



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Bruno Filipe Brites Fernandes Moreira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*Limulus Amebocyte Lysate*: as suas aplicações na biomedicina” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Leite e Silva, da Dra. Paula Marques e da Professora Doutora Carla Varela apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Bruno Filipe Brites Fernandes Moreira

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*Limulus Amebocyte Lysate*: as suas aplicações na biomedicina“ referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Ana Leite e Silva, da Dra. Paula Marques e da Professora Doutora Carla Varela apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2019



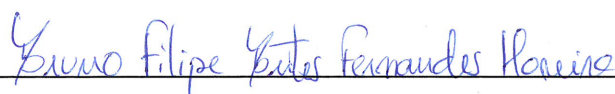
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Declaração de Honra

Eu, Bruno Filipe Brites Fernandes Moreira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2014232089, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*Limulus Amebocyte Lysate*: as suas aplicações na biomedicina” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 5 de setembro de 2019.



(Bruno Filipe Brites Fernandes Moreira)

Agradecimentos

*A Coimbra, pelo que representa para mim,
Às madrugadas no Penedo.*

*A Deus por me dar sabedoria,
À minha família, em especial os meus pais, porque sem eles não seria possível,
À tertúlia, por estes cinco anos de amizade que se prolongarão,
Ao Sara, à Xana, ao Filipe, à Carla, ao Encolhe, à Juliana, à Parreira e à Patrícia, por serem
uma segunda família.*

*Ao Kevin, por ensinar a viver Coimbra.
À Maria, a minha grande companheira de estágio.*

*À Professora Doutora Carla Varela, pelo seu auxílio e orientação.
À equipa dos Serviços Farmacêuticos do Hospital de Braga, e
a toda a equipa da Farmácia Coimbra.*

Índice

CAPÍTULO I	7
1 Farmácia Coimbra	10
2 Análise SWOT	10
2.1 Pontos Fortes	10
2.1.1 Localização, Instalações e Horário	10
2.1.2 Segmentação do estágio por períodos	11
2.1.3 Utilização do <i>software Sifarma 2000</i> [®]	11
2.1.4 Serviços farmacêuticos	12
2.1.5 Sistema de armazenamento e aprovisionamento <i>robot</i>	13
2.1.6 Utentes fidelizados	13
2.1.7 Formação contínua	13
2.2 Pontos Fracos	14
2.2.1 Preparação de manipulados	14
2.2.2 Medicamentos para uso animal	14
2.2.3 Elevada afluência de utentes	14
2.3 Oportunidades	15
2.3.1 Plano curricular do MICF	15
2.4 Ameaças	15
2.4.1 Desmaterialização de prescrições médicas	15
2.4.2 Rutura de <i>stocks</i>	15
2.4.3 Alterações de preço dos MSRM	16
2.4.4 Alterações do preço nos artigos de saúde e bem-estar e dos MNSRM	16
3 Referências Bibliográficas	18
CAPÍTULO 2	19
1 Hospital de Braga	22
2 Análise SWOT	22
2.1 Pontos Fortes	22
2.1.1 Passagem por todas as áreas dos SF	22
2.1.2 Inventário geral das existências dos SF	23
2.1.3 Possibilidade de experimentar a manipulação de medicamentos estéreis	23
2.1.4 Organização dos SF e filosofia <i>kaizen</i>	23
2.1.5 Participação em visitas nos ensaios clínicos	24

2.1.6	Colaboração no desenvolvimento de uma apresentação sobre o derrame de fármacos citotóxicos	25
2.2	Pontos Fracos	25
2.2.1	Reduzida duração do estágio	25
2.3	Oportunidades	26
2.3.1	Plano curricular do MICF	26
2.3.2	Informar o doente de ambulatório do preço do tratamento	26
2.4	Ameaças	27
2.4.1	Fim da parceria público-privada	27
2.4.2	Plano curricular do MICF	27
3	Referências Bibliográficas	30
CAPÍTULO 3		34
1	Introdução	38
2	Endotoxinas	39
3	Caranguejo-ferradura (Família Limulidae)	40
4	Amebócitos	41
4.1	Preparação do lisado	41
4.2	Morfologia do amebócito	41
4.3	Atividade coagulante - Mecanismo de coagulação	43
4.3.1	Ativação da cascata de coagulação dependente do LPS	44
4.3.1.1	Fator C	45
4.3.1.2	Fator B	46
4.3.2	Ativação da cascata de coagulação dependente de (1,3)- β -D-glucanos	46
4.3.2.1	Fator G	46
4.3.3	Enzima pró-coagulante	47
4.3.4	Coagulogénio	47
4.4	Regulação do mecanismo de coagulação	48
5	Ensaio LAL	49
5.1	Preparação da solução a testar	49
5.1.1	Método de formação de coágulo	50
5.1.2	Métodos fotométricos quantitativos	50
5.1.2.1	Métodos cromogénicos	50
5.1.2.2	Métodos turbidimétricos	51
5.1.3	Métodos eletroquímicos	51

6	Sensibilidade e interferências	52
6.1	<i>Low endotoxin recovery</i>	53
6.2	Nanomateriais	54
6.2.1	<i>Low endotoxin recovery</i> em nanopartículas	54
6.2.2	Coagulação mediada por nanotubos de carbono	55
6.3	Reatividade cruzada com outros compostos	55
7	Perspetivas para o futuro do LAL	55
7.1	Teste de Ativação de Monócitos (MAT)	56
7.2	Ensaio Fator C recombinante	57
8	Conclusão	60
9	Referências Bibliográficas	61
10	Anexo	68

CAPÍTULO I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária Farmácia Coimbra

Sob orientação da Dra. Ana Leite e Silva

Siglas e Acrónimos

FC - Farmácia Coimbra

FEFO - *First-Expired-First-Out*

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

IRS - Imposto sobre o Rendimento de Pessoas Singulares

IVA - Imposto de Valor Acrescentado

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM - Medicamento Sujeito a Receita Médica

PA - Pressão Arterial

PIC - Preço Inscrito na Cartonagem

PVP - Preço de Venda ao Público

SNS - Sistema Nacional de Saúde

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

UC - Unidade Curricular

Introdução

A realização deste relatório assenta no estágio realizado em farmácia comunitária no âmbito da unidade curricular (UC) intitulada Estágio Curricular, no 2º semestre do 5º ano do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Através deste estágio, o estudante tem a oportunidade de estabelecer um elo entre os conhecimentos técnico-científicos apreendidos durante os cinco anos de formação do MICF e a realidade profissional no setor farmacêutico mediante a sua integração em equipas multidisciplinares, no contexto de uma farmácia comunitária. Assim, no período compreendido entre 8 de janeiro e 1 de maio, iniciou-se o estágio curricular na Farmácia Coimbra (FC) sob orientação da Dra. Ana Leite e Silva.

O objetivo deste relatório é, recorrendo à metodologia de análise *SWOT*, traçar um perfil do estágio no que concerne aos seus pontos fortes (*Strengths*), aos seus pontos fracos (*Weaknesses*) - atributos inerentes ao objeto de análise - às oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) focando no meio onde o objeto se insere. Adicionalmente, integra-se uma descrição da farmácia para melhor enquadrar o estágio.

I Farmácia Coimbra

A FC encontra-se inserida numa superfície comercial, o *Coimbrashopping*, numa zona de elevada densidade populacional e na proximidade da unidade de saúde familiar Norton Matos. Sendo estas as características do meio envolvente, verifica-se uma maior afluência de utentes numa farmácia que funciona em regime de horário alargado.

Para que a farmácia tenha capacidade de responder a todos os pedidos dos utentes, é feito um esforço no sentido de alargar as opções disponíveis ao nível do número de laboratórios de genéricos para cada entidade química impelindo a que o volume de encomendas seja elevado. Atendendo a estas características, o estagiário encontra um ambiente mais laborioso, especialmente no que concerne ao atendimento e às suas funções no *backoffice*, nomeadamente, na receção de encomendas. No entanto, este fator é também diferenciador pois capacita os estagiários a exercerem os seus deveres atendendo aos diversos tipos de utentes proporcionando um ensino expandido.

2 Análise SWOT

2.1 Pontos Fortes

2.1.1 Localização, Instalações e Horário

A localização privilegiada da FC, nas proximidades de uma unidade de saúde familiar e inserida numa zona de elevada densidade populacional, incrementa a afluência de utentes. Adicionalmente, estando inserida numa grande superfície comercial, beneficia da conveniência de ver inserido num único espaço diferentes ofertas de serviços permitindo ao utente que, numa única deslocação, supra diferentes necessidades quer de produtos quer de serviços.

No ano de 2011 alocou-se no *Coimbrashopping*, para que se pudesse apresentar como uma farmácia moderna e ampla onde seria possível fazer uma melhor organização das existências direcionada para o utente. Conta com as seguintes áreas acessíveis ao utente: dermofarmácia e dermocosmética, produtos capilares, artigos de puericultura, artigos de bem-estar e nutrição, cuidados orais e cuidados podológicos; e, localizados na retaguarda dos balcões, os medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). Esta segmentação do espaço de atendimento ajuda a que, durante o atendimento, o estagiário consiga orientar o apoio ao utente de forma mais convicta pois todos os artigos referentes a determinada indicação ou linha se encontram organizados no mesmo local. Por alinhamento da farmácia com a política horária da superfície comercial, é disponibilizado ao utente um funcionamento em regime de horário alargado nos dias úteis e funcionamento durante o fim de semana e feriados. Por esta particularidade, o estagiário poderá contactar com diferentes públicos com

necessidades e preocupações distintas. Ademais, no período de fim de semana o utente está mais predisposto a um atendimento mais personalizado permitindo que o aluno possa desenvolver e aperfeiçoar a sua capacidade de efetuar venda cruzada.

2.1.2 Segmentação do estágio por períodos

O estágio foi dividido em dois períodos distintos, um primeiro período onde foi possível contactar com as atividades de *backoffice* e, num segundo momento, o contato com o utente no atendimento. Este desdobramento do estágio permite ao estagiário ter um contato prévio com os produtos comercializados, bem como garantir a criação de bases e noções necessárias à realização das atividades subsequentes.

As atividades de *backoffice* podem ser circunscritas a todo o circuito da encomenda. Esta tem início no envio de uma lista ao armazém na qual estão inscritos todos os produtos em falta ou que irão ser comercializados pela primeira vez. Assim que o armazenista faz a entrega na farmácia, procede-se a um trabalho de confirmação e contagem de todos os artigos requeridos para que possam ser registados como entradas no *stock* da farmácia. Paralelamente ao trabalho de contagem e confirmação, é feita a separação de artigos para consecutiva arrumação ou devolução. No caso de discrepâncias na encomenda, é gerada uma nota de devolução do(s) artigo(s) que é assinada e datada para posterior envio ao armazenista. Na etapa seguinte é iniciado o trabalho de arrumação, sendo este de fundamental importância para o estagiário na medida em que pode se familiarizar com a disposição e organização da farmácia para que, no momento de atendimento, possa reduzir o tempo de espera dos atendimentos bem como transparecer maior confiança.

Após a familiarização com todos os procedimentos de *backoffice* é iniciada a segunda etapa do estágio, o atendimento. Preliminarmente, a observação de atendimentos realizados pelos elementos da equipa técnica é crucial. É importante apreender, sobretudo, como é feita a abordagem ao utente, saber questionar da forma mais adequada, como proceder mediante determinado contexto, bem como ter a capacidade de articular todo o conjunto de forma simultânea. Num momento posterior, e, tendo adquirido este conhecimento, o estagiário poderá iniciar o atendimento de forma mais independente contando sempre com o apoio da equipa técnica na extinção de dúvidas ou inseguranças aquando o auxílio ao utente.

2.1.3 Utilização do *software Sifarma 2000*[®]

Na FC é utilizado o *software Sifarma 2000*[®] desenvolvido especificamente para gestão das atividades de farmácia comunitária e prestação de cuidados ao utente. Destacam-se as

seguintes funcionalidades: disponibilização de informação científica acerca das entidades químicas desde a sua indicação terapêutica, passando pela sua posologia, as suas contraindicações, as interações medicamentosas e as reações adversas, atividades relacionadas com a gestão de encomendas – receção, devolução de produtos, monitorização de prazos de validade, rotulagem de produtos sem preço inscrito na cartonagem (PIC) – e gestão financeira da farmácia. A fim de garantir as mais atualizadas informações técnicas e científicas dos fármacos, o programa é alvo de constantes *updates* e revisões.

Ora, a utilização deste *software* é uma mais-valia no percurso do estagiário pois apresenta-se de fulcral importância nas atividades de *backoffice*, permitindo reunir num único local todos os comandos de gestão e logística, bem como um importante instrumento científico no atendimento ao utente uma vez que permite oferecer um conjunto de informações relevantes no ato da dispensa do medicamento.

2.1.4 Serviços farmacêuticos

O regime jurídico da farmácia comunitária, inscrito no Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de agosto, legitima as farmácias para prestarem serviços farmacêuticos com vista a promoção da saúde e bem-estar da população. Através da Portaria n.º 1429/2007, de 2 de novembro, e subsequente alteração pela Portaria n.º 97/2018, de 9 de abril, estão definidos os serviços que podem ser prestados aos utentes, concernindo à atividade farmacêutica, a saber apoio domiciliário, administração de primeiros socorros, administração de medicamentos, utilização de meios auxiliares de diagnóstico e terapêutica, administração de vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação, programas de cuidados farmacêuticos, consultas de nutrição, programas de adesão à terapêutica e reconciliação, realização de testes rápidos para rastreio de infeções, serviços simples de enfermagem e cuidados de nível I na prevenção e tratamento do pé diabético.

A FC disponibiliza aos seus utentes a administração de injetáveis, avaliação de parâmetros como a glicémia, a pressão arterial (PA) e o valor de colesterol total e, quinzenalmente, consultas de nutrição com uma nutricionista. Por impedimento de administração de injetáveis e vacinas por pessoas sem a devida formação, é interdito ao estagiário este tipo de atividades podendo, no entanto, executar outras funções, particularmente a determinação dos parâmetros de glicémia, PA e de colesterol total. Nessa medida, foi de elevada utilidade a oportunidade de contato com os utentes para o esclarecimento de dúvidas relativas à terapêutica instituída e efetuar um trabalho de promoção

da saúde quer pela mudança de estilos de vida quer pela reiteração da necessidade de cumprir os esquemas posológicos prescritos pelo médico.

2.1.5 Sistema de armazenamento e aprovisionamento *robot*

A FC conta com um sistema de armazenamento *robot* para grande parte dos seus medicamentos, particularmente os MSRM, embora também se encontrem nele armazenados alguns MNSRM de maior rotatividade. A utilização deste aparelho é de extrema importância no armazenamento das existências, pois permite uma organização e cedência seguindo o modelo de *First-Expired-First-Out* (FEFO), ou seja, há uma priorização da cedência de artigos com validade mais curta viabilizando uma melhor gestão das existências. Esta mais-valia, de forma conjunta, permite que a cedência se faça conforme o princípio de FEFO e que ocorra uma diminuição drástica dos erros associados à errada identificação e dispensa de produtos, possibilitando um atendimento mais rápido e seguro, que de outra forma, poderia estar dificultado em indivíduos sem experiência profissional, como é o caso do estagiário.

2.1.6 Utentes fidelizados

A FC dispõe de um elevado número de utentes fidelizados e registados nas fichas de cliente que frequentam a farmácia várias vezes por mês. Neste contexto, o trabalho de identificação dos laboratórios pode ser conseguido muito mais rapidamente sendo possível aceder ao registo medicamentoso dispensado, anteriormente, ao utente.

2.1.7 Formação contínua

Sendo exigido ao farmacêutico competências de elevado nível técnico e de um competente aconselhamento, a FC assegura aos seus profissionais uma constante atualização de conhecimentos científicos e pedagógicos relativos às patologias e ao seu tratamento. Se por um lado é explícito que estas ofertas formativas têm como principal objetivo a venda de uma marca e os seus produtos, é inegável que estas formações aprimoram e orientam o aconselhamento no momento de atendimento.

Adicionalmente a estas formações, a FC possui uma coleção de materiais de consulta como panfletos, revistas e catálogos para consulta periódica a fim de mitigar qualquer dúvida aquando o atendimento. Para o aluno em formação, proporcionam uma fonte de conhecimento adicional, disponível sem constrangimentos, que complementam os ensinamentos transmitidos pelos restantes elementos da equipa técnica.

2.2 Pontos Fracos

2.2.1 Preparação de manipulados

Uma das atividades contempladas pelo Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto, passa pela preparação de fórmulas magistrais, vulgarmente designadas como manipulados. Durante o período de estágio não foi possível proceder à formulação de manipulados pois, sendo a FC integrante de um grupo de farmácias, dispõe de instalações bem equipadas localizadas numa farmácia na cidade do Porto. Todas as prescrições de manipulados entregues na FC são enviadas para a farmácia no Porto onde são preparadas. Por este motivo, não foi possível adquirir as competências técnicas associadas a estas preparações.

2.2.2 Medicamentos para uso animal

Estando a FC inserida numa zona habitacional e sendo crescente o número de famílias e habitações com animais de estimação, existe uma reduzida oferta de medicamentos veterinários e um deficitário aconselhamento especializado. Esta debilidade passa, não só, pelo deficiente plano de estudos do MICEF no que concerne a cuidados animais, como também pela inexistência de formações relativas a medicamentos para uso animal durante todo o período de estágio. Apesar desta falha, foi possível apreender alguns conhecimentos relativos a artigos animais, particularmente, os de eliminação de parasitas internos e externos.

2.2.3 Elevada afluência de utentes

Foi supramencionado que o elevado número de utentes da FC se demonstrou como uma vantagem deste estágio pelas oportunidades de colocar em prática os ensinamentos do MICEF e pelo diversificado leque de utentes, contudo o atendimento de clientes não habituais manifesta o aparecimento de reações negativas aquando, por exemplo, a negação da dispensa de alguns artigos, como é o caso dos MSRM por utentes que não apresentem prescrição. A solução destas situações por parte de alguém tão inexperiente como o estagiário é de difícil resolução especialmente quando ocorre insistência por parte do utente. Ademais, numa tentativa de escoar o número elevado de utentes, o aprendente encontra-se impossibilitado de colocar em prática os conhecimentos de acompanhamento de forma a minorar os tempos de espera.

2.3 Oportunidades

2.3.1 Plano curricular do MIFC

Durante todo o período de estágio foi perceptível que os conhecimentos apreendidos ao longo de cinco anos de MIFC foram relevantes e adequados ao objetivo primordial de um farmacêutico, a prestação de cuidados de saúde de qualidade. Não obstante, existe um conjunto de formações mais específicas que melhorariam o ato de aconselhamento e dispensa, nomeadamente elucidações fiscais relativas à dispensa de medicamentos, a saber, regimes de Imposto de Valor Acrescentado (IVA), deduções no Imposto sobre o Rendimento de Pessoas Singulares (IRS) e os tipos de fatura. Adicionalmente, seria de elevada utilidade uma aprendizagem dos diferentes regimes de comparticipação, bem como dos planos de saúde existentes.

2.4 Ameaças

2.4.1 Desmaterialização de prescrições médicas

A partir de 1 de abril de 2016, cumprindo o Despacho n.º 2935-B/2016 do Ministério da Saúde, todas as instituições pertencentes ao Serviço Nacional de Saúde (SNS) estão obrigadas à prescrição exclusiva através de receita eletrónica desmaterializada. Esta obrigatoriedade suscita alguns inconvenientes impedindo os utentes de acompanharem a dispensa dos medicamentos, de atualizarem a lista de medicamentos já dispensados e de se inteirarem dos prazos de validade da prescrição. Por outro lado, existe uma inaptidão dos utentes mais idosos em se orientarem com esta nova forma de prescrição sendo comum o pedido de impressão de um talão contendo as linhas de prescrição.

2.4.2 Rutura de stocks

Como já mencionado, a FC preza pela preferência dos utentes no que concerne à escolha do laboratório, sendo obrigada a disponibilizar uma grande variedade de marcas e laboratórios. Tal facto leva a que seja mais difícil ter todos os produtos em *stock* em qualquer momento.

Durante o período de estágio foram constantes a ruturas de algumas entidades químicas na FC. Embora a situação não fosse restrita a esta farmácia, era percebida como tal pelos clientes habituais que, acostumados a dispensar as prescrições na FC, questionavam se a farmácia de encontrava em situação de insolvência. Perante as inúmeras faltas de medicamentos ou de alguns laboratórios em específico, a tarefa de apresentar soluções ao utente foi dificultada não só pelo desconhecimento geral acerca da equivalência do princípio

ativo entre os laboratórios de marca e laboratórios de genéricos, mesmo após a explicação da equipa técnica, como pela desconfiança face às soluções encontradas. Para estes utentes, as únicas respostas que poderiam ser dadas passavam pela indicação de procura do medicamento numa outra farmácia ou pela espera de envio das entidades químicas à farmácia.

2.4.3 Alterações de preço dos MSRM

A variação do preço dos MSRM manifestou, em alguns utentes, uma ameaça à relação de confiança entre o utente e o profissional de saúde devido à insciência de que os preços praticados estão sob responsabilidade da farmácia. Tal associação era, por vezes, de difícil dissociação na medida em que era entendida como uma tentativa de aumento das margens de lucro da farmácia.

2.4.4 Alterações do preço nos artigos de saúde e bem-estar e dos MNSRM

Sendo a FC parte integrante de um grupo de farmácias, a decisão de seleção do preço de venda ao público (PVP) está incumbida ao departamento de compras do grupo assim, durante o período de estágio, foram sucessivas as alterações de PVP dos produtos sem PIC. Tais mudanças, junto de utentes habituais, geraram alguma desconfiança e suspeição sendo que estes estão mais sensibilizados para os valores comumente praticados.

Conclusão

A passagem pela FC mostrou-se essencial para solidificar e contextualizar os conhecimentos teóricos apreendidos na formação do MICF, sendo uma etapa necessária à formação de futuros profissionais de saúde. Não só é possível aplicar a instrução de cinco anos de MICF como também desenvolver competências relacionadas com a prática diária, como as *soft skills* e a capacidade de adaptar o discurso ao tipo de utente.

A experiência permite percecionar o farmacêutico como sendo um profissional de saúde importante na promoção do bem-estar da população. Enquanto especialista do medicamento, deverá continuar a primar pela promoção da sua boa utilização e alcance dos objetivos e metas terapêuticas instituídas. Para tal, contribui a sua constante atualização científica, ética e legal de forma a que a prestação dos seus serviços continue a ser eficiente e centralizada no utente. Adicionalmente, é palpável a importância do farmacêutico em todos os processos e metodologias de boa gestão relacionados com a escolha de *stocks*, direção de equipas e procedimentos legais.

Devido à sua proximidade com a população, a farmácia é, comumente, o agente orientador para a procura de cuidados de saúde diferenciados no SNS. Por esta razão, é clara a necessidade de aposta neste serviço por parte das autoridades competentes, no sentido de escoar os números elevados de utentes que acorrem aos centros de saúde e urgências hospitalares procurando serviços que poderiam ser prestados nas farmácias.

3 Referências Bibliográficas

DECRETO-LEI n.º 176/2006, Diário da República, Série I n.º 167 (2006-08-30) 6297-6383.

DECRETO-LEI n.º 307/2007. Diário da República, Série I n.º 168 (2007-08-31) 6083-6091.

DESPACHO n.º 2935-B/2016, Diário da República n.º39, Série II 1º Suplemento (2016-02-25) 6072-6072.

PORTARIA n.º 1429/2007, Diário da República, Série I n.º 211 (2007-11-02) 7993-7993.

PORTARIA n.º 97/2018, Diário da República, Série I n.º69 (2018-04-09) 1556-1557.

CAPÍTULO 2

Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar Hospital de Braga

Sob orientação da Dra. Paula Marques

Siglas e Acrónimos

2CA-Braga - Centro Clínico Académico

AO - Assistente Operacional

EC - Ensaio Clínicos

GJMS - Grupo José de Mello Saúde

HB - Hospital de Braga

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

OF - Ordem dos Farmacêuticos

PDA - *Personal Digital Assistant*

SF - Serviços Farmacêuticos

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

UC - Unidade Curricular

Introdução

A realização deste relatório assenta no estágio realizado em farmácia hospitalar no âmbito da unidade curricular (UC) intitulada Estágio Curricular, no 2º semestre do 5º ano do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Através deste estágio, o estudante tem a oportunidade de estabelecer um elo entre os conhecimentos técnico-científicos apreendidos durante os cinco anos de formação do MICF e a realidade profissional no setor farmacêutico mediante a sua integração em equipas multidisciplinares, no contexto de uma farmácia hospitalar. Assim, no período compreendido entre 1 de julho e 30 de agosto, iniciou-se o estágio curricular nos Serviços Farmacêuticos (SF) do Hospital de Braga (HB) sob orientação da Dra. Paula Marques.

O objetivo deste relatório é, recorrendo à metodologia de análise *SWOT*, traçar um perfil do estágio no que concerne aos seus pontos fortes (*Strengths*), aos seus pontos fracos (*Weaknesses*) - atributos inerentes ao objeto de análise - as oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*) focando no meio onde o objeto se insere. Adicionalmente, integra-se uma descrição do hospital para melhor enquadrar o estágio.

I Hospital de Braga

O HB é um hospital integrado no Serviço Nacional de Saúde sob gestão privada a cargo do grupo José de Mello Saúde (JMS) situado na cidade de Braga. As presentes instalações abriram portas em maio de 2011 após transferência do antigo Hospital de São Marcos de forma a prestar melhores cuidados de saúde aos 1,2 milhões de utentes que serve anualmente. Apesar de se localizar na cidade Braga presta serviços aos utentes da área geodemográfica do distrito de Braga e de Viana de Castelo sendo por isso um hospital de grande dimensão. A classificação a nível de Excelência Clínica no Sistema Nacional de Avaliação em Saúde atribuída desde 2014 leva a que o HB seja considerado o melhor hospital do país. (Hospital de Braga, 2019).

Nas suas instalações concilia unidades de assistência médica, ensino universitário e investigação. Relativamente a números e estatísticas, o HB conta com 2800 colaboradores, realizando 1854 consultas e cerca de 100 cirurgias por dia (Hospital de Braga, 2019).

2 Análise SWOT

2.1 Pontos Fortes

2.1.1 Passagem por todas as áreas dos SF

Para que o aluno aproveite da melhor forma a passagem pelos SF do HB, o estágio é dividido e estruturado em dez semanas, sendo a primeira destinada ao reconhecimento geral do funcionamento da farmácia e do hospital. Em cada semana o aluno é acompanhado pelo farmacêutico responsável por cada área de forma a fazer uma integração e contextualização das tarefas e funções incumbidas. Aquando a passagem em cada área dos SF, é dado para leitura um conjunto de documentos a saber, o manual de funcionamento e os procedimentos em vigor de cada área para que o estagiário se possa familiarizar. A divisão do estágio foi a seguinte:

- Distribuição Individual Diária em Dose Unitária;
- Intervenção farmacêutica e farmacovigilância;
- Distribuição de medicamentos a doentes em regime de Ambulatório;
- Hospital de Dia Oncológico e preparação e de formas farmacêuticas estéreis citotóxicas;
- Preparações galénicas e produção de formas farmacêuticas de nutrição parentérica e estéreis;
- Distribuição clássica de medicamentos;
- Gases medicinais e distribuição de medicamentos sujeitos a controlo especial: hemoderivados e estupefacientes;

- Receção, armazenamento e gestão das existências;
- Ensaio clínicos;
- Comissões técnicas.

2.1.2 Inventário geral das existências dos SF

Durante o estágio nos SF foi realizado o inventário de todos os produtos dos seus armazéns. Tal atividade foi de extrema importância pois permitiu ao estagiário contactar com todas as existências da farmácia, o seu local de armazenamento e poder se familiarizar com as formas farmacêuticas disponíveis para cada entidade química ou quais os tipos de dispositivos médicos presentes no seu formulário. Outro motivo pelo qual o inventário se constituiu um ponto forte para o estágio passou por permitir que o estagiário pudesse perceber quais as condições necessárias para o armazenamento de algumas das existências. Foi possível perceber quais os fármacos que necessitam de armazenamento a 2-8 °C de temperatura ou armazenamento ao abrigo da luz.

Adicionalmente esta atividade foi importante para perceber as quantidades e validade dos produtos e, desta forma, organizar e gerir da melhor forma a cedência de produtos farmacêuticos aos serviços clínicos tendo em conta as necessidades específicas de cada um.

2.1.3 Possibilidade de experimentar a manipulação de medicamentos estéreis

Durante a semana destinada à preparação galénica e produção de formas farmacêuticas de nutrição parentérica e estéreis foi dada a possibilidade de manipular. Nesta experiência foi mimetizado o processo de produção de bolsas para nutrição parentérica em neonatologia com especial atenção ao ensinamento de técnicas associadas à manipulação e correção de erros. Tal experiência é especialmente importante para o aluno pois, durante o ensino académico, não é dada a oportunidade de trabalhar com este tipo de formas farmacêuticas. Assim, apresenta-se como uma lacuna para os que pretendem ingressar numa carreira em farmácia hospitalar.

2.1.4 Organização dos SF e filosofia *kaizen*

A filosofia *kaizen* é utilizada nos SF o que promove a excelência organizacional permitindo ao estagiário se ambientar rapidamente aos procedimentos em funcionamento. A prática *kaizen* tem por base a melhoria contínua por meio de processos consistentes, trabalho de equipa e correção das causas dos problemas. Dessa forma, a prática desta filosofia no SF

do HB traduz-se pela utilização de: *kanbans*, marcadores fixos arrumados conjuntamente com os produtos farmacêuticos demarcando o ponto de encomenda, ou seja, o *stock* mínimo do produto a partir do qual é necessário proceder a nova encomenda; marcação no chão das rotas de arrumação consoante o tipo de produtos rececionados, a saber, medicamentos citotóxicos, produtos inflamáveis, medicamentos de utilização na farmácia de ambulatório, grandes volumes, medicamentos estupefacientes e hemoderivados, colírios oftálmicos e material de uso em bloco operatório; organização de todo o material necessário para a prática do ato farmacêutico e auxílio ao mesmo.

Outras medidas adotadas pelos SF do HB que garantem a qualidade do trabalho praticado por todos os seus colaboradores passam, por exemplo, pelo rigoroso controlo de todos os procedimentos praticados traduzindo-se no constante registo destes em formulários e impressos para que, em posterior consulta em caso de auditoria ou apuramento de responsabilidades, seja facilitada a identificação de problemas ou fazer um seguimento de todas as ações e/ou procedimentos; pela utilização pelos assistentes operacionais de sistema digitais como os *Personal Digital Assistant (PDA)* para a garantia de correta recolha dos produtos farmacêuticos, sendo necessário proceder à leitura do código de barras associado ao produto; pela contagem trissemanal dos produtos sujeitos a controlo adicional como os hemoderivados e estupefacientes para impedir erros de *stock*; pela contagem diária dos níveis e *dewars* de gases medicinais.

Os SF contam com um grande quadro de colaboradores contando com vinte farmacêuticos, oito técnicos superiores de diagnóstico e terapêutica, três assistentes técnicos e doze assistentes operacionais (AO). Com este quadro de recursos humanos, é possível uma clara definição de funções impedindo uma sobrecarga de tarefas, que prejudicaria a qualidade dos serviços de saúde prestados ao doente.

2.1.5 Participação em visitas nos ensaios clínicos

No HB, está sediado o Centro Clínico Académico (2CA-Braga), uma parceria sem fins lucrativos, criada em 2012 entre o HB, a Universidade do Minho, o Hospital CUF Porto e a *Eurotrials*. O 2CA-Braga dispõe de uma ala de internamento do HB, para o desenvolvimento de projetos de investigação respondendo às necessidades dos investigadores, dos promotores e participantes dos ensaios clínicos (EC). O setor de EC nos SF do HB, localiza-se numa área específica da farmácia, de acesso restrito.

Na passagem pela área dos ensaios clínicos foi possível assistir a duas visitas de representantes da indústria farmacêutica, sendo uma de visita de qualificação e uma de início.

A visita de qualificação constitui o primeiro contacto entre o promotor e a equipa do 2CA-Braga. É disponibilizado ao centro uma sinopse do protocolo com informações relativas ao medicamento experimental e ao recrutamento. Paralelamente, na visita é também dado a conhecer ao promotor as condições do centro de EC podendo os SF disponibilizar um resumo das informações importantes sobre o seu funcionamento. No que concerne à visita de início, esta é promovida pelo promotor e visa a integração de todos os intervenientes da equipa de investigação relativamente às suas funções. O promotor acorda com os SF do HB o estabelecimento do circuito do medicamento experimental, fornecendo o *dossier* da Farmácia - documento contendo informações acerca do protocolo do ensaio, brochuras, autorizações e pareceres das autoridades competentes, protocolos financeiros, formulários, certificados de libertação de lote e contatos do promotor.

A possibilidade de integrar estas visitas foi um fator diferenciador deste estágio pois permite que o estagiário assista a uma realidade com a qual não tem, habitualmente, qualquer contato, quer durante a sua formação no MICF quer durante os períodos de estágios

2.1.6 Colaboração no desenvolvimento de uma apresentação sobre o derrame de fármacos citotóxicos

Durante a estadia nos SF do HB foi pedido aos estagiários que desenvolvessem um projeto. Para tal, em colaboração com a orientadora foi desenvolvido uma apresentação com vista à formação de AO subordinada ao tema: “Como atuar em caso de derrame de medicamentos citotóxicos” (Anexo I). Na apresentação foram contempladas quais as atitudes a tomar para um correto manuseamento destes materiais garantindo a segurança do utilizador e atuando de forma a minimizar e eliminar o risco de propagação tendo em conta as formas farmacêuticas em que estes produtos se apresentavam.

2.2 Pontos Fracos

2.2.1 Reduzida duração do estágio

Como referido anteriormente, o estágio foi segmentado em dez semanas, onde o aluno tem a oportunidade de conhecer e contactar cada área dos SF do HB. Sendo que o aluno passa uma semana em cada setor, este período de tempo mostrou-se insuficiente para garantir dominar os conhecimentos necessários. Através do estágio foi possível adquirir um conhecimento mais generalizado das atividades inerentes aos SF do HB. No entanto, é sabido que este tipo de conhecimento só pode ser completamente dominado após vários anos de experiência e contato com profissionais da área.

Uma estadia mais prolongada beneficiaria o aluno pois permitiria o aperfeiçoamento de técnicas de manipulação de fármacos e dispositivos, uma maior capacitação a nível da farmacovigilância e intervenção farmacêutica bem como o acompanhamento de processos desenvolvidos ao longo de um período de maior duração como os da área dos ensaios clínicos.

2.3 Oportunidades

2.3.1 Plano curricular do MIFC

O estágio nos SF do HB foi importante para reconhecer algumas falhas da formação do MIFC. É perceptível que os conhecimentos adquiridos ao longo dos cinco anos foram relevantes e adequados à prestação de cuidados de saúde de qualidade na área da farmácia comunitária. Relativamente à formação na área da farmácia hospitalar existe uma lacuna. Segundo estatísticas da Ordem dos Farmacêuticos (OF), oito em cada cem farmacêuticos inscritos na OF exercem a sua atividade na área hospitalar (Roteiros Farmacêuticos, 2019). Esta lacuna foi particularmente notória nos conhecimentos de oncologia e as terapêuticas disponíveis, na utilização dos gases medicinais, procedimentos e legislação requeridos pelas autoridades nacionais e de dispositivos médicos.

Durante o estágio foi evidente o vácuo de formação na área da oncologia. Sugere-se um maior acompanhamento das terapêuticas oncológicas com especial atenção aos protocolos existentes para os tipos de tumores mais comuns. Adicionalmente seria relevante uma formação mais extensiva na área dos dispositivos médicos.

2.3.2 Informar o doente de ambulatório do preço do tratamento

Contrariamente aos medicamentos dispensados na farmácia comunitária, a medicação cedida aos doentes em contexto de farmácia hospitalar é entregue sem qualquer custo. Na farmácia comunitária o custo monetário imputado ao doente poderá incutir uma mentalidade de cumprimento do plano terapêutico pois, a sua não adesão à terapêutica pode ser percecionada como uma perda de dinheiro. A dispensa gratuita de medicamentos em farmácia hospitalar pode conduzir a um maior desleixo aquando a toma dos fármacos. Tal facto foi observado durante a passagem pela farmácia de ambulatório dos SF.

Através do procedimento de dispensa do fármaco ao doente é possível aceder à percentagem de adesão à terapêutica. Dessa forma, é feita a comunicação do facto ao doente para que se perceba qual a razão pela qual não faz a toma correta. Foi possível observar que os medicamentos que apresentavam menor percentagem de adesão eram os antirretrovíricos e as hormonas de crescimento, sendo os tratamentos destas duas dos mais avultados para as

administrações hospitalares. No caso dos antirretrovíricos, para além da despesa económica associada, existe o risco do desenvolvimento de resistências derivadas das constantes interrupções de tratamento (Gardner *et al.*, 2009) (World Health Organization, 2019).

De forma a ajudar a tarefa do aluno e do farmacêutico no auxílio da consciencialização do doente para uma boa adesão à terapêutica poderia ser instituída uma política de informação acerca do custo do tratamento farmacológico. Assim, pretende-se imputar consciência ao doente.

2.4 Ameaças

2.4.1 Fim da parceria público-privada

Em abril de 2019 foi dado a conhecer ao público a decisão de não renovação da parceria público-privada entre o grupo JMS e o Estado português (Despacho n.º 4040/2019, 2019). Esta parceria de dez anos termina no dia 1 de setembro com transferência total do HB para a esfera pública. Esta mudança de gestão leva a processos complexos e demorados devido às diversas alterações dos procedimentos de gestão previamente instituídos. Como tal, durante o período de estágio houve alguma incerteza quanto aos novos métodos de trabalho a adotar. Tendo os SF trabalhado durante dez anos com o modelo de gestão implementado pela JMS torna-se desafiante prever quais as possíveis alterações que esta cessação de contrato acarreta. Um dos pontos que levanta mais preocupação é a alteração dos sistemas e aplicações informáticas habitualmente utilizadas pelos SF e consequente processo de adaptação. Adicionalmente, no que toca ao sistema de gestão de compras poderá assistir a uma interrupção e adaptação a uma nova realidade.

2.4.2 Plano curricular do MICF

Previamente neste relatório foi mencionado como oportunidade a possibilidade de adequar o programa curricular do MICF contribuindo para uma melhor integração e contextualização no estágio nesta área. A exploração desta oportunidade passa pela criação de possíveis novas unidades curriculares (UC) nas quais se abordem temáticas que não são, habitualmente, tratadas. A referência do plano curricular enquanto ameaça prende-se com a necessidade de reestruturar a UC de Farmácia Hospitalar. Na abordagem proposta é dado ênfase ao funcionamento geral dos hospitais no que se refere à sua divisão em serviços, modelos organizacionais e circuitos gerais dos procedimentos internos mais relevantes, como os realizados nas farmácias de ambulatório. Adicionalmente seria de elevada importância a integração de conhecimentos relacionados com o financiamento dos hospitais no que

concerne ao Serviço Nacional de Saúde e qual os regimes de aplicação das taxas moderadoras em consultas, admissão em serviço de urgência e internamentos.

A UC apresenta uma desconexão entre a formação teórica e a experiência do quotidiano o que levava ao aparecimento de algumas dificuldades em compreender alguns procedimentos, até mesmo os mais básicos como quais os honorários imputados ao doente após internamento ou admissão em urgências.

Conclusão

A passagem pelos SF do HB mostrou-se uma experiência estimulante do ponto de vista de complemento da formação adquirida no MICEF. Após a realização deste estágio é possível concluir a importância do farmacêutico hospitalar nos cuidados de saúde mesmo que a sua função seja maioritariamente desconhecida pelos doentes e pelos utentes em geral. Assim, o farmacêutico hospitalar deverá zelar pela maior intervenção junto das equipas multidisciplinares de forma a contribuir para a correta utilização do medicamento em contexto hospitalar diminuindo os custos económicos associados ao incorreto uso ou a reações adversas.

A sua presença é também relevante nas áreas de gestão estando diretamente envolvido na aquisição, na preparação e distribuição de medicamentos pelos serviços clínicos. É o responsável pela produção de informação de natureza clínica, científica ou financeira que o sistema carece, tendo especial atenção às inovações terapêuticas. Paralelamente, apresenta um papel fundamental na realização dos ensaios clínicos sendo responsável pelo circuito do medicamento experimental.

A oportunidade de experienciar novas áreas para além da farmácia comunitária mostrou-se importante e por isso este tipo de oportunidades deverá continuar a ser dada aos estudantes para que, com maior confiança, possam definir uma carreira profissional.

3 Referências Bibliográficas

DESPACHO n.º 4040/2019, Diário da República n.º 73, Série I (2019-04-12), 11603-11604.

GARDNER, E. M., BURMAN, W. J., STEINER, J. F., ANDERSON, P. L., BANGSBERG, D. R., - **Antiretroviral Medication Adherence and The Development of Class-Specific Antiretroviral Resistance**. AIDS. Vol. 23(9) (2009) 1035-1046.

HOSPITAL DE BRAGA (2019). **O Hospital: sobre nós**. <https://www.hospitaldebraga.pt/hospital/sobre-nos> [Consultado às 15.40 do dia 25.08.2019].

ROTEIROS FARMACÊUTICOS (2019). **Distribuição por área de exercício**. <http://www.roteirosfarmaceuticos.pt/pt/indicadores/distribuicao-por-area-de-exercicio> [Consultado às 18.05 do dia 26.08.2019].

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). **Drug Resistance: HIV/AIDS**. <https://www.who.int/drugresistance/hivaids/en/> [Consultado às 22.20 do dia 25.08.2019].

Anexo

Anexo I - Apresentação com o tema “Gestão de derrames de citotóxicos”

Gestão de derrames de citotóxicos

Derrame de citotóxicos

Os derrames podem acontecer na sequência de:

- manuseamento
 - preparação/administração
- armazenamento
- transporte
- eliminação



- Os derrames podem resultar em contaminação de chãos, superfícies de trabalho, equipamentos, vestuário, bem como doentes e seus cuidadores e membros de *staff*.

Derrame de citotóxicos

Correto tratamento de um derrame

- Na ocorrência de libertação indevida de citotóxicos, deverá ser evitada contaminação adicional.
- Derrames de citotóxicos e os seus desperdícios deverão ser contidos imediatamente pois apresentam elevado risco de exposição.
- Tais situações poderão ser asseguradas por:
 - Técnica de limpeza adequada.
 - Uso de equipamento apropriado (EPI)

Kit de derramamento

- Os kits de derramamento deverão estar localizados em **todas as áreas** onde os citotóxicos são manuseados
- A sua localização deverá estar claramente sinalizada
- A instalação e manutenção destes kits é, idealmente, da responsabilidade da farmácia enquanto unidade centralizada de preparação de citotóxicos.

Atuação em caso de derrame

- Cada hospital tem os seus procedimentos de atuação em caso de derrame – Instrução de trabalho (IDT.016) – *Atuação em caso de derrame/quebra/contato acidental com citotóxicos*
- Este procedimento aplica-se a todos os serviços onde exista manipulação e administração de citotóxicos
- Os funcionários envolvidos nos procedimentos de descontaminação deverão ser alvos de formação regular.

Conteúdo do kit de derrame



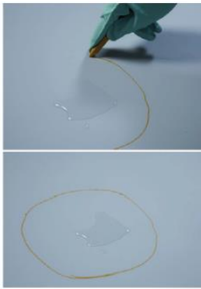
Utilização do Kit

Isolar o local

Pedir ajuda e abrir o kit de derrame



Demarcar a zona contaminada



Utilização do Kit

Uso dos EPI, de acordo com a seguinte ordem de colocação:

1. Máscara P3
2. Touca protetora
3. Primeiro par de luvas
4. Bata impermeável
5. Proteção para pés
6. Segundo par de luvas



Utilização do Kit

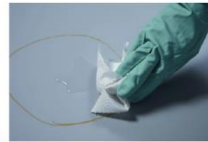
Equipamento completo



Utilização do Kit

Atuação em caso de derramamento de um fármaco líquido

- Cubra a área de derrame com o pó *Green Z* que irá formar um gel (facilita a remoção) e cubra com o pano deixando que este absorva o líquido.
- Repita se necessário
- NÃO faça gestos desnecessários (risco de aerossol)
- Colocar o pano sujo num saco plástico vermelho



Absorção do líquido



Colocar o pano no saco plástico

Utilização do Kit

Limpar do exterior para o interior!!



Utilização do Kit

Atuação em caso de derramamento de um pó liofilizado

- Cubra o pó com um pano húmido. O pó irá aderir ao pano.
- Suavemente, levante o pano e coloque-o num saco plástico
- Repita se necessário



NUNCA utilize uma vassoura para limpar o pó

Utilização do Kit



Citotóxico em pó

Remover com um pano húmido



Utilização do Kit

Remoção de fragmentos de vidro

- Em primeiro lugar, remova o pó ou líquido
- Utilize a pá e o limpa-vidros para recolher os estilhaços de vidro
- Suavemente, levante a pá e coloque no saco plástico
- Utilize um segundo pano absorvente e seque completamente a superfície
- Coloque a pá e todo o material dentro do saco plástico vermelho para resíduos contaminados

Remove os estilhaços



Utilização do Kit



Sele o saco apertando firmemente a braçadeira

Utilização do Kit

Limpe a área contaminada

1. Generosa quantidade de solução alcalina
(ex.: 0,05M ou 0,1M ou solução aquosa de hipoclorito de sódio a 5%)
2. Uma solução alcoólica
(ex.: 70% de álcool isopropílico ou etanol)

Todo o material proveniente desta operação e equipamento de proteção individual deverão ser colocados num saco plástico vermelho para resíduos contaminados de quimioterapia (Resíduos grupo IV)

CAPÍTULO 3

Limulus Amebocyte Lysate: as suas aplicações na biomedicina

Sob orientação da Professora Doutora Carla Varela

Resumo

A hemolinfa extraída de elementos da família *Limulus* é habitualmente utilizada na indústria farmacêutica no controlo de qualidade de materiais ou compostos para utilização e administração parentérica. Uma vez que estes estão em contato direto com as vias sanguíneas humanas, torna-se especialmente importante garantir a esterilidade de modo a prevenir a ocorrência de reações patogénicas, como a pirogenicidade. O lisado das células hemolinfáticas circulantes dos elementos desta família apresentam elevada sensibilidade à presença de endotoxinas bacterianas. O seu contato com essas endotoxinas culmina com a formação de um coágulo no local de infeção permitindo que a área de contaminação seja mais restrita. A partir desta reação foi desenvolvido um teste contendo o lisado do amebócito de *Limulus* (LAL) com o propósito de avaliar a presença de lipopolissacarídeos, um conhecido pirogéneo.

Palavras-chave: Caranguejo-ferradura; Lisado de amebócito de *Limulus*; endotoxina; lipopolissacarídeos; coagulação; controlo de qualidade de produtos farmacêuticos.

Abstract

Hemolymph extracted from elements of the *Limulus* family is commonly used in the pharmaceutical industry for quality assessment of materials and compounds for parenteral use and administration. Once these compounds are in direct contact with the human blood pathways, it is especially important to ensure their sterility in order to prevent the occurrence of pathogenic reactions such as pyrogenicity. The circulating hemolymphatic cell lysate of the elements of this family is highly sensitive to the presence of bacterial endotoxins. Contact with endotoxins culminates with the formation of a clot at the site of infection allowing the area of contamination to be restricted. From this reaction, a test containing *Limulus* Amoebocyte Lysate (LAL) was developed to assess the presence of lipopolysaccharides, a known pyrogen.

Keywords: Horseshoe Crab; *Limulus* amoebocyte lysate; endotoxin; lipopolysaccharides; coagulation; quality control of pharmaceutical products.

Siglas e Acrónimos

3Rs – *Refine, reduce and replace*

BET – *Bacterial endotoxin test*

BPOG – *BioPhorum Operations Group*

EGF – *Epidermal Growth Factor*

ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EU – *European Union*

FDA – *Food and Drug Administration*

FE/EF – *Farmacopeia Europea*

LAL – *Limulus Amebocyte Lysate*

LER – *Low Endotoxin Recovery*

LPS – *Lipopolissacarídeo*

MAT – *Monocyte Activation Test*

PAMP – *Pathogen-associated Molecular Patterns*

rFC – *Recombinant Factor C*

rpm – *rotações por minuto*

RPT – *Rabbit Pyrogen Test*

SCR – *Short Consensus Repeat*

TLRs – *Toll-like Receptors*

USP – *United States Pharmacopeia*

Índice de Figuras

- Figura 1** - Esquematização da membrana de bactérias gram-negativas (A). Representação de uma molécula de lipopolissacarídeos (B). (Retirado e adaptado de: Sandle, 2016). 39
- Figura 2** - Microfotografia obtida por microscopia ótica. Na figura é observável um amebócito, extraído de um caranguejo-ferradura japonês (*T. tridentatus*), com os grandes e pequenos grânulos no seu interior. (Retirado e adaptado de: Iwanaga, 2007).42
- Figura 3** - Representação esquemática dos mecanismos moleculares de ativação da cascata de coagulação na hemolinfa de indivíduos da família Limulidae, mediado pelo LPS e pelo (1,3)- β -D-glucano. (Retirado e adaptado de: Iwanaga, 2007).44
- Figura 4** - Domínios estruturais dos fatores de coagulação. As setas negras indicam os locais de clivagem para ativação do fator. (Retirado e adaptado de: Iwanaga, 2007).45
- Figura 5** - Estrutura da molécula de coagulogénio obtida por cristalografia de raio X. A violeta, a cadeia A, a azul, as folhas β numeradas de B1 a B6, a verde as espirais e voltas da molécula, no topo a vermelho, a hélice de péptido C e, por fim, a amarelo, as pontes dissulfureto. (Retirado e adaptado de: Iwanaga, 2007).48
- Figura 6** - Diagrama esquemático da configuração dos elétrodos. (Retirado e adaptado de: Miao *et al.*, 2013).52
- Figura 7** - Representação esquemática do princípio da metodologia MAT. (Retirado e adaptado de: Merck Millipore 2017).57
- Figura 8** - Ativação do rFC com hidrólise do substrato e produção de um produto fluorimétrico (A). Medição da fluorescência do produto (B). (Retirado e adaptado de: Ding e Ho, 2010).58
- Figura 9** - Princípios das diferentes metodologias de avaliação de pirogenicidade. (EP) - Farmacopeia Europeia; (IL) - Interleucina. (Retirado e adaptado de: Merck Millipore, 2017).59

I Introdução

As endotoxinas, componente maioritário da parede celular de bactérias gram-negativas, são compostas por lipopolissacarídeos (LPS) e evidenciam especial importância no ciclo destes organismos (Amro *et al.*, 2000). Os LPS desenvolvem diferentes atividades fisiopatológicas quando entram em contato com o organismo humano tais como pirogenicidade e imunogenicidade. Daqui resultam fortes reações *in vivo* com a manifestação de diversos sintomas clínicos que podem mesmo, no limite, causar a morte. Assim, a prevenção da contaminação por esta molécula assume-se como fundamental para garantir a segurança dos produtos farmacêuticos, em particular os de uso parentérico. A utilização destes produtos está condicionada a um restrito controlo de esterilidade de forma a impedir potenciais episódios de patogenicidade. Um dos métodos habitualmente utilizados para a deteção dessas toxinas assenta nas reações que ocorrem entre estas e o lisado de amebócito de *Limulus*, em inglês *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL).

O LAL resulta do extrato aquoso obtido pela lise de hemócitos/amebócitos do caranguejo-ferradura, um artrópode da família Limulidae. Estes amebócitos compõem 99 % das células presentes no fluído circulante, a hemolinfa, e contêm um leque de substâncias com função de defesa e neutralização de organismos invasores. No decurso do contato de bactérias e outros microrganismos com a hemolinfa do caranguejo-ferradura dá-se no local de contato uma reação de gelificação com conseqüente formação de um coágulo que impede a propagação da infeção (Iwanaga, 2007) (Iwanaga e Lee, 2011).

Este ano assinalam-se os 42 anos desde a aprovação do LAL pela *US Food and Drugs Administration* (FDA) enquanto teste de pesquisa de endotoxinas em materiais biológicos, fármacos e dispositivos médicos (Williams, 2007) (Pacific BioLabs, 2019). A utilização desta entidade nestes ensaios está também contemplada na Farmacopeia Europeia (European Pharmacopoeia, 2010). O ensaio baseia-se na reação de coagulação que ocorre no decurso do contato dos componentes presentes nos amebócitos do artrópode e as endotoxinas presentes na parede celular das bactérias, com conseqüente formação de um coágulo. Esta reação de gelificação é interpretada como contaminação bacteriana da preparação (Iwanaga, 2017).

Esta revisão bibliográfica tem como objetivo de apresentar os fundamentos desta técnica, bem como os diferentes tipos de ensaios, as limitações e quais as perspetivas para o futuro.

2 Endotoxinas

A parede bacteriana é dotada de rigidez estrutural devido à presença de uma camada disposta em rede de peptidoglicanos. Este material é um polímero que consiste no entrelaçado de açúcares e aminoácidos na camada externa da membrana plasmática de bactérias. Nas bactérias gram-negativas esta camada é substancialmente mais fina do que nas bactérias gram-positivas, sendo que não constitui a camada mais externa (Sandle, 2016). Na camada mais externa à membrana encontra-se o LPS, como está esquematizado na Figura 1

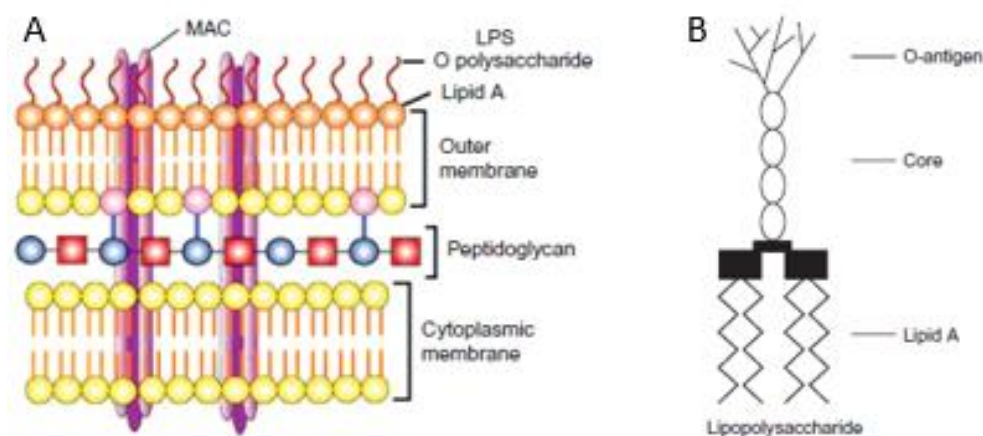


Figura 1 - Esquematização da membrana de bactérias gram-negativas (A). Representação de uma molécula de lipopolissacarídeo (B). (Retirado e adaptado de: Sandle, 2016).

A presença de LPS garante às bactérias um conjunto de vantagens evolucionárias como a adesão a superfícies, estabilização da estrutura membranar e retenção de produtos do metabolismo. O LPS é uma molécula anfílica, ou seja, apresenta um polissacarídeo hidrofílico e uma porção lipídica hidrofóbica (Sperandeo, Martorana e Polissi, 2017). O LPS apresenta três regiões distintas: o lípido A na porção mais próxima da membrana bacteriana, responsável pela atividade pirogênica (Ptatco, Kave e Tidswell, 2016), uma porção intermédia contendo polissacarídeos e o antígeno O na porção mais externa, embora esta última possa por vezes estar ausente em algumas espécies da classe de bactérias gram-negativas (Figura 1) (Sperandeo, Martorana e Polissi, 2017). Assim, o LPS é um composto pirogênico e habitualmente sinónimo de endotoxina bacteriana (Sandle, 2016). Quando ocorre a destruição de bactérias gram-negativas no corpo humano, as moléculas de LPS são libertadas ativando o sistema imunitário que, por sua vez, eleva a temperatura corporal traduzindo-se na resposta pirogênica (Sandle, 2016).

As endotoxinas são altamente estáveis ao calor e, portanto, não são destruídas nas condições de esterilização habituais. Para a sua inativação são necessárias temperaturas superiores a 180 °C. Quando presentes em soluções elas manifestam carga negativa e

demonstram capacidade de formar agregados, em micelas ou vesículas de elevada estabilidade, dependendo das características da solução (Gorbet e Sefton, 2005). A presença de endotoxinas bacterianas nos produtos farmacêuticos constitui um risco significativo nos produtos de uso parental, devido não só à sua e elevada potência tóxica, mas também por serem estáveis em condições extremas, acabando por serem facilmente encontradas em diversas etapas no fabrico desses produtos (Sandle, 2016).

3 Caranguejo-ferradura (Família Limulidae)

Caranguejo-ferradura é o nome comum dado a quatro espécies da família Limulidae (Sekiguchi, 1988). Destas, *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* e *Carcinoscorpius rotundicauda* habitam as costas do sudeste asiático enquanto *Limulus polyphemus* a costa este do subcontinente norte-americano. Apesar de ser habitualmente chamado de caranguejo, partilha algumas semelhanças com outros membros do mesmo filo como escorpiões e aranhas (The National Wildlife Federation, 2019).

Com a sua origem há 450 milhões de anos (Sadava et al., 2016), estes fósseis vivos são desprovidos de um sistema imunitário adaptativo estando inteiramente dependentes da imunidade inata (Iwanaga e Kawabata, 1998). Não obstante, são encontrados na hemolinfa uma variedade de compostos com atividade antibacteriana, antifúngica e, possivelmente, antiviral (Iwanaga e Lee, 2011). Os compostos presentes no LAL atuam por ligação e inativação das endotoxinas bacterianas e também exercem efeito barreira à entrada de novos organismos invasores e de propagação da infeção como resultado do coágulo criado no decurso da ativação pela endotoxina (John et al., 2010). Assim, a endotoxina surge não só como ponto de partida da cascata de ativação, como também de sinalização da lesão.

O ensaio de pirogenicidade em coelhos (RPT – do inglês *Rabbit Pyrogen Test*) inscrito na *United States Pharmacopoeia* (USP) em 1943, é o teste de referência na avaliação da pirogenicidade (The United States Pharmacopeia, 2011) (Franco et al., 2018). Neste teste mede-se a temperatura corporal do animal antes e após a administração de uma solução teste na corrente sanguínea do coelho (Franco et al., 2018). Apesar de ser comumente praticado e apresentar correlação com a fisiologia humana, a sua utilização acarreta alguma variabilidade inerente aos ensaios com modelos animais (John et al., 2010) (Hermanns, 2012) (Vipond, 2016). Nesse sentido, a sua utilização tem vindo a ser substituída pelo método de LAL uma vez que neste a pirogenicidade está associada à presença de endotoxinas que são facilmente detetadas por este ensaio.

A origem do LAL está associada à investigação de Jack Levin e Frederik B. Bang, na década de 60. Durante as suas investigações observaram que as infeções bacterianas em caranguejos-ferradura provocavam a coagulação da hemolinfa do animal (Iwanaga, 2007). Mais tarde, foi possível identificar que o agente responsável por essa coagulação se encontrava no interior dos amebócitos sendo que se iniciava através do contato com as endotoxinas bacterianas (Iwanaga e Lee, 2011) (Ariki *et al.*, 2004). Atendendo à sensibilidade, facilidade, especificidade e vantagem económica deste teste, o interesse pela sua utilização foi aumentando na indústria farmacêutica como potencial substituto do RPT (Franco *et al.*, 2018).

4 Amebócitos

4.1 Preparação do lisado

O corpo do caranguejo-ferradura pode ser dividido em três secções, o *prossoma* equivalente à cabeça, onde estão inseridos os órgãos vitais; o *opistossoma* ou abdómen, onde se encontram os órgãos digestivos do animal; e por fim o *télson* ou cauda (Walls, Berkson e Smith, 2002) (National Wildlife Federation, 2019). A coleta da hemolinfa inicia-se em laboratórios autorizados com a introdução de uma agulha na ligação entre o *prossoma* e o *opistossoma* e, sob condições estéreis, são recolhidos entre 50-150 mL de hemolinfa (cerca de 30 % da quantidade total) (Hermanns *et al.*, 2012) (Iwanaga, 2007), por indivíduo adulto, com devolução do animal ao meio marinho. De seguida, a hemolinfa é centrifugada por 10 minutos a 2500 rpm sendo possível observar a formação de um depósito. O sobrenadante é rejeitado e depois inicia-se a lise dos amebócitos recolhidos através da adição de água purificada à suspensão. A diferença de osmolaridade entre o amebócito e a água purificada leva a uma rápida entrada de água com consequente destruição da célula e libertação do conteúdo intracelular (Iwanaga, 2007). Por fim, a amostra é sujeita a liofilização e é embalada sob vácuo para garantir a estabilidade do produto. O liofilizado deverá ser conservado no frigorífico a 2-8 °C e deve ser evitada a exposição do lisado a temperaturas superiores a 37 °C ou a luz brilhante uma vez que pode perder as suas características (Lonza Group Ltd., 2019).

4.2 Morfologia do amebócito

A nível morfológico, o amebócito apresenta-se com uma forma oval e plana com cerca de 15 a 20 µm de comprimento (Iwanaga, 2007). Na Figura 2 é apresentada uma microfotografia de um amebócito de *Tachypleus tridentatus* (*T. tridentatus*) onde se pode observar dois tipos estruturas granulares densas na célula, distinguíveis pelo tamanho. As

estruturas negras de maior dimensão, também chamados grânulos L (do inglês (L)-*large*), com uma dimensão de 1,5 μm e os grânulos S (do inglês (S)-*small*) de diâmetro inferior a 0,6 μm (Iwanaga e Kawabata, 1998) (Iwanaga, 2007). No interior destes grânulos encontram-se substâncias implicadas no sistema imunitário, maioritariamente proteínas que, quando o amebócito é exposto ao LPS bacteriano, são responsáveis pela adesão e agregação do amebócito ao organismo invasor, e pela posterior desgranulação e formação do coágulo. Todo o processo ocorre em apenas 90 segundos, sendo importante referir que o coágulo formado é mais macio do que os coágulos formados por fibrina encontrados no ser humano (Iwanaga, 2007) (Ariki *et al.*, 2004) (Iwanaga, Kawabata e Muta, 1998).

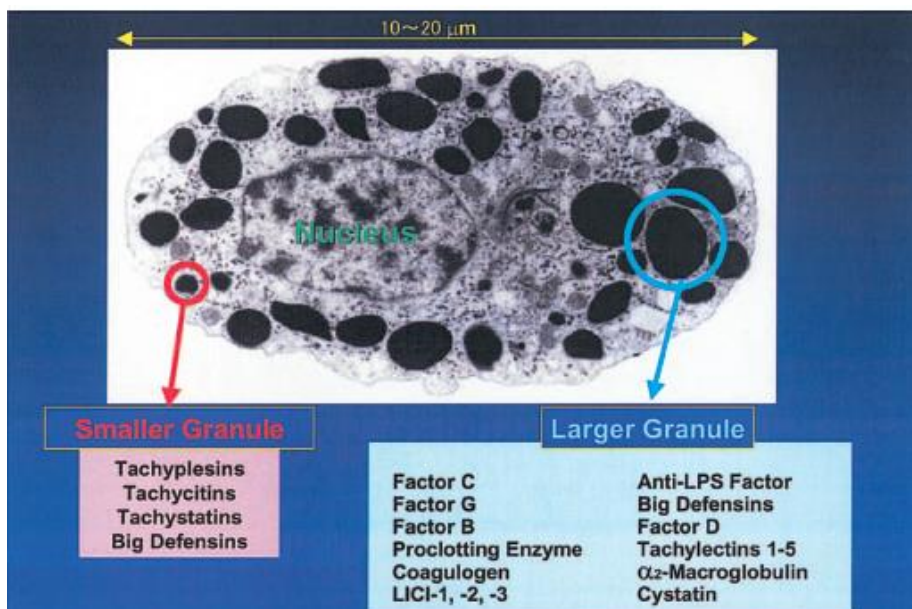


Figura 2 - Microfotografia obtida por microscopia ótica. Na figura é observável um amebócito, extraído de um caranguejo-ferradura japonês (*T. tridentatus*), com os grandes e pequenos grânulos no seu interior. (Retirado e adaptado de: Iwanaga, 2007).

Relativamente aos grânulos, não só a dimensão os distingue como também o seu conteúdo é desigual. Do extenso trabalho de Iwanaga e equipa foi possível identificar o conteúdo de cada um dos grânulos (Iwanaga *et al.*, 1992). Nos grânulos L são armazenados mais de 20 substâncias de defesa, de massas moleculares compreendidas entre 8 e 120 kDa. Entre elas fatores de coagulação, uma proteína coagulante - o coagulogénio, inibidores de proteases, lectinas e proteínas com ação antimicrobiana. Por sua vez, os grânulos S contêm uma menor variedade de compostos, com massas inferiores a 30 kDa e cuja função atribuída aos cerca de 6 péptidos é de defesa antimicrobiana. Na Tabela I (Anexo) (Iwanaga e Lee, 2005) é possível consultar os vários intervenientes proteicos identificados na hemolinfa e nos amebócitos do género *Limulus* (Iwanaga e Lee, 2011) (Iwanaga, 1992). Comparativamente ao

sangue humano, a hemolinfa do caranguejo-ferradura possui uma reduzida variedade de proteínas, sendo possível identificar três predominantes: a hemocianina (responsável pelo transporte de oxigênio) proteínas C reativas e α_2 -macroglobulinas (Iwanaga e Lee, 2005).

4.3 Atividade coagulante - Mecanismo de coagulação

Quando a endotoxina entra em contato com a hemolinfa do caranguejo, inicia-se um processo de reconhecimento com consequente ativação da cascata de coagulação. Durante essa reação, os amebócitos começam a desgranular com libertação do conteúdo dos grânulos e inicia-se a coagulação da hemolinfa (Iwanaga *et al.*, 1992). A reação desenvolve-se depois com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP- do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) como o LPS na superfície das bactérias, uma vez que não possuem imunoglobulinas como as que se encontram no Homem (Iwanaga e Lee, 2005). No ser humano o reconhecimento dos PAMP está associado a recetores na superfície celular chamados de recetores Tolls e recetores Toll semelhantes (TLRs - do inglês *Toll-Like Receptors*) que, após ativação, induzem a resposta inata e adaptativa do sistema imunitário (Medzhitov, Preston-Hurlburt e Janeway, 1997) (Ariki *et al.*, 2004). Na família Limulidae não foram identificadas proteínas específicas com capacidade de reconhecimento do LPS e envolvidas na exocitose do conteúdo granular. Todavia, estudos realizados sugerem que a exocitose é mediada por uma proteína G (Ariki *et al.*, 2004).

A Figura 3 representa o mecanismo molecular envolvido na coagulação da hemolinfa de *Limulus* (Iwanaga, 2007). O contato com o LPS ou (1,3)- β -D-glucano inicia a cascata de coagulação.

Os fatores, a pró-enzima coagulante e coagulogénio estão localizados nos grânulos L, libertados na hemolinfa aquando a ativação da cascata.

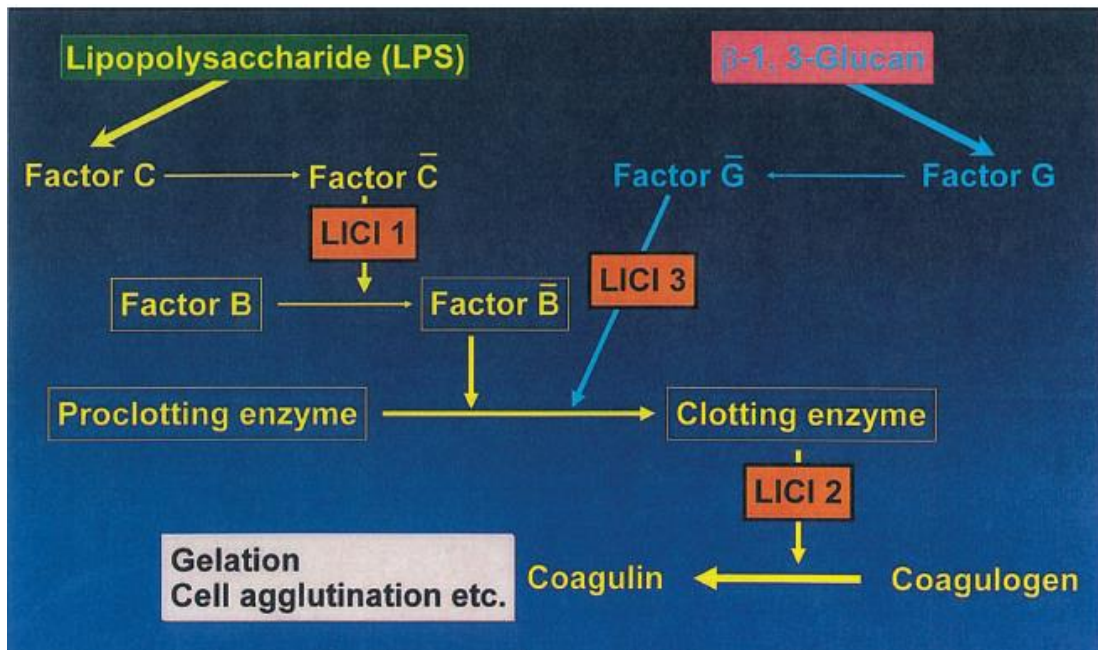


Figura 3 - Representação esquemática dos mecanismos moleculares de ativação da cascata de coagulação na hemolinfa de indivíduos da família Limulidae, mediado pelo LPS e pelo (1,3)-β-D-glucano. (Retirado e adaptado de: Iwanaga, 2007).

4.3.1 Ativação da cascata de coagulação dependente do LPS

A cascata de coagulação mediada pelo LPS envolve três tipos de proteases baseadas na serina: o fator C, o fator G e a enzima de pró-coagulação, e ainda uma proteína que induz a produção do gel, o coagulogénio (Iwanaga, 2007). A Figura 4 apresenta os domínios estruturais dos fatores coagulação. Quase todos os fatores são glicoproteínas típicas que variam apenas no peso molecular, com exceção do coagulogénio (Iwanaga, 2007).

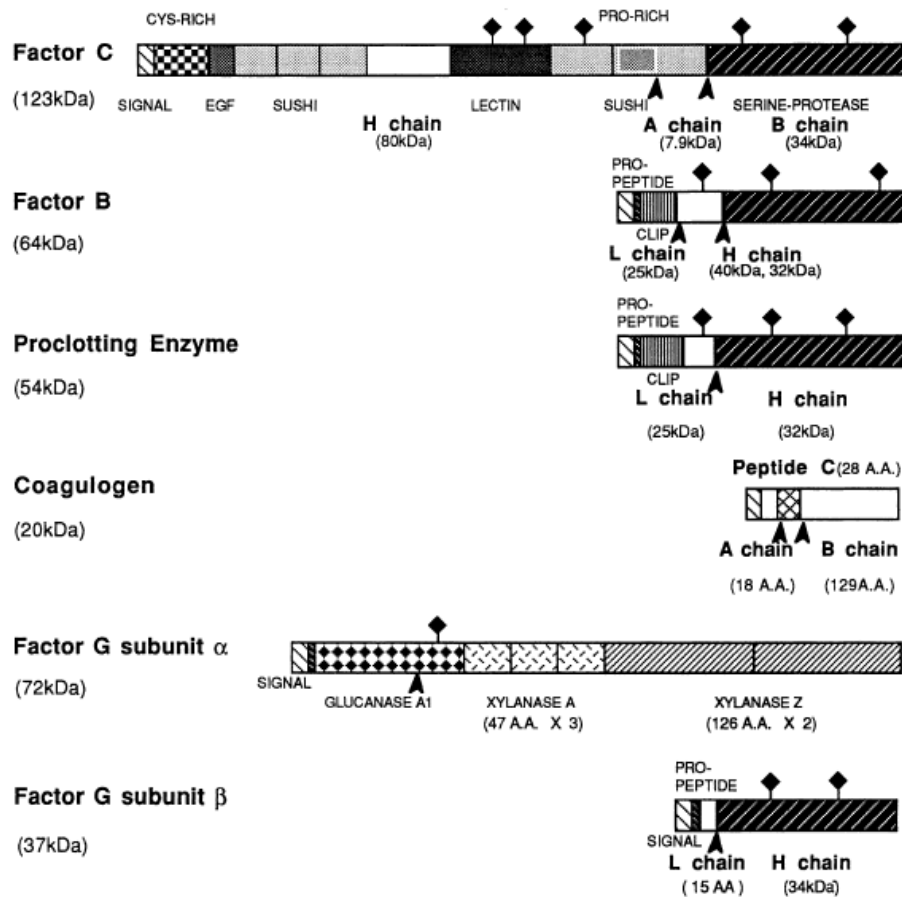


Figura 4 - Domínios estruturais dos fatores de coagulação. As setas negras indicam os locais de clivagem para ativação do fator. (Retirado e adaptado de: Iwanaga, 2007).

4.3.1.1 Fator C

Após a desgranulação do amebócito e consequente libertação do seu conteúdo na hemolinfa, a cascata de coagulação começa acionada pelo contato entre o fator ativador, fator C, e o LPS. O fator C, glicoproteína com massa molecular de 123 kDa é composto por duas cadeias: H (do inglês *heavy*) e L (do inglês *light*). O fator C apresenta 5 repetições de um conjunto de 60 aminoácidos denominados *Sushi* ou SCR (do inglês *Short Consensus Repeat*), comumente encontrado em proteínas associadas ao sistema de complemento mamífero. Na cadeia H é encontrado um domínio com semelhança ao fator de crescimento epidérmico EGF (do inglês *Epidermal Growth Factor*). Proteínas que contêm este domínio estão implicadas na coagulação sanguínea e no sistema de complemento. A partilha de semelhanças entre o fator

C e as proteínas do sistema de complemento poderá indiciar uma relação evolutiva entre estes, estando por descobrir a sua origem comum (Iwanaga *et al.*, 1992).

O LPS vai, por autocatálise, transformar o fator C na forma ativa \bar{C} que é ativa, após clivagem na ligação fenilalanina-isoleucina da cadeia L, com formação de dois novos fragmentos, B e A (Iwanaga, 2007).

4.3.1.2 Fator B

O fator B é uma glicoproteína de cadeia única de massa molecular 64 kDa e que, após ativação pelo fator \bar{C} , é convertida na sua forma ativa \bar{B} através da dupla clivagem da cadeia. Esta clivagem origina 2 cadeias, a cadeia H (32 kDa) e L (25 kDa), com libertação de um péptido de ativação (Iwanaga *et al.* 1992). Por sua vez, o fator \bar{B} converte a enzima pró-coagulante na enzima de coagulação (Iwanaga, 2007).

Em 1998, Iwanaga e equipa, descreveram as semelhanças nos domínios estruturais entre o fator B e a enzima pró-coagulante (Iwanaga, Kawabata e Muta, 1998). Para além de conterem o mesmo domínio protease COOH terminal, ambos partilham um domínio denominado “clip”-like na extremidade NH₂ da cadeia L. Foi também descoberto, posteriormente, que o padrão de dobra das três pontes de dissulfureto no domínio *clip* apresenta semelhanças com o de defensinas de *Limulus*. Uma vez que a região das dobras está mais suscetível à clivagem proteolítica, estes domínios *clip* poderão ser libertados em consequência da ativação da cascata de coagulação atuando como agentes antimicrobianos. Assim, a libertação de homólogos das defensinas pelo fator B e enzima pró-coagulante, faz com que a cascata de coagulação assuma uma dupla ação contra a invasão bacteriana: antimicrobiana e coagulante (Iwanaga, Kawabata e Muta, 1998).

4.3.2 Ativação da cascata de coagulação dependente de (1,3)- β -D-glucanos

4.3.2.1 Fator G

Como já referido, não só o LPS bacteriano tem a capacidade de ativar a cascata de coagulação. Também organismos invasores com (1,3)- β -D-glucano na sua superfície são capazes disto. O (1,3)- β -D-glucano é um dos componentes maioritários da parede celular dos fungos (Douglas, 2001). Na presença de (1,3)- β -D-glucano, o fator G autocatalisa-se a fator \bar{G} que por sua vez ativa a enzima pró-coagulante que está diretamente ligada à formação do gel de coagulina (Iwanaga, 2007).

O fator G é um heterodímero composto por duas subunidades, α e β , ligadas por uma ligação covalente (Muta *et al.*, 1995). Uma vez que elas têm uma diferente origem genética, a

transcrição e tradução do gene ocorre de forma independente com posterior reunião nos amebócitos. Apesar de envolver elementos diferentes dos encontrados na cascata mediada pelo LPS, observa-se ainda assim uma homologia entre a subunidade β e o fator B (40,5 % de conteúdo proteico) e a enzima pró-coagulante (37,7 %). Esta correlação revela uma origem evolutiva comum entre os três. Por sua vez, a subunidade α não apresenta homologia significativa com elementos da coagulação dependente de LPS (Iwanaga, 2007).

Na ativação do fator G estão implicadas duas clivagens de ligações, uma em cada subunidade, Arg15-Ile16 em β e Arg150-Glu151 em α . Seria expectável que as proteases endógenas, como tripsinas do caranguejo-ferradura, pudessem ativar este fator induzindo a coagulação. No entanto, isto não parece ocorrer. Iwanaga insinua que a interação do (1,3)- β -D-glucano com a subunidade α induz uma alteração conformacional o que resulta na ativação da subunidade β (Iwanaga, 2007). Por fim, com ambos os locais de ativação livres as subunidades ficam suscetíveis de sofrer autocatálise tornando-se na sua forma ativa (Muta e Iwanaga, 1996).

4.3.3 Enzima pró-coagulante

A enzima pró-coagulante é ativada tanto pelo fator \bar{B} como pelo fator \bar{G} . É uma glicoproteína de cadeia única com uma massa molecular de 54 kDa. Para que ocorra a formação do coágulo é necessário que a forma ativa da enzima pró-coagulante, a enzima coagulante, clive 2 ligações no coagulogénio levando à gelificação da coagulina. Assim, o par enzima pró-coagulante/enzima coagulante aparenta ser o equivalente ao sistema protrombina/ α -trombina encontrada nos vertebrados (Iwanaga *et al.*, 1992).

4.3.4 Coagulogénio

No último passo da cascata de coagulação, ocorre a conversão do coagulogénio, um péptido solúvel semelhante ao fibrinogénio nos artrópodes, na coagulina. Esta conversão ocorre mediante a clivagem da sua cadeia única em dois locais, Arg18-Thr19 e Arg46-Gly47 (Figura 4). Desta clivagem resulta uma sequência de 28 aminoácidos denominada péptido C que leva à formação do monómero de coagulina, AB, que consiste na ligação entre o terminal NH_2 da cadeia A e o terminal COOH da cadeia B, covalentemente ligados por duas pontes dissulfureto. Este monómero tem a capacidade de se autopolimerizar com formação de uma espécie de gel composto por monómeros AB polimerizados (Iwanaga, 2007).

O exato mecanismo pelo qual ocorre a polimerização é ainda desconhecido, mas análises de cristalografia de raios X poderão esclarecer um pouco este aspeto. Na Figura 5 é

apresentada a estrutura da molécula de coagulogénio onde é possível identificar a cadeia A, a cadeia B e o péptido C. A violeta, a cadeia A, a azul, as folhas β numeradas de B1 a B6, a verde as espirais e voltas da molécula, no topo a vermelho, a hélice de péptido C e, por fim, a amarelo, as pontes de dissulfureto. Como é possível ver, o péptido C protege uma porção hidrofóbica da molécula que se torna disponível após clivagem e libertação de péptido C. A interação entre os núcleos hidrofóbicos do coagulogénio poderá estar na origem da reação de polimerização (Bergner *et al.*, 1996) (Iwanaga, 2007).

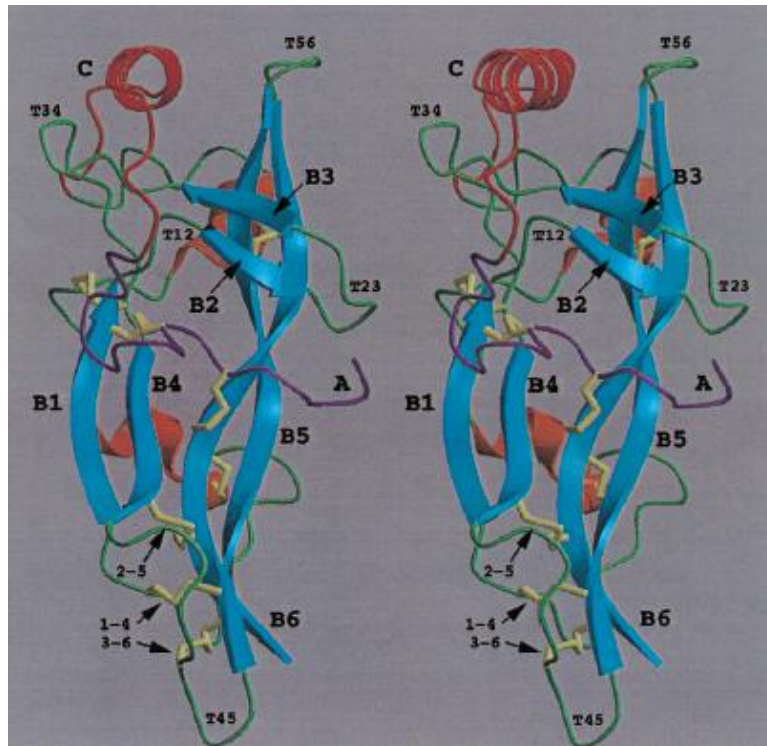


Figura 5 - Estrutura da molécula de coagulogénio obtida por cristalografia de raio X. A violeta, a cadeia A, a azul, as folhas β numeradas de B1 a B6, a verde as espirais e voltas da molécula, no topo a vermelho, a hélice de péptido C e, por fim, a amarelo, as pontes dissulfureto. (Retirado e adaptado de: Iwanaga, 2007).

4.4 Regulação do mecanismo de coagulação

Uma vez controlado o ataque pelo organismo invasor, é necessário um mecanismo que cesse atividade coagulante de forma a impedir uma extensa coagulação com difusão dos fatores de coagulação para longe do local de infeção, o que poderia resultar numa possível morte do animal. Iwanaga refere a existência de três inibidores intracelulares da coagulação em *Limulus* (LICI) (do inglês *Limulus Intracellular Coagulation Inhibitor*), LICI-1, LICI-2 e LICI-3, localizados nos grânulos L (Miura, Kawabata e Iwanaga, 1994) (Miura *et al.*, 1995) (Agarwala *et al.*, 1996).

Estas moléculas apresentam alguma homologia com os inibidores de proteases encontrados em mamíferos (Agarwala *et al.*, 1996).

Todos os LICI apresentam atividade inibitória sobre agentes da cascata de coagulação, embora com especificidade para os diversos fatores libertados. A atividade do fator \bar{C} é inibida pelo LICI-1 (Miura, Kawabata e Iwanaga, 1994), o LICI-2 exerce a sua atividade inibitória sobre o fator \bar{C} e sobre a enzima coagulante (Miura *et al.*, 1995) e, por fim, o LICI-3 apresenta grande especificidade para o fator \bar{G} (Agarwala *et al.*, 1996).

O armazenamento conjunto dos fatores e dos seus inibidores nos grânulos L garante que, aquando uma lesão e/ou infeção, todos os compostos sejam libertados na hemolinfa ocorrendo uma eficaz coagulação e posterior regulação no local da lesão (Agarwala *et al.*, 1996).

5 Ensaio LAL

A pesquisa de endotoxinas afigura-se como o principal uso do LAL na indústria farmacêutica. De forma a garantir a completa esterilidade de materiais biológicos, fármacos, implantes e outros dispositivos médicos, este é o teste referenciado na Farmacopeia Europeia (European Pharmacopoeia, 2010).

De forma a avaliar a quantidade de endotoxinas presentes nas amostras foi uniformizada uma unidade, a unidade de endotoxina (EU). Esta unidade não mede, todavia, a quantidade de endotoxina presente numa amostra, mas sim a atividade da endotoxina. A avaliação deste parâmetro é mais útil dado que a potência depende de uma grande variedade de fatores como o tamanho da cadeia do polissacarídeo, a agregação com outras endotoxinas, a solubilidade em fluídos biológicos ou a espécie bacteriana. A Farmacopeia Europeia (FE) estabelece que o limite de endotoxinas é dependente do tipo de administração, sendo que admite valores inferiores para a administração intratecal. O limite máximo de endotoxinas em preparações parentéricas, definido em função da dose, é igual ao quociente entre o limiar de dose pirogênica da endotoxina por quilograma de massa corporal (K) e dose a máxima administrada no período de 60 minutos (M) (European Pharmacopoeia, 2010).

A FE descreve dois tipos de métodos para a determinação de endotoxinas: método de formação de coágulo e métodos fotométricos.

5.1 Preparação da solução a testar

As soluções de teste são preparadas dissolvendo ou diluindo o princípio ativo, ou substâncias, utilizando água para o teste de endotoxinas bacterianas (BET) (do inglês *bacterial*

Endotoxin Test). No entanto, algumas preparações podem realizadas noutras soluções aquosas. Se necessário, mediante especificações do fabricante do LAL, ajustar o pH da solução teste, geralmente 6,0 a 8,0. O pH pode ser ajustado pelo uso de ácido, base ou um tampão adequado, conforme recomendado pelo fabricante do lisado (Lonza Group Ltd., 2019).

5.1.1 Método de formação de coágulo

O método de formação de coágulo passa pela verificação da presença ou ausência de formação de um coágulo após o contato entre a amostra e o lisado. Para a realização deste método é necessária a preparação de quatro soluções, replicadas duas vezes, a saber: solução teste (A), solução teste com adição de quantidade conhecida de endotoxina (B), água para BET com adição da mesma quantidade conhecida de endotoxina de B (C) e controlo negativo (D) composto por água para BET. As amostras são, habitualmente, incubadas a 37 ± 1 °C por um período de 60 minutos (The United States Pharmacopeia, 2011) (European Pharmacopoeia, 2010). O teste é considerado válido quando ambos os replicados da solução B e C são positivos e os da solução D são negativos. Se a sua validade for confirmada, poderá ter um dos seguintes resultados:

- Quando um resultado negativo é encontrado para as duas réplicas de solução A, a preparação a ser examinada está em conformidade com o teste.
- Quando um resultado positivo é encontrado para ambas as réplicas de solução A, a preparação a ser examinada não está de acordo com o teste.
- Quando um resultado positivo é encontrado para uma réplica da solução A e um resultado negativo é encontrado para a outra, é necessário proceder à repetição do teste.

5.1.2 Métodos fotométricos quantitativos

5.1.2.1 Métodos cromogénicos

Estes métodos baseiam-se nas reações de libertação de um grupo cromóforo a partir de um peptídeo cromogénico adicionado à amostra, normalmente o Boc-Leu-Gly-Arg-p-nitroanilida (pNa) (Tanaka e Iwanaga, 1993). Isto ocorre após reação entre as endotoxinas presentes na amostra e o lisado. Dependendo do teste, esta técnica pode ser classificada como sendo de *end-point* cromogénico ou o teste cinético-cromogénico (European Pharmacopoeia, 2010).

O teste cromogénico de *end-point* é baseado na relação quantitativa entre a concentração de endotoxina e a quantidade de cromóforo libertada no final de um período de incubação (European Pharmacopoeia, 2010).

Para a elaboração deste teste é necessário a preparação de três tipos de soluções em replicado: solução teste, solução de controlo negativo e soluções padrão sucessivamente diluídas contendo uma quantidade conhecida de endotoxina. Após a adição do lisado a todas as soluções, as misturas são incubadas por 30 minutos a 37 °C. A reação é terminada por adição de ácido acético podendo então ser lida a absorvância a 405 nm aquando da utilização do pNa como péptido cromogénico. Através da curva de calibração é possível interpolar a quantidade de endotoxina presente na amostra (Tanaka e Iwanaga, 1993). A diluição máxima válida, ou seja, a diluição máxima da solução-amostra para a qual o limiar de deteção de endotoxina é atingido, é de 1:5 (Dobrovolskaia *et al.*, 2010).

O teste cinético-cromogénico mede tanto o tempo necessário para que a mistura da reação atinja uma absorvância predeterminada como a taxa de desenvolvimento da cor. O teste é realizado na temperatura de incubação recomendado pelo fabricante do lisado (geralmente 37 ± 1 °C) (The United States Pharmacopeia, 2011) (European Pharmacopoeia, 2010).

5.1.2.2 Métodos turbidimétricos

Técnica fotométrica utilizada para medir o aumento de turbidez, ou seja, de turvação da solução. Pode ser classificada como turbidimétrica de *end-point* ou o teste cinético-turbidimétrico (European Pharmacopoeia, 2010).

O teste turbidimétrico de *end-point* é baseado na relação quantitativa entre a concentração de endotoxina e a turbidez, medida pela absorvância ou pela transmissão, da solução após mistura com o lisado, no final de um período de incubação. O teste cinético-turbidimétrico é um método para medir o tempo necessário para que a mistura entre o lisado e a solução teste alcance uma absorvância ou transmitância preestabelecida, ou a taxa de desenvolvimento de turbidez. O teste é realizado na temperatura de incubação recomendada pelo fabricante do lisado (geralmente 37 ± 1 °C) (The United States Pharmacopeia, 2011).

Os métodos turbidimétricos são mais sensíveis que os métodos cromogénicos, tendo uma diluição máxima válida de 1:1500 (Dobrovolskaia *et al.*, 2010).

5.1.3 Métodos eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos surgiram recentemente como alternativa aos mencionados anteriormente na tentativa de ultrapassar algumas das suas desvantagens. Assim, uma equipa de investigadores desenvolveu uma nova metodologia eletroquímica que não requer nenhuma alteração química dos elétrodos, com fácil sistema de deteção e a um custo

reduzido. Este novo método baseia-se na medida por amperometria do comportamento eletroquímico da formação do coágulo (Miao *et al.*, 2013).

Esta técnica assenta na utilização de um sistema eletroquímico de três eléctrodos sendo a medição da diferença de corrente entre os eléctrodos proporcional à concentração do analito na amostra. Esta metodologia já havia sido previamente utilizada para quantificar nitritos em águas de uso doméstico (Miao *et al.*, 2011). Na Figura 6 está representado o sistema com um eléctrodo de referência de Ag/AgCl, um de carbono oposto e um de trabalho (Miao *et al.*, 2013).

O ferrocianeto de potássio é usado como espécie eletroquímica passível de determinar a variação do fluxo de difusão, tendo este sido adicionado a um conjunto de soluções de endotoxina juntamente com o reagente LAL. Na presença de endotoxinas a cascata de coagulação inicia-se com formação do coágulo de coagulina. Ora, na ausência das endotoxinas, as espécies eletroquímicas, isto é, o ferrocianeto de potássio, podem interagir com os eléctrodos e gerar corrente eléctrica. No entanto, quando o coágulo está presente na solução impede a aproximação destas espécies à superfície do eléctrodo. Assim, regista-se uma diminuição da corrente eléctrica lida. Esta diminui conforme a quantidade de coágulo formado que é proporcional à quantidade de endotoxina contida na amostra. Mediante a construção de uma curva de calibração é possível relacionar a variação do fluxo de difusão com a quantidade de endotoxina presente na amostra (Miao *et al.*, 2013).

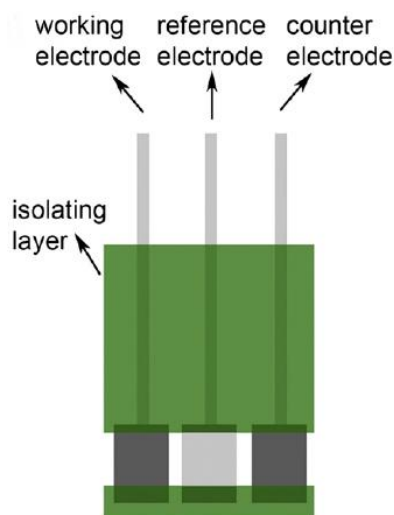


Figura 6 - Diagrama esquemático da configuração dos eléctrodos. (Retirado e adaptado de: Miao *et al.*, 2013).

6 Sensibilidade e interferências

O ensaio LAL consegue detetar quantidades pequenas de endotoxinas bacterianas. No entanto, desde 2013 que têm sido apresentados estudos que evidenciam a inabilidade do teste

LAL em apresentar resultados positivos quando se sabe que há endotoxinas presentes em solução (Wintzingerode, 2016). Por outro lado, estudos demonstram a existência de compostos, que não são endotoxinas bacterianas, que causam uma reação positiva ao LAL (Elin *et al.*, 1973).

Embora este seja um teste com elevada sensibilidade para as endotoxinas bacterianas a falta de especificidade levanta sérias questões para a detecção de endotoxinas em soluções desconhecidas (Elin *et al.*, 1973) (Jones e Grainger, 2009).

6.1 Low endotoxin recovery

Na apresentação anual da *Parenteral Drug Association* no ano de 2013, Chen e Vinther, reportaram um fenómeno que apelidaram de *Low Endotoxin Recovery* (LER), ou em português, baixa recuperação de endotoxina, observado em diversas formulações biológicas e terapêuticas (Bolden *et al.*, 2016). O LER é definido como a perda de atividade de endotoxina no ensaio LAL ao fim de algum tempo quando as amostras são contaminadas com quantidades conhecidas de endotoxinas (em inglês *spiked*) (Wintzingerode, 2016). O LER é dependente do tempo e da temperatura, pelo que não ocorre de forma imediata, mas apenas durante o armazenamento. Este fenómeno pode apresentar um risco para produtos contaminados com endotoxinas porque podem simplesmente não ser detetadas pelo LAL (Wintzingerode, 2016).

O exato mecanismo adjacente ao LER é ainda desconhecido. Porém, algumas causas prováveis já foram postuladas (Wintzingerode, 2016). Assim, tem sido sugerido que surfactantes, agentes quelantes e outras matrizes possam converter o LPS em formas menos reativas e desse modo alterar a sua atividade afetando o LAL (Reich, 2013) (Wintzingerode, 2016). Outros estudos apontam a mudança do estado de agregação das endotoxinas também como uma causa provável do LER (Tsuchiya, 2014). O LPS não apresenta atividade biológica *per se*, tal atividade parece estar associada à formação de agregados de LPS com tamanho ótimo definido (Mueller *et al.*, 2004). Assim a elevada agregação de moléculas de LPS poderá impedir o acesso do LAL à molécula de LPS com conseqüente diminuição da ativação (Tsuchiya, 2014). Outra hipótese aponta a agregação de surfactantes e solução tampão à endotoxina como origem do LER (Correa *et al.*, 2017). O LAL só apresenta resultado positivo se a endotoxina se libertar destes agregados ficando disponível para reagir com o LAL (Wintzingerode, 2016).

A ocorrência de LER no teste de LAL impede o aparecimento de resultados positivos *in vitro* em produtos *spike*, o que resulta na conclusão de inexistência de endotoxinas na amostra. No entanto, quando sujeita ao teste RPT apresenta reação pirogênica positiva. Esta

discordância entre o resultado *in vitro* e *in vivo* poderá indiciar a ocorrência de contaminações que não são detetadas resultando num risco de segurança dos produtos de uso clínico (Wintzingorde, 2016).

6.2 Nanomateriais

O desenvolvimento de nanomateriais segue um rumo intensivo com enorme utilização destes na prática clínica. Entre estes, as nanopartículas têm o seu merecido destaque mas agora também os nanotubos de carbono se demarcam com grande aplicação na biomedicina como adjuvantes imunológicos (Villa *et al.*, 2011), sistemas de entregas de fármacos (Battigelli *et al.*, 2013), sondas de diagnóstico (Bates e Kostarelos, 2013) ou como indutores de regeneração de tecidos (Ahadian *et al.*, 2017). Tendo em conta a crescente utilização destes materiais no organismo humano, torna-se imperativo avaliar a possível contaminação destes com endotoxinas e verificar até que ponto podem interferir com o LAL.

6.2.1 *Low endotoxin recovery* em nanopartículas

A grande área de superfície e reatividade, a superfície carregada positivamente e a até a própria forma de produção das nanopartículas fazem com que sejam particularmente suscetíveis à contaminação por endotoxinas (Jones e Grainger, 2009). O elevado grau de ligação das endotoxinas à superfície de nanopartículas faz com que o teste LAL não consiga identificar a presença de LPS dado que este deteta a presença de endotoxinas livres ou ligadas a compostos com elevada capacidade de as libertar. Sendo a ligação de endotoxinas a nanopartículas muito forte, ou até mesmo permanente, ocorre o efeito de *masking* com o possível aparecimento de resultados falsos negativos (Jones e Grainger, 2009).

Em 2010, um estudo efetuado em nanopartículas demonstrava a interferência de certas nanopartículas com o LAL para qualquer das metodologias usadas (Dobrovolskaia *et al.*, 2010). Este estudo avaliou diferentes formulações de nanopartículas de ouro por dois métodos do LAL, cromogénico e turbidimétrico. A comparação da percentagem de recuperação para as diferentes formulações nos dois métodos revelou que, apesar do cumprimento dos requisitos formais de aceitação para a validade do teste LAL, os resultados para a mesma formulação de nanopartículas nas duas metodologias LAL diferem consideravelmente. Portanto, nas situações em que os resultados dos dois ensaios LAL são diferentes em mais de 25 %, é requerida uma verificação adicional com técnicas que permitam a obtenção de resultados conclusivos, como por exemplo o teste RPT (Dobrovolskaia *et al.*, 2010).

6.2.2 Coagulação mediada por nanotubos de carbono

Yang e equipa verificaram que nanotubos de carbono livres de endotoxinas eram capazes de originar resultados falsos positivos nos testes de LAL, pelo método de coagulação e cromogénico de *end-point* (Yang *et al.*, 2017). Ensaio específicos demonstraram a ausência de coagulogénio e a presença de coagulina, indiciando que este foi totalmente convertido em coagulina, tendo sido formulada a hipótese de que a superfície dos nanotubos consegue, de uma forma ainda desconhecida, ativar a cascata de coagulação e assim desenvolver resultados falsos positivos (Yang *et al.*, 2017).

6.3 Reatividade cruzada com outros compostos

Estão registadas na literatura vários casos de falsos positivos para o ensaio LAL, sendo por isso importante atender à sua especificidade. Em 1989, uma equipa japonesa observou que a presença de outro material capaz de fazer reação ao teste LAL após administração endovenosa de imunoglobulinas (Ikemura *et al.*, 1989). Estudos mais aprofundados concluíram que a ativação da cascata não se dava pela via do LPS, mas sim por ativação do fator G, sugerindo que esse material teria de ser um (1,3)- β -glucano já que é o único tipo de material com capacidade de ativar o fator G. (Ikemura *et al.*, 1989).

Antes disso já em 1973, Ronald J. Elin e Sheldon M. Wolff questionavam a especificidade do LAL uma vez que detetaram a formação de coágulo com polinucleótidos e proteínas como a trombina, tromboplastina e ribonuclease (Elin e Wolff, 1973). Além disso, também verificaram que dois compostos considerados pirogénicos, o dextrano e o leucócito pirogénico humano, apresentavam resultado negativo no teste LAL (Elin e Wolff, 1973).

Estas duas análises demonstram a necessidade de se ter especial atenção aos resultados obtidos no teste LAL quando aplicados na prática clínica. Para que se possa minorar estes resultados incorretos, aconselha-se a verificação do ensaio recorrendo a outras metodologias complementares. Além disso, é também de extrema importância a constante atualização sobre a especificidade do ensaio, no sentido de garantir a maior adequação da metodologia conforme o tipo de produtos ou composto a testar.

7 Perspetivas para o futuro do LAL

O futuro de LAL ainda se revela incerto. Constantes preocupações têm sido levantadas ao longo dos anos, mas até aos dias de hoje ainda se mantém o LAL como teste de referência para a pesquisa de endotoxinas. Uma das preocupações mais sonantes relaciona-se com o impacto ambiental associado à obtenção do lisado, em particular, a taxa de mortalidade (Ding

e Ho, 2010). Apesar de existir regulamentação que restringe o número de laboratórios aprovados para fazer a recolha do caranguejo-ferradura e proceder à colheita da hemolinfa e de todo o processo ser realizado em condições que garantam o bem-estar animal, a taxa de mortalidade associada ao procedimento é de 10-15 % (Hermanns, 2012). Para além da mortalidade associada ao ensaio, estudos sobre o impacto nos organismos associados à colheita da hemolinfa foram desenvolvidos tendo revelado alterações comportamentais e fisiológicas, nomeadamente desorientação e lesões (Anderson *et al.*, 2013) (James-Pirri *et al.*, 2012).

A União Europeia tem instaurado uma política de proteção animal em estudos de cariz científico, reforçando a mudança do paradigma para ensaios sem utilização de espécies animais. Nesse sentido, em setembro de 2010 é aprovada a Diretiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu para a proteção dos animais usados para fins científicos. Esta diretiva estabelece a substituição de animais vivos por outros métodos sempre que cientificamente possível.

7.1 Teste de Ativação de Monócitos (MAT)

Antecipando-se à entrada em vigor da diretiva, em 2010 a FE incluiu na literatura o Teste de Ativação de Monócitos (MAT - do inglês *Monocyte Activation Test*) como alternativa aos ensaios de pirogenicidade baseados em animais (European Pharmacopoeia, 2013) (Franco *et al.*, 2018). Os monócitos apresentam importantes funções na resposta imunitária sendo os responsáveis pelo reconhecimento dos patogéneos e consequente ativação da fagocitose com produção de pirogénios endógenos, como as prostaglandinas, e de citocinas pro-inflamatórias como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Hoffmann *et al.*, 2005). Contrariamente ao ensaio LAL, este ensaio *in vitro* usa a produção de citocinas a partir de monócitos para mimetizar a reação humana aos pirogénios não detetando apenas endotoxinas bacterianas, ou seja, o aparecimento de um resultado positivo pode ser consequência de uma contaminação com endotoxinas ou por outro composto pirogénico não relacionado com endotoxinas, como DNA bacteriano, vírus ou fungos (Figura 7) (Merck Millipore, 2017).

Há diferentes variantes do MAT dependendo da fonte de monócitos humanos e do parâmetro detetado pelo ELISA (do inglês, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (Merck Millipore, 2017). Assim, como fonte de monócitos podem ser contemplados: sangue total, monócitos primários isolados ou linhas celulares monocíticas (Figura 7). O teste ELISA pode detetar as citocinas de interesse, como a IL-1 β , IL-6 ou TNF- α .

Uma das principais vantagens desta metodologia está relacionada com a capacidade de se ultrapassar a limitação do LER associado ao teste LAL, uma vez que está mais próximo da reação humana aos pirogênicos (Fritsch, 2017).

É de extrema importância garantir a sanidade do dador de sangue de forma a prevenir falsos positivos (Schindler *et al.*, 2009).

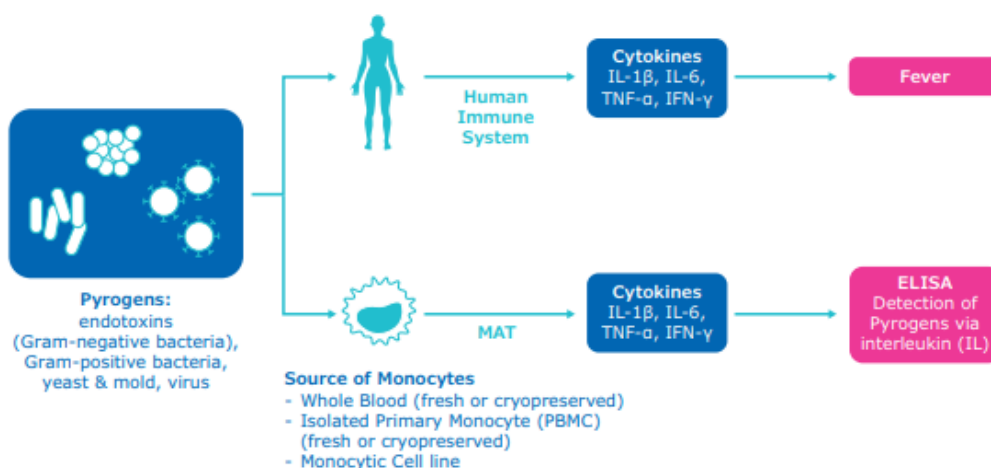


Figura 7 - Representação esquemática do princípio da metodologia MAT. (Retirado e adaptado de: Merck Millipore 2017).

7.2 Ensaio Fator C recombinante

Uma molécula sintética foi preparada tendo como base o DNA do fator C do LAL sendo apelidado de fator C recombinante (rFC) (Ding e Navas, 1995) (Bolden e Smith, 2017) (Ding e Ho, 2010). Esta molécula, sem origem animal, apresenta o mesmo mecanismo de ativação que o fator C, ou seja, na presença de LPS inicia a cascata de coagulação.

Baseado no rFC desenvolveu-se um teste de diagnóstico para endotoxinas simples, rápido, específico e sensível (Ding e Ho, 2001). O rFC apresenta-se como uma pró-enzima ficando ativo mediante contato com a endotoxina. Uma vez ativa, irá promover a hidrólise de um substrato com obtenção de um produto que será quantificado permitindo avaliar o nível de endotoxina (Ding e Ho, 2001). O substrato que normalmente se utiliza é o Boc-Val-Pro-Arg-MCA (Boc- butoxicarbonilo; MCA- 7-amido-4-metulcumarina) que tem atividade fluorogénica, e após hidrólise pelo rFC resulta num produto fluorimétrico. Este produto é posteriormente medido com uma excitação de 380 nm e uma emissão de 460 nm pelo que é possível quantificar a endotoxina presente na amostra dada a relação de proporcionalidade com a fluorescência do produto (Figura 8) (Ding e Ho, 2001) (Ding e Ho, 2010).

O rFC revela ser bastante sensível e específico para a endotoxina, eliminando possíveis falsos positivos mediados por β -(1,3)-D-glucanos, como acontece em LAL (Bolden e Smith, 2017).

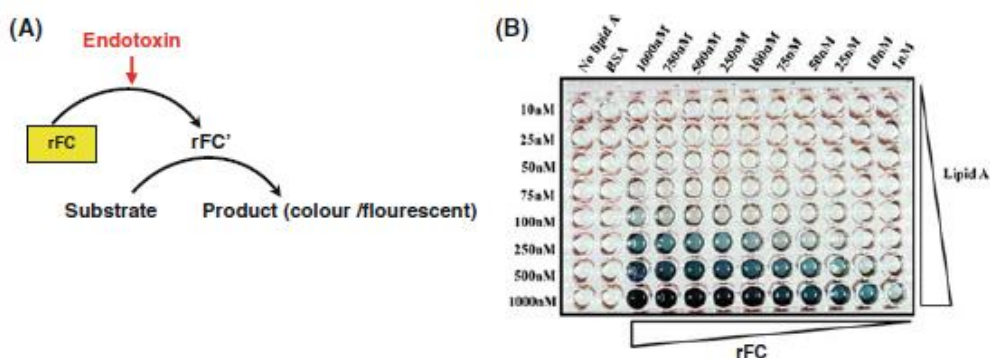


Figura 8 - Ativação do rFC com hidrólise do substrato e produção de um produto fluorimétrico (A). Medição da fluorescência do produto (B). (Retirado e adaptado de: Ding e Ho, 2010).

Em 2017, um consórcio mundial de catorze biofarmacêuticas, o *BioPhorum Operations Group* (BPOG), formou uma comissão de trabalho para comparar as duas metodologias, o rFC e LAL, no sentido de verificar se o LER é uma problemática no ensaio baseado no rFC (Bolden *et al.*, 2017). O estudo avaliou os três principais métodos de LAL: o método de coagulação clássico, o turbidimétrico e o cromogénico. Embora alguma variabilidade tenha sido observada entre os testes, o estudo do BPOG demonstrou que o rFC pode detetar endotoxinas com alto limite de deteção e mesmo na presença de interferentes, como tampões com surfactantes como o citrato e o polissorbato.

A Figura 9 apresenta um esquema comparativo entre as metodologias para avaliação da pirogenicidade apresentadas neste trabalho de revisão.

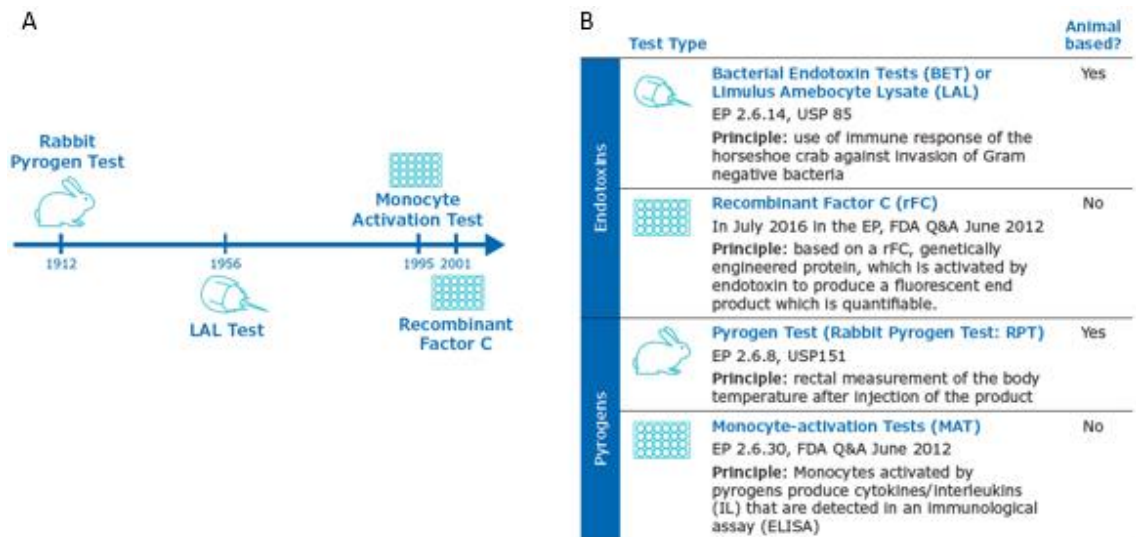


Figura 9 - Princípios das diferentes metodologias de avaliação de pirogenicidade. (EP) - Farmacopeia Europeia; (IL) - Interleucina. (Retirado e adaptado de: Merck Millipore, 2017).

8 Conclusão

Com o avanço da medicina para práticas e terapêuticas mais invasivas surgiu a necessidade de um apertado controlo bacteriológico de todos os materiais que entram em contato com o organismo de forma a evitar contaminação com agentes patogénicos sobretudo por compostos capazes de causar pirogenicidade. A metodologia LAL foi revolucionária na ciência, na indústria e na prática clínica. É considerado um ensaio de referência para a pesquisa de endotoxinas em produtos parentéricos há mais de quatro décadas. Para tal, contribuiu a facilidade de aplicação à escala industrial aliada ao seu reduzido custo e elevada sensibilidade.

Desde a sua conceção, a metodologia original foi alvo de melhorias sendo que o principal motor para esta otimização a necessidade de transformar a metodologia tradicional, qualitativa, num ensaio com capacidade de quantificar as endotoxinas. Assim, surgiram os métodos eletroquímicos e fotométricos, estando os últimos contemplados nas principais farmacopeias de relevo.

Este ensaio é sem dúvida uma referência na área farmacêutica. Todavia, recentes preocupações quanto à sua especificidade e ao impacto ambiental levaram à pesquisa e desenvolvimento de novos métodos, desde logo métodos que não recorressem a animais. Os ensaios MAT e rFC são promissores e, possivelmente, mais específicos que o LAL. Embora sejam de mais difícil reprodução à escala industrial poderão substituir o ensaio LAL. Esta mudança foi muito impulsionada pelas novas diretivas europeias que preconizam a cessação de ensaios com animais, ou provenientes de animais, quando alternativas científicas estejam disponíveis e, desse modo, ir ao encontro do conceito dos 3Rs: *Refine*, *Reduce* e *Replace*, aperfeiçoar, reduzir e substituir o recurso aos testes em animais.

9 Referências Bibliográficas

AGARWALA, K., KAWABATA, S., MIURA Y., KUROKI, Y., IWANAGA, S. - ***Limulus* Intracellular Coagulation Inhibitor Type 3. PURIFICATION, CHARACTERIZATION, Cdna CLONING, AND TISSUE LOCALIZATION.** The Journal of Biological Chemistry. Vol. 271 (30) (1996) 23768-23774.

AHADIAN, S., HUYER, L. D., ESTILI, M., YEE B., SMITH, N., XU, Z., SUN, Y., RADISIC, M. - **Moldable Elastomeric Polyester-Carbon Nanotube Scaffolds For Cardiac Tissue Engineering.** Acta Biomaterialia 52 (2017) 81-91.

AMRO, N., KOTRA, L. P., WADU-MESTHRIGE, K., BULYCHEV, A., MOBASHERY, S., LIU, G. - **High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies Of The Escherichia Coli Outer Membrane: Structural Basis For Permeability.** Langmuir 10 (2000) 2789-2796.

ANDERSON, R.L., WATSON, W.H., CHABOT, C.C. - **Sublethal Behavioral And Physiological Effects Of The Biomedical Bleeding Process On The American Horseshoe Crab, *Limulus Polyphemus*.** Biological Bulletin 225 (2013) 137-51.

ARIKI, S., KOORI, K., OSAKI, T., MOTOYAMA, K., INAMORI, K., KAWABATA, S. - **A Serine Protease Zymogen Functions As A Pattern-Recognition Receptor For Lipopolysaccharides.** Proceedings of the National Academy of Sciences vol. 101 n.º4 (2004) 953-958.

BATES, K.; KOSTARELOS, K. - **Carbon Nanotubes As Vectors For Gene Therapy: Past Achievements, Present Challenges And Future Goals.** Advanced Drug Delivery Reviews. (2013) 2023-2033.

BATTIGELLI, A., MÉNARD-MOYON, C., ROS, T., PRATO, M., BIANCO, A., - **Endowing Carbon Nanotubes With Biological And Biomedical Properties By Chemical Modifications.** Advanced Drug Delivery Reviews. 12481 (2013) 1899-1920.

BERGNER, A., OGANESSYAN, V., MUTA, T., IWANAGA, S., TYPKE, D., HUBER, R., BODE, W. - **Crystal Structure Of A Coagulogen, The Clotting Protein From Horseshoe Crab: A Structural Homologue Of Nerve Growth Factor.** The EMBO Journal vol.15 no.24 (1996) 6789-6797.

BOLDE, J. S., WARBURTON, ROB. E. PHELAN, R., MURPHY, M., SMITH, K., DE FELIPPIS, M. R., CHEN, D. - **Endotoxin Recovery Using *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) Assay**. *Biologicals* Vol 44 (2016) 434-440.

BOLDEN, J., SMITH, K. - **Application Of Recombinant Factor C Reagent For The Detection Of Bacterial Endotoxins In Pharmaceutical Products**. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 71(5) (2017), 405-412.

BOLDEN, J. KNIGHT, M., STOCKMAN, S., OMOKOKO, B. - **Results Of A Harmonized Endotoxin Recovery Study Protocol Evaluation By 14 Biophorum Operations Group (BPOG) Member Companies**. *Biologicals* 48 (2017) 74-81.

CORREA, W., BRANDENBURG, K., ZÄHRINGER, U., RAVURI, K., KHAN, T., WINTZINGERODE, F. - **Biophysical Analysis of Lipopolysaccharide Formulations for an Understanding of the Low Endotoxin Recovery (LER) Phenomenon**. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol 18 (2017) 2737-2752.

CHEN, J., VINTHER, A. - **Low Endotoxin Recovery In Common Biologics Products** - In: *PDA Annual Meeting*. Orlando, Estados Unidos da América : 15-17 de abril 2013.

COUNCIL OF EUROPE, **European Pharmacopoeia**, 8th Ed, 2010.

DING J.L., NAVAS M.A., - **Molecular Cloning And Sequence Analysis Of Factor C Cdna From The Singapore Horseshoe Crab, *Carcinoscorpius Rotundicauda***. *Molecular Marine Biology Biotechnology* 4(1) (1995) 90-103.

DING J.L., HO, B. - **A New Era In Pyrogen Testing**. *Trends in Biotechnology* 19(8) (2001) 277-281.

DING J.L., HO, B. - **Endotoxin Detection - From *Limulus* Amebocyte Lysate To Recombinant Factor C**. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. 1° Ed. Dordrecht, Países Baixos, Springer, (2010) ISBN 978-90-481-9077-5.

DOBROVOLSKAIA, M., NEUN, B. W., COLGSTON, J. D., DING, H., LJUBIMOVA, J., MCNEIL, S. E. - **Ambiguities In Applying Traditional *Limulus* Amebocyte Lysate Tests To Quantify Endotoxin In Nanoparticle Formulations**. *Nanomedicine*. 5(4) (2010) 555-562.

DOUGLAS, C. M. - **Fungal β -(1,3)-D-Glucan Synthesis**. *Medical Mycology* 39 (2001) 55-66.

ELIN, R. J., WOLFF, S. M. - **Nonspecificity Of The *Limulus* Amebocyte Lysate Test: Positive Reactions With Polynucleotides And Proteins.** Journal of Infectious Diseases. (1973) 349-352.

FRANCO, E., GARCIA-RECIO, V., JIMÉNEZ P., GARROSA, M., GIRBÉS, T., CORDOBA-DIAZ, M., CORDOBA-DIAZ, D.. - **Endotoxins From A Pharmacopoeial Point Of View.** Toxins. 10 (2018) 1-9.

FRITSCH, A. (2017). **Low Endotoxin Recovery (LER) Is Today One Of Authorities Serious Concerns Regarding Pyrogen Testing.** *La Vague.* <https://en.a3p.org/low-endotoxin-recovery-ler-is-today-one-of-authorities-serious-concerns-regarding-pyrogen-testing-la-vague-53> [Consultado às 12.05 do dia 24.08.2019].

GORBET, M. B., SEFTON, M. V. - **Endotoxin: The Uninvited Guest.** Biomaterials 26 (2005) 6811-6817.

HERMANN, J., BACHE, C., BECKER, B., LOESCHNER, B., MONTAG, T., SPREITZER, I., - **Alternatives To Animal Use For The LAL-Assay.** ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten, WC8 (2012) 81-84.

HOFFMANN, S., PETERBAUERE, A., SCHINDLER, S., FENNRICHA, S., POOLEB S., MISTRY Y., MONTAG-LESSING T., SPREITZER, I., LÖSCHNER, B., AALDEREND, M., BOS R., GOMMERD, M., NIBBELINGD, R., WERNER-FELMAYER, G., LOITZL, P., JUNGI, T., BRCIC, M., BRQGGER, P., FREY, E., BOWE, G., CASADO, J., COECKE, S., LANGE, J., MOGSTER, B., NAESS, L. M., AABERGE, I. S., WENDEL, A., HARTUNG T. - **International Validation Of Novel Pyrogen Test Based On Human Monocytoid Cells.** Journal of Immunological Methods 298 (2005) 161-173.

IKEMURA, K., IKEGAMI, K., SHUMAZU, T., YOSHIOKA, T., SUGIMOTO, T. - **False-Positive Result in *Limulus* Test Caused by *Limulus* Amebocyte Lysate-Reactive Material in Immunoglobulin Products.** Journal of Clinical Microbiology Vol. 27 no.9 (1985) 1965-1968.

IWANAGA, S., - **Biochemical Principle Of *Limulus* Test Detecting Bacterial Endotoxins.** Proceedings of Japanese Academy. 83 (2007) 110-119.

IWANAGA, S., KAWABATA, S. I., MUTA, T. - **New Types Of Clotting Factors And Defense Molecules Found In Horseshoe Crab Hemolymph: Their Structures And Functions.** Journal of Biochemistry. (1998) 1-15.

IWANAGA, S., LEE, B., - **Recent Advances In The Innate Immunity Of Invertebrate Animals.** BMB Reports. (2011) 128-150.

IWANAGA, S., KAWABATA S. - **Evolution And Phylogeny Of Defense Molecules Associated With Innate Immunity In Horseshoe Crab.** Frontiers in Bioscience 3 (1998) 973-984.

IWANAGA, S., MIYATA, T., TOKUNAGA, F., MUTA, T. - **Molecular Mechanism Of Hemolymph Clotting System In *Limulus*.** Thrombosis Research 68 (1992) 1-32.

JAMES-PIRRI, M-J., VEILLETTE P. A., LESCHEN, A. S. - **Selected Hemolymph Constituents Of Captive, Biomedically Bled, And Wild Caught Adult Female American Horseshoe Crab (*Limulus Polyphemus*).** Maritime Freshwater Behavior Physiology 35 (2012) 281-289.

JOHN, B. A., JALAL, K. C. A., KAMARUZZAMAN, Y. B., ZALEHA, K. - **Mechanism In The Clot Formation Of Horseshoe Crab Blood During Bacterial Endotoxin Invasion.** Journal of Applied Sciences. 10 (17) (2010) 1930-1936.

JONES, C. F., GRAINGER, D. W. - **In Vitro Assessments Of Nanomaterial Toxicity.** Advanced Drug Delivery Reviews. 61 (2009) 438-456.

LONZA GROUP - ***Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) PYROGENT™ Plus** http://www.lonzabio.jp/products/endotoxin/pdf/00190168_en.pdf [Consultado às 20.02 do dia 05.08. 2019].

LONZA GROUP - ***Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic-QCL®** http://www.lonzabio.jp/products/endotoxin/pdf/00190169_en.pdf [Consultado às 19.02 do dia 19.08.2019].

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., JANEWAY JR, C. A. - **A Human Homologue Of The *Drosophila* Toll Protein Signals Activation Of Adaptive Immunity.** Nature. 388 July (1997) 6-9.

MERCKMILLIPORE (2017) **Monocyte Activation Teste (MAT) The In Vitro Test For Pyrogen Detection.** <http://www.merckmillipore.com/PT/en/> [Consultado às 23.55 do dia 06.08.2019].

MIAO, P., SHEN, M., NONG, L., CHEN, G., YIN, Y. - **Functionalization Of Platinum Nanoparticles For Electrochemical Detection Of Nitrite.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. 399 (2011) 2407-2411.

MIAO, P., HAN, K., QI, J. ZHANG, C., LIU, T. - **Electrochemical Investigation Of Endotoxin Induced *Limulus* Amebocyte Lysate Gel-Clot Process.** Electrochemistry Communications. 26 (2013) 29-32.

MIURA, Y., KAWABATA, S., IWANAGA, S. - **A *Limulus* Intracellular Coagulation Inhibitor With Characteristics Of The Serpin Superfamily. Purification, Characterization and cDNA Cloning.** The Journal of Biological Chemistry. Vol 269(1) (1994) 542-547.

MIURA, Y., KAWABATA, S., WAKAMIYA, Y., NAKAMURA, T., IWANAGA, S. - **A *Limulus* Intracellular Coagulation Inhibitor Type 2. Purification, Characterization, cDNA Cloning, and Tissue Localization.** The Journal of Biological Chemistry. Vol 270(2) (1995) 558-565.

MUELLER, M., LINDNER, B., KUSUMOTO, S., FUKASE, K., SCHROMM, A. B., SEYDEL, U. - **Aggregates Are The Biologically Active Units Of Endotoxin.** Journal of Biological Chemistry. Vol 279(25) (2004) 26307-26313.

MUTA, T., IWANAGA, S. - **The Role Of Hemolymph Coagulation In Innate Immunity.** Current Opinion in Immunology. 8 (1996) 41-47.

MUTA, T., SEKI, N., TAKAKI, Y., HASHIMOTO, R., ODA, T., IWANAGA, A., TOKUNAGA, F., IWANAGA, S. - **Purified Horseshoe Crab Factor G.** The Journal of Biological Chemistry. Vol 270 (2) (1995) 892-897.

NATIONAL WILDLIFE FEDERATION - <https://www.nwf.org/Educational-Resources/Wildlife-Guide/Invertebrates/Horseshoe-Crab>, 2019 [Consultado às 23.37 do dia 31.07.2019].

PACIFIC BIOLABS - <https://pacificbiolabs.com/lal-endotoxin-testing>, 2019 [Consultado às 23.03 do dia 18.08.2019].

PLATCO, C., KAVE, J., TIDSWELL, E. C. - **Resolution of Low Endotoxin/ Lipopolysaccharide Recovery (LER/LLR) Testing,** 2013. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/190994-Resolution-of-Low-Endotoxin-Lipopolysaccharide-Recovery-LER-LLR-Testing/> [Consultado às 19.15 do dia 21.08.2019].

REICH J. - **An Advanced Endotoxin Assay: Insights And Strategies For Overcoming Low Endotoxin Recovery In Complex Formulations.** In: Pharmaceutical Microbiology Forum Bacterial Endotoxin Summit, 7^o, Philadelphia, Pennsylvania September 2013.

SADAVA, D., HELLER, H., HILLIS, D. Life: **The Science Of Biology.** 9^a Ed. Nova Iorque: W.H.Freeman & Co Ltd, 2016, ISBN 9781319126575.

SANDLE, T. - **Pharmaceutical Microbiology Essentials for Quality Assurance and Quality Control.** 1^a Ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2016, ISBN 978-0-08-100022-9.

SCHINDLER, S., AULOCK, S., DANESHIAN, M., HARTUNG, T. - **Development, Validation and Applications of the Monocyte Activation Test for Pyrogens Based on Human Whole Blood.** ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten. 26 4/09 (2009) 265-277.

SEKIGUCHI, K. - **Biology Of Horseshoe Crab,** 1^o Ed. Tóquio: Tokyo: Science House CO., 1998. ISBN 9784915572258.

SPERANDEO, P., MARTORANA, A. M., POLISSI, A. - **Lipopolysaccharide Biogenesis And Transport At The Outer Membrane Of Gram-Negative Bacteria.** Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. 1862(11) (2017) 1451-1460.

TANAKA, S., IWANAGA, S. - **Limulus Test For Detecting Bacterial Endotoxins. Proteolyc Enzymes In Coagulation, Fibrinolysis And Complement Activation Part B: Complement Activation, Fibrinolysis, And Nonmammalian Blood Coagulation Factors And Inhibitors.** Methods in Enzymology vol. 223 (1993) 358-364.

THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION - **DIRECTIVE 2010/63/EU** - Official Journal of the European Union 276 (2010) 33-79.

TSUCHIYA M. - **Possible Mechanism Of Low Endotoxin Recovery.** American Pharmaceutical Review, 2014. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/171005-Possible-Mechanism-of-Low-Endotoxin-Recovery/> [Consultado às 19.52 em 28.07.2019].

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION - **The United States Pharmacopeia.** The National Formulary, 40th Ed. Rockville, 2011.

VILLA, C. H., DAO, T., AHEARN, I., FEHRENBACHER, N., CASEY, E., REY, D. A., KORONSVIT, T. ZAKHALEVA, V., BATT, C. A., PHILLIPS, M. R., SCHEINBERG, D. A., - **Single-Walled Carbon Nanotubes Deliver Peptide Antigen Into Dendritic Cells And Enhance Igg Responses To Tumor-Associated Antigens.** ACS Nano. vol 5 no7 (2011) 5300-5311.

VIPOND, C., FINDLAY, L., FEAVERS, I., CARE, R., - **Limitations of the Rabbit Pyrogen Test for Assessing Meningococcal OMV Based Vaccines.** ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten 33(1) (2016) 47-53.

YANG, M., NIE, X. MENG, J., SUN, Z., XU, H. - **Carbon Nanotubes Activate Limulus Amebocyte Lysate Coagulation by Interface Adsorption.** ACS Applied Materials and Interfaces. 9 (2017) 8450-8454.

WALLS, E. A., BERKSON, J., SMITH, S. A., - **The Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*: 200 Million Years of Existence, 100 Years of Study.** Reviews in Fisheries Science. 10(1) (2002) 39-73.

WILLIAMS, K. L., - **Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation.** 3° Ed. Boca Rato, EUA: CRC Press, 2007. ISBN 9781420020595.

WINTZINGERODE, F. - **Low Endotoxin Recovery, A Brief Overview,** 2013. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/239898-Low-Endotoxin-Recovery-A-Brief-Overview>. [Consultado às 19.15 do dia 22.08.2019].

10Anexo

Tabela I – Moléculas de defesa encontradas nos amebócitos e na hemolinfa do caranguejo-ferradura. (Retirado e adaptado de Iwanaga e Lee, 2005).

Proteins and peptides	Mass (kDa)	Function/specificity	Localization
Coagulation factors			
Factor C	123	Serine protease	L-granule
Factor B	64	Serine protease	L-granule
Factor G	110	Serine protease	L-granule
Proclotting enzyme	54	Serine protease	L-granule
Coagulogen	20	Gelation	L-granule
Protease inhibitors			
LICI-1	48	Serpin/factor C	L-granule
LICI-2	42	Serpin/clotting enzyme	L-granule
LICI-3	53	Serpin/factor G	L-granule
Trypsin inhibitor	6.8	Kunitz-type	ND
LTI	16	New type	ND
LEBP-PI	12	New type	L-granule
Limulus cystatin	12.6	Cystatin family 2	L-granule
α_2 -Macroglobulin	180	Complement	Plasma & L-granule
Chymotrypsin inhibitor	10	ND	Plasma
Antimicrobial substances			
Anti-LPS factor	12	GNB	L-granule
Tachyplesins	2.3	GNB, GPB, FN	S-granule
Polyphemusins	2.3	GNB, GPB, FN	S-granule
Big defensin	8.6	GNB, GPB, FN	L & S-granule
Tachycitin	8.3	GNB, GPB, FN	S-granule
Tachystatins	6.5	GNB, GPB, FN	S-granule
Factor D	42	GNB	L-granule
Lectins			
Tachylectin-1	27	LPS (KDO), LTA	L-granule
Tachylectin-2	27	GlcNAc, LTA	L-granule
Tachylectin-3	15	LPS (O-antigen)	L-granule
Tachylectin-4	470	LPS (O-antigen), LTA	ND
Tachylectin-5	380-440	N-acetyl group	Plasma
Limnectin	54	PC	L-granule
18K-LAF	18	Hemocyte aggregation	L-granule
Limulin	300	HLA/PC, PE, SA, KDO	Plasma
LCRP	300	PC, PE	Plasma
TCRP-1	300	PE	Plasma
TCRP-2	330	HLA/PE, SA	Plasma
TCRP-3	340	HLA/SA, KDO	Plasma
Polyphemins	ND	LTA, GlcNAc	Plasma
TTA	ND	SA, GlcNAc, GalNAc	Plasma
Liphemin	400-500	SA	Hemolymph
Carcinoscorpins	420	SA, KDO	Hemolymph
GBP	40	Gal	Hemolymph
PAP	40	Protein A	Hemolymph
(1 → 3) β -D-glucan binding protein	168	Pachyman, cardian	Hemocyte
Others			
Transglutaminase (TGase)	86	Cross-linking	Cytosol
8.6 kDa protein	8.6	TGase substrate	L-granule
Pro-rich proteins (Proxins)	80	TGase substrate	L-granule
Limulus kexin	70	Precursor processing	ND
Hemocyanin	3600	O ₂ transporter (PO activity)	Plasma
Toll-like receptor (rToll)	110	ND	Hemocyte
L1	11	Unknown	L-granule
L4	11	Unknown	L-granule

LICI, *Limulus* intracellular coagulation inhibitor; LTI, *Limulus* trypsin inhibitor; LEBP-PI, *Limulus* endotoxin-binding protein-protease inhibitor; GNB, Gram-negative bacteria; GPB, Gram-positive bacteria; FN, fungus; LPS, lipopolysaccharide; LAF, *Limulus* 18-kDa agglutination-aggregation factor; KDO, 2-keto-3-deoxyoctonic acid; PC, phosphorylcholine; PE, phosphorylethanolamine; SA, sialic acid; TTA, *Tachyplesus tridentatus* agglutinin; LCRP, *Limulus* C-reactive protein; TCRP, *Tachyplesus* C-reactive protein; HLA, hemolytic activity; LTA, lipoteichoic acid; GBP, galactose-binding protein; PAP, protein A binding protein; PO, phenoloxidase; ND, not determined.