.* 2006;19(6):754-61. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2006.07.002>
62. Labovský J, Laššák P, Markoš J, Jelemenský L. Design, optimization, and safety analysis of a heterogeneous tubular reactor by using the HAZOP methodology. *Computer-Aided Chem Eng.* 2007;24:1241-6. [https://doi.org/10.1016/S1570-7946\(07\)80231-8](https://doi.org/10.1016/S1570-7946(07)80231-8)
63. Labovský J, Švandová S, Markoš J, Jelemenský L. Model-based HAZOP study of a real MTBE plant. *J Loss Prevent Proc.* 2007;20(3):230-7. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2007.03.015>
64. Zhao J, Cui L, Zhao L, Qiu T, Chen B. Learning HAZOP expert system by case-based reasoning and ontology. *Comput Chem Eng.* 2009;33(1):371-8. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2008.10.006>



65. Cui L, Shu Y, Wang Z, Zhao J, Qiu T, Sun W et al. HASILT: an intelligent software platform for HAZOP, LOPA, SRS and SIL verification. *Reliab Eng Syst Saf.* 2012;108:56-64. <https://doi.org/10.1016/j.res.2012.06.014>
66. Rahman S, Khan F, Veitch B, Amyotte P. ExpHAZOP: knowledge-based expert system to conduct automated HAZOP analysis. *J Loss Prevent Proc.* 2009;22(4):373-80. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2009.01.008>
67. Wang F, Gao J, Wang H. A new intelligent assistant system for HAZOP analysis of complex process plant. *J Loss Prevent Proc.* 2012;25(3):636-42. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2012.02.001>
68. Wang F, Zhao Y, Yang O, Cai J, Deng M. Process safety data management program based on HAZOP analysis and its application to an ethylene oxide/ethylene glycol plant. *J Loss Prevent Proc.* 2013;26(6):1399-406. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2013.08.020>
69. Iri M, Aoki K, O'shima E, Matsuyama H. An algorithm for diagnosis of system failures in the chemical process. *Comput Chem Eng.* 1979;3(1-4):489-493. doi:[https://doi.org/10.1016/0098-1354\(79\)80079-4](https://doi.org/10.1016/0098-1354(79)80079-4)
70. Yang F, Shah SL, Xiao D. Signed directed graph based modeling and its validation from process knowledge and process data. *Int J Appl Math Comp.* 2012;22(1):41-53.
71. Maurya MR, Rengaswamy R, Venkatasubramanian V. A systematic framework for the development and analysis of signed digraphs for chemical processes: 1. Algorithms and analysis. *Ind Eng Chem Res.* 2003;42(20):4789-810. <https://doi.org/10.1021/ie020644a>
72. Maurya MR, Rengaswamy R, Venkatasubramanian V. A systematic framework for the development and analysis of signed digraphs for chemical processes: 2. Control loops and flowsheet analysis. *Ind Eng Chem Res.* 2003;42(20):4811-27. <https://doi.org/10.1021/ie0206453>
73. Maurya MR, Rengaswamy R, Venkatasubramanian V. Application of signed digraphs-based analysis for fault diagnosis of chemical process flowsheets. *Eng Appl Artif Intell.* 2004;17(5):501-18. <https://doi.org/10.1016/j.engappai.2004.03.007>
74. Lü N, Wang X. SDG-based HAZOP and fault diagnosis analysis to the inversion of synthetic ammonia. *Tsinghua Sci Technol.* 2007;12(1):30-7. [https://doi.org/10.1016/S1007-0214\(07\)70005-6](https://doi.org/10.1016/S1007-0214(07)70005-6)
75. Wang H, Chen B, He X, Tong Q, Zhao J. SDG-based HAZOP analysis of operating mistakes for PVC process. *Process Saf Environ.* 2009;87(1):40-6. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2008.06.004>
76. Kwamura K, Naka Y, Fuchino T, Aoyama A, Takagi N. Hazop support system and its use for operation. *Computer-Aided Chem Eng.* 2008;25:1003-8. [https://doi.org/10.1016/S1570-7946\(08\)80173-3](https://doi.org/10.1016/S1570-7946(08)80173-3)
77. Adhitya A, Srinivasan R, Karimi IA. Supply chain risk management through HAZOP and dynamic simulation. *Computer-Aided Chem Eng.* 2008;25:37-42. [https://doi.org/10.1016/S1570-7946\(08\)80011-9](https://doi.org/10.1016/S1570-7946(08)80011-9)
78. Haug EJ. *Basic Methods. Computer-aided kinematics and dynamics of mechanical systems.* Massachusetts: Allyn and Bacon; 1989. Vol. 1.
79. Hu JQ, Zhang LB, Liang W, Wang ZH. Quantitative HAZOP analysis for gas turbine compressor based on fuzzy information fusion. *Syst Eng Theory Pract.* 2009;29(8):153-9. [https://doi.org/10.1016/S1874-8651\(10\)60065-8](https://doi.org/10.1016/S1874-8651(10)60065-8)
80. Intan R. Rarity-based similarity relations in a generalized fuzzy information system. In: *IEEE Conference on Cybernetics and Intelligent Systems, 2004 Dec 1-3, Singapore.*
81. Cui L, Zhao J, Zhang R. The integration of HAZOP expert system and piping and instrumentation diagrams. *Process Saf Environ.* 2010;88(5):327-34. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2010.04.002>
82. Jeerawongsuntorn C, Sainyamsatit N, Srinophakun T. Integration of safety instrumented system with automated HAZOP analysis: an application for continuous biodiesel production. *J Loss Prevent Proc.* 2011;24(4):412-9. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2011.02.005>
83. Wang F, Gao J. A novel knowledge database construction method for operation guidance expert system based on HAZOP analysis and accident analysis. *J Loss Prevent Proc.* 2012;25(6):905-15. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2012.05.001>
84. Bhandari J, Abbassi R, Garaniya V, Khan F. Risk analysis of deepwater drilling operations using Bayesian network. *J Loss Prevent Proc.* 2015;38:11-23. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2015.08.004>
85. Ben-Gal I. *Encyclopedia of statistics in quality and reliability.* Oxford: John Wiley & Sons; 2007.
86. Weber P, Medina-Oliva G, Simon C, Lung B. Overview of Bayesian networks applications for dependability, risk analysis, and maintenance areas. *Eng Appl Artif Intell.* 2012;25(4):671-82. <https://doi.org/10.1016/j.engappai.2010.06.002>
87. Weber P, Jouffe L. Complex system reliability modeling with Dynamic Object-Oriented Bayesian Networks (DOOBN). *Reliab Eng Syst Saf.* 2006;91(2):149-62. <https://doi.org/10.1016/j.res.2005.03.006>
88. Lin Y, Chen M, Zhou D. Online probabilistic operational safety assessment of multi-mode engineering systems using Bayesian methods. *Reliab Eng Syst Saf.* 2013;119:150-7. <https://doi.org/10.1016/j.res.2013.05.018>
89. Pasman H, Rogers W. Bayesian networks make LOPA more effective, QRA more transparent and flexible, and thus safety more definable! *J Loss Prevent Proc.* 2013;26(3):434-42. <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2012.07.016>
90. Hu J, Zhang L, Cai Z, Wang Y. An intelligent fault diagnosis system for process plant using a functional HAZOP and DBN integrated methodology. *Eng Appl Artif Intell.* 2015;45:119-35. <https://doi.org/10.1016/j.engappai.2015.06.010>
91. Partridge D. The scope and limitations of first generation expert systems. *Future Gener Comput Syst.* 1987;3(1):1-10. [https://doi.org/10.1016/0167-739X\(87\)90038-0](https://doi.org/10.1016/0167-739X(87)90038-0)
92. Cowan R. Expert systems: aspects of and limitations to the codifiability of knowledge. *Res Policy.* 2001;30(9):1355-72. [https://doi.org/10.1016/S0048-7333\(01\)00156-1](https://doi.org/10.1016/S0048-7333(01)00156-1)



93. Zio E. Challenges in the vulnerability and risk analysis of critical infrastructures. *Reliab Eng Syst Saf.* 2016;152:137-50. <https://doi.org/10.1016/j.res.2016.02.009>

94. Woodcock J, Griffin J, Behrman R, Cherney B, Crescenzi T, Fraser B et al. The FDA's assessment of follow-on protein products: a historical perspective. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(6):437-42. <https://doi.org/10.1038/nrd2307>

Acknowledgments

A. S. Luna thanks, the support of UERJ (Programa Prociência), Faperj and CNPq.

M. A de la O H. thanks, the support of the *Instituto de Tecnología de Inmunobiológicos* (Biomanguinhos) and the contribution of the co-authors to make this work possible.

Conflict of Interest

Authors have no potential conflict of interest to declare, related to this study's political or financial peers and institutions.



This publication is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported license. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt>.

REVISION

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.00970>

Determinación de residuos de antibióticos veterinarios en productos de origen animal mediante cromatografía líquida

Determination of veterinary antibiotic residues in foods of animal origin by liquid chromatography

RESUMEN

Pedro Enrique La Rosa Zambrano¹

Juan Antonio Espinoza Blanco¹

Carlos Adam Conte-Junior^{II}

César Aquiles Lázaro de la Torre^{1,*}

Introducción: La presencia de ciertos agentes infecciosos hace necesario el uso de antibióticos para asegurar el bienestar de los animales destinados a consumo humano; sin embargo, hay que considerar y respetar el tiempo de retiro ya que existe la posibilidad de encontrar residuos por encima de los niveles permitidos, hecho que podría constituir un riesgo para la salud pública. **Objetivo:** Presentar una recopilación de información basada en cómo se realiza la detección y cuantificación de residuos de antibióticos en diversos productos de origen animal mediante métodos cromatográficos. **Método:** Revisión de bases de datos en Elsevier, SciELO, Springer, Hindawi, FAO, EFSA, Senasa y Sanipes, utilizando palabras clave como “cromatografía líquida”, “espectrometría de masas”, “residuos de antibióticos” y “productos de origen animal” en idioma español e inglés. **Resultados:** Se seleccionaron 71 referencias entre artículos, capítulos de libros, normas y reglamentos publicados entre el 2000 al 2017, de las cuales se destaca que las metodologías cromatográficas para el monitoreo de residuos de antibióticos deben ser sensibles, reproducibles, confiables e identificar volúmenes en mg/kg; asimismo, deben cumplir con las exigencias de las normas internacionales para la detección de límites máximos de residuos. **Conclusiones:** La cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas es la técnica más utilizada ya permite la separación de matrices complejas en base del peso molecular del compuesto (antibiótico) o sus fragmentos; sin embargo, es compleja, costosa y requiere personal altamente entrenado.

PALABRAS CLAVE: Antibióticos; Cromatografía Líquida; Espectrometría de Masas; Residuos de Fármacos Veterinarios

ABSTRACT

Introduction: The presence of certain infectious agents makes necessary the use of antibiotics to ensure the welfare of animals destined for human consumption; however, the withdrawal time must be considered and respected since there is the possibility of finding residues above the permitted levels, which could constitute a risk to public health. **Objective:** Present a collection of information based on how is performed the detection and quantification of antibiotic residues in various products of animal origin using chromatography methods. **Method:** Review of databases in Elsevier, SciELO, Springer, Hindawi, FAO, EFSA, Senasa and Sanipes, using keywords such as “liquid chromatography”, “mass spectrometry”, “antibiotic residues” and “products of animal origin” in Spanish and English. **Results:** They were selected 71 references among articles, book chapters, norms and regulations published between 2000 and 2017, which it is emphasized that chromatographic methodologies for antibiotic residues monitoring must be sensitive, reproducible, reliable and identify volumes in mg/kg; likewise, they must follow the requirements of international standards for the maximum residue limits detection. **Conclusions:** Liquid chromatography coupled to a mass spectrometer is the most used technique to allow the separation of complex matrices based on the molecular weight of the compound (antibiotic) or its fragments; however, it is complex, expensive and requires highly trained personnel.

¹ Laboratorio de Farmacología y Toxicología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, San Borja, Lima, Perú

^{II} Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

* E-mail: clazarod@unmsm.edu.pe

Recibido: 26 mayo 2017

Aceptado: 23 ene 2018

KEYWORDS: Antibiotic; Liquid Chromatography; Mass Spectrometry; Veterinary Drug Residues



INTRODUCCIÓN

La presencia de residuos de antibióticos de uso veterinario en alimentos de origen animal es uno de los problemas más importantes relacionados con la inocuidad alimentaria¹. Estos productos han sido usados en veterinaria desde 1950 con fines terapéuticos y como promotores de crecimiento, teniendo desde esa época una relación con los residuos alimentos y el medio ambiente, volviéndose un problema de salud pública cuando residuos del fármaco y/o sus metabolitos llega al consumidor en niveles que pueden ser perjudiciales para su salud ocasionando reacciones alérgicas, toxicidad y teratogenicidad². Además de eso, se puede generar resistencia bacteriana e inclusive causar problemas tecnológicos³.

Debido a estas prerrogativas, es de suma importancia el control de los residuos de antibióticos. Para esto organismos como *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)* y *World Health Organization (WHO)* han establecido límite máximo de residuos (LMR) en alimentos. Según la Tabla 1, donde se muestran algunos de los LMR de antibióticos para productos de origen animal, se tendría que poner más énfasis en los LMR de productos como músculo (carne) y la leche; sin embargo, estos valores son igual o más bajos si los comparados con otros tejidos como hígado, riñones, grasa. Esto es de suma importancia ya que en diversas partes del mundo estos tejidos se consumen y son parte fundamental de la dieta.

“Métodos screening” como *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Elisa)* el cual tiene la ventaja de ser de bajo costo,

su facilidad operativa, rapidez y el manejo de gran número de muestras, han sido propuestos para la identificación de antibióticos. Sin embargo, muchas veces esta técnica no diferencia entre antibióticos de la misma clase y/o proporciona información semicuantitativa de los residuos por lo que para la necesidad de establecer si los residuos están por encima de los LMR recomendados, Elisa no sería la más adecuada⁴. Por estos motivos y antes de declarar que las muestras analizadas contienen residuos de antibióticos es necesario realizar una adecuada confirmación de la identificación y su cuantificación⁵. Es así que el análisis cromatográfico en fase líquida (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) o gaseosa (*Gas Chromatography, GC*) acoplados a diferentes tipos de detectores (Ultra-violeta, UV, Arreglo de diodos, DAD, fluorescencia y espectrometría de masas [*mass spectrometry, MS*]) es una técnica que responde a estas exigencias⁶, brindando información sobre el analito en evaluación^{7,8,9}.

A pesar de ser una herramienta confiable, los métodos cromatográficos no están exentos de inconvenientes como el costo de implementación del equipamiento, capacitación técnica, infraestructura de laboratorios, personal capacitado, costo por análisis, tiempo entre la recolección y el resultado, entre otros. Debido a esto es necesario conocer las diversas técnicas cromatográficas para poder elegir la que mejor se adapte a las necesidades y viabilidad de cada laboratorio.

Tabla 1. Límites máximos permisibles de antibióticos en carne de diversas especies y leche.

| Antibiótico | Bovino | Porcino | Ovino | Pollo | Pavo | Conejo | Leche |
|---|----------|---------|-------|-------|------|--------|-------|
| Amoxicilina | 50 | 50 | 50 | - | - | - | 4 |
| Avilamicina | - | 200 | - | 200 | 200 | 200 | - |
| Benzilpenicilina | 50 | 50 | - | 50 | - | - | 4 |
| Ceftiofur | 1.000 | 1.000 | - | - | - | - | 100 |
| Colistina | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 50 |
| Clortetraciclina/Oxitetraciclina/tetraciclina | 200 | 200 | 200 | 200 | - | - | 100 |
| Danofloxacina | 200 | 100 | - | 200 | - | - | - |
| Estreptomicina | 600 | 600 | 600 | 600 | - | - | 200 |
| Eritromicina | - | - | - | 100 | 100 | - | - |
| Flumequina | 500 | 500 | 500 | 500 | - | - | - |
| Gentamicina | 100 | 100 | - | - | - | - | 200 |
| Lincomicina | - | 200 | - | 200 | - | - | 150 |
| Neomicina | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | - | 1.500 |
| Pirlimicina | 100 | - | - | - | - | - | 100 |
| Sarafloxacina | - | - | - | 10 | 10 | - | - |
| Espectinomina | 500 | 500 | 500 | 500 | - | - | 200 |
| Espiramicina | 200 | 200 | - | 200 | - | - | 200 |
| Sulfadimidina | 100 | - | - | - | - | - | 25 |
| Tilmicosina | 100 | 100 | 100 | 150 | 100 | - | - |
| Tilosina | 100 | 100 | - | 100 | - | - | 100 |
| Cloranfenicol/Furazolidona/Nitrofurano/Olanquinox | Ausencia | | | | | | |

Valores expresados en µg/kg para carne y µg/L para leche.

Fuente: FAO/WHO⁷.



MÉTODO

El presente trabajo narrativo tiene como objetivo brindar información y explorar las diferentes técnicas cromatográficas y su aplicación en determinación de residuos de antibióticos veterinarios en productos de origen animal a partir de una revisión de literatura de capítulos de libros y artículos científicos indexados, siendo las bases de datos más consultadas Elsevier, *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), Springer y Hindawi. Además, fueron consultados diversas normas y reglamentos de las bases de datos internacionales como la FAO, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA), Unión Europea, Comunidad Andina; y otras nacionales como el Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria (Senasa) del Perú, Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (Sanipes). Todos ellos están disponibles en internet de forma libre y/o bajo un costo. Es importante señalar que inicialmente la búsqueda *on-line* se basó en términos de referencia mixtos en español involucrando palabras como: productos de origen animal, antibióticos y cromatografía líquida, espectrometría de masas. Esto nos sirvió para conocer un poco la realidad. Sin embargo, la búsqueda no resultó muy actualizada por lo que posteriormente se empezó a utilizar términos en inglés como: “Liquid chromatography” “chromatography”, “mass spectrometry”, “LC/MS”, “antibiotic residues”, “meat”, “milk”, “fish”, “food”, “animal origin”. El periodo de búsqueda bibliográfica fue de enero de 2016 hasta diciembre de 2017. En este tiempo se pudieron encontrar 164 referencias, de las cuales solo se utilizaron 71 para la realización de esta revisión. Dentro de los criterios de inclusión de las referencias seleccionadas se trató en lo posible de usar referencias de los últimos 7 años, sin embargo fue necesario ampliar este rango ya que encontramos referencias que eran interesantes y necesarias, sobre todo algunas normas y reglamentos que vienen desde el año 2000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Panorama sobre el control y monitoreo de residuos de antibióticos veterinarios

Es bastante conocida la importancia del uso de antibióticos en la crianza de animales de producción. Sin embargo, su uso indiscriminado, la falta de información sobre su cinética en diferentes especies o incluso no respetar los periodos de retiro hace que se incremente el riesgo de residuos por encima de los niveles tolerables. Esto podría conllevar a la aparición de cuadros alérgicos y el desarrollo de resistencia bacteriana transferida del alimento al hombre¹⁰. Todos los alimentos son susceptibles de contener residuos de fármacos, un ejemplo son los productos provenientes de bovinos (leche, carne y derivados), a los cuales se les asocia la presencia de residuos de antibióticos al tratamiento de enfermedades infecciosas frecuentes como mastitis, neumonía o podofilitis^{11,12}. Aunque los países de la Unión Europea (UE) prohibieron el uso de antibióticos como promotores de crecimiento desde 2006 y los Estados Unidos han planteado su retiro gradual, muchos

países continúan con esta práctica que contribuye a la generación de residuos¹³. En una sociedad que esta interconectada globalmente, es necesario que países importadores y exportadores de alimentos estén monitoreando continuamente sus productos. Una de las producciones que más está destacando en los últimos años por la preferencia del consumidor es la de productos acuícolas. En la Tabla 2 se presentan LMR de algunos antibióticos establecidos por diferentes países para productos de acuicultura.

En la UE el Reglamento n° 37/2010, de 22 de diciembre de 2009, describe las sustancias y medicamentos veterinarios monitoreados y los procedimientos para establecer los LMR para productos veterinarios en productos de origen animal¹⁴. Basado en esto el monitoreo realizado en el 2014 por la EFSA evidenció que 0,03% de muestras (n = 736.907) presentó residuos de antibióticos del Grupo A (sustancias prohibidas como cloranfenicol, nitrofuranos, nitroimidazoles) asimismo solo el 0.18% de las muestras analizadas presentó valores por encima de los permisibles para antibióticos del Grupo B (Residuos de antibióticos veterinarios), siendo las muestras de miel las que estaban más implicadas¹⁵.

En el caso de los países miembros de la Comunidad Andina se viene impulsado el desarrollo pecuario y agroindustrial, siendo uno de sus objetivos alcanzar un mayor grado de seguridad alimentaria. Todo esto dentro del marco establecido por el Acuerdo de Cartagena establecido para adoptar normas y programas comunes de sanidad vegetal y animal. Es así que Decisión 483 establece una norma para el registro, control, comercialización y uso de productos veterinarios en todos los países miembros de la Comunidad Andina¹⁶.

En base a esta Decisión, si vemos lo que sucede en el Perú en relación a los residuos de antibióticos, encontramos un Reglamento de Inocuidad Agroalimentaria y un Programa Nacional de Monitoreo de contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos mediante Decreto Supremo N° 004-2011-AG. Este también establece que los alimentos agropecuarios primarios que se consuman en el mercado nacional, incluyendo los alimentos importados, no deben exceder límites máximos permisibles

Tabla 2. Límites máximos permisibles de antibióticos para productos acuícolas aceptados por diversos países.

| Antibiótico | PERÚ | USA | EUROPA | JAPON |
|-----------------|----------|----------|----------|-------|
| Cloranfenicol | Ausencia | - | - | - |
| Nitrofuranos | Ausencia | - | - | - |
| Amoxicilina | 50 | Ausencia | 50 | 50 |
| Ciprofloxacina | 100 | Ausencia | Ausencia | 200 |
| Enrofloxacin | 100 | Ausencia | 100 | 100 |
| Eritromicina | 200 | Ausencia | 200 | 200 |
| Florfenicol | 1.000 | 1000 | 1.000 | 200 |
| Sulfas | 100 | Ausencia | 100 | 100 |
| Oxitetraciclina | 100 | 2000 | 100 | 200 |

Valores expresados en µg/kg.

Fuente: Servicio Nacional de Sanidad Pesquera (Sanipes)^{22,23}.



de residuos químicos y otros contaminantes, fijados en la norma nacional, o establecidos por la FAO/WHO¹⁷. Este país cuenta con 3 instituciones encargadas del control y monitoreo de residuos de fármacos: el Senasa, la Dirección General de Salud Ambiental (Digesa) y el Sanipes^{18,19}. Estas establecen planes anuales para realizar muestreos por regiones, definen el tipo de alimento a evaluar, el número de muestra a analizar y los procedimientos analíticos; además, se establecen los procedimientos necesarios para la toma y envío para la determinación de residuos de medicamentos veterinarios^{20,21}.

La cromatografía en la determinación de residuos veterinarios

Haciendo un poco de historia, encontramos que las primeras experiencias sobre cromatografía fueron llevadas a cabo en el año 1906 por el botánico ruso Mikhail Tswett quien consiguió separar algunos pigmentos (clorofilas y xantofilas) de hojas de plantas utilizando una columna de vidrio empacadas con CaCO_3 . Las especies separadas aparecían como bandas coloridas sobre la columna, lo cual explica el nombre de origen griego *chroma* = color y *graphein* = describir, con el cual se nombró el método. Según la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) la cromatografía se define como un método físico de separación en el cual los componentes son separados y distribuidos entre dos fases, una que es fija (fase estacionaria) mientras que la otra se mueve en una dirección establecida (fase móvil), la cual puede ser gas, gel o líquido^{24,25}. Este principio es fundamental para la separación y análisis de moléculas específica en matrices complejas como los alimentos, por lo que su aplicación en la determinación de residuos de fármacos ha sido muy explorada.

En nuestra revisión podemos verificar que la cromatografía y su aplicación en residuos de antibiótico han variado mucho durante los años. En un inicio se empleaba la GC acoplada a detectores de captura de electrones (ECD), nitrógeno-fósforo (NPD) y fotométrico de llama (FPD). Las aplicaciones que se llevaban a cabo mediante LC eran menos habituales debido a que los detectores utilizados como UV, diodos y fluorescencia presentaban una menor sensibilidad y selectividad que los empleados en GC. El desarrollo que ha experimentado la MS, que permiten detectar niveles por debajo de $\mu\text{g}/\text{kg}$ e incluso ng/kg , ha revolucionado este campo a tal punto que hoy en día no puede concebirse la detección y cuantificación de residuos sin el uso de los detectores de MS²⁶. Los detectores MS aportan a los métodos cromatográficos una sensibilidad y poder de confirmación mucho más elevados, que no era posible conseguir con los detectores tradicionales (UV y fluorescencia)²⁷. Teniendo en consideración esto, a continuación vamos a detallar los procedimientos para realizar la LC acoplada a detector MS.

Cromatografía líquida de alta resolución

Mejor conocida como HPLC por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*²⁸, este tipo de cromatografía se basa en una fase móvil líquida donde se usan solventes como agua, acetonitrilo o metanol y una fase estacionaria o columna cromatográfica que puede variar dependiendo del analito.

Al introducir la muestra al sistema cromatográfico, esta hace una interacción con ambas fases y es en la fase estacionaria donde se retienen las sustancias que pretendemos identificar. Las partículas retenidas poseen diferente afinidad por la fase estacionaria, esta propiedad hace que la salida del sistema sea en tiempos diferentes, esto corresponde al tiempo de retención y es fundamental en el proceso de separación. Esto podría realizarse con mayor velocidad y eficacia si incrementamos la presión del flujo de la fase móvil de algunos cientos de kilos por centímetro cuadrado, por lo que son necesarias ciertas condiciones en el equipo que soporte estas variaciones²⁹.

Normalmente, un sistema HPLC cuenta con 6 componentes básicos: un sistema de inyección para introducir la muestra, una bomba que mantiene constante el flujo de la fase móvil, una fase estacionaria, un detector y el integrador que procesa las señales y las transforma en un lenguaje que podamos interpretar (Figura 1). La elección del sistema de detección para el sistema HPLC es muy importante para la selectividad y sensibilidad del analito a identificar. Entre los detectores más utilizados podemos mencionar el UV y el de DAD⁴. Sin embargo, en la actualidad la asociación del HPLC con la detección por espectrometría de masas (LC-MS) es la más preferida para la determinación de residuos de fármacos veterinarios⁶. Es importante señalar también que los métodos cromatográficos empleados deben ser validados para una correcta aplicación, tratando que cumplan especificaciones como límites de detección/cuantificación, repetitividad, linealidad, robustez, entre otras³⁰.

La clasificación de la LC puede ser realizada en base a la composición química de los tipos de relleno de la columna cromatográfica, las cuales tienen características físico-químicas que producen diferentes mecanismos de separación. En el caso de antibióticos el más utilizado es la LC en fase reversa la cual se adecua al análisis de analitos polares e incluso iónicos, si se hace uso de la formación de pares iónicos. El tipo de material apolar con que se rellenan las columnas de fase reversa suele ser sílice químicamente modificada (cadenas de C8, C18), las cuales interactúan con una fase móvil polar (combinaciones de agua con solventes orgánicos como metanol o acetonitrilo). El porcentaje y tipo de modificador orgánico en la fase móvil es el factor más determinante en la retención de los analitos polares, pero no iónicos. Las interacciones entre el analito y el solvente son las que determinan la especificidad de la cromatografía en fase reversa, ya que las interacciones del analito con la fase estacionaria son relativamente débiles, interacciones de Van der Waals no específicas³¹.

Procedimientos utilizados para realizar la cromatografía líquida de alta resolución

Acondicionamiento de las muestras

Las condiciones y procedimientos empleados van a depender del tipo de material a ser analizado (carne, leche, huevos, entre otros). En el caso de muestras sólidas como la carne, es necesario realizar un proceso de cortes, molido y homogenización³². Una desventaja de esto es que el muestreo es destructivo y se realiza luego de que el animal ha sido faenado⁶.

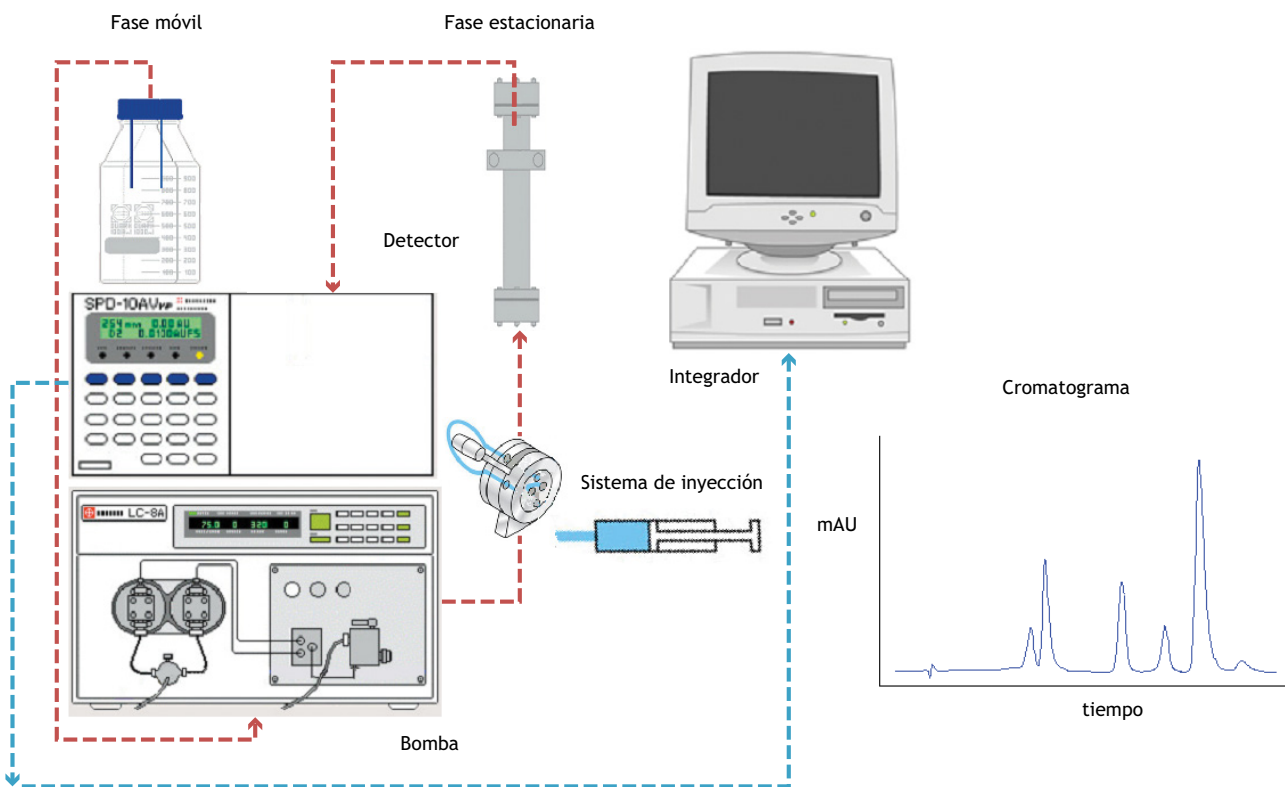


Figura 1. Esquema de un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de ultravioleta.

Extracción de analitos de la muestra

Luego de su acondicionamiento, deben eliminarse elementos como proteínas, lípidos u otros que puedan interferir en la lectura de los analitos. La mayoría de metodologías usan solventes orgánicos (acetonitrilo, acetato de etilo, metanol, acetona o éter de petróleo). El uso de estos solventes va acompañado de proceso de agitación, homogeneización o ultrasonificación que permite una mejor interacción con las muestras³³.

Posterior a este procedimiento, es recomendable utilizar una técnica de purificación o limpieza denominada extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE). En esta parte se somete la muestra más el solvente orgánico a un cartucho (jeringa) que contiene internamente las mismas propiedades de la fase estacionaria (C18) y sirve para retener los analitos de interés (residuos de antibióticos). Para recuperar estos residuos se realiza el lavado del cartucho con solventes (acetonitrilo/metanol y agua) para luego ser inyectado en el cromatógrafo³³. La SPE es muy efectiva para la detección de compuestos con propiedades no muy diferentes; sin embargo, esta técnica inicialmente concebida con la fase estacionaria fija en un cartucho demandaba aun tiempo de preparación, uso bombas de vacío y limpieza para su reutilización. Por este motivo comenzaron a presentarse variaciones a la SPE inicial³⁴.

La extracción en fase sólida dispersa (SPE-d) es una de estas variaciones, la cual consiste en la adición de un material adsorbente al extracto crudo seguido de agitación, centrifugación y posterior aislamiento del adsorbente. En la actualidad este método

es el denominado QuEChERS, acrónimo de las palabras en inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe*. Esta técnica, la cual se caracteriza por ser rápida, fácil de realizar, económica, eficaz, robusta y segura, consta de dos etapas: 1) extracción líquida con solventes (agua y acetonitrilo) y soluciones hipertónicas (cloruro de sodio, sulfato de magnesio, agentes tampón) y 2) SPE-d en la que una alícuota de la fase orgánica de la primera etapa se trata con diversos adsorbentes para eliminar los interferentes de la matriz que pudieran dificultar el posterior análisis instrumental^{33,35}. Recientemente se ha experimentado con diversos materiales para mejorar la extracción y purificación utilizando SPE. Columnas con polímeros impresos molecularmente (PIM) que reconocen selectivamente moléculas para lo que fueron sintetizados hacen que la adsorción sea más selectiva³⁶.

El proceso de extracción es fundamental para asegurar la vida media de las columnas y optimizar los tiempos de mantenimiento y limpieza del sistema cromatográfico. Sin embargo, si se abusa de los solventes en los procesos de filtrado y purificación, podemos perder parte de los analitos (residuos de antibióticos). Por este motivo se debe elegir juiciosamente el método a utilizar de acuerdo al alimento como el tipo de molécula³⁵.

Instrumentación

Las partes fundamentales del sistema cromatográfico constan de una bomba, la cual suministra un flujo constante (entre 10 μ L/min y 2 mL/min) y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna. A parte de la capacidad de la bomba, la



velocidad del flujo depende del diámetro y del material de la columna cromatográfica. Asimismo, la bomba debe ser fabricada con materiales químicamente inertes, soportar altas presiones y proporcionar un flujo libre de pulsaciones²⁴. Otro parte fundamental del sistema es la columna, lugar donde se realiza la separación de los analitos. La mayoría de las columnas consisten en estructuras cilíndricas de acero rellenas de sílice químicamente modificada (C8 ó C18). Existen variaciones de la columna en base al diámetro interno, longitud, tipo de relleno y tamaño de partícula de relleno. La evolución de la columna ha priorizado la disminución del tamaño de partícula de relleno, lo cual se ha traducido en un incremento de la selectividad y mejora de la resolución de los cromatogramas³¹.

El detector del sistema cromatográfico debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal amplia, tener poco ruido de fondo y ser estable en el tiempo que dura la corrida cromatográfica. Además, debe ser capaz de resistir presión, flujo y porcentajes de la fase móvil (gradiente). Algunos de los detectores más usados son los espectrofotómetros que miden la absorbencia a una o varias longitudes de onda en el espectro UV o en el visible; los de fluorescencia, que miden la emisión fluorescente por parte de los analitos inducida mediante un reactor situado antes o después de la separación; y otros más complejos como la MS pueden proporcionar información específica que permita la determinación inequívoca de compuestos en base a su peso molecular²⁹. En la siguiente sección se detalla las partes y funcionamiento del detector de MS.

El volumen de muestra aplicada al sistema cromatográfico debe ser preciso y no debe perturbar la circulación de la fase móvil. Debido a esto es necesario contar con un sistema de inyección el cual consta de válvulas rotatorias de alta presión de varias vías las cuales pueden ser manuales o automatizadas. Estas válvulas poseen dos posiciones. En la posición de llenado, la bomba y la columna están comunicadas y la muestra se introduce en un pequeño depósito de forma tubular (bucle) con ayuda de una microjeringa. El bucle puede escogerse de diferente volumen (5-500 μ L). En la posición de inyección, gracias a la rotación de la válvula, la muestra se arrastra por el flujo de la fase móvil y se introduce en la columna²⁹. Por otro lado, es necesario que los solventes que ingresen al sistema estén libres de aire. Esto hace preciso el uso de un desgasificador, el cual puede funcionar por un sistema de bombeo al vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los solventes o sistemas de difusión que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad. Por ejemplo, una forma conveniente de tratar los solventes antes de ser usados como fase móvil es filtrarlos al vacío a través de un filtro de poro muy pequeño.

En la actualidad, los diversos métodos favorecen la interacción de la fase móvil y estacionaria lleve más tiempo por lo que se tuvo que aumentar la velocidad del flujo para no afectar el tiempo de retención. Esto trajo como consecuencia la aparición de una nueva línea de cromatógrafos con capacidad de trabajar en altas presiones, utilizar inyectoros más rápidos, flujos de alta velocidad y detectores de mayor velocidad

de captura lo que conllevó a reducir el tiempo de la corrida cromatográfica. Es así como aparece la Cromatografía Líquida de Ultra Presión (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) y la Cromatografía Líquida Ultra Rápida (*Ultra Fast Liquid Chromatography*, UFLC)³⁷.

Espectrometría de masas

La MS acoplada a LC (Figura 2) es una de las técnicas analíticas que más se ha extendido en las últimas décadas para la confirmación de residuos de antibióticos en productos de origen animal. El éxito de su aplicación es una consecuencia de la combinación de una técnica de separación por LC y la capacidad de detección por espectro de masas. La MS se ha presentado como una técnica analítica de elevadísima sensibilidad, incluso hasta niveles de pg/L. Además, es capaz de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación. Incluso, ha sido posible aplicar todas esas cualidades en muestras de alta complejidad, alcanzando niveles de resolución muy altos^{37,38}.

La MS está basada en la detección de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo a la relación masa a carga (m/z), y finalmente se detectan por medio de un detector que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada y almacenada. Estos analizadores, pueden detectar sólo los iones y por lo tanto las moléculas deben ser ionizadas en una fuente de iones antes de su separación y detección.

Métodos de ionización

La clave que asegura el éxito de la detección por MS es conseguir que los compuestos neutros se conviertan, dependiendo de la fuente de iones, en iones moleculares, moléculas protonadas, cationizadas, desprotonadas, anionizadas o fragmentos en estado gaseoso mediante la aplicación de campos eléctricos

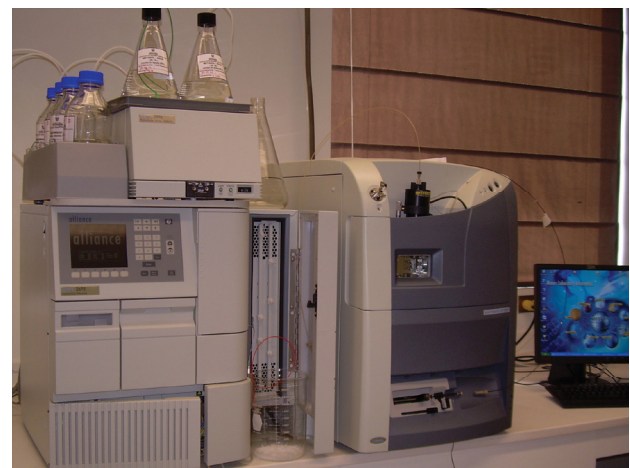


Figura 2. Cromatógrafo líquido acoplado a espectrómetro de masas cuadrupolo en tándem. (Cortesía Senasa).



y magnéticos. La ionización es la una propiedad en la que las moléculas de los analitos pasan a estado gaseoso ionizándose, este estado se consigue adicionando o eliminando un electrón o un protón. El exceso de energía proporcionado en este paso también puede transformarse en una fragmentación de la molécula, generando iones fragmento²⁴.

Las primeras interfases que se desarrollaron tenían como objetivo la eliminación del disolvente (fase móvil) e intentar conseguir moléculas de analito en fase gaseosa antes de llegar a la fuente de ionización. Posteriormente, durante el desarrollo de estas fuentes se comprobó que era posible favorecer la ionización de los analitos en presencia del solvente y a presión atmosférica sin perturbar al analizador de masas. A partir de estos principios físicos básicos se comenzó a desarrollar las interfases a presión atmosféricas (*Atmospheric Pressure Interface*, API), incluyendo la de ionización por electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI) que son los más utilizados en la detección de residuos de antibióticos por LC-MS³⁷.

La ESI se produce por la aplicación de un alto voltaje (3-6 kV) sobre un capilar conductor por el que circula un pequeño flujo de fase móvil a presión atmosférica. La elevada diferencia de potencial crea un campo eléctrico que induce la acumulación de cargas sobre la superficie del líquido al final del capilar, rompiéndose en pequeñas gotas de solvente cargado positivamente (modo positivo) o negativamente (modo negativo). Estas gotas de solvente se dispersan como consecuencia de la introducción de un flujo de gas inerte coaxial al flujo de la fase móvil, este gas también provoca la evaporación o pérdida del resto de solvente en las gotas, ya que circula a altas temperaturas. El flujo óptimo proveniente de la LC debe ser del orden de 2 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, sin embargo se han aplicado flujos mayores, de hasta 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, empleando diseños de fuentes con energía adicional, temperatura o flujo del gas, lo que permitir una mejor dispersión de las gotas a partir del capilar³⁷.

Por otro lado, la Ionización Química a Presión Atmosférica (*Atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) es una interfase que primero vaporiza la fase móvil y luego somete a las partículas a una descarga para cargarlas al analito en fase gaseosa. Esta técnica es usada en compuestos que no se ionizan bien con la ESI (frecuentemente más estables, compuestos con pesos moleculares bajos y compuestos no polares) pero en condiciones más complejas es probable que ESI cause la degradación de la muestra, especialmente en compuestos termolábiles. Al parecer APCI tienes menos problemas para la ionización que ESI. Debido a que tanto ESI como APCI tienen diferentes mecanismos de ionización, la respuesta y la selectividad pueden variar entre ambas interfases³⁹.

Separación de iones

Al analizador de masas es la parte más importante del espectrómetro, el principio físico se basa en la dispersión y focalización de los iones en función de la relación masa/carga (indicado comúnmente como m/q o m/z), siendo las variantes de este proceso la diferencia entre los distintos instrumentos de

espectrometría de masa. Entre los más utilizados tenemos: cuadrupolo (*Quadrupole*, Q), trampa de iones cuadrupolares (*Quadrupole Ion Trap*, QIT) y tiempo de vuelo (*Time of flight*, TOF).

El cuadrupolo es el más usado ya que ofrece un amplio rango de masas (40 a 4000 u), reproducibilidad y precisión para la cuantificación, además de una alta sensibilidad. Un cuadrupolo consiste en cuatro barras dispuestas en paralelo con una alta precisión, los polos se encuentran espaciados alrededor de unos ejes centrales. Las barras situadas en posición opuesta se les aplican una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF)³⁸. Los iones son introducidos en el campo cuadrupolar mediante la aplicación de un potencial, con lo que empiezan a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras. De esta manera los iones describen una trayectoria que depende directamente de su relación m/z permitiendo realizar un análisis completo de todos los elementos de la muestra (*Full scan*). Sin embargo, de forma específica, los cuadrupolos son capaces de ajustar una radiofrecuencia para estabilizar una relación m/z concreta que es dirigida hacia el detector, descartando aquellas relaciones m/z mayores o menores a la seleccionada (*Selected Ion Monitoring*). El cuadrupolo actúa como un filtro de masas, de forma que, de todos los iones provenientes de la fuente, sólo se van transfiriendo al detector los seleccionados, perdiéndose el resto por el camino. En ese sentido, para obtener un barrido total de masas debe ir acoplado una a una las m/z mediante la creación de campos eléctricos selectivos de cada una de ellas^{37,38}.

La trampa iónica cuadrupolar es un dispositivo formado por tres electrodos, dos de ellos hiperbólicos, y entre estos un electrodo en forma de anillo toroidal. El sistema tiene el mismo fundamento que el analizador de cuadrupolo. Se aplican, simultáneamente, una corriente continua y un potencial de radiofrecuencia, de tal forma que los iones generados quedan confinados dentro del anillo toroidal. Los iones son expulsados de la cámara tras la aplicación de rampas de radiofrecuencia. Conforme aumenta el voltaje, aumenta la amplitud de su movimiento oscilatorio hasta ser expulsados. Los iones de mayor masa se desestabilizan conforme va aumentando el voltaje de radiofrecuencia, de tal forma que los iones se detectan de forma secuencial, obteniendo así el espectro en función del voltaje y la masa²⁴.

El triple cuadrupolo (QqQ o TQ), donde el primer cuadrupolo (Q1) actúa como un filtro que selecciona y separa las moléculas cargadas del resto de componentes que eluyen del cromatógrafo. El tercer cuadrupolo (Q3) actúa también como filtro, pero en este caso de los fragmentos producidos por disociación que llegan del segundo cuadrupolo (Q2), dejando pasar hacia el detector solo aquellas masas de los fragmento seleccionados. El proceso de disociación que ocurre en el Q2, es inducido por un gas ionizado y acelerado, de forma que colisiona con las moléculas de analito provocando su fragmentación²⁴.

El TOF, se basa en la separación de los iones en función del tiempo que tardan en atravesar un tubo de vuelo de longitud conocida. Este tiempo depende de la relación m/z porque los iones menos pesados llegarán más rápidamente al detector



que aquellos que presentan una relación m/z de valor más alto. Una de las dificultades más importantes de este tipo de instrumentos al acoplarlos con LC es que los iones que llegan continuamente de la interfase tienen que ser enviados al TOF mediante un pulso. Para obtener una buena medida del tiempo de vuelo de los iones, el tiempo al que comienza el vuelo de los iones debe estar muy bien controlado. TOF trabaja de forma discontinua al contrario que el analizador de cuadrupolo, ya que los iones que llegan al analizador son pulsados al tubo de vuelo teniendo que esperar el tiempo necesario para que todos alcancen al detector antes de volver a lanzar otro pulso^{37,38}.

Tradicionalmente se había trabajado con cuadrupolos simples acoplados a GC, debido a que se obtenía gran cantidad de información estructural bajo una ionización por impacto electrónico. Ante la aparición de las fuentes de ionización API, que permiten el acoplamiento entre LC y MS, se vio un primer inconveniente relacionado a la poca fragmentación de las moléculas ionizadas, lo cual genera escasa información estructural. Por este motivo surge la idea de acoplar dos analizadores de espectrometría de masa (MS/MS) para aumentar considerablemente el potencial y las posibilidades que ofrece el LC-MS. De este modo, la MS en tándem (MS/MS) conlleva dos etapas: En la primera, se produce la selección de un ion precursor seguida de una ionización de las moléculas mediante un proceso de disociación o por medio de una reacción química. En la segunda etapa se lleva a cabo el análisis de los iones producto obtenidos del proceso de fragmentación. Esta técnica ofrece una gran selectividad, ya que permite la posibilidad de aislar un ión en la celda de colisión, eliminando otros iones o fragmentos que puedan interferir. La fragmentación en este caso se produce por la colisión del ión seleccionado^{37,38}.

Detección de iones

Un espectro de masas será, en consecuencia, una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación m/z de cada uno de ellos. Una vez realizada la adquisición, el procesamiento de los datos es una de las partes más importantes para identificar y cuantificar la cantidad de analitos presentes en la muestra. Hay que tener en cuenta que de una muestra eluyen miles de compuestos, incluyendo los de interés, siendo la determinación de todos casi imposible debido en parte a la cantidad de compuestos presentes y a las bases de datos insuficientes para los compuestos³⁵.

La mayoría de los proveedores de instrumentos ofrecen herramientas de *software* quimiométricos para analizar sus propios formatos de datos. Sin embargo, la determinación de los compuestos en análisis se realiza mediante comparación con estándares. Además, la creación de bases de datos (bibliotecas) con información acerca de fragmentos, fórmula molecular, etc., para el análisis es de vital importancia. La mayoría de los programas proporcionados por los fabricantes permiten la generación de varias fórmulas moleculares a partir de un m/z particular y su patrón isotópico³⁵.

La cuantificación utilizando la detección MS/MS no difiere de la cuantificación utilizada por otras técnicas cromatográficas. Básicamente se compara la intensidad de la señal generada por un analito en una muestra con un estándar con cantidades y concentraciones conocidas. En base a esto se puede crear una relación entre la señal y la concentración del estándar, obteniendo una ecuación lineal (Figura 3). La MS en tándem presenta grandes ventajas prácticas frente a MS simple, ya que la calidad y la cantidad de información proporcionada por MS/MS, aumenta la selectividad y la capacidad de la técnica para la elucidación estructural. En la mayoría de equipos MS, la cuantificación y determinación de los compuestos puede ser direccionada con diferentes formas de análisis³⁷.

- **Barrido de todos los iones (Full Scan)**, en este modo de adquisición todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector. En el QqQ, tanto la celda de colisión (q) como el segundo cuadrupolo (Q2) no actúan en el proceso de selección, realizándose el barrido de iones en alguno de los cuadrupolos y obteniendo un espectro de full scan.
- **Adquisición de un ión seleccionado (Single Ion Monitoring, SIM)**, la adquisición SIM está dirigida a la medida de un solo ión, que es seleccionado en el primer cuadrupolo. Este tipo de adquisición deriva del uso de Q simple, y su aplicación en instrumentos QqQ no suele ser muy frecuente.
- **Barrido de iones producto (Product Ion Scan)**, el barrido de iones producto se lleva a cabo seleccionando en el primer cuadrupolo (Q1) una m/z concreta denominado ión precursor, que se fragmenta con una energía adecuada en la celda de colisión; el segundo analizador adquiere en modo full scan de forma que se obtiene la medida de todos los fragmentos del ión precursor. A estos fragmentos se les denomina iones producto. Este modo de adquisición es ideal para la obtención de la máxima información estructural posible del ión precursor.

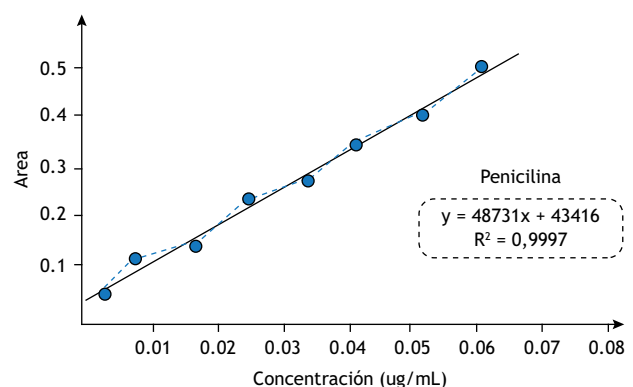


Figura 3. Representación de la Linealidad. Relación entre señal (área) y concentración del estándar para la cuantificación cromatográfica. En este caso se presentan ocho concentraciones diferentes del estándar de penicilina.



- **Adquisición de la reacción seleccionada (*Selected Reaction Monitoring, SRM*)**, en el modo de adquisición SRM, se selecciona un ión en el primer cuadrupolo (Q1) denominado ión precursor; el ión precursor se fragmenta en la celda (q) de colisión en presencia de gas inerte aplicando una energía de colisión óptima; uno de los iones fragmento obtenido en q se selecciona en el segundo cuadrupolo (Q2) etiquetándose como ión producto. La adquisición en SRM es la más utilizada en las aplicaciones analíticas cuantitativas mediante QqQ, ya que minimiza al máximo la presencia de otros interferentes y se presenta como una herramienta de alta sensibilidad y selectividad.
- **Barrido de iones precursor (*Precursor Ion Scan*)**, en este modo de adquisición, el primer cuadrupolo (Q1) hace un barrido de todos los iones que provienen de la interfase en el primer cuadrupolo, fragmentándose en la celda de colisión a una energía concreta, de todos los fragmentos obtenidos sólo se selecciona uno por el segundo cuadrupolo (Q2). El barrido de iones precursores tiene sentido en instrumentos de QqQ, debido a que se debe seleccionar un ión fragmento proveniente de la celda de colisión en el segundo analizador (Q2). La aplicación a la que viene asociado este modo de adquisición es a un grupo de compuestos de la misma familia o a metabolitos provenientes de un mismo analito, pues el barrido de iones precursores a un ión producto común está directamente ligado a una estructura química común.
- **Barrido de pérdidas neutras (*Neutral Loss Scan*)**, es un modo de adquisición muy específico de QqQ debido a que es necesario que dos analizadores trabajen coordinadamente. El primer cuadrupolo (Q1) y el segundo cuadrupolo (Q2) realizan un barrido en desfase, fijando un valor de masa que diferencia los iones barridos en Q1 y los barridos en Q2, una vez han sido fragmentados en la celda de colisión a una energía concreta. De esta forma, solo aquellos analitos que presenten la pérdida neutra seleccionada serán detectados. Al igual que en el barrido de iones precursores, este modo de adquisición es idóneo para la búsqueda de analitos de la misma familia o de metabolitos que comparten una estructura química común.

Aplicación de la cromatografía en la determinación de antibióticos

Basados en la naturaleza polar y baja volatilidad de los residuos de antibióticos veterinarios, la LC es la técnica de elección para su identificación y cuantificación; sin embargo, hay tener en cuenta puntos importantes como la diversidad de antimicrobianos usados en la crianza de animales; la baja concentración de residuos de antimicrobianos en los alimentos, muchas veces en $\mu\text{g}/\text{kg}$ y la complejidad de las matrices alimentarias las cuales pueden contener elementos que interfieren en la lectura cromatográfica, esto hace que se desarrollen diversos métodos de extracción^{2,40,41}. La Figura 4 muestra las estructuras químicas de los principales antimicrobianos usados en veterinaria.

Como se mencionó anteriormente en la sección extracción de analitos de la muestra, los antibacterianos se unen a diversos componentes de la matriz alimentaria (proteínas) por lo que las muestras deben sufrir un primer proceso de desproteínización. Esto puede ser realizado con solvente como acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano o metanol. La SPE es otro de los pasos fundamentales en la extracción ya que permite retener diversos componentes de la matriz alimentaria que puedan interferir en el sistema cromatográfico^{2,42}. A continuación presentamos un resumen de los métodos de separación y detección en diferentes técnicas cromatográficas usadas para el monitoreo de algunos antibióticos (Tabla 3).

Aminoglucósidos

Lo más representativos de esta clase son la gentamicina, neomicina y estreptomina⁴³. Aunque es sabido que estos fármacos pueden causar nefro y ototoxicidad, aún son utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas⁶. Diversos factores hacen difícil su determinación. Su naturaleza polar impide su extracción y separación cromatográfica, asimismo no poseen propiedades de cromóforos o fluoróforos y la mayoría de fármacos de este grupo poseen estructuras similares^{6,43}. Para su determinación se prefiere la extracción por intercambio iónico en pH alto o bajo, también puede ser utilizada el pareamiento iónico en solución acuosa o metanólica⁶. Por otro lado, para facilitar su visualización uno de los agentes de derivatización que más se utiliza es el heptaldehído (OPA) y un detector de fluorescencia. Dentro del protocolo de extracción las muestras pueden pasar por desproteínización con ácido tricloroacético ó ácido clorhídrico. Debido a su naturaleza polar la purificación es realizada con columnas C8 ó C18, se usa una fase móvil de acetonitrilo/metanol y agua y se prefiere un sistema de cromatografía líquida de intercambio iónico^{6,43}.

Tetraciclinas

Producidas por *Streptomyces* spp. y con actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo algunas anaerobias. Tienen afinidad sobre el ribosoma 30S y por lo tanto inhibe la síntesis de proteínas, produciendo un efecto bacteriostático. Los fármacos más representativos de este grupo son la oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, demeclociclina; siendo asociados a problemas gastrointestinales, hipersensibilidad y pobre desarrollo fetal en humanos con un consumo subcrónico⁴⁴. Como se vio anteriormente, los LMR para carne de diversas especies y leche de este grupo son de 200 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente; sin embargo, se acepta 400, 600 y 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en huevos, hígado y riñones⁷. Por otro lado, para miel no debe encontrarse, aunque algunos países europeos aceptan LMR entre 15 a 50 ng/g ⁴⁵. Las técnicas de extracción para la determinación de tetraciclinas por HPLC prefieren el uso de SPE, detección por ultravioleta y diferentes soluciones dependiendo del alimento. Cinquina et al.⁴⁶ usaron ácido tricloroacético en leche y carne mientras que Andersen et al.⁴⁷ utilizaron ácido succínico en camarones. Por otro lado, para la miel Viñas et al.⁴⁸ y Li et al.⁴⁵ realizaron propusieron usar un buffer de Na_2 EDTA.

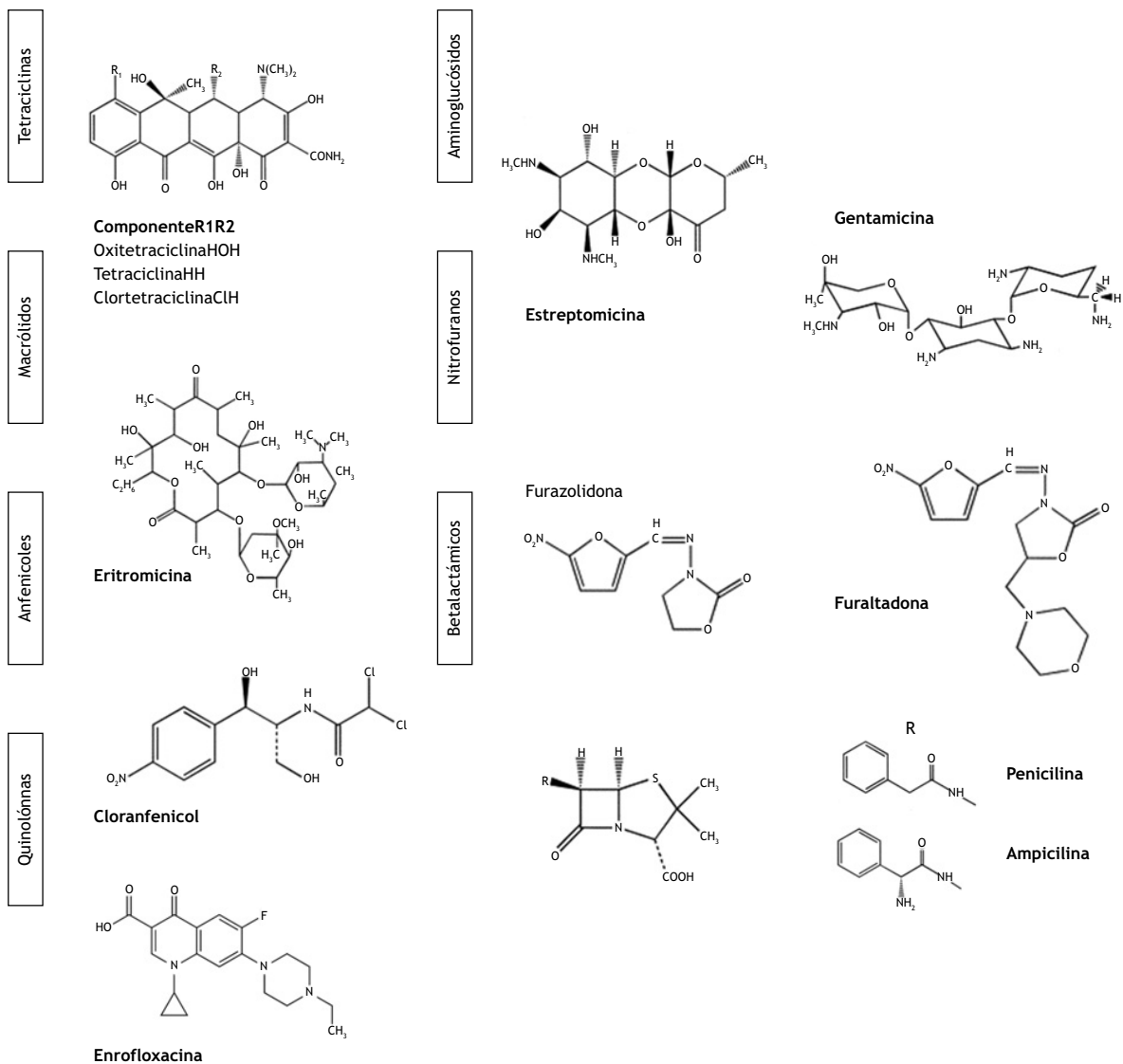


Figura 4. Estructura química de los principales antibióticos veterinarios de importancia en salud pública.

Betalactámicos

Este grupo de antibióticos son ampliamente utilizados en bovinos. Básicamente están divididos en dos clases las penicilinas y las cefalosporinas¹⁰. Dentro de la metodología cromatográfica la parte de extracción y purificación es uno de los pasos más complicados pues requiere una gran cantidad de sales buferradas y solventes orgánicos (acetato de sodio, acetato de amonio, cloruro de tetraetilamonio, tungsteno de sodio, citrato de sodio, ácido tricloroacético, ácido sulfúrico o acetonitrilo); asimismo, se indica el uso de SPE (C18) y la detección en base a MS^{49,43}. Los LMR varían de 4µg/L para la ampicilina en leche hasta 300 µg/Kg para oxacilina, cloxacilina en tejido como músculo, hígado y riñones¹⁰.

Macrólidos

Son un grupo de fármacos con efectos sobre bacterias Gram positivas, algunas Gram negativas y micoplasma. Actúan

inhibiendo la síntesis proteica de los microorganismos sensibles, al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. No se unen a ribosomas de células de mamíferos. Los métodos cromatográficos se basan en la extracción con acetonitrilo ó metanol. La fase móvil está compuesta de agua, acetonitrilo/metanol y ácido fórmico/acetato en diferentes proporciones. Asimismo, se prefiere el uso de columnas C18 acoplada a espectrómetro de masas. La forma de ionización más utilizada es la ESI debido a que los macrólidos son moléculas que contienen átomos de nitrógeno que son fácilmente protonadas positivamente⁵⁰.

Quinolón

Es un compuesto heterocíclico aromático que muestra una excelente actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas inhibiendo la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano. Es usado a menudo en la industria ganadera y en la acuicultura para combatir cuadros infecciosos de tipo pulmonar,



Tabla 3. Técnicas cromatográficas para la determinación de residuos de antibióticos veterinarios.

| Antibiótico | Muestra | Extracción | Fase estacionaria | Fase Móvil | Detección | Referencia |
|----------------------|-------------------------------------|--|-------------------|-------------------|-----------|---------------------------------------|
| Tetraciclinas | | | | | | |
| | Carne | Metanol/diclorometano/Fase líquida dispersiva | C18 | ACE, FOR, AG | MS/MS | Mookantsa, Dube y Nindi ⁴⁴ |
| | Carne, leche, huevos | Acetonitrilo, Ácido trifluoroacético/Fase sólida con polímero impreso molecularmente | C18 | ACE, TFA, AG | UV | Feng et al. ⁵⁹ |
| | Miel, leche | Acetonitrilo, ácido acético/Fase sólida miniaturizada | C18 | FOR, MET | TOF/MS | Xu et al. ⁶⁰ |
| B-lactámicos | | | | | | |
| | Carne | Acetonitrilo/Fase líquida | C18 | ACE, AAC, AG | MS/MS | Li et al. ⁶¹ |
| | Leche, huevos | Acetonitrilo/Fase líquida | C18 | ACE, ACA, AG | UV | Shao et al. ⁴⁹ |
| | Carne (cerdo) | Acetonitrilo/Fase sólida dispersiva | C18 | ACE, FOR, AG | MS/MS | Huang et al. ⁶² |
| Macrólidos | | | | | | |
| | Carne (cerdo, pollo, bovino) | Borato de sodio y acetato de etilo/Fase sólida con polímero impreso molecularmente | C18 | ACE, FOR, AG | MS/MS | Song et al. ⁶³ |
| | Carne (cerdo, pollo, bovino), leche | Acetonitrilo/Fase líquida | C18 | ACE, AG | MS/MS | Jank et al. ⁶⁴ |
| Quinolón | | | | | | |
| | Carne, huevos | Metanol, ácido metafosfórico/Fase sólida | C18 | ACE, FOR, AG | MS/MS | Annunziata et al. ⁶⁵ |
| | Leche | Acetonitrilo, metanol/Fase sólida dispersiva | C18 | MET, FOR | MS/MS | Dorival-García et al. ⁶⁶ |
| Cloranfenicol | | | | | | |
| | Leche, miel | Acetonitrilo, ácido acético/Fase sólida | C18 | MET, ACE | MS/MS | Liu, Lin y Fuh ⁶⁷ |
| | Carne (Pollo, bovino, pescado) | Acetato de etilo, hidróxido de sodio | C18 | ACE, ACA, AG | MS/MS | Barreto et al. ⁶⁸ |
| Nitrofuranos | | | | | | |
| | Pescado (diversos) | Ácido clorhídrico/Fase sólida | C18 | ACE, ACA, AG | MS/MS | Zhang et al. ⁶⁹ |
| | Carne (pollo, pescado), leche, miel | Ácido clorhídrico/Fase líquida | C18 | MET, AG | MS/MS | Alkan, Kotan y Ozdemir ⁷⁰ |
| | Carne (pollo) | Ácido clorhídrico/Fase sólida | C18 | ACE, ACA, MET, AG | MS/MS | Kim et al. ⁷¹ |

C18, Columna cromatográfica de carbono octadecil ligado a sílice; MS, Espectrómetro de masa; UV, Ultravioleta; TOF, Tiempo de vuelo, ACE, Acetonitrilo; FOR, ácido fórmico; TFA, ácido trifluoroacético; MET, metanol; AAC, ácido acético; ACA, acetato de amonio, AG, agua

urinario y digestivo. Dentro de las técnicas cromatográficas, la extracción del analito con acetonitrilo a diferentes pH y la identificación y cuantificación con el HPLC y el detector de fluorescencia fueron los más usados. Sin embargo, en años recientes se está empleando más la LC-MS/MS⁴.

Anfenicoles

El cloranfenicol se ha utilizado durante más de 60 años en veterinaria debido a su actividad antibiótica de amplio espectro contra una variedad de patógenos. Sin embargo, en 1994 se clasificó como medicamento de riesgo para la salud y desde entonces se ha prohibido su uso en la producción ganadera. Los métodos de extracción más utilizados involucran el uso de acetato de etilo ó acetonitrilo, una purificación con SPE (C18), separación en columnas C18 y detección por ultravioleta⁴³.

Nitrofuranos

Son un grupo particular de antibióticos que fueron usados como promotores de crecimiento en diversos sistemas de producción animal y utilizados fundamentalmente para tratar la histomoniasis y coccidiosis en aves, tricomoniasis en ganado vacuno o la disentería porcina; sin embargo fueron prohibidos debido a la implicancia de sus residuos en matrices alimentares y la generación de carcinogénesis y mutagénesis en humanos. Nitrofurantoina (NFT), furazolidona (FZD), nitrofurazona (NFZ), nifursol (NFS) y furaltadona (FTD) son alguno de los fármacos que fueron utilizados. Estos rápidamente eran metabolizados y se generaban ciertos metabolitos como 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), 3,5-dinitro-ácido salicílico hidracina (DNSAH), semicarbazida (SEM), y 1-aminohidantoina (AHD)^{51,52}. El proceso de extracción cuenta con el uso de soluciones ácidas



como el HCl (0.125 M), fase móvil con mezclas de agua y metanol, SPE y detección por espectrometría de masa

Múltiples residuos de antibióticos

En la actualidad, diversas técnicas cromatográficas han sido desarrolladas y validadas orientadas a la determinación simultánea de fármacos de diferentes grupos. Esto ha sido posible debido al enorme progreso de la MS⁵³. El objetivo es desarrollar una técnica que sea fácil, económica y rápida en la determinación y cuantificación de residuos de antibióticos. El análisis simultáneo de residuos de antibióticos veterinarios ha sido realizado en diversas matrices alimentarias de origen animal como huevos⁵³, miel^{54,55} y leche^{56,57,58}.

CONCLUSIONES

Después de la revisión realizada podemos definir que la técnica más eficiente para detectar y cuantificar residuos de

antibióticos en productos de origen animal es la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a la MS en tándem (LC-MS/MS). Esta técnica es compleja ya que involucra una serie de pasos, procedimientos y equipos además de un nivel de especialización del personal a cargo. Sin embargo, se ha convertido en una herramienta esencial ya permite la separación de matrices complejas e información estructural a base del peso molecular del compuesto o sus fragmentos. Esto la hace ideal para los planes de control y monitoreo en diversos países. Es evidente que en los últimos años se han producido avances en resolución, rendimiento y automatismo en esta técnica con lo cual se ha conseguido tener mayor sensibilidad y precisión. Siendo así, nuestra revisión trata de dar alcances de las metodologías aplicadas en la detección de residuos de diferentes grupos de antibióticos, sobre todo los que tienen una implicancia directa en salud pública.

REFERENCIAS

1. Mastovska K. Multiresidue analysis of antibiotics in food of animal origin using liquid chromatography: mass spectrometry. In: Zweigenbaum J, editor. Mass spectrometry in food safety: methods and protocols. Totowa: Humana Press; 2011. p. 267-307.
2. Blasco C, Picó Y, Torres CM. Progress in analysis of residual antibacterials in food. Trends Analyt Chem. 2007;26(9):895-913. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.08.001>
3. Pacheco-Silva É, Souza JRd, Caldas ED. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. Quim Nova. 2014;37(1):111-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422014000100020>
4. Talero-Pérez YV, Medina OJ, Rozo-Núñez W. Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. Univ Sci. 2013;19(1):18. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC19-1.taci>
5. Verdon E. Antibiotic residues in muscle tissues of edible animal products. In: Nollet LML, Toldrá F, editors. Safety analysis of foods of animal origin. New York: CRC Press; 2010. p. 249-347. 6.
6. Stolker AAM, Brinkman UAT. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals: review. J Chromatogr A. 2005;1067(1-2):15-53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.037>
7. World Health Organization. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. CAC/MRL 2-2017 Updated up to the 40th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2017) 2017[acceso 5 ago 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%252FBMRL%252F%252FMRL2e.pdf>
8. European Union. 2002/657/EC: Decisión de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (Texto pertinente a efectos del EEE) [notificada con el número C(2002) 3044]. 2002[acceso 12 dez 2016]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32002D0657>
9. Romero González R, Fernández Moreno JL, Plaza Bolaños P, Garrido Frenich A, Martínez Vidal JL. Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. Rev Esp Salud Publica. 2007;81(5):461-74.
10. Bogiatti S, Di Corcia A. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. Anal Bioanal Chem. 2009;395(4):947-66. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2930-6>
11. Máttar S, Calderón A, Sotelo D, Sierra M, Tordecilla G. Detección de antibióticos en leches: Un problema de salud pública. Rev Salud Publica. 2009;11:579-90. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642009000400009>
12. Reig M, Toldrá F. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. Meat Science. 2008;78(1-2):60-7. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.029>
13. Baynes RE, Dedonder K, Kissell L, Mzyk D, Marmulak T, Smith G, et al. Health concerns and management of select veterinary drug residues. Food Chem Toxicol. 2016;88:112-22. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.020>
14. European Union. Commission Regulation (EU) 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off J Eur Communities. 2010[acceso 1 nov 2016]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32010R0037>



15. European Food Safety Authority - EFSA. Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. 2016[acceso 25 jan 2017]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2016.EN-923/epdf>
16. Comisión de la Comunidad-Andina. Decision 483: Normas para el registro, control, comercialización y uso de productos veterinarios. [s.L.]: Sistema de Información sobre Comercio Exterior; 2000[acceso 18 maio 2016]. Disponible en: <http://www.sice.oas.org/Trade/Junac/decisiones/dec483as.asp>
17. Perú. Decreto Supremo N° 004-2011- AG. Aprueba el reglamento de inocuidad alimentaria. El Peruano. 2001[acceso 19 maio 2016]. Disponible en: https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/jer/SECCION_NOR_AGROA/DS%20004%202011%20AG%20Reglamento%20de%20Inocuidad%20Agroalimentaria.pdf
18. Perú. Resolución Directoral N° 0041-2016-MINAGRI-SENASA-DIAIA. Aprueban plan anual de monitoreo de residuos químicos y otros contaminantes en alimentos agropecuarios primarios y piensos, periodo abril - diciembre 2016. El Peruano. 21 abr 2016[acceso 19 maio 2016]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/11/RD-0041-2016-MINAGRI-SENASA-DIAIA.pdf>
19. Perú. Decreto Supremo N° 034-2008-AG. 2008. Reglamento del Decreto Legislativo 1062. Ley de Inocuidad de los Alimentos. El Peruano. 17 dic 2008[acceso 20 maio 2016]. Disponible en: https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/jer/SECCION_NOR_AGROA/D.S.%20034-2008-AG%20Reglamento%20de%20la%20Ley%20de%20INOCUIDAD.pdf
20. Perú. Resolución Jefatural N° 0207-2012-AG-SENASA. Programa Nacional de Contaminantes. El Peruano. 7 set 2012[acceso 20 maio 2016]. Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2016/08/RJ-0207-2012-AG-SENASA.pdf>
21. Perú. Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria. Dirección de Insumos Agropecuarios e Inocuidad Agroalimentaria. PRO-SIAG-07. Procedimiento: Toma y envío de muestras de alimentos agropecuarios primarios y piensos. 2015[acceso 3 jun 2016]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2015/10/PRO-SIAG-07.-PROCEDIMIENTO-TOMA-Y-ENVÍO.pdf>
22. Perú. Dirección del Servicio Nacional de Sanidad Pesquera. División de Control Sanitario del Medio Acuícola. SGC-MAI/SANIPES. Manual: Indicadores o criterios de seguridad alimentaria e higiene para alimentos y piensos de origen pesquero y acuícola. 2010[acceso 5 jun 2016]. Disponible en: http://www.sanipes.gob.pe/procedimientos/13_ManualIndicadoresocriteriosdeseguridadalimentaria-rev02-2010.compressed.pdf
23. Perú. Dirección del Servicio Nacional de Sanidad Pesquera. División de Control Sanitario del Medio Acuícola. PR-DSANIPES/CSMAA - 02. Procedimiento: Control de residuos de medicamentos veterinarios, sustancias prohibidas y plaguicidas en la acuicultura. 2008[acceso 11 maio 2016]. Disponible en: http://www.sanipes.gob.pe/procedimientos/13_ControldeResiduosdemedicamentosveterinariosysustanciasprohibidasylaguicidasenlaacuicultura.compressed.pdf
24. Ardrey RE. Liquid chromatography: mass spectrometry: an introduction. Wiltshire: John Wiley & Sons; 2003. Chapter 2, Liquid chromatography; p. 7-31.
25. Ettre LS. Unified nomenclature for chromatography. *J High Resolut Chromatogr.* 1993;16(4):258-61. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240160411>
26. Koester CJ, Moulik A, editors. Trends in environmental analysis. Livermore: Lawrence Livermore National Laboratory; 2005.
27. Balizs G, Hewitt A. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2003;492(1-2):105-31. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00890-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00890-0)
28. Shi J, Xue SJ, Ye X, Jiang Y, Ma Y, Li Y, et al. Separation technology in food processing. In: Simpson BK, editor. Food biochemistry and food processing. Iowa,: Wiley-Blackwell; 2012. p. 764-84.
29. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Equipment. In: Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW, editors. Introduction to modern liquid chromatography. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 87-145.
30. European Union. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Communities.* 2002[acceso 20 jun 2016]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32002D0657>
31. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. The Column. In: Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW, editors. Introduction to modern liquid chromatography. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 199-252.
32. Reig M, Toldrá F. Growth promoters. In: Nollet LML, Toldrá F, editors. Safety analysis of foods of animal origin. New York: CRC Press; 2010. p. 229-48.
33. Mayor R. Preparative separations. In: Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW, editors. Introduction to modern liquid chromatography. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 725-55.
34. Abd-Talib N, Mohd-Setapar S, Khamis AK. The benefits and limitations of methods development in solid phase extraction: Mini review. *Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering).* 2014;69(4):69-72. <https://doi.org/10.11113/jt.v69.3177>
35. León N, Roca M, Igualada C, Martins CPB, Pastor A, Yusá V. Wide-range screening of banned veterinary drugs in urine by ultra high liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2012;1258:55-65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.031>
36. Sarafraz-Yazdi A, Razavi N. Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques. *Trends Analyt Chem.* 2015;73:81-90. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.004>
37. Dass C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry. New Jersey: John Wiley & Sons; 2006. 610 p. <https://doi.org/10.1002/9780470118498>



38. Hoffmann E, Stroobant V. Mass spectrometry: Principles and applications. 3rd ed. Wiltshire: Wiley & Sons; 2013.
39. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Detection. In: Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW, editors. Introduction to modern liquid chromatography. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 147-197.
40. Niessen WMA. LC-MS in food safety analysis. In: Niessen WMA, editor. Liquid chromatography-mass spectrometry. 3rd ed. Chromatographic Science Series. New York: CRC Press; 2006. p. 381-412.
41. Susanne R, RicardoMathias O. Antimicrobial residues. In: Nollet LML, Toldrá F, editors. Food analysis by HPLC. 3rd ed. New York: CRC Press; 2012. p. 567-90.
42. Kennedy DG, McCracken RJ, Cannavan A, Hewitt SA. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *J Chromatogr A*. 1998;812(1-2):77-98. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00048-X)
43. Schenck FJ, Callery PS. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J Chromatogr A*. 1998;812(1-2):99-109. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01291-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01291-0)
44. Mookantsa SOS, Dube S, Nindi MM. Development and application of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of tetracyclines in beef by liquid chromatography mass spectrometry. *Talanta*. 2016;148:321-8. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.006>
45. Li J, Chen L, Wang X, Jin H, Ding L, Zhang K, et al. Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography. *Talanta*. 2008;75(5):1245-52. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.027>
46. Cinquina AL, Longo F, Anastasi G, Giannetti L, Cozzani R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J Chromatogr A*. 2003;987(1-2):227-33. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01446-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01446-2)
47. Andersen WC, Roybal JE, Gonzales SA, Turnipseed SB, Pfenning AP, Kuck LR. Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2005;529(1-2):145-50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.08.012>
48. Viñas P, Balsalobre N, López-Erroz C, Hernández-Córdoba M. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. *J Chromatogr A*. 2004;1022(1-2):125-9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.066>
49. Shao Y-X, Chen G-H, Fang R, Zhang L, Yi L-X, Meng H-L. Analysis of six β -lactam residues in milk and egg by micellar electrokinetic chromatography with large-volume sample stacking and polarity switching. *J Agric Food Chem*. 2016;64(17):3456-61. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00482>
50. Wang J. Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices. *Mass Spectrom Rev*. 2009;28(1):50-92. <https://doi.org/10.1002/mas.20189>
51. Lázaro CA, Espinoza J, Silva JT, Paschoalin VMF, Conte Júnior CA. Chromatographic detection of nitrofurans in foods of animal origin. *Arq Instit Biol*. 2015;82:1-9. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000532013>
52. Walker M, Wong Y-c. Protection of the agri-food chain by chemical analysis. In: Bhat R, Gómez-López VM, editors. Practical food safety. Chichester: John Wiley & Sons; 2014. p. 125-44. <https://doi.org/10.1002/9781118474563.ch8>
53. Jiménez V, Rubies A, Centrich F, Companyó R, Guiteras J. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011;1218(11):1443-51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.021>
54. Hammel Y-A, Mohamed R, Gremaud E, LeBreton M-H, Guy PA. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008;1177(1):58-76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.112>
55. Bargańska Ż, Namieśnik J, Ślebioda M. Determination of antibiotic residues in honey. *Trends Analyt Chem*. 2011;30(7):1035-41. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.014>
56. Martins MT, Barreto F, Hoff RB, Jank L, Arsand JB, Motta TMC, et al. Multiclass and multi-residue determination of antibiotics in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Combining efficiency of milk control and simplicity of routine analysis. *Int Dairy J*. 2016;59:44-51. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.048>
57. Han RW, Zheng N, Yu ZN, Wang J, Xu XM, Qu XY, et al. Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS. *Food Chem*. 2015;181:119-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.041>
58. Aguilera-Luiz MM, Vidal JLM, Romero-González R, Frenich AG. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008;1205(1-2):10-6. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.066>
59. Feng MX, Wang GN, Yang K, Liu HZ, Wang JP. Molecularly imprinted polymer-high performance liquid chromatography for the determination of tetracycline drugs in animal derived foods. *Food Control*. 2016;69:171-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.050>
60. Xu JJ, An M, Yang R, Tan Z, Hao J, Cao J, et al. Determination of tetracycline antibiotic residues in honey and milk by miniaturized solid phase extraction using chitosa-modified graphitized multiwalled carbon nanotubes. *J Agric Food Chem*. 2016;64(12):2647-54. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00748>
61. Li W, Shen H, Hong Y, Zhang Y, Yuan F, Zhang F. Simultaneous determination of 22 cephalosporins drug residues in pork muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2016;1022:298-307. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.026>



62. Huang Z, Pan X-D, Huang B-f, Xu J-J, Wang M-L, Ren Y-P. Determination of 15 β -lactam antibiotics in pork muscle by matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD) and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Control*. 2016;66:145-50. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.037>
63. Song X, Zhou T, Liu Q, Zhang M, Meng C, Li J et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*. 2016;208:169-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.070>
64. Jank L, Martins MT, Arsand JB, Campos Motta TM, Hoff RB, Barreto F et al. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS). *Talanta*. 2015;144:686-95. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.078>
65. Annunziata L, Visciano P, Stramenga A, Colagrande MN, Campana G, Scortichini G et al. Development and validation of a method for the determination of quinolones in muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods*. 2016;9(8):1-13. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0407-8>
66. Dorival-García N, Junza A, Zafra-Gómez A, Barrón D, Navalón A. Simultaneous determination of quinolone and β -lactam residues in raw cow milk samples using ultrasound-assisted extraction and dispersive-SPE prior to UHPLC-MS/MS analysis. *Food Control*. 2016;60:382-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.008>
67. Liu H-Y, Lin S-L, Fuh M-R. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk and honey using modified QuEChERS extraction coupled with polymeric monolith-based capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2016;150:233-9. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.045>
68. Barreto F, Ribeiro C, Barcellos Hoff R, Dalla Costa T. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2016;1449:48-53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.024>
69. Zhang Y, Qiao H, Chen C, Wang Z, Xia X. Determination of nitrofurans metabolites residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*. 2016;192:612-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.035>
70. Alkan F, Kotan A, Ozdemir N. Development and validation of confirmatory method for analysis of nitrofurans metabolites in milk, honey, poultry meat and fish by liquid chromatography-mass spectrometry. *Mac Vet Rev*. 2016;39(1):15. <https://doi.org/10.1515/macvetrev-2015-0060>
71. Kim D, Kim B, Hyung S-W, Lee CH, Kim J. An optimized method for the accurate determination of nitrofurans in chicken meat using isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry. *J Food Composit Anal*. 2015;40:24-31. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.005>

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj), número de proceso E-26/201.185/2014. C.A. Conte-Junior agradece el apoyo del Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número de proceso 311422/2016-0.

Conflicto de Interese

Los autores informan que no existe conflicto de interes con pares e instituciones, políticos ó financieros para este estudio.



Esta publicación está bajo la licencia Creative Commons Asignación 3.0 no adaptada. Para ver una copia de esta licencia, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.