



Adriana Nunes Alves Castanheira da Costa

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Resistência à colistina e sua disseminação: implicações em saúde pública” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dr.ª Cláudia Gama, da Dr.ª Joana Coragem e da Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Adriana Nunes Alves Castanheira da Costa

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Resistência à colistina e sua disseminação: implicações em saúde pública” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dr.<sup>a</sup> Cláudia Gama, da Dr.<sup>a</sup> Joana Coragem e da Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Adriana Nunes Alves Castanheira da Costa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011151589, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Resistência à colistina e sua disseminação: implicações em saúde pública” 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, 7 de setembro de 2017.

Adriana Nunes Alves Castanheira da Costa

(Adriana Nunes Alves Castanheira da Costa)

## **Agradecimentos**

À minha tutora da monografia, Professora Doutora Gabriela Silva, por ter aceite fazer parte deste projeto, por toda a disponibilidade que sempre demonstrou, por todo o apoio e motivação que sempre me deu. Agradeço a revisão cuidada do presente documento, todos os conselhos e sugestões.

À minha orientadora de estágio em Indústria Farmacêutica, Dr.<sup>a</sup> Cláudia Gama, por me ter dado a oportunidade de realizar o estágio no Laboratório de Microbiologia, no departamento do Controlo de Qualidade da Bluepharma, Indústria Farmacêutica, SA.

À Ana Paula, à Manu, à Marta e à D. Rosa, sem as quais o estágio na Bluepharma não teria sido tão enriquecedor. Pelo carinho com que me receberam, por todas as palavras de sabedoria que me transmitiram, por me mostrarem o que é trabalhar com dedicação, e por todos os bons momentos que me proporcionaram ao longo de três meses.

À minha orientadora de estágio em Farmácia Comunitária, Dr.<sup>a</sup> Joana Coragem, por me ter aberto a porta da Farmácia Gaspar para realizar o meu estágio. Um agradecimento muito especial por toda a sabedoria que me transmitiu, pelo apoio incondicional que me prestou, e por toda a confiança que depositou em mim, desde o primeiro dia.

Ao Héber, à Rita e à Joana, por me terem feito sentir parte da equipa da Farmácia Gaspar, por me terem brindado com conhecimento, e por todos os bons momentos que me proporcionaram ao longo de quatro meses.

À minha família por me ter ensinado a sonhar, a conquistar os meus sonhos, e por percorrer este longo caminho a meu lado.

A todos, muito obrigada!

# Índice

Resumo .....	8
Abstract .....	9

## **CAPÍTULO 1 – Relatório de Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica**

Lista de Abreviaturas .....	11
Introdução .....	12
1. Análise SWOT .....	13
1.1. Pontos Fortes .....	13
1.1.1. Sessão de acolhimento e integração .....	13
1.1.2. Visita às instalações da Bluepharma .....	13
1.1.3. Sessões de formação interna .....	13
1.1.4. Equipa do Laboratório de Microbiologia .....	14
1.1.5. Instalações e boas práticas de laboratório .....	14
1.1.6. Regulamentação do Controlo de Qualidade da Indústria Farmacêutica .....	15
1.1.7. Utilização dos equipamentos do Laboratório de Microbiologia .....	15
1.1.8. Preparação e controlo de meios de cultura .....	16
1.1.9. Procedimento de amostragem .....	16
1.1.10. Validação de métodos analíticos de avaliação da contaminação microbiana .....	17
1.1.11. Avaliação da contaminação microbiana de amostras farmacêuticas .....	17
1.1.12. Avaliação da qualidade da água purificada .....	18
1.1.13. Avaliação da contaminação microbiana do ar .....	18
1.2. Pontos Fracos .....	19
1.2.1. Análise microbiológica através de métodos convencionais .....	19
1.2.2. Avaliação microbiológica exclusiva de comprimidos e cápsulas .....	19
1.3. Oportunidades .....	20
1.3.1. Experiência profissional em Indústria Farmacêutica .....	20
1.4. Ameaças .....	20
1.4.1. Duração do estágio em Indústria Farmacêutica .....	20
2. Caso Prático .....	21
2.1. Avaliação da contaminação microbiana do comprimido revestido Blue 5mg .....	21
Conclusão .....	24
Referências Bibliográficas .....	25

## **CAPÍTULO 2 – Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária**

Lista de Abreviaturas .....	28
Introdução .....	29

I. Análise SWOT.....	30
I.1. Pontos Fortes .....	30
I.1.1. Aprendizagem gradual durante o estágio.....	30
I.1.2. Equipa da Farmácia Gaspar.....	30
I.1.3. Localização da Farmácia Gaspar .....	31
I.1.4. Receituário .....	32
I.1.5. Organização dos medicamentos.....	32
I.1.6. Preparação de medicamentos manipulados.....	33
I.1.7. Oferta de outros serviços farmacêuticos .....	33
I.2. Pontos Fracos .....	34
I.2.1. Nomes comerciais e DCI .....	34
I.2.2. Dificuldades no aconselhamento farmacêutico.....	34
I.3. Oportunidades .....	35
I.3.1. Sessões de formação externa .....	35
I.3.2. Formação escolar “Cuidados com o Sol” .....	36
I.3.3. Diferenciar a farmácia num futuro próximo .....	36
I.4. Ameaças .....	37
I.4.1. Duração do estágio .....	37
2. Caso Prático.....	38
2.1. Erradicação de <i>Helicobacter pylori</i> .....	38
Conclusão .....	39
Referências Bibliográficas .....	40

### **CAPÍTULO 3 – Monografia**

Introdução.....	44
I. Colistina .....	45
I.1. Estrutura química.....	45
I.2. Mecanismo de ação antibacteriano.....	46
I.3. Espectro de atividade antibacteriano .....	46
I.4. Formas de apresentação e vias de administração .....	47
I.5. Abandono do uso da colistina em medicina humana .....	48
I.5.1 Nefrotoxicidade .....	48
I.5.2 Neurotoxicidade .....	49
I.6. Uso clínico atual.....	49
I.6.1. Medicina humana.....	50
I.6.2. Medicina veterinária .....	51

2. Resistência à colistina .....	51
2.1. Mecanismos de resistência .....	51
2.2. Disseminação da resistência à colistina e implicações em saúde pública .....	57
2.2.1. Epidemiologia e detecção do gene <i>mcr-1</i> .....	57
2.2.1.1. Epidemiologia e detecção do gene <i>mcr-1</i> em Portugal .....	58
2.2.2. Disseminação do gene <i>mcr-1</i> .....	59
2.2.3. Consequências da disseminação .....	61
2.2.4. Medidas para evitar a disseminação – <i>One Health</i> .....	62
Conclusão .....	66
Referências Bibliográficas .....	67

## Resumo

A informação apresentada neste documento encontra-se dividida em três capítulos. No primeiro capítulo é discutida a experiência adquirida durante o estágio realizado em Indústria Farmacêutica, na Bluepharma – Indústria Farmacêutica, S.A. O segundo capítulo refere-se à experiência desenvolvida em Farmácia Comunitária, na Farmácia Gaspar. O terceiro capítulo descreve a monografia sobre a "Resistência à colistina e sua disseminação: implicações em saúde pública"

A colistina é um antibiótico polipeptídico que foi extensivamente utilizado, a nível mundial, em medicina humana e veterinária, na década de 1960. Na medicina humana, a elevada incidência de nefrotoxicidade e de neurotoxicidade, desencadeou o declínio da utilização sistémica da colistina. Consequentemente, a colistina foi substituída por outros antibióticos menos tóxicos. No entanto, nas últimas décadas, o elevado número de surtos hospitalares provocados por bactérias Gram-negativo resistentes a múltiplos fármacos, levou os clínicos a re-introduzir a colistina sistémica, como fármaco de último recurso.

Até 2015, a resistência à colistina relacionava-se com a ocorrência de mutações cromossómicas, não havendo descrição da ocorrência de transferência horizontal de genes. Em novembro de 2015, na China, foi publicado, pela primeira vez, um caso de resistência à colistina codificado pelo gene *mcr-1*, localizado num plasmídeo. Em junho de 2016, na Bélgica, foi detetado outro gene de resistência à colistina mediada por plasmídeo, designado *mcr-2*. Após a sua divulgação, os genes foram detetados em animais produtores de alimentos, humanos e fontes ambientais, em muitos países, o que indica uma epidemia global.

Inicialmente, será efetuada uma contextualização dos principais aspetos relacionados com a colistina, que se tornam importantes para compreender a sua estrutura química, o seu mecanismo de ação antibacteriano e as suas indicações terapêuticas. Posteriormente, serão apresentados os mecanismos de resistência cromossómica e mediada por plasmídeo. Por último, serão propostas medidas de controlo e prevenção da resistência à colistina, de acordo com a abordagem *One Health*.

**Palavras-chave:** Indústria Farmacêutica; Farmácia Comunitária; Colistina; Mecanismos de resistência; Gene *mcr-1*.

## Abstract

The information presented in this paper is divided into three chapters. In the first chapter is discussed the experience acquired during the internship held in Pharmaceutical Industry, in Bluepharma – Indústria Farmacêutica, S.A. The second chapter refers to the experience developed in Community Pharmacy, in Farmácia Gaspar. The third chapter describes the project about “Colistin resistance and its dissemination: implications for public health”.

Colistin is a polypeptide antibiotic that was used extensively worldwide in human and veterinary medicine, in the 1960s. In human medicine, systemic colistin treatment was gradually declined due to the reported high incidence of nephrotoxicity and neurotoxicity. Consequently, colistin was replaced by other less toxic antibiotics. However, in the last few decades, the extensive number of hospital outbreaks as a result of the multidrug resistant Gram-negative bacteria, forced clinicians to re-introduce systemic colistin, as a last resort drug.

Until the year 2015, colistin resistance has involved chromosomal mutations but dissemination of colistin resistance has never been reported via horizontal gene transfer. Nonetheless, in November 2015, in China, it was published a colistin resistance case encoded by the *mcr-1* gene located on a plasmid, for the first time. In June 2016, in Belgium, it was detected another case of plasmid mediated colistin resistance gene, designated *mcr-2*. Since those descriptions, these genes have been detected in isolates recovered from food producing animals, humans and environmental sources, in many countries, which indicates a global epidemy.

Firstly, an introduction about the main aspects related to colistin will be presented to explain the chemical structure, the antibacterial mechanism of action and therapeutic indications of colistin. Secondly, the chromosomal and the plasmid-mediated resistance mechanisms will be presented. Finally, measures for control and prevention of colistin resistance will be proposed, taking into account the *One Health* approach.

**Keywords:** Pharmaceutical Industry; Community Pharmacy; Colistin; Resistance mechanisms; *mcr-1* gene.

# **CAPÍTULO I**

## **Relatório de Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica**



**Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A.**

## Lista de Abreviaturas

**°C** - Graus Celsius

**h** - Hora

**g** - Grama

**mg** - Miligrama

**n°** - Número

**mL** - Mililitro

**µL** - Microlitro

**ECTS** - *European Credit Transfer System* (Sistema Europeu de Transferência de Créditos)

**GLPs** - *Good Laboratory Practices* (Boas Práticas de Laboratório)

**GMPs** - *Good Manufacturing Practices* (Boas Práticas de Fabrico)

**MICF** - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**Ph. Eur.** - Farmacopeia Europeia

**RCS** - *Reuter Centrifugal Sampler*

**TAMC** - *Total Aerobic Microbial Count* (Contagem de microrganismos aeróbios totais)

**TYMC** - *Total Yeasts and Moulds Count* (Contagem de fungos e leveduras totais)

**UFC** - Unidade Formadora de Colónia

**USP** - *United States Pharmacopoeia* (Farmacopeia Americana)

## Introdução

O presente relatório foi elaborado no âmbito do Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), na área da Indústria Farmacêutica. O Estágio decorreu na Bluepharma – Indústria Farmacêutica, S.A., no departamento do Controlo de Qualidade, no Laboratório de Microbiologia, sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Cláudia Gama em colaboração com a Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Reis, entre 9 de janeiro de 2017 e 7 de abril de 2017.

A Bluepharma é uma Indústria Farmacêutica portuguesa, fundada em 2001, com sede em Coimbra. A empresa surgiu na sequência da aquisição de uma unidade industrial pertencente à multinacional alemã Bayer. Inicialmente, a sua atividade destinava-se à produção de medicamentos, abrangendo o fabrico, o embalamento e o controlo de qualidade das formas farmacêuticas produzidas. Atualmente, além da atividade industrial, atua em mais duas áreas, sendo estas, a área da investigação, desenvolvimento e registo de medicamentos e a área da comercialização de medicamentos genéricos <sup>(1)</sup>.

A Bluepharma concentra a sua produção nas formas farmacêuticas sólidas orais não estéreis, designadamente comprimidos e cápsulas. De acordo com as especificidades da Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.) e da *United States Pharmacopoeia (USP)*, estas preparações farmacêuticas podem conter determinados microrganismos, não sendo obrigatório demonstrar a sua esterilidade <sup>(2,3)</sup>. Neste âmbito, a atividade do departamento do Controlo de Qualidade Microbiológico centra-se na garantia da qualidade das formas farmacêuticas produzidas, através da avaliação da contaminação microbiana do produto semi-acabado e do produto acabado. Com o objetivo de minimizar o risco de contaminação microbiana, é também efetuada uma monitorização das principais fontes de contaminação dos produtos farmacêuticos, ou seja, das matérias-primas, da água purificada, dos equipamentos e do ar das salas limpas das áreas de Fabricação e Embalamento <sup>(4)</sup>.

As análises microbiológicas baseiam-se em métodos fenotípicos, contemplando parâmetros de caráter quantitativo (determinação do *Total Aerobic Microbial Count (TAMC)* e do *Total Yeasts and Moulds Count (TYMC)*) e qualitativo (pesquisa de microrganismos específicos). Os procedimentos analíticos de avaliação da contaminação microbiana exigem uma prévia validação interna, pelo que se recorre à contaminação da amostra em estudo utilizando microrganismos padrão. Desta forma, garante-se que o procedimento possui a capacidade de detetar possíveis contaminações microbiológicas <sup>(5-8)</sup>.

# **I. Análise SWOT**

## **I.1. Pontos Fortes**

### **I.1.1. Sessão de acolhimento e integração**

A sessão de acolhimento e integração, realizada no primeiro dia do meu estágio curricular, consistiu na apresentação do enquadramento da Bluepharma, da sua evolução histórica e de projetos futuros, por parte do Dr. Paulo Barradas Rebelo, Presidente do Conselho de Administração. Do meu ponto de vista, esta apresentação foi crucial na obtenção de uma visão global e integrada da empresa.

### **I.1.2. Visita às instalações da Bluepharma**

A visita guiada à Fabricação, à Embalagem, ao Desenvolvimento Analítico e Galénico, ao Controlo de Qualidade e ao Armazém, permitiu-me conhecer o trabalho desenvolvido em cada um dos departamentos. Desta forma, tive a possibilidade de fazer a interligação entre os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do MICF e a prática profissional do farmacêutico na Indústria Farmacêutica.

### **I.1.3. Sessões de formação interna**

Na fase inicial do meu estágio curricular, recebi formação interna, de carácter predominantemente introdutório, no âmbito do Sistema de Gestão Integrado. Esta formação centrou-se na apresentação das normas relativas à Qualidade (ISO 9001), a *Good manufacturing practices (GMPs)*, à Segurança no Trabalho e no Ambiente (ISO 14001) e à Investigação, Desenvolvimento e Inovação (NP 4456 e NP 4457). Recebi, ainda, formação no âmbito do Sistema de Gestão Documental (*Ennov Doc*) e de Processos (*Ennov Process*). A criação de uma conta de *e-mail* Bluepharma e de uma conta de utilizador, no sistema informático, aliada aos conhecimentos adquiridos nesta formação, permitiu-me consultar os procedimentos analíticos utilizados no Laboratório de Microbiologia, presentes na plataforma *Ennov Doc*. Além da formação de carácter introdutório, tive formação, de carácter mais específico, sobre as atividades desenvolvidas em alguns departamentos, nomeadamente no departamento dos Assuntos Regulamentares, da Farmacovigilância e do Desenvolvimento de Negócio. As sessões de formação iniciais, a que tive o privilégio de assistir, foram determinantes na minha integração, uma vez que me permitiram conhecer a política da empresa e a metodologia de trabalho a adotar.

Ao longo do meu estágio, fui recebendo formação teórica e prática, sobre o Controlo de Qualidade Microbiológico, o que me possibilitou a aquisição das competências necessárias à execução das atividades desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia.

#### **1.1.4. Equipa do Laboratório de Microbiologia**

Um dos pontos mais positivos, da experiência que tive na Bluepharma, foi a excelente integração que a equipa do Laboratório de Microbiologia me proporcionou. A contextualização prévia das atividades desenvolvidas no laboratório, a disponibilidade total para me ensinar, o acompanhamento constante e a confiança que depositaram em mim para desenvolver as várias tarefas, permitiu-me enriquecer os meus conhecimentos na área da Microbiologia. Consequentemente melhorei a minha prática laboratorial e adquiri experiência profissional, que será essencial para as minhas perspetivas profissionais futuras.



**Figura 1** – Equipa do Laboratório de Microbiologia do departamento do Controlo de Qualidade.

#### **1.1.5. Instalações e boas práticas de laboratório**

As instalações do Laboratório de Microbiologia incluem uma antecâmara, uma sala de preparação de meios de cultura, uma sala de manipulação e incubação de amostras e uma sala de lavagem do material. Este laboratório possui, ainda, um sistema de controlo de temperatura, humidade e pressão, cujos limites estabelecidos obedecem às *Good Laboratory Practices (GLPs)*, operações definidas por sala e um circuito unidirecional de materiais. Desta forma, neste estágio, tive a oportunidade de contactar com um laboratório, que se encontra organizado de acordo com as GLPs.

No Laboratório de Microbiologia são manipulados materiais contaminados e microrganismos patogénicos, o que implica a instituição de medidas que minimizem o risco da sua disseminação para as áreas adjacentes. Estas medidas incluem a utilização exclusiva de

uma bata bege no interior do Laboratório de Microbiologia, que difere da bata de cor branca utilizada nos restantes laboratórios da empresa. O laboratório inclui, também, a manutenção de uma pressão negativa, relativamente às áreas adjacentes, e um diferencial de pressão decrescente, nas várias salas do laboratório. A avaliação da contaminação microbiana de amostras farmacêuticas, efetuada no laboratório, exige a manutenção de um ambiente assético, com vista à garantia da ausência de contaminações externas das amostras. Esta exigência obriga à execução de procedimentos de limpeza, desinfeção e higiene, que se encontram de acordo com as *GLPs*.

Um dos pontos fortes do meu estágio foi a execução das ações preventivas de contaminação, anteriormente descritas. Deste modo, tive contacto com a vertente da Segurança associada ao Controlo de Qualidade Microbiológico, o que é uma mais-valia para o meu futuro, enquanto profissional.

#### **1.1.6. Regulamentação do Controlo de Qualidade da Indústria Farmacêutica**

A Bluepharma exporta uma grande percentagem das preparações farmacêuticas, resultantes da sua atividade industrial, para o mercado Europeu e Americano. A aquisição de preparações farmacêuticas por parte destes dois mercados impõe a prévia realização de ensaios de Controlo de Qualidade, que garantam o cumprimento dos requisitos exigidos pelas farmacopeias de referência, dos mercados em causa.

O meu estágio iniciou-se com a consulta e interpretação dos capítulos da Ph. Eur. e da USP, com o objetivo de adquirir os conhecimentos necessários à realização dos ensaios de Controlo de Qualidade Microbiológico, que, posteriormente, vim a executar. Tive, assim, a possibilidade de compreender as bases legais e científicas do Controlo de Qualidade da Indústria Farmacêutica.

#### **1.1.7. Utilização dos equipamentos do Laboratório de Microbiologia**

Consultei e interpretei o procedimento de utilização dos equipamentos existentes no laboratório, nomeadamente do autoclave, das balanças analíticas e de precisão, da sonda de temperatura do banho de água e do potenciómetro. O conhecimento que adquiri a partir da leitura do modo de funcionamento dos diferentes equipamentos foi fundamental, na medida em que me forneceu as bases necessárias à realização das tarefas relacionadas com os equipamentos.

Executei, com a supervisão de um analista, a calibração interna diária das balanças e do potenciómetro. Após a calibração interna diária dos equipamentos, anteriormente

referidos, fazia a sua verificação operacional. As balanças são verificadas através da pesagem de dois pesos aferidos. O potenciómetro, por sua vez, é verificado através da leitura do valor de pH de uma solução tampão.

#### **1.1.8. Preparação e controlo de meios de cultura**

Uma das tarefas realizada no Laboratório de Microbiologia é a preparação de meios de cultura, sob a forma de caldos, geloses e soluções. Considerei a observação da execução do procedimento de preparação de meios de cultura, a partir de meios desidratados, um ponto forte do meu estágio, uma vez que até à data não tinha conhecimento deste procedimento.

Após a preparação de meios de cultura é necessário avaliar as suas propriedades nutritivas, seletivas e de esterilidade.

O ensaio das propriedades nutritivas e seletivas do meio é realizado através da avaliação do crescimento dos microrganismos, no meio a testar. Estes microrganismos são adquiridos sob a forma de culturas liofilizadas, o que exige a sua prévia revivificação. Posteriormente, é preparado um inóculo, a partir das colónias isoladas, e adicionado um determinado volume do mesmo aos meios de cultura a serem controlados. Paralelamente é efetuada uma avaliação com um controlo positivo, isto é, com um lote de meio de cultura previamente controlado e aprovado. O controlo positivo tem como objetivo determinar o número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) que se espera obter nos meios de cultura a controlar <sup>(7,8)</sup>.

O ensaio de esterilidade possui a finalidade de avaliar a eficácia da esterilização do meio de cultura, nas condições de tempo e temperatura descritas na Ph. Eur. e na USP <sup>(7,8)</sup>.

A oportunidade de executar o procedimento do controlo das propriedades nutritivas, seletivas e de esterilidade dos meios de cultura, preparados internamente, com a supervisão de um analista, foi crucial no desenvolvimento de competências prático-laboratoriais.

#### **1.1.9. Procedimento de amostragem**

A possibilidade de acompanhar a equipa de Amostragem do Controlo de Qualidade permitiu-me conhecer o procedimento de colheita de amostras para avaliação da contaminação microbiana. A colheita das amostras é efetuada na zona superior do recipiente onde se encontram armazenadas, uma vez que esta zona apresenta uma maior suscetibilidade de contaminação, por se encontrar em contacto com o ar das salas limpas da Fabricação.

#### **1.1.10. Validação de métodos analíticos de avaliação da contaminação microbiana**

Os procedimentos analíticos de avaliação da contaminação microbiana exigem uma prévia validação interna. O princípio da validação de métodos assenta na contaminação da amostra em estudo, com estirpes de microrganismos padrão, de forma a garantir que o procedimento analítico possui a capacidade de detetar possíveis contaminações microbiológicas.

A validação de métodos testa diferentes estratégias de análise, mais especificamente o método da sementeira em placa e o método de filtração por membrana. No método da sementeira em placa são testadas diferentes diluições da amostra (1:10, 1:100 e 1:1000). O objetivo de testar várias diluições de amostra é aumentar a disponibilidade de nutrientes provenientes do meio de cultura disponível, compensando a possível ação inibitória do produto testado, favorecendo, assim, o crescimento dos microrganismos. O método de filtração por membrana apenas é utilizado quando nenhuma das diluições anteriormente descritas permite observar o crescimento dos microrganismos em presença de produto. Este método visa a eliminação de possíveis substâncias com propriedades inibitórias do crescimento dos microrganismos, presentes na preparação farmacêutica. Em ambos os métodos é também preparado um controlo positivo e um controlo negativo. O controlo positivo visa a garantia da viabilidade dos microrganismos padrão utilizados, bem como das propriedades nutritivas e seletivas do meio de cultura, sendo constituído pela suspensão da estirpe de microrganismo e pelo meio de cultura. O controlo negativo é formado apenas pelo meio de cultura, de modo a garantir que a contaminação detetada e presente é apenas a que foi introduzida no processo de validação <sup>(5-8)</sup>.

Encaro a observação e a participação na validação interna de métodos analíticos como um ponto forte do meu estágio. Deste modo, tive a possibilidade de compreender a razão das diferenças existentes entre os procedimentos analíticos de avaliação da contaminação microbiana, das diferentes amostras farmacêuticas.

#### **1.1.11. Avaliação da contaminação microbiana de amostras farmacêuticas**

A análise microbiológica inclui parâmetros de carácter quantitativo e qualitativo. Os parâmetros quantitativos obrigam à realização de ensaios microbiológicos de enumeração, mais especificamente a pesquisa do TAMC e do TYMC, através do método de sementeira em placa ou de filtração por membrana <sup>(5,6)</sup>. Por sua vez, os parâmetros qualitativos, incluem

a realização do ensaio de pesquisa de microrganismos específicos, de acordo com as especificações descritas nas monografias da Ph. Eur. e USP <sup>(7,8)</sup>.

Executei de forma autónoma, com a supervisão de um analista, o procedimento de avaliação da contaminação microbiana de matérias-primas, produto em *holding time*, produto semi-acabado, produto acabado e de preparações farmacêuticas em desenvolvimento galénico e analítico (amostras de lotes piloto e de estudos de estabilidade para as zonas climáticas I, II, III e IV). Os procedimentos utilizados na avaliação dos parâmetros anteriormente referidos eram do meu conhecimento, uma vez que foram lecionados nas aulas teóricas e práticas de Microbiologia Geral e de Bacteriologia e Análises Bacteriológicas, do MICF.

#### **1.1.12. Avaliação da qualidade da água purificada**

A água purificada é uma matéria-prima de extrema importância, uma vez que é utilizada na produção e na análise da maioria das preparações farmacêuticas. A análise microbiológica da água purificada inclui apenas parâmetros de carácter quantitativo, mais especificamente, a pesquisa de microrganismos totais, segundo o método de filtração por membrana. O procedimento inicia-se com a filtração de 5mL de cada amostra de água purificada, numa câmara de fluxo laminar horizontal, recorrendo a uma rampa de filtração e a uma membrana de tamanho de poro 0,45 µm estéril. Posteriormente, a membrana é incubada no agar R2A, durante 5-7 dias, a 30-35°C. Este meio de cultura é nutritivo e não seletivo, possui um elevado teor em água e um baixo teor em nutrientes. As particularidades anteriormente descritas, em combinação com um tempo de incubação prolongado, permitem a deteção dos microrganismos característicos dos sistemas de água purificada, uma vez que simulam as condições adversas encontradas neste tipo de sistemas <sup>(9,10)</sup>.

Executei de forma autónoma, com a supervisão de um analista, o procedimento anteriormente descrito. Uma vez que o plano de estudos das aulas práticas de Microbiologia Geral contempla a realização de análises à água, este procedimento era já por mim conhecido. Por esta razão, considero que foi muito vantajoso ter tido, novamente, a oportunidade de o executar e, assim, melhorar a técnica laboratorial de filtração por membrana.

#### **1.1.13. Avaliação da contaminação microbiana do ar**

O ar das salas limpas das áreas de Fabricação e Embalamento é uma das principais fontes de contaminação dos produtos farmacêuticos, sendo, por isso, fundamental efetuar a

sua monitorização microbiológica (4). A determinação do teor de microrganismos no ar das salas limpas inclui uma determinação semi-quantitativa e uma determinação quantitativa. A determinação semi-quantitativa é obtida através do método de sedimentação em placas, enquanto a determinação quantitativa é obtida através do método de impacto. O método de sedimentação em placas consiste na exposição ao ar de placas de Agar de Peptona de Caseína e de Agar *Sabouraud-Dextrose-Cloranfenicol*, com o objetivo de se efetuar a contagem do TAMC e do TYMC, respetivamente. Por sua vez, o método de impacto é executado com recurso ao equipamento *Reuter Centrifugal Sampler (RCS)*. Este equipamento colhe um volume conhecido de ar e, posteriormente, por centrifugação semeia os microrganismos em tiras de Agar de Peptona de Caseína e Soja e de Agar *Sabouraud-Dextrose-Cloranfenicol*. Posteriormente, as placas e tiras que visam a determinação do TAMC são incubadas a 30-35°C, durante um período de 3 a 5 dias, enquanto as placas e tiras utilizadas para a enumeração do TYMC são incubadas a 20-25°C, durante um período de 5 a 7 dias <sup>(11)</sup>.

Acompanhei o procedimento de avaliação da contaminação microbiana do ar das salas limpas, tendo tido, assim, a possibilidade de aprofundar os meus conhecimentos sobre a monitorização microbiológica. E, igualmente, a oportunidade de observar, uma vez mais, as operações da Fabricação e Embalamento realizadas nas salas limpas.

## **I.2. Pontos Fracos**

### **I.2.1. Análise microbiológica através de métodos convencionais**

A análise microbiológica efetuada no Laboratório de Microbiologia da Bluepharma, apenas inclui a pesquisa de parâmetros de carácter quantitativo e qualitativo, obtidos através de métodos fenotípicos convencionais. A impossibilidade de executar análises microbiológicas segundo os mais recentes métodos moleculares de pesquisa e identificação de microrganismos limitou-me a aquisição de competências laboratoriais.

### **I.2.2. Avaliação microbiológica exclusiva de comprimidos e cápsulas**

A atividade industrial da Bluepharma concentra a sua produção nas preparações não aquosas para uso oral, mais especificamente, em comprimidos e cápsulas. Deste modo, não tive a oportunidade de contactar com os procedimentos de avaliação microbiológica dos restantes produtos farmacêuticos, ou seja, dos estéreis e de não estéreis de uso rectal, vaginal, nasal, auricular, cutâneo e transdérmico.

### **I.3. Oportunidades**

#### **I.3.1. Experiência profissional em Indústria Farmacêutica**

A parceria entre a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e a Bluepharma permitiu-me conhecer o papel do farmacêutico na Indústria Farmacêutica e os departamentos em que pode ser inserido, pelas suas capacidades e competências. Esta parceria deu-me, ainda, a oportunidade de desenvolver uma das atividades integrantes do ato farmacêutico, mais especificamente, o Controlo de Qualidade dos Medicamentos em Laboratório de Controlo de Qualidade <sup>(12)</sup>.

### **I.4. Ameaças**

#### **I.4.1. Duração do estágio em Indústria Farmacêutica**

A ausência de atribuição de *European Credit Transfer System* (ECTS) ao estágio em Indústria Farmacêutica limitou a sua duração. A curta duração do estágio restringiu o contributo do trabalho por mim desenvolvido para a empresa, uma vez que, após a fase de adaptação e de aquisição de conhecimentos, o período de estágio terminou. A proposta de um novo plano de estudos do MICEF, que apresente um estágio curricular com uma duração superior a seis meses, de modo a incluir as diferentes vertentes integrantes do ato farmacêutico, além da Farmácia Comunitária e da Farmácia Hospitalar, seria uma estratégia viável de modo a aumentar a duração do estágio em Indústria Farmacêutica.

## 2. Caso Prático

### 2.1. Avaliação da contaminação microbiana do comprimido revestido Blue 5mg

O Blue 5mg é um comprimido revestido, sendo, por isso, classificado como uma preparação farmacêutica não estéril. Segundo as especificidades da Ph. Eur. e da USP, os critérios de análise microbiológica, tendo em conta a classe do fármaco e a sua via de administração, incluem ensaios microbiológicos de enumeração (determinação do TAMC e TYMC) e ensaios de pesquisa de microrganismos específicos.

O Blue é classificado como uma preparação não aquosa para uso oral, pelo que os critérios de aceitação dos resultados da avaliação da contaminação microbiana especificam um limite numérico máximo de  $10^3$  UFC/g ou mL de produto para o TAMC e de  $10^2$  UFC/g ou mL de produto para o TYMC. Relativamente à pesquisa de microrganismos específicos, obrigam à demonstração da ausência de *E. coli* por g ou mL de produto <sup>(4)</sup>.

#### 2.1.1. Ensaio microbiológico de enumeração: determinação do TAMC e TYMC

A preparação farmacêutica Blue é solúvel em meio aquoso, pelo que, de acordo com as especificidades da Ph. Eur. e da USP., dissolvem-se 10 g da amostra em 100 mL de Caldo de Peptona Tamponado com Cloreto de Sódio pH 7.0.

Posteriormente, efetua-se uma diluição da amostra, com o objetivo de aumentar a quantidade de meio de cultura, disponibilizando, assim, um maior teor de nutrientes aos possíveis microrganismos contaminantes, de modo a favorecer a sua deteção. A diluição é efetuada de acordo com o método previamente validado, sendo, neste caso, preparada uma diluição de 1:10. Assim, transferem-se 10 mL da solução anteriormente preparada para 100mL de Caldo de Peptona Tamponada com Cloreto de Sódio pH 7.0.

A quantificação dos microrganismos é efetuada através do método da sementeira em placa, em profundidade. A determinação do TAMC implica semear 1 mL da diluição, anteriormente descrita, em duas placas de Agar de Peptona de Caseína e Soja. Por sua vez, a determinação do TYMC implica semear 1 mL em duas placas de Agar Sabouraud-Dextrose. As placas que visam a determinação do TAMC são incubadas a 30-35°C, durante um período de 3 a 5 dias, enquanto as placas utilizadas para a enumeração do TYMC são incubadas a 20-25°C, durante um período de 5 a 7 dias <sup>(5,6)</sup>.

**Tabela I** - Resultados do TAMC e TYMC para a amostra do Blue testado.

Ensaio	Diluição	UFC/placa	UFC/g
TAMC	1:100	0	<5
TAMC	1:100	0	<5
TYMC	1:100	0	<5
TYMC	1:100	0	<5

**Legenda:** Os resultados da determinação do TAMC e TYMC demonstram 0 UFC por placa, o que se traduz numa contaminação inferior a 5 UFC/g de amostra do Blue testado.

Os critérios de aceitação dos resultados da avaliação da contaminação microbiana especificam um limite numérico máximo de  $10^3$  UFC/g para o TAMC e de  $10^2$  UFC/g para o TYMC, como referido anteriormente. Deste modo, pode concluir-se que o Blue testado se encontra em conformidade com as especificidades da Ph. Eur. e da USP, uma vez que a contaminação é inferior a 5 UFC/g de amostra do Blue testado <sup>(2,3)</sup>.

### 2.1.2. Pesquisa de microrganismos específicos: ausência de *E. coli*

A pesquisa de *E. coli* inicia-se com a dissolução de 10 g da amostra em 100 mL de Caldo de Peptona Tamponado com Cloreto de Sódio pH 7.0, tendo este a função de diluente.

Posteriormente, transferem-se 10 mL da solução preparada anteriormente para 100 mL de Caldo de Peptona de Caseína e Soja. O meio referido é um meio de enriquecimento, que tem como função exponenciar o crescimento dos possíveis microrganismos contaminantes. Seguidamente, procede-se à incubação da solução a 30-35°C, durante 18 a 24 horas.

Após a incubação, transfere-se 1 mL da solução anterior para 100 mL de Caldo de MacConkey. De seguida, efetua-se uma nova incubação a 42-44°C, durante 24 a 48 horas. O Caldo de MacConkey é um meio diferencial, utilizado para detetar a presença de bactérias Gram negativas fermentadoras de lactose, como é o exemplo de *E. coli*. Na presença de microrganismos fermentadores de lactose ocorre acidificação do meio, sendo possível observar a alteração da cor do meio, de vermelho para amarelo.

No entanto, a não alteração de coloração não implica a conformidade do produto quanto à ausência de *E. coli*, uma vez que a sua ausência só pode ser confirmada depois da subcultura em Agar de MacConkey. Por esta razão, faz-se uma subcultura em duas placas de Agar de MacConkey e incuba-se a 30-35°C, durante 18 a 72 horas. O crescimento de

colónias indica a possível presença de *E. coli*, que apenas é confirmada através da realização de ensaios de identificação <sup>(7,8)</sup>.

**Tabela 2** - Resultados da pesquisa de *E. coli* para a amostra do Blue testado.

Ensaio	Resultado
Pesquisa de <i>E. coli</i>	Ausência de <i>E. coli</i> por g produto

**Legenda:** Os resultados pesquisa de *E.coli* demonstram a ausência de *E.coli* por grama de amostra do Blue testado, pelo que se encontram em conformidade com as especificidades da Ph. Eur. e da USP.

Os critérios de aceitação dos resultados da avaliação da contaminação microbiana obrigam à demonstração da ausência de *E. coli* por g ou mL de produto. Deste modo, pode concluir-se que o Blue testado se encontra em conformidade com as especificidades da Ph. Eur. e da USP, uma vez que foi demonstrada a ausência de *E. coli* por g de produto <sup>(2,3)</sup>.

## Conclusão

A realização do Estágio Curricular na Bluepharma permitiu-me observar o dia-a-dia do farmacêutico na Indústria Farmacêutica e adquirir uma noção real do seu papel nesta área de atividade. Tive a possibilidade de confirmar que o plano de estudos do MIF me proporcionou capacidades e competências, de enorme abrangência e multidisciplinaridade, possibilitando-me, assim, a inserção em vários departamentos da Indústria Farmacêutica.

A centralização do meu estágio curricular no departamento do Controlo de Qualidade, no Laboratório de Microbiologia, permitiu-me integrar uma equipa extremamente competente e empenhada. Tive, assim, o privilégio de receber o conhecimento necessário à realização das principais atividades analíticas desenvolvidas no laboratório e o apoio necessário para as executar. Por todas as razões apresentadas ao longo do relatório, posso afirmar que esta experiência me proporcionou as condições necessárias para enriquecer os meus conhecimentos teóricos microbiológicos, melhorar a minha prática laboratorial e adquirir experiência profissional, que será uma mais-valia para o meu futuro.

O Estágio Curricular na Bluepharma possibilitou-me, ainda, adquirir sentido de responsabilidade, valorizar os meus conhecimentos e capacidades para executar procedimentos e técnicas microbiológicas, e acima de tudo, ter confiança nos resultados obtidos.

Posso, assim, concluir que o objetivo do estágio curricular foi cumprido, pois, contribuiu para o meu crescimento científico, profissional e pessoal.

## Referências Bibliográficas

1. BLUEPHARMA (2017) - **Quem somos**. Acedido em 26 de fevereiro de 2017. Disponível em <http://www.bluepharma.pt./about-us.php>.
2. COUNCIL OF EUROPE - **5.1.4 Microbiological quality of nonsterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use**. European Pharmacopoeia 9.0. Strasbourg: EDQM, 2017. ISBN: 978-9287181336.
3. USP - **Chapter <1111> Microbiological Examination of Nonsterile Products: Acceptance Criteria for Pharmaceutical Preparations and Substances for Pharmaceutical Use**. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. Rockville: The United States Convention, 2016. ISBN: 978-3769265606.
4. USP - **Chapter <1115> Bioburden Control of Nonsteril Drug Substances and Products**. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. Rockville: The United States Convention, 2016. ISBN: 978-3769265606.
5. COUNCIL OF EUROPE - **2.6.12. Microbiological Examination of Non-sterile Products: Microbial Enumeration Tests**. European Pharmacopoeia 9.0. Strasbourg: EDQM, 2017. ISBN: 978-9287181336.
6. USP - **Chapter <61> Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests**. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. Rockville: The United States Convention, 2016. ISBN: 978-3769265606.
7. COUNCIL OF EUROPE - **2.6.13. Microbiological Examination of Non-sterile Products: Test for Specified Micro-organisms**. European Pharmacopoeia 9.0. Strasbourg: EDQM, 2017. ISBN: 978-9287181336.
8. USP - **Chapter <62> Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms**. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. Rockville: The United States Convention, 2016. ISBN: 978-3769265606.
9. COUNCIL OF EUROPE - **Water Purified Monograph**. European Pharmacopoeia 9.0. Strasbourg: EDQM, 2017. ISBN: 978-9287181336.
10. USP - **Chapter <1231> Water for Pharmaceutical Purposes**. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. Rockville: The United States Convention, 2016. ISBN: 978-3769265606.

**11. USP - Chapter <1116> Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments.** United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. Rockville: The United States Convention, 2016. ISBN: 978-3769265606.

**12. Lei nº 131/2015 de 4 de setembro.** Diário da República, 1.ª série - N.º 173. Assembleia da República.

## CAPÍTULO 2

### Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária



Farmácia Gaspar

## **Lista de Abreviaturas**

**DCI** - Denominação Comum Internacional

**EDP-Sã Vida** - Eletricidade De Portugal-Sã Vida

**FG** - Farmácia Gaspar

**MICF** - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**MNSRM** - Medicamento Não Sujeito a Receita médica

**MSRM** - Medicamento Sujeito a Receita Médica

**SAMS** - Serviços Assistência Médico Sociais

**SNS** - Serviço Nacional de Saúde

**SS-CGD** - Serviços Sociais da Caixa Geral de Depósitos

## Introdução

O presente relatório foi elaborado no âmbito do Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), na área da Farmácia Comunitária. O estágio decorreu na Farmácia Gaspar (FG), sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Joana Coragem, entre 10 de abril de 2017 e 21 de julho de 2017.

A FG é uma farmácia comunitária, localizada na Rua Carlos Seixas, em Coimbra. É um espaço com 33 anos de existência que se caracteriza por ser reconhecido pelos seus utentes como a sua farmácia de confiança.

O principal objetivo da FG é prestar um serviço de excelência, com um atendimento personalizado para cada utente. Deste modo, a equipa trabalha com simpatia, dedicação e profissionalismo, tendo sempre como foco o utente.

A sua atividade centra-se no cuidado do doente através da cedência de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), da indicação de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) e outros produtos de saúde, da preparação de medicamentos manipulados, do seguimento farmacoterapêutico, da farmacovigilância e da educação para a saúde, com o objetivo de prevenir a doença e promover a saúde do utente <sup>(1)</sup>.

A informação da farmácia é gerida com base no sistema informático Sifarma 2000<sup>®</sup>. Este sistema permite fazer a gestão de *stocks*, a gestão e a receção de encomendas e proporciona um melhor atendimento ao balcão, disponibilizando informação sobre o utente, desde a sua primeira visita à farmácia, e sobre o medicamento a ser dispensado.

# **I. Análise SWOT**

## **I.1. Pontos Fortes**

### **I.1.1. Aprendizagem gradual durante o estágio**

Um dos pontos fortes do meu estágio foi receber formação sobre as diversas atividades realizadas na farmácia. A aprendizagem gradual foi fundamental, tendo em conta a dificuldade da transição da faculdade para a realidade da prática farmacêutica na farmácia comunitária.

O meu estágio iniciou-se com a receção e entrada de encomendas, uma atividade de retaguarda, no entanto, imprescindível para evitar falhas no momento do atendimento, uma vez que garante uma correta gestão de stocks, controlo de prazos de validade e preço dos medicamentos. Esta atividade também me permitiu associar a denominação comum internacional (DCI) ao nome comercial dos medicamentos e, ainda, pesquisar informação científica sobre estes, nomeadamente, a indicação terapêutica e a posologia, indispensáveis para disponibilizar um bom atendimento aos utentes. Após a receção e entrada de encomendas, procedia ao armazenamento e acondicionamento dos medicamentos e outros produtos de saúde, de acordo com as Boas Práticas, com o objetivo de conhecer a sua localização na farmácia e, assim, preparar-me para o atendimento.

Simultaneamente, fui acompanhando as tarefas realizadas por cada profissional, que comigo partilhou os seus conhecimentos, designadamente, o atendimento ao balcão, a conferência do receituário, a preparação de manipulados e a determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos. O facto de ter acompanhado as suas tarefas, permitiu-me adquirir os conhecimentos necessários à realização das atividades, que, numa fase mais tardia, vim a executar de forma autónoma. Deste modo, após a fase de integração, iniciei o atendimento ao balcão, com supervisão farmacêutica, a qual foi crucial sempre que necessitei de auxílio. A equipa da FG teve um papel determinante nesta minha fase de aprendizagem, colaborando, sempre que necessário, na resolução do caso junto do utente e, posteriormente, dando-me uma explicação com maior detalhe e rigor científico.

### **I.1.2. Equipa da Farmácia Gaspar**

Um dos pontos mais positivos da experiência que tive na FG foi a excelente integração que a equipa me proporcionou, fazendo com que o meu processo de adaptação e aprendizagem tenha sido muito proveitoso.

A contextualização prévia das atividades desenvolvidas na farmácia e, o facto de ter acompanhado as tarefas realizadas por cada farmacêutico, que comigo partilhou os seus conhecimentos e a sua experiência, permitiu-me adquirir os alicerces necessários para o meu futuro, enquanto farmacêutica.

Destaco, ainda, a disponibilidade total da equipa para me ensinar, nos períodos de menor movimento da farmácia, revendo comigo alguns conceitos relacionados com a prática clínica, de enorme relevância no aconselhamento farmacêutico.



**Figura 1** - Equipa da Farmácia Gaspar.

### **1.1.3. Localização da Farmácia Gaspar**

A FG localiza-se na rua Carlos Seixas, encontrando-se, assim, numa zona de elevada densidade habitacional. Como consequência, os seus utentes são, essencialmente, vizinhos da farmácia, podendo considerar-se uma “farmácia de bairro”. Deste modo, a maioria dos utentes são fidelizados e demonstram uma enorme confiança na equipa da farmácia. Encaro a fidelização como um ponto forte do meu estágio, uma vez que me permitiu criar ligação com um número considerável de utentes devido à elevada frequência com que se deslocaram à farmácia. Neste âmbito, tive a possibilidade de observar e participar no acompanhamento farmacoterapêutico de alguns doentes crónicos regulares e no esclarecimento de dúvidas sobre alterações na medicação, após consultas médicas.

É, ainda, importante referir que a farmácia se localiza nas proximidades da Clínica Dentária *DentalHouse* e do Centro de Saúde Norton de Matos. A proximidade à Clínica Dentária deu-me a oportunidade de contactar com uma enorme diversidade de produtos de higiene, cuidado e tratamento buco-dentário. Por sua vez, a proximidade ao Centro de Saúde é responsável pela elevada afluência de utentes com receita médica. Assim, tive a

possibilidade de aprender a fazer o atendimento e conferência de receitas sem papel, eletrónicas e manuais.

#### **1.1.4. Receituário**

Apesar das receitas eletrónicas e manuais terem caído em desuso, após a obrigatoriedade da introdução da receita sem papel <sup>(2)</sup>, tive a oportunidade de contactar com estas, uma vez que ainda são relativamente frequentes nesta farmácia. Encaro a afluência de utentes com receitas eletrónicas e manuais como um ponto forte, uma vez que me permitiu ter contato com questões pouco abordadas no MICF, como os regimes de comparticipação e respetivos sistemas complementares. Nestas receitas, contrariamente ao que sucede com as receitas sem papel, em que a comparticipação é introduzida automaticamente, os regimes de comparticipação têm que ser introduzidos no sistema informático durante o atendimento, pelo farmacêutico.

Tive, assim, a possibilidade de me familiarizar com os regimes excecionais de comparticipação de alguns medicamentos sujeitos a legislação específica. Nestes medicamentos a comparticipação é alterada, caso o médico prescriptor faça referência ao despacho pelo qual estão abrangidos, designadamente o diploma do Lúpus, da Psoríase, da doença de *Alzheimer*, da doença de *Crohn*, entre outros <sup>(3)</sup>. Tive, ainda, a oportunidade de contactar com os organismos de complementaridade do Serviço Nacional de Saúde (SNS), nomeadamente a Eletricidade De Portugal-Sã Vida (EDP-Sã Vida), Serviços Assistência Médico-Sociais (SAMS), os Serviços Sociais da Caixa Geral de Depósitos (SS-CGD), entre outros.

#### **1.1.5. Organização dos medicamentos**

Na FG os medicamentos encontram-se separados em duas classes: MSRM e MNSRM. Dentro de cada uma das classes, encontram-se organizados por forma farmacêutica e, dentro da forma farmacêutica, por ordem alfabética do nome comercial e do DCI, no caso dos medicamentos de marca e dos genéricos, respetivamente.

A organização dos medicamentos na FG foi um ponto forte do meu estágio curricular, uma vez que a separação dos medicamentos em MSRM E MNSRM foi, essencial, para os distinguir. Deste modo, nos casos em que me foi solicitado um aconselhamento farmacêutico, tornou-se mais fácil para mim, fazer a seleção do medicamento a indicar.

### **1.1.6. Preparação de medicamentos manipulados**

A preparação de medicamentos manipulados nas farmácias tem vindo a diminuir, ao longo dos anos, como consequência do aumento dos medicamentos industrializados, dos custos associados e do tempo despendido pelo farmacêutico para a sua preparação. No entanto, por vezes, a preparação destes medicamentos torna-se necessária para satisfazer as necessidades dos utentes, nomeadamente, em casos cujas formulações pretendidas não se encontram disponíveis no mercado ou nos casos em que é necessário efetuar um ajuste posológico.

A FG é dotada de um laboratório destinado à preparação de medicamentos manipulados, pelo que tive a possibilidade de participar na preparação de alguns, designadamente na preparação da pomada de vaselina com enxofre a 6%. A pomada, anteriormente referida, possui indicação terapêutica na escabiose, uma doença infecciosa causada por *Sarcoptes scabiei* var. *hominis*, cujos principais sintomas são o prurido intenso e o aparecimento de pápulas inflamatórias. A pomada de vaselina com enxofre a 6% é um dos tratamentos mais antigos, no entanto, demonstra-se eficaz após aplicação durante três dias consecutivos <sup>(5)</sup>.

A possibilidade de participar na preparação de medicamentos manipulados permitiu-me ter contacto com a respetiva ficha de preparação. Nesta ficha são registadas as matérias-primas utilizadas, o processo de manipulação, as características da embalagem, a rotulagem, o prazo de utilização, as condições de conservação, o controlo de qualidade, o nome e morada do doente, e o nome do médico prescriptor. Permitiu-me, ainda, aprender a calcular o preço de venda dos medicamentos manipulados de acordo com a legislação em vigor <sup>(4)</sup>. Deste modo, considero que a participação na preparação de medicamentos manipulados me deu as bases necessárias para, mais tarde, puder vir a desenvolver esta tarefa.

### **1.1.7. Oferta de outros serviços farmacêuticos**

A FG destaca-se pela sua relação de proximidade com os utentes. Uma das tarefas que contribui para esta proximidade é a prestação de diversos serviços que visam monitorizar o estado saúde dos utentes, designadamente, a determinação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos (medição da tensão arterial, da glicémia e do colesterol total). Neste âmbito, a farmácia apoia os seus utentes, quer na prevenção e diagnóstico precoce de várias patologias, quer no acompanhamento farmacoterapêutico do doente crónico, já medicado, através da avaliação da efetividade e segurança da terapêutica.

A possibilidade de ter realizado estes serviços permitiu-me estabelecer um contacto mais próximo com os utentes, e assim, participar na sua educação para a saúde, através da divulgação de medidas não farmacológicas que devem ser adotadas, com o objetivo de eliminar comportamentos individuais de risco.

A FG, também, pretende implementar uma consulta farmacêutica, que permita que os utentes recebam a medicação prescrita, organizada em caixas da medicação. A consulta destina-se aos utentes polimedicados, com dificuldade na organização da sua própria medicação. A sua finalidade é colaborar na correta utilização dos medicamentos e promover a adesão à terapêutica. Neste âmbito, desenvolvi cartazes de divulgação da consulta farmacêutica, no entanto, até ao término do meu estágio não houve adesão por parte dos utentes da farmácia.

## **1.2. Pontos Fracos**

### **1.2.1. Nomes comerciais e DCI**

A formação que tive ao longo do MICEF incidiu, essencialmente, na nomenclatura por DCI, estando muito pouco familiarizada com os nomes comerciais dos medicamentos. Como consequência, uma das maiores dificuldades que senti durante o estágio, principalmente durante a fase inicial, foi efetuar a associação entre a DCI e o nome comercial do medicamento.

De modo a melhorar este ponto fraco, quer durante a receção e entrada de encomendas dos medicamentos, com o auxílio do programa informático Sifarma 2000<sup>®</sup>, quer durante o acompanhamento do atendimento realizado por cada membro da equipa, comecei a interiorizar os nomes comerciais. Posso, assim, afirmar que as atividades, anteriormente mencionadas, foram determinantes na minha preparação para o atendimento ao público, no sentido em que os utentes raramente conhecem a nomenclatura por DCI.

### **1.2.2. Dificuldades no aconselhamento farmacêutico**

No aconselhamento farmacêutico, a seleção de um MNSRM deve ter em conta a situação fisiológica do utente, problemas de saúde já diagnosticados, alergias e possíveis interações medicamentosas. O farmacêutico deverá informar o utente da dose a administrar, da frequência de administração, da duração do tratamento e de precauções que deve tomar, sempre que oportuno <sup>(1)</sup>.

A formação que tive ao longo do MICF não foi suficiente na maioria das situações em que me foi solicitado um aconselhamento farmacêutico, mais especificamente, uma indicação terapêutica e o respetivo regime posológico, para um determinado problema de saúde exposto. No entanto, a equipa da FG teve um papel preponderante nestas situações, tendo-me exemplificado o procedimento que deveria adotar, para que, em situações futuras idênticas, estivesse apta a indicar uma terapêutica apropriada ao utente.

Ao longo do estágio, tive a possibilidade de acompanhar o tipo de diálogo que os profissionais da equipa da FG estabelecem com os utentes, de modo a recolher informação sobre os diversos casos clínicos, designadamente, as questões a colocar sobre os sintomas associados ao problema de saúde e a sua duração. Após a recolha da informação, foi-me dada formação sobre o MNSRM mais indicado a ser aconselhado, em cada caso clínico.

### **1.3. Oportunidades**

#### **1.3.1. Sessões de formação externa**

Ao longo do meu estágio curricular, foi-me dada a oportunidade de assistir a formações externas promovidas por vários laboratórios, colmatando, desta forma, algumas lacunas na minha formação.

Destaco a formação, proporcionada pela *La Roche Posay*<sup>®</sup>, sobre a gama de protetores solares *Anthelios*<sup>®</sup>. Esta formação foi muito útil porque me permitiu melhorar o aconselhamento farmacêutico aos utentes da farmácia, aconselhando-lhes, com maior confiança, o protetor solar mais adequado ao seu tipo de pele.

Assisti, também, à formação “*L’oreal Cosmética Ativa*”, que se centrou na apresentação dos produtos da gama da *La Roche Posay*<sup>®</sup> e da *Vichy*<sup>®</sup>. Deste modo, tive a possibilidade de conhecer a composição dos produtos, as principais diferenças entre eles e o seu público-alvo.

A Galderma possibilitou-me a frequência de uma ação de formação sobre o esquema de tratamento da acne com os produtos *Benzac*<sup>®</sup> e *Benzacare*<sup>®</sup>, e as precauções a ter com estes produtos. Além disso, promoveu uma formação sobre técnicas de venda na farmácia.

As formações externas, anteriormente descritas, foram uma mais-valia para mim, uma vez que me permitiram adquirir novos conhecimentos, e assim, aperfeiçoar o aconselhamento farmacêutico a prestar aos utentes da farmácia durante a aquisição dos produtos.

### **1.3.2. Formação escolar “Cuidados com o Sol”**

O farmacêutico é um agente de saúde pública, cumprindo-lhe o dever de executar todas as ações de educação dirigidas à comunidade, no âmbito da promoção da saúde <sup>(6)</sup>. De acordo com este princípio, a FG visitou a escola primária Externato de João XXIII, com o objetivo de sensibilizar as crianças e promover comportamentos saudáveis e responsáveis, no âmbito dos cuidados com o sol.

Encaro esta atividade, de salvaguarda da saúde pública, como um ponto forte do meu estágio, uma vez que me foi proporcionada a oportunidade de acompanhar a FG na visita à minha antiga escola primária. Tive a possibilidade de colaborar na formação e de explicar ao público infantil, de forma dinâmica, as vantagens da utilização de proteção contra o sol.

### **1.3.3. Diferenciar a farmácia num futuro próximo**

O farmacêutico é o último profissional de saúde a contactar com o utente, sendo que o seu potencial é, por vezes, subaproveitado. Nesta perspetiva, penso que uma medida de diferenciação da farmácia, num futuro próximo, pode relacionar-se com a implementação de um serviço de informação ao utente sobre a existência de testes de diagnóstico preditivos da resposta à terapêutica.

Estes testes baseiam-se numa medicina personalizada, que se caracteriza pela prescrição de uma terapêutica otimizada a cada doente, evitando a prescrição de uma terapêutica com efeitos adversos significativos ou, mesmo, sem nenhum efeito terapêutico. Apesar destes testes serem ainda pouco implementados, existem testes já disponíveis nos Estados Unidos <sup>(7)</sup>. Deste modo, esta poderá ser uma estratégia a implementar nas farmácias, em Portugal, num futuro próximo. Neste âmbito, o farmacêutico possui o dever de informar o utente que possua uma patologia crónica ou grave, cuja terapêutica não esteja a ser eficaz, para a existência e benefícios da realização destes testes.

As enzimas do Citocromo P450 são responsáveis pelo metabolismo da grande maioria dos fármacos. Neste contexto, a variabilidade genética nestas enzimas pode influenciar a resposta dos doentes ao fármaco, pelo que a realização de um teste de diagnóstico preditivo da resposta à terapêutica, permite classificar os doentes em metabolizadores pobres, intermédios e rápidos. E, assim, auxiliar o médico a prescrever o fármaco correto, na dose correta, para o indivíduo em causa <sup>(7)</sup>.

A implementação deste serviço levaria ao aumento da confiança e do prestígio da profissão farmacêutica, por parte dos utentes.

## **I.4. Ameaças**

### **I.4.1. Duração do estágio**

Durante os meses de janeiro a março, realizei estágio curricular em indústria farmacêutica, pelo que, apenas, iniciei o estágio na FG em abril. Como consequência, o estágio em farmácia comunitária foi realizado durante o período da Primavera/Verão. Por esta razão, adquiri mais conhecimentos sobre os produtos de venda livre sazonais, mais vendidos durante o período da Primavera/Verão do que sobre os produtos sazonais da época de Outono/Inverno, uma vez que não tive possibilidade de acompanhar muitos casos em que estes fossem aconselhados. A proposta de um novo plano de estudos do MICEF, que apresente um estágio curricular com uma duração superior, seria uma estratégia viável de modo a colmatar esta ameaça à formação dos estudantes do MICEF.

## 2. Caso Prático

### 2.1. Erradicação de *Helicobacter pylori*

Uma utente, do sexo feminino, dirigiu-se à FG após consulta no Centro de Saúde Norton de Matos. Apresentou uma receita sem papel com a seguinte prescrição:

- Omeprazol, 20 mg, cápsula gastroresistente, blister de 14 unidades;
- Claritromicina, 500 mg, comprimido de libertação prolongada, blister de 7 unidades;
- Amoxicilina, 1000 mg, comprimido, blister de 16 unidades.

Após a leitura da receita, identificámos um caso clínico de erradicação de *Helicobacter pylori*. A norma da direção geral de saúde recomenda a utilização da terapia tripla, durante 10 a 14 dias <sup>(8)</sup>:

- Inibidor da bomba de prótons - dose normal indicada para cada um dos possíveis fármacos disponíveis, duas vezes por dia;
- Claritromicina – 500 mg, duas vezes por dia;
- Amoxicilina – 1 g, duas vezes por dia.

A interpretação da prescrição levou-nos a suspeitar de um possível erro de prescrição eletrónica, uma vez que a forma farmacêutica da Claritromicina prescrita era de libertação modificada, quando se pretendia uma de libertação imediata. Além disso, a embalagem prescrita possuía apenas 7 unidades, não sendo suficiente para a utente terminar o tratamento <sup>(8)</sup>.

De modo a garantir a administração de uma terapêutica correta à utente, contactou-se o médico prescriptor, uma vez que devido à localização da FG, existe uma relação de proximidade com os médicos prescritores. Concluiu-se, que, efetivamente, se tratava de um erro de prescrição eletrónica, devido a uma seleção incorreta da linha de prescrição.

Selecionei o caso clínico, anteriormente descrito, para apresentar no meu relatório porque demonstra um dos principais erros associados à prescrição eletrónica e a importância do papel ativo do farmacêutico na garantia de uma terapêutica farmacológica eficaz e segura para o utente.

## **Conclusão**

A passagem pela Farmácia Comunitária deu-me a oportunidade de conhecer o dia-a-dia do farmacêutico nesta área de atividade, tendo-me despertado para a responsabilidade do que é ser Farmacêutico.

O estágio curricular na FG permitiu-me integrar uma equipa que me transmitiu o conhecimento necessário à realização das principais atividades desenvolvidas na farmácia e o apoio necessário para as executar. E, ainda, os valores e a postura que um bom farmacêutico deve adotar no exercício da sua profissão.

Por todas as razões apresentadas ao longo do relatório, posso afirmar que esta experiência me proporcionou as condições necessárias para consolidar e aplicar toda a formação académica teórica adquirida ao longo dos últimos cinco anos. Mas, mais do que isso, preparou-me para o desafio que é responder à diversidade de situações que surgem diariamente no balcão da farmácia.

Posso, assim, concluir que o objetivo do estágio curricular foi cumprido, pois, a cada dia que passou, tive a oportunidade de evoluir tanto a nível profissional, como a nível pessoal.

## Referências Bibliográficas

1. SANTOS, H.J.; CUNHA, I.N.; COELHO, P.V.; CRUZ, P.; FARIA, R.B.G.; MARQUES, C.; GOMES, A. (2009). - **Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária**. 3ª Revisão, Conselho Nacional da Qualidade, Ordem dos Farmacêuticos.
2. Ministério da Saúde - Portaria n.º 224/2015 de 27 de julho. Diário da República: I série, N.º 144 (2015).
3. INFARMED. - **Regimes excecionais de participação**. Acedido a 03 julho 2017. Disponível em <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/regimes-excecionais-de-competicacao>
4. Ministério da Saúde - Portaria n.º 594/2004 de 2 de Junho. Diário da República n.º 129 - Série I-B (2004) 3441-3445
5. SALAVASTRU, C.M.; CHOSIDOW, O.; BOFFA, M.J.; JANIER, M.; TIPLICA, G.S.; - **European guideline for the management of scabies**. European Academy of Dermatology and Venereology. (2017).
6. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. - **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. Acedido a 14 de julho de 2017. Disponível em [http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer\\_pt/docs/Doc10740.pdf](http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/Doc10740.pdf)
7. FONSECA, F. A. P. - **Farmacogenómica**. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde. (2014).
8. DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE. - Norma n.º 036/2011 de 30/09/2011 - Supressão Ácida: Utilização dos Inibidores da Bomba de Protões e das suas Alternativas Terapêuticas. Acedido a 14 de julho de 2017. Disponível em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0362011-de-30092011.aspx>

## **CAPÍTULO 3**

### **Monografia**

**Resistência à colistina e sua disseminação: implicações em saúde pública**



## **Lista de Abreviaturas**

**BGN** - Bactérias Gram-negativo

**BGN-MR** - Bactérias Gram-negativo multi-resistentes

**CAPs** - *Cationic Antimicrobial Peptides* (Polipéptidos Catiônicos Antimicrobianos)

**CHMP** - *Committee for Medicinal Products for Human Use* (Comité de Medicamentos para Uso Humano)

**CMS** - *Sodium Colistimethate* (Colistimetato de Sódio)

**CS** - *Colistin Sulfate* (Sulfato de Colistina)

**CVMP** - *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use* (Comité de Medicamentos para Uso Veterinário)

**Dab** - 2,4-ácido diaminobutírico

**EMA** - *European Medicines Agency* (Agência Europeia do Medicamento)

**ESBLs** - *Extended spectrum beta-lactamases* (Beta-lactamases de largo espectro)

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**L-Ara4N** - 4-amino-4-desoxi-L-arabinose

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PEtN** - Fosfoetanolamina

## Lista de Figuras

**Figura 1** - Estrutura química da colistina.

**Figura 2** - Representação esquemática da regulação de genes envolvidos na resistência à colistina em *E.coli*.

**Figura 3** - Representação esquemática da regulação de genes envolvidos na resistência à colistina em *K. pneumoniae*.

**Figura 4** - Representação esquemática da regulação de genes envolvidos na resistência à colistina em *A. baumannii*.

**Figura 5** - Representação esquemática da regulação de genes envolvidos na resistência à colistina em *P. aeruginosa*.

**Figura 6** - Representação esquemática da disseminação do gene *mcr-1* envolvido na resistência à colistina em *E. coli*.

**Figura 7** - Representação esquemática das várias medidas que devem ser implementadas para evitar a disseminação da resistência à colistina de acordo com a perspectiva *One Health*.

## Introdução

A emergência e a propagação da resistência aos antimicrobianos é um dos problemas de saúde pública mais relevantes, uma vez que muitas bactérias anteriormente suscetíveis aos antibióticos usualmente utilizados deixaram de responder a esses mesmos fármacos. A resistência aos antibióticos conduz a um aumento da morbidade, da mortalidade e dos custos dos cuidados de saúde e, portanto, constitui uma necessidade urgente de atuação <sup>(1)</sup>. A resistência antimicrobiana é reconhecida como uma das mais graves ameaças globais para a saúde humana no século XXI, havendo o perigo iminente de retorno à era pré-antibiótica <sup>(2)</sup>.

Atualmente, observa-se um número crescente de infecções causadas por bactérias Gram-negativo multi-resistentes (BGN-MR), nomeadamente por *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Stenotrophomonas mallei*. Esta realidade resulta do facto de estas bactérias se apresentarem resistentes às opções terapêuticas existentes, como cefalosporinas, quinolonas e carbapenemos, e de durante as últimas duas décadas não terem sido sintetizados novos antibióticos com ação contra estas bactérias <sup>(3)</sup>.

O aparecimento de BGN-MR desencadeou um interesse renovado por uma classe de antibióticos outrora utilizada, mais especificamente pelas Polimixinas. As Polimixinas são uma classe de agentes antibacterianos constituída por cinco compostos, quimicamente distintos, nomeadamente a Polimixina A, B, C, D, e E, sendo que apenas dois destes compostos são utilizados na prática clínica, designadamente a Polimixina B e E <sup>(4, 5)</sup>. A denominação “Polimixina” provém da estirpe de *Paenibacillus polymyxa* a partir da qual são sintetizadas. A Polimixina E é o produto da fermentação da estirpe de *Paenibacillus polymyxa* subspécies *colistinus*, pelo que é também designada por colistina <sup>(6)</sup>.

A colistina começou a ser clinicamente utilizada nos anos 50, demonstrando-se eficaz no tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos, mais especificamente, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter species*, *Salmonella species*, *Shigella species* e *Haemophilus influenzae* <sup>(3)</sup>. No entanto, a notificação de reações adversas, mais concretamente de nefrotoxicidade e neurotoxicidade, associada ao aparecimento de alternativas terapêuticas mais seguras, desencadeou o declínio da sua utilização na medicina humana, a partir dos anos 80 <sup>(4)</sup>. Ao contrário do que se observou na medicina humana, o seu uso em medicina veterinária foi crescente, tendo sido utilizada com fins terapêuticos, profiláticos, metafiláticos e de promoção de crescimento nos animais destinados à produção de alimento <sup>(7)</sup>.

# I. Colistina

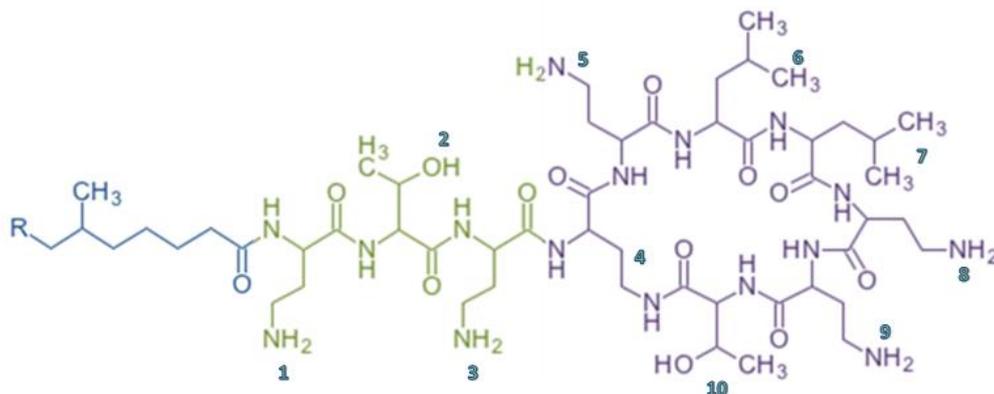
## I.1. Estrutura química

A molécula da colistina é um lipodecapeptídeo, cuja estrutura química consiste num decapeptídeo ligado a um resíduo de ácido gordo através de uma ligação alfa amida <sup>(5)</sup>.

O decapeptídeo é constituído por uma cadeia tripeptídica exocíclica e por um heptapeptídeo cíclico. As posições 1, 3, 4, 5, 8 e 9 do decapeptídeo encontram-se carregadas positivamente, devido aos grupos amina livres dos resíduos de 2,4-ácido diaminobutírico (Dab), as posições 2 e 10 contêm o aminoácido Treonina e as posições 6 e 7 apresentam o aminoácido Leucina <sup>(5)</sup>.

O resíduo de ácido gordo é variável, pelo que a colistina é uma mistura da colistina A e B. A molécula adquire a denominação de colistina A quando o resíduo de ácido gordo é o ácido 6-metiloctanóico ( $R=CH_3$ ), e de colistina B quando o resíduo é o ácido 6-metilheptanóico ( $R=H$ ) <sup>(5, 8)</sup>.

Desta forma, a colistina é uma molécula anfipática, com uma região hidrofílica atribuível aos grupos amina livres do Dab e uma região hidrofóbica atribuível ao resíduo de ácido gordo <sup>(5, 6, 9)</sup>. Na figura I está representada a sua estrutura química.



**Figura I** - Estrutura química da colistina. A colistina é um lipodecapeptídeo constituído por um heptapeptídeo cíclico (representado a roxo), e uma cadeia tripeptídica exocíclica (representada a verde) ligada a um resíduo de ácido gordo (representado a azul) através de uma ligação alfa amida. (Fonte: Adaptado de <sup>(5)</sup>).

## **I.2. Mecanismo de ação antibacteriano**

O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente da membrana externa das bactérias Gram-negativo (BGN), sendo formado por três domínios, mais especificamente, o lípido A, o domínio de ligação oligossacarídico e o antígeno O. A sua estrutura é mantida através da presença de catiões divalentes de Cálcio e Magnésio, que interagem com a sua porção aniónica <sup>(10)</sup>.

A ação bactericida da colistina inicia-se pela sua ligação ao lípido A da porção lipopolissacarídica da membrana externa das BGN. A ligação ocorre através da interação electrostática entre os grupos amina livres do Dab, carregados positivamente, e os grupos fosfato do lípido A, carregados negativamente. Esta interação desencadeia uma permuta catiónica, sendo que os catiões divalentes de Cálcio e Magnésio são substituídos pela colistina policatiónica, provocando uma alteração na estrutura do LPS. Após a inserção da colistina, mais especificamente, do ácido gordo e dos aminoácidos D-Leucina<sup>6</sup>-L-Leucina<sup>7</sup> na membrana externa ocorre um mecanismo de absorção auto promovido, que permite o acesso ao espaço periplasmático, aumentando, assim, a permeabilidade da membrana citoplasmática. Deste modo, a integridade física da bicamada fosfolipídica da membrana citoplasmática é comprometida, levando à sua disrupção com libertação do conteúdo intracelular e consequente morte celular <sup>(4, 11)</sup>.

O mecanismo de ação anteriormente descrito é o mais documentado, contudo, recentemente, foram descritos mecanismos de ação alternativos relacionados com a atividade da colistina no interior da célula. Estudos recentes demonstraram que a colistina induz a morte celular através da produção de radicais hidroxilo <sup>(12)</sup> e da inibição da enzima NADH-quinona oxidoreductase <sup>(13)</sup>.

Além da potente atividade bactericida, a colistina apresenta, também, atividade anti-endotoxina. O lípido A da molécula do LPS representa a endotoxina de BGN, pelo que, a ligação da colistina a este componente impede a sua capacidade de induzir endotoxémia, através da inibição da ativação de leucócitos e da consequente produção do fator de necrose tumoral alfa e de outras interleucinas <sup>(4, 6)</sup>.

## **I.3. Espectro de atividade antibacteriano**

O espectro de atividade antibacteriano da colistina engloba a maioria dos bacilos Gram-negativo aeróbios, excluindo *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Neisseria* spp., *Providencia* spp, *Brucella* spp., *Edwardsiella* spp., *Pseudomonas mallei* e o complexo *Burkholderia cepacia*. Por sua

vez, não inclui bactérias anaeróbias, cocos Gram-negativo, bactérias Gram-positivo e fungos <sup>(6)</sup>.

A ausência de atividade contra *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Burkholderia cepacia* e *Serratia marcescens* deve-se ao facto do seu alvo de ação, ou seja, o lípido A do LPS possuir o componente 4-amino-4-desoxi-L-arabinose (L-Ara4N) adicionado <sup>(14)</sup>, enquanto que nas bactérias Gram-positivo deve-se ao facto do componente LPS estar ausente.

Atualmente, a colistina é, essencialmente, utilizada no tratamento de infeções por BGN-MR, incluindo *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *S. maltophilia* <sup>(15)</sup>. Apesar de possuir atividade contra outras BGN, tais como *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp., *Yersinia pseudotuberculosis*, *Haemophilus influenzae* e várias espécies de micobactérias, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, não deve ser utilizada no tratamento empírico de infeções provocadas por estas bactérias <sup>(6,15)</sup>.

#### **1.4. Formas de apresentação e vias de administração**

A colistina possui duas formas de apresentação disponíveis no mercado, mais especificamente, o sulfato de colistina (CS) e o colistimetato de sódio (CMS) <sup>(3,16)</sup>.

A primeira forma da colistina surgiu sob a forma de CS, sendo passível de ser administrada por via tópica e oral. Porém, a notificação de reações adversas de nefrotoxicidade e neurotoxicidade desencadeou o estudo de modificações na sua estrutura molecular, de modo a reduzir os seus efeitos tóxicos. Como consequência dos estudos de relação estrutura-atividade, no ano de 1959, surgiu um profármaco da colistina, o CMS <sup>(3)</sup>.

A reação da colistina com formaldeído e bissulfito de sódio provoca a adição do componente  $\text{CH}_2\text{SO}_3$  aos grupos amina livres do Dab da colistina, formando, assim, o CMS. Por esta razão, o CMS é um polianião a pH fisiológico, ao contrário do CS que é um fármaco catiónico a pH fisiológico, o que o impede de possuir atividade antibacteriana, sendo, por isso, um profármaco. Esta molécula é muito instável, pelo que, a pH fisiológico é, rapidamente, hidrolisada numa mistura de compostos metilsulfonados e colistina, adquirindo, deste modo, atividade farmacológica <sup>(3)</sup>.

As vias de administração da colistina incluem a via parentérica, tópica, oral e inalatória <sup>(3,16)</sup>.

O profármaco CMS é utilizado quando se pretende uma administração por via parentérica, mais especificamente pela via intravenosa, intramuscular, intratecal ou

intraventricular. A administração intramuscular é evitada na prática clínica por ser demasiado dolorosa <sup>(16)</sup>.

O CS é passível de ser administrado por via oral e tópica. A administração por via oral é exclusiva para o tratamento de infeções intestinais por BGN, uma vez que o CS não é absorvido no trato gastrointestinal, possuindo apenas efeito bactericida local. Por sua vez, a administração por via tópica apresenta como indicação clínica o tratamento de infeções cutâneas por BGN <sup>(3,16)</sup>.

A colistina pode, ainda, ser administrada através da via inalatória, podendo recorrer-se à utilização das suas duas formas de apresentação, CS e CMS <sup>(3,16)</sup>.

**Tabela I** - Comparação das duas formas de apresentação da colistina. (Fonte: Adaptado de <sup>(17)</sup>).

	Sulfato de colistina (CS)	Colistimetato de sódio (CMS)
Obtenção	Síntese a partir de <i>Paenibacillus polymyxa</i> subsp. <i>colistinus</i>	Colistina modificada quimicamente
Atividade antimicrobiana	Molécula ativa	Profármaco
Estrutura química	Policatión	Polianião
Estabilidade	Estabilidade superior	Pouco estável
Tempo de meia vida	~4 h	~2 h
Vias de administração	Via oral, tópica e inalatória	Via parentérica e inalatória

## 1.5. Abandono do uso da colistina em medicina humana

A colistina começou a ser clinicamente utilizada nos anos 50, no entanto, a notificação de reações adversas, mais concretamente de nefrotoxicidade e neurotoxicidade, associada ao aparecimento de alternativas terapêuticas mais seguras desencadeou o declínio da sua utilização na medicina humana, a partir dos anos 80 <sup>(4)</sup>.

Os efeitos adversos reportados incluem, essencialmente, a nefrotoxicidade e a neurotoxicidade <sup>(18)</sup>.

### 1.5.1 Nefrotoxicidade

A nefrotoxicidade é o efeito adverso mais prevalente, caracterizando-se por ser reversível, diminuindo, rapidamente, após a suspensão do fármaco, na maioria dos casos <sup>(18)</sup>. A prevalência de nefrotoxicidade varia entre 0 a 53,5%, originando, assim, uma elevada

discrepância no número de casos, como consequência dos estudos existentes se basearem em diferentes definições de insuficiência renal <sup>(6, 18)</sup>.

Os fatores de risco para este efeito adverso estão relacionados com o plano terapêutico e, ainda, com as características intrínsecas ao doente. Os fatores de risco relacionados com a terapêutica incluem a sua duração, a dose administrada e a co-administração de outros fármacos suscetíveis de provocarem nefrotoxicidade, nomeadamente os anti-inflamatórios não esteróides, os aminoglicosídeos e a vancomicina. Por sua vez, os fatores intrínsecos ao doente incluem a idade avançada, a presença de doença renal pré-existente e a sua gravidade, hipoalbuminémia e hiperbilirrubinémia <sup>(6,18)</sup>.

A manifestação clínica mais comum é a diminuição da *Clearance* da Creatinina, podendo também observar-se proteinúria, glicosúria e cilindrúria <sup>(6,18)</sup>.

### **1.5.2 Neurotoxicidade**

A neurotoxicidade é um efeito adverso menos frequente do que a nefrotoxicidade, no entanto, é, igualmente, dependente da dose administrada e, reversível, diminuindo rapidamente após a suspensão do fármaco <sup>(18)</sup>.

Os fatores de risco incluem insuficiência renal, hipoxia e co-administração de relaxantes musculares, analgésicos opiáceos, anestésicos e corticosteróides <sup>(19)</sup>.

A manifestação clínica mais comum é a parestesia periférica e facial, surgindo em aproximadamente, 27% e 7,3% dos doentes tratados por via intravenosa e intramuscular, respetivamente. Outras manifestações clínicas incluem oftalmoplegia com ptose palpebral e perturbações visuais, dificuldade de deglutição, ataxia, depressão, vertigens, confusão, alucinações e convulsões. O bloqueio neuromuscular, que pode culminar em insuficiência respiratória ou apneia, é uma reação adversa classificada como rara, não havendo registo de casos há mais de 15 anos <sup>(18)</sup>.

### **1.6. Uso clínico atual**

A utilização clínica da colistina no tratamento de infeções causadas por BGN iniciou-se em 1950. A partir dos anos 80, observou-se um declínio da sua administração por via parentérica devido à notificação das reações adversas, anteriormente descritas, e ao aparecimento de agentes antibacterianos menos tóxicos. No entanto, a administração da colistina por via oral e tópica manteve-se na prática clínica em humanos, mas, essencialmente, na medicina veterinária <sup>(17)</sup>.

Entre 1990 e 2000, a utilização da colistina, através da via parentérica, foi re-introduzida nas indicações terapêuticas para o tratamento da fibrose quística provocada por BGN-MR <sup>(17)</sup>.

O aumento progressivo das infeções nosocomiais por BGN-MR, associado ao facto de as opções terapêuticas disponíveis atualmente não serem eficazes no tratamento destas infeções, desencadeou a sua re-introdução. Atualmente, a colistina é considerada a última linha de defesa contra as infeções causadas por BGN-MR, mais especificamente, por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* <sup>(17)</sup>.

### **1.6.1. Medicina humana**

Na medicina humana, a colistina sofreu um enorme declínio da sua utilização, tal como referido anteriormente, mas tem ressurgido como uma opção terapêutica no tratamento de infeções causadas por BGN-MR, para as quais existe uma lacuna terapêutica <sup>(3)</sup>.

As indicações terapêuticas da administração do CMS por via intravenosa e intramuscular incluem o tratamento de infeções nosocomiais graves por BGN-MR, nomeadamente, infeções sistémicas graves, infeções broncopulmonares em doentes com fibrose quística e pneumonias associadas à ventilação mecânica <sup>(7,16)</sup>. As vias intratecal e intraventricular são utilizadas no tratamento de infeções no sistema nervoso central, mais especificamente, meningite ou ventriculite <sup>(16)</sup>. Por sua vez, a administração do CMS através da via inalatória, apenas, possui indicação terapêutica no tratamento de infeções pulmonares crónicas por *P. aeruginosa* em doentes com fibrose quística. A utilização do CMS sob a forma de pó para solução para nebulização, não é aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA), possuindo apenas indicação clínica aprovada pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) <sup>(7,17)</sup>.

A administração do CS por via oral é utilizada no tratamento de infeções intestinais provocadas por BGN-MR, uma vez que o CS não é absorvido no trato gastrointestinal, possuindo apenas efeito bactericida local <sup>(15)</sup>. A indicação terapêutica, anteriormente referida, destina-se a doentes em estado crítico, com vista à prevenção da ocorrência de infeções sistémicas ou pulmonares, e assim, se garantir uma redução da mortalidade <sup>(9)</sup>.

O Comité de Medicamentos para Uso Humano (CHMP) autorizou a utilização da colistina em adultos, crianças e recém-nascidos, no tratamento de infeções graves provocadas por BGN-MR, nos casos clínicos cujas opções terapêuticas sejam limitadas <sup>(7)</sup>.

## **1.6.2. Medicina veterinária**

Na União Europeia, a colistina tem sido amplamente utilizada em medicina veterinária, desde a sua aprovação pela EMA, em 1950. A sua utilização iniciou-se nos anos 50 e, contrariamente, ao que se observou na medicina humana, o seu uso em medicina veterinária foi crescente <sup>(7)</sup>.

Na medicina veterinária, a colistina começou por ser utilizada com fins terapêuticos, profiláticos, metafiláticos e de promoção de crescimento nos animais destinados à produção de alimento, essencialmente em suínos, mas também em galinhas, ovinos, bovinos, caprinos e coelhos. Era administrada sob a forma de CS, através da via oral e da via tópica. A administração por via oral, através da água e da ração dos animais, tinha como indicação clínica o tratamento de infeções do trato gastrointestinal provocadas por *E.coli* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Por sua vez, a administração tópica visava o tratamento de otites externas e infeções oculares <sup>(7)</sup>.

Atualmente, devido ao surgimento de resistências a este fármaco, a EMA recomendou a utilização da colistina apenas para fins terapêuticos ou metafiláticos, em infeções entéricas causadas por *E. coli* não invasiva <sup>(7)</sup>.

## **2. Resistência à colistina**

A resistência à colistina relacionava-se com a ocorrência de mutações cromossómicas, no entanto, em novembro de 2015, observou-se o aparecimento de um mecanismo de resistência plasmídico <sup>(2)</sup>.

### **2.1. Mecanismos de resistência**

A ação bactericida da colistina inicia-se através da interação eletrostática entre os seus grupos amina livres, carregados positivamente, e os grupos fosfato do lípido A da porção lipopolissacarídica da membrana externa, carregados negativamente <sup>(4,11)</sup>. No entanto, as bactérias, perante estímulos ambientais adversos, nomeadamente a exposição a polipéptidos catiónicos antimicrobianos (CAPs), como a colistina, desenvolvem mecanismos de resistência que visam impedir a interação eletrostática <sup>(14)</sup>.

Os mecanismos de resistência à colistina em BGN devem-se, essencialmente, à modificação pós-tradução das moléculas do LPS. As modificações são desencadeadas por mutações que ocorrem no material genético bacteriano ou por estímulos ambientais, culminando na alteração da membrana bacteriana <sup>(20)</sup>.

Um dos principais mecanismos de resistência inclui a modificação do LPS, através da substituição dos grupos fosfato, carregados negativamente, por grupos de L-Ara4N e fosfoetanolamina (PEtN), carregados positivamente. A modificação do LPS através da substituição catiónica dos grupos fosfato por L-Ara4N é a mais comum, e também, a mais eficaz, uma vez que o lípido A adquire carga nula. A substituição catiónica por grupos de PEtN diminui a carga negativa de -1,5 para -1. Estas moléculas reduzem, assim, a carga resultante do LPS e conseqüentemente, impedem a sua ligação à colistina, o que se traduz no desenvolvimento de resistência antibacteriana <sup>(14)</sup>.

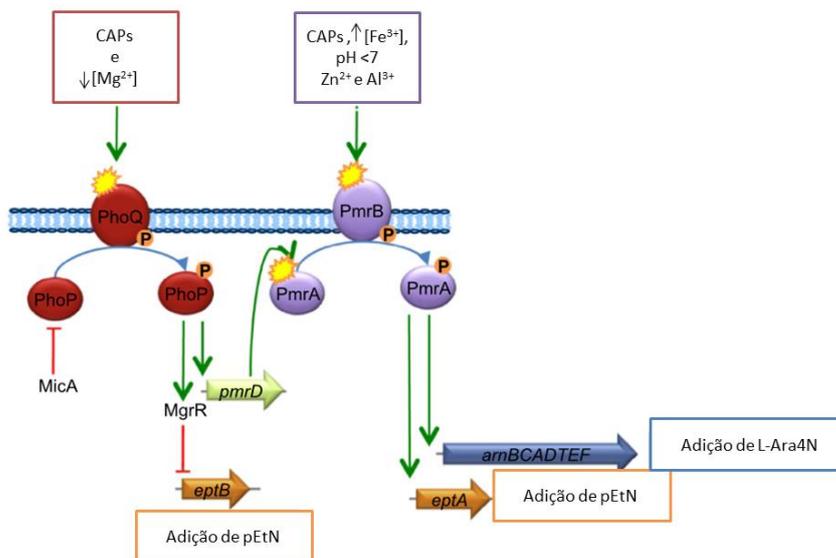
A síntese de L-Ara4N e PEtN é mediada por meio dos sistemas reguladores PmrA-PmrB e PhoP-PhoQ, cuja ativação é desencadeada por mutações específicas nos próprios sistemas ou por estímulos ambientais. Cada um destes sistemas é constituído por uma histidina cinase transmembranar (PmrB e PhoQ), que sofre auto-fosforilação sob determinados estímulos, e por um regulador de resposta citoplasmática (PmrA e PhoP), que quando fosforilado, modula a expressão dos genes alvo <sup>(20)</sup>. A ativação do sistema PmrA-PmrB desencadeia a expressão constitutiva do gene *eptA* ou *pmrC* e o operão *arnBCADTEF*, que codificam as proteínas responsáveis pela síntese e transferência de PEtN e L-Ara4N, respetivamente, para o lípido A do LPS. Por sua vez, o sistema PhoP-PhoQ ativa, indiretamente, o sistema regulador PmrA-PmrB <sup>(14,20)</sup>.

Outros mecanismos de resistência incluem a utilização de bombas de efluxo, a perda total do LPS, um aumento da expressão da proteína membranar OprH e a ativação de outros sistemas reguladores, mais especificamente CrrA-CrrB, ParR-ParS, ColR-CoS e CprR-CprS <sup>(14,20)</sup>.

Em *E.coli*, a ativação de PhoQ é desencadeada pela presença CAPs, designadamente a colistina, e por baixas concentrações de magnésio, enquanto o PmrB deteta sinais moleculares gerados pela exposição a CAPs, ao zinco, ao alumínio, a um ambiente ácido (pH <7) e a elevadas concentrações de ferro. Por sua vez, a ocorrência de mutações em PmrA, PmrB e PhoQ é, também, responsável pela ativação dos sistemas <sup>(20)</sup>. Na figura 2, a ocorrência de mutações encontra-se representada a amarelo.

A ativação do sistema PmrA-PmrB desencadeia a expressão constitutiva do gene *eptA* e do operão *arnBCADTEF*, que codificam as proteínas responsáveis pela síntese e transferência de PEtN e L-Ara4N, respetivamente, para o lípido A do LPS. O sistema PhoP-PhoQ ativa, indiretamente, o sistema regulador PmrA-PmrB, através do produto do gene *PmrD*. O RNA MgrR reprime diretamente a expressão do gene *eptB*, um gene necessário à

adição do pEtN ao núcleo de LPS, enquanto o RNA MicA reprime o gene *phoP* <sup>(20)</sup>. Na figura 2 encontra-se esquematizada a regulação dos genes envolvidos na resistência à colistina em *E.coli*.



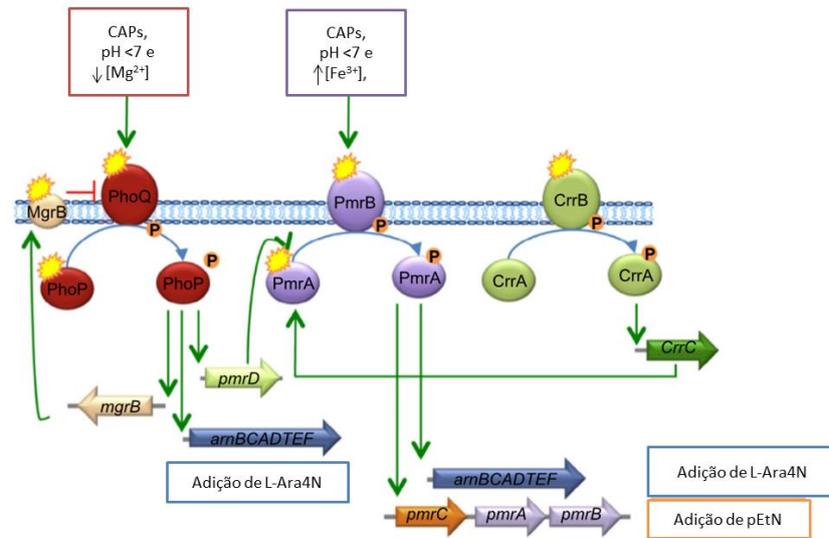
**Figura 2** - Representação esquemática da regulação de genes envolvidos na resistência à colistina em *E.coli*. (Fonte: Adaptado de <sup>(20)</sup>).

Em *K. pneumoniae*, a ativação de PhoQ é desencadeada pela presença de CAPs, por baixas concentrações de magnésio e por um ambiente ácido, enquanto o PmrB deteta a exposição a CAPs, um ambiente ácido e elevadas concentrações de ferro. A ocorrência de mutações (representada a amarelo na Figura 3) em PmrA, PmrB, PhoP e PhoQ, na histidina cinase CrrB e a inativação do gene *mgrB*, também, atuam na ativação destes sistemas <sup>(20)</sup>. Verificou-se, ainda, que as bombas de efluxo contribuem para o aumento da resistência à colistina, uma vez que se observou uma maior sensibilidade bacteriana nas estirpes de *K. pneumoniae* cuja bomba de efluxo KpnEF se apresentava mutada <sup>(14)</sup>.

A ativação do sistema PmrA-PmrB desencadeia a expressão do gene *pmrC* e do operon *arnBCADTEF* que codificam as proteínas responsáveis pela síntese e transferência de PEtN e L-Ara4N, respetivamente, para o lípido A do LPS. Ao contrário do que se observa em *E.coli*, o operon *arnBCADTEF*, pode ser diretamente ativado através do sistema regulador PhoP-PhoQ <sup>(14,20)</sup>.

A mutação em CrrB é responsável pela ativação do sistema regulador PmrA-PmrB, através do produto do gene *CrrC*, enquanto a inativação do gene *mgrB* culmina na fosforilação de Pho, que pode ativar diretamente o operon *arnBCADTEF* ou indiretamente, através da prévia ativação de PmrA, através do produto do gene *PmrD* <sup>(14,20)</sup>. Na figura 3

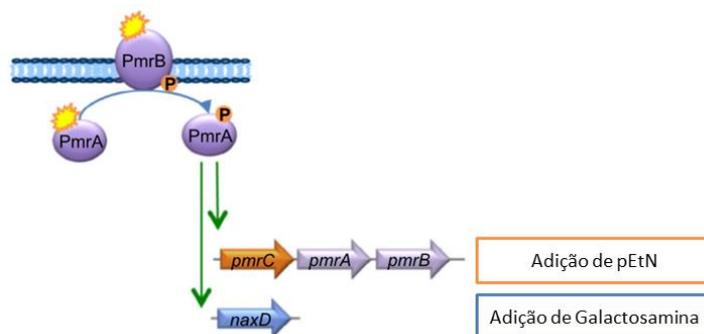
encontra-se esquematizada a regulação dos genes envolvidos na resistência à colistina em *K. pneumoniae*.



**Figura 3** - Representação esquemática da regulação de genes envolvidos na resistência à colistina em *K. pneumoniae*. (Fonte: Adaptado de (20)).

No caso de *A. baumannii*, foram documentados dois mecanismos de resistência à colistina, mais especificamente, a modificação do LPS e a sua eliminação total (14). Na figura 4 encontra-se esquematizada a regulação dos genes envolvidos na modificação do LPS.

Ao contrário da maioria das BGN, *A. baumannii* não possui os genes cromossômicos necessários à síntese e transporte de L-Ara4N. A modificação do LPS deve-se a mutações em PmrA e PmrB, responsáveis pela ativação do sistema regulador PmrA-PmrB. Após a sua ativação, a expressão do gene *pmrC* e de *NaxD* surge aumentada. O gene *pmrC* promove a adição de PEtN ao lípido A, enquanto o gene *NaxD* está envolvido na síntese de Galactosamina e na sua adição ao lípido A (20).



**Figura 4** - Representação esquemática da regulação de genes envolvidos na resistência à colistina em *A. baumannii*. (Fonte: Adaptado de (20)).

A perda total do LPS está associada à substituição dos três primeiros genes responsáveis pela síntese do lípido A, designadamente o gene *lpxA*, *lpxC*, e *lpxD*, pelo elemento *ISAbalI* <sup>(14)</sup>.

Observou-se, ainda, que a aquisição de resistência antibacteriana nas estirpes de *A. baumannii* lhes confere uma redução no “fitness” bacteriano, ou seja na sua capacidade de sobrevivência, manifestada pela redução da velocidade de crescimento, capacidade de virulência e de disseminação <sup>(14)</sup>.

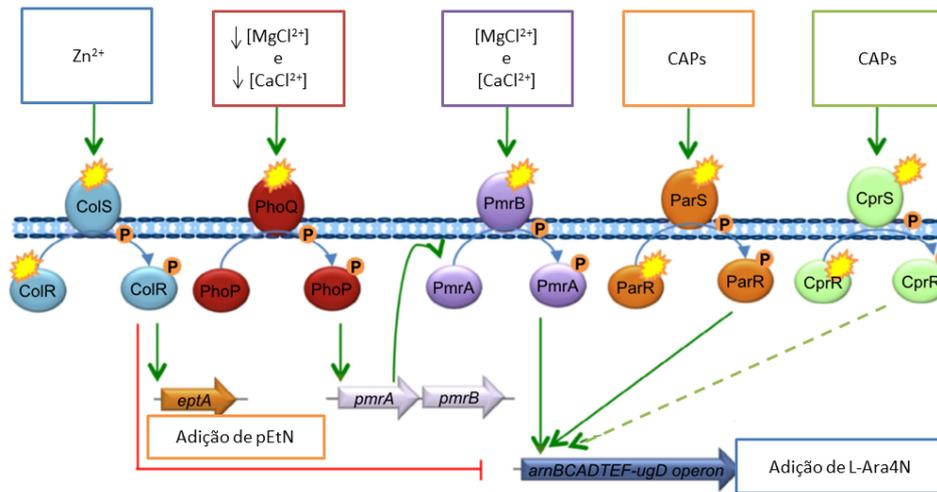
No caso de *P. aeruginosa*, outra importante bactéria Gram-negativa, foram descritos cinco sistemas reguladores, com um papel preponderante na resistência à colistina, designadamente ColR-CoS, PmrA-PmrB, PhoP-PhoQ, ParR-ParS e CprR-CprS <sup>(14, 20)</sup>.

O sistema regulador ColR-CoS é ativado na presença de zinco, os sistemas PmrA-PmrB e PhoP-PhoQ são ativados na presença de baixas concentrações de cátions divalentes, designadamente  $MgCl^{2+}$  e  $CaCl^{2+}$ , enquanto os sistemas ParR-ParS, e CprR-CprS são ativados na presença de CAPs. A ocorrência de mutações em PmrB, PhoQ, ParS, e ParR, também, atua na ativação destes sistemas (As mutações encontram-se representadas a amarelo na Figura 5) <sup>(20)</sup>.

A ativação destes sistemas promove um aumento da expressão do operão *arnBCADTEF-ugD* e a respetiva síntese de L-Ara4N, com exceção do sistema regulador ColR-CoS que promove a adição de pEtN e reprime a síntese de L-Ara4N <sup>(20)</sup>.

A ocorrência de mutações nos sistemas ColR-CoS e CprR-CprS está associada a elevados níveis de resistência à colistina em isolados mutantes *phoQ*. Deste modo, existem duas teorias sobre a influência dos sistemas ColR-CoS e CprR-CprS no mecanismo de resistência à colistina. Uma das teorias afirma que estes interagem com o sistema PhoP-PhoQ, melhorando a sua atividade, o que poderia explicar os maiores níveis de resistência. Por sua vez, também é aceite que os sistemas ColR-CoS e CprR-CprS possam estar envolvidos na regulação de outros genes com ação no mecanismo de resistência <sup>(14)</sup>.

Foi, ainda, descrito que sob baixas concentrações de magnésio a expressão do gene *OprH* que codifica a proteína membrana *OprH* surge aumentada. Esta proteína detém a função de ocupar os locais membranares do magnésio, reduzindo, assim, os locais de ligação da colistina <sup>(14)</sup>.



**Figura 5** - Representação esquemática da regulação de genes envolvidos na resistência à colistina em *P. aeruginosa*. (Fonte: Adaptado de <sup>(20)</sup>).

Até 2015, os mecanismos de resistência da colistina relacionavam-se com a ocorrência de mutações cromossômicas, ou seja, apenas se observava uma transmissão vertical, incapaz de se disseminar para outras bactérias. No entanto, em novembro de 2015, um estudo realizado na China no âmbito da avaliação da resistência antimicrobiana em amostras de *E. coli* provenientes de animais produtores de alimento, documentou um rápido aumento da resistência à colistina nos últimos anos. Suspeitou-se que este rápido aumento da resistência fosse desencadeado por um mecanismo de resistência plasmídico, uma vez que os mecanismos cromossômicos dificilmente seriam os responsáveis por este aumento tão acelerado. Deste facto, resultou um estudo da estirpe resistente à colistina proveniente de suínos, mais especificamente de *E. coli* SHP45, tendo-se detetado a presença de um plasmídeo do tipo IncI2, denominado Phnshp45. Com o objetivo de identificar o gene responsável pela resistência à colistina, este plasmídeo foi totalmente sequenciado, o que permitiu conhecer a sua estrutura e identificar o gene responsável pela resistência à colistina, designado gene *mcr-1* <sup>(2)</sup>.

Mais recentemente, em junho de 2016, na Bélgica, foi efetuada uma análise a amostras de *E. coli* resistentes à colistina provenientes de bezerros e suínos. O gene *mcr-1* foi detetado em 12,4% das amostras de *E. coli*. Neste estudo, foram, ainda, analisadas as amostras de *E. coli* resistentes à colistina que não apresentavam o gene *mcr-1* na sua constituição, tendo-se identificado um novo gene de resistência à colistina mediada por plasmídeo, em 21% das amostras. O novo gene de resistência designado *mcr-2* encontrava-se inserido no plasmídeo pKP37-BE do tipo IncX4 <sup>(21)</sup>.

## 2.2. Disseminação da resistência à colistina e implicações em saúde pública

### 2.2.1. Epidemiologia e detecção do gene *mcr-1*

Após a descoberta do gene *mcr-1*, foi efetuada uma investigação retrospectiva em amostras de *E. coli* provenientes de animais e de alimentos de origem animal, mais especificamente, de suínos no matadouro e de carne de frango e de porco, de modo a avaliar o nível de disseminação do gene na China. A investigação documentou que a proporção de amostras positivas para a presença de *mcr-1* aumentou de 2011 para 2014. Detetou-se a presença de *mcr-1* em 20,6% de amostras de suínos nos matadouros e 14,9% em amostras de carne. Foi, ainda, efetuada uma avaliação de amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* provenientes de seres humanos infetados, tendo-se detetado 16 amostras positivas para a presença de *mcr-1* em 1322 amostras, o que corresponde a 1,21% de amostras positivas em humanos <sup>(2)</sup>.

Além dos factos anteriormente descritos, este estudo, realizado na China, permitiu demonstrar que a resistência à colistina pode ser transferida, a partir de *E. coli* SHP45 para *E. coli* C600, por conjugação, com um aumento da concentração mínima inibitória. Observou-se que o plasmídeo Phnshp45 pode, também, ser transferido por transformação, a partir de *E. coli* SHP45 para outras bactérias, nomeadamente, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* <sup>(2)</sup>.

A divulgação da sequência de nucleótidos do gene *mcr-1* resultou num rastreio de sequências arquivadas de DNA bacteriano, por parte de um elevado número de grupos de investigação, a nível mundial. A presença do gene *mcr-1* foi detetada em cinco dos sete continentes, mais especificamente, na Ásia (China, Camboja, Japão, Laos, Malásia, Taiwan, Tailândia e Vietnam), na Europa (Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Grã-Bretanha, Itália, Lituânia, Polónia, Portugal, Espanha, Suíça e Países Baixos), em África (Argélia, Egito, Nigéria, África do Sul e Tunísia), na América do Sul (Argentina e Brasil) e na América do Norte (EUA) <sup>(22)</sup>.

O gene *mcr-1* tinha sido, inicialmente, identificado em *E. coli*, no entanto, a sua presença foi detetada em diversas bactérias, nomeadamente, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *Shigella sonnei* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Anatum, Derby, 1,4,[5],12:i:2, Java, Paratyphi B, Rissen, Schwartzengrund, Typhimurium e Virchow <sup>(22)</sup>.

Após a análise das diversas bactérias, revelou-se a presença do gene *mcr-1* incorporado em plasmídeos estruturalmente semelhantes ao plasmídeo chinês do tipo IncI2. Mais concretamente, os plasmídeos do tipo IncI2 foram encontrados em *E. coli*, *S.*

Typhimurium e *K. pneumoniae* <sup>(22)</sup>. No entanto, o gene *mcr-1* foi, também, detetado em plasmídeos estruturalmente diferentes do plasmídeo encontrado na China, nomeadamente, em plasmídeos do tipo IncHI2, IncP, IncFIP e IncX4 <sup>(23)</sup>.

As evidências apresentadas suportam a diversidade de plataformas genéticas do gene *mcr-1*, levando-nos a concluir que o gene de resistência à colistina possui uma elevada capacidade de disseminação.

Além disso, estes estudos permitiram observar que os plasmídeos transportadores do gene *mcr-1*, além de transportarem este gene, podem, também, transportar outros genes de resistência, incluindo genes de resistência a carbapenemases e beta-lactamases de largo espectro (ESBLs) <sup>(22)</sup>. Foi documentada a co-existência do gene *mcr-1* e do gene *bla*<sub>NDM-5</sub>, responsável pela resistência a antibióticos beta-lactâmicos, incluindo carbapenemos, num plasmídeo do tipo IncX3-X4. Um outro estudo demonstrou a associação do gene *mcr-1* ao gene *bla*<sub>CTX-M</sub> e ao gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, que são responsáveis, respetivamente, pela resistência aos beta-lactâmicos com exceção dos carbapenemos e pela resistência aos beta-lactâmicos incluindo carbapenemos <sup>(23)</sup>.

### **2.2.1.1. Epidemiologia e deteção do gene *mcr-1* em Portugal**

Após a divulgação da sequência de nucleótidos do gene *mcr-1* encontrado na China <sup>(2)</sup>, foi efetuada uma análise retrospectiva de sequências de DNA bacteriano de estirpes de *Salmonella* spp, em Portugal <sup>(24,25)</sup>.

Um dos estudos analisou 258 amostras de estirpes de *S. enterica*, de modo a averiguar a presença do gene *mcr-1* nessas amostras. Estas foram obtidas a partir de alimentos de origem animal, designadamente, de suínos, galinhas e bovinos, entre 2011 e 2012. Analisando os resultados, os autores verificaram que quatro estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium foram positivas para a presença do gene *mcr-1*, o que corresponde a uma percentagem de 1,55%. Em dois dos quatros isolados, observou-se que o gene *mcr-1* se encontrava inserido num plasmídeo do tipo IncHI2, diferindo do plasmídeo original detetado na China. Numa dessas amostras, o plasmídeo, para além do gene *mcr-1*, transportava, também, o gene *bla*<sub>CTX-M<sub>15</sub></sub> que codifica uma ESBL. Nessa amostra, foi, ainda, demonstrada homologia com a porção ISApII-clrA do plasmídeo chinês pHNSHP45 <sup>(24)</sup>.

Um outro importante estudo, realizado em Portugal, investigou a presença do gene *mcr-1* em 1010 amostras de *Salmonella* de 58 serotipos diferentes. As amostras foram isoladas a partir de diversas fontes, nomeadamente, amostras clínicas, animais produtores de alimento, alimentos de origem animal e água. A colheita das amostras foi efetuada nas zonas

norte, centro e sul de Portugal, durante o período de 2002 a 2015. Os autores verificaram que o gene *mcr-1* foi detetado em 11 isolados de *Salmonella* num total de 1010 amostras, o que corresponde a uma percentagem de 1.1%. O gene *mcr-1* apresentava 100% de homologia com a sequência de nucleótidos do gene *mcr-1* detetado na China, e era transportado em dois tipos de plasmídeos, mais especificamente, IncHI2 e IncX4. As amostras positivas foram isoladas a partir de amostras clínicas e de carne de suíno, colhidas em 2011 e 2014, respetivamente. Os 11 isolados de *Salmonella* positivos para o gene *mcr-1* pertenciam aos serotipos S. 1,4, [5], 12: i: - e S. Rissen <sup>(25)</sup>.

Ambos os estudos suportam a diversidade de plataformas genéticas do *mcr-1* e a sua elevada capacidade de disseminação, e permitem, ainda, concluir que o gene *mcr-1*, já se encontrava disseminado em Portugal, em 2011 <sup>(24,25)</sup>. A deteção de S. 1,4, [5], 12: i: - em amostras clínicas, em 2011, evidencia, a possível disseminação de *mcr-1* em humanos, a longo prazo, em Portugal <sup>(25)</sup>.

Tendo em conta os resultados obtidos, a resistência à colistina mediada por plasmídeos, parece ser mais frequente na Europa, do que inicialmente se suspeitava <sup>(24,25)</sup>.

### **2.2.2. Disseminação do gene *mcr-1***

Várias evidências sugerem que o principal reservatório do gene *mcr-1* é de origem animal. A principal evidência relaciona-se com o uso generalizado da colistina em medicina veterinária, mais especificamente, com fins terapêuticos, profiláticos, metafiláticos e de promoção de crescimento, nos animais destinados à produção de alimento <sup>(26)</sup>. Os dados disponíveis de 26 países da União Europeia demonstraram que a colistina é o quinto antimicrobiano mais utilizado no tratamento de infeções em animais produtores de alimento, o que corresponde a uma percentagem de 6,1% <sup>(7)</sup>.

A colistina é um antibiótico amplamente utilizado no tratamento de infeções gastrointestinais provocadas por *Enterobacteriaceae* em suínos. Apesar da utilização em suínos ser a mais frequente, é, também, utilizada em outros animais produtores de alimento. Na América do Norte, as doenças gastrointestinais provocadas por BGN em vitelos e borregos são tratadas, através da administração da colistina por via oral, durante três dias consecutivos. Na China, o controlo de infeções gastrointestinais provocadas por BGN em galinhas, perus, coelhos e patos, é efetuado através da utilização da colistina. Por sua vez, na Europa, é utilizada no tratamento de infeções gastrointestinais provocadas por *E. coli* em galinhas e em leitões <sup>(9)</sup>.

Outras evidências incluem a identificação do gene de resistência ao florfenicol (*florR*) em plasmídeos contendo o gene *mcr-1*, uma vez que o florfenicol é, apenas, administrado a animais. E, ainda, a associação do gene *mcr-1* à sequência de inserção *ISApII*, proveniente de *Pasteurella multocida*, um patógeno comum nos animais. A presença desta sequência a montante do gene *mcr-1* foi encontrada em diferentes classes de plasmídeos, localizados em diversas espécies animais. Este fenómeno sugere uma possível transmissão deste elemento genético móvel entre as diferentes espécies animais <sup>(26)</sup>.

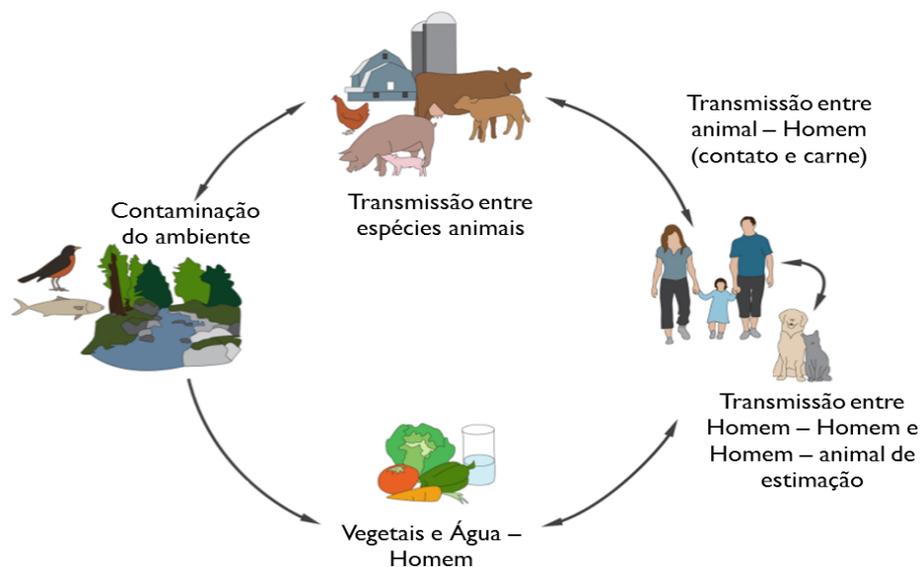
Apesar do gene *mcr-1* possuir origem animal, este foi, também, identificado em alimentos de origem vegetal, seres humanos e em amostras ambientais, nomeadamente, na água do rio e no estrume animal utilizado na fertilização de terras agrícolas <sup>(9)</sup>.

O gene *mcr-1* foi identificado numa estirpe de *E. coli* em cães e gatos, numa loja de animais, na China. Num dos indivíduos que trabalhava na loja, foi, também, identificado o gene *mcr-1* na mesma estirpe de *E. coli* encontrada nos animais. Com base neste caso, suspeita-se que a transmissão de animais de estimação para seres humanos seja possível <sup>(9)</sup>.

O isolamento do gene *mcr-1* em cinco crianças, com idades entre os 2 e os 27 meses, sem prévio contato com animais, sugere que o gene se encontra disseminado no meio ambiente, sendo, passível de ser transmitido através de várias vias para o ser humanos <sup>(9)</sup>.

Por sua vez, as aves migratórias parecem, também, ter impacto na disseminação da resistência à colistina mediada por plasmídeos. O gene *mcr-1* foi isolado a partir de aves migratórias, mais especificamente, a partir de *Larus argentatus* e de *Larus dominicanus*, na Lituânia e na Argentina, respetivamente <sup>(9)</sup>.

Tendo em conta os factos anteriormente apresentados, as vias de transmissão do gene *mcr-1* foram reformuladas <sup>(9)</sup>. Na figura 6 encontra-se esquematizada a disseminação do gene *mcr-1* envolvido na resistência à colistina.



**Figura 6** - Representação esquemática da disseminação do gene *mcr-1* envolvido na resistência à colistina em *E. coli*. (Fonte: Adaptado de <sup>(9)</sup>).

Resumindo, o gene *mcr-1* pode ser transmitido entre animais, meio ambiente, alimentos e humanos <sup>(9)</sup>.

O principal reservatório do gene *mcr-1* é de origem animal, pelo que, a transmissão pode ocorrer entre diferentes espécies de animais, e estes podem, ainda, contaminar o meio ambiente e o ser humano <sup>(9)</sup>.

A contaminação do meio ambiente é passível de ocorrer através do estrume animal utilizado na fertilização de terras agrícolas, disseminando-se, assim, para as águas e alimentos de origem vegetal. As aves migratórias têm, também, um papel preponderante na disseminação do gene *mcr-1* a nível global <sup>(9)</sup>.

A transmissão do animal para o Homem ocorre através de alimentos de origem animal, por contato nos matadouros e pelo consumo de carne. Pode, também, ocorrer através do contato com animais de estimação. O Homem pode, ainda, ser contaminado através do contato com indivíduos infetados e através do consumo de alimentos de origem vegetal e de água <sup>(9)</sup>.

### 2.2.3. Consequências da disseminação

A colistina é um antimicrobiano de último recurso em medicina humana, utilizado no tratamento de infeções nosocomiais graves, causadas por bactérias BGN-MR. Por vezes, não existem outros tratamentos alternativos, pelo que, a colistina é o único antimicrobiano eficaz no tratamento dessas infeções <sup>(17)</sup>.

O mecanismo de resistência, recentemente, identificado apresenta uma ampla distribuição geográfica e potencial para uma maior disseminação. Durante os últimos anos, vários estudos demonstraram que o principal reservatório do gene responsável pela resistência à colistina é de origem animal, sendo, por isso, mais difícil evitar a sua disseminação, em comparação com outros reservatórios. Além disso, o seu principal hospedeiro, designadamente, *E. coli*, é uma das espécies bacterianas mais amplamente distribuída na comunidade, estando presente no meio ambiente, nos animais e nos humanos. O gene *mcr-1* possui, ainda, uma diversidade de vetores de transmissão, sendo passível de ser transportado em diversos tipos de plasmídeos, localizados em diversos isolados bacterianos. Deste modo, suspeita-se um aumento da sua prevalência <sup>(26)</sup>.

Vários estudos verificaram que os plasmídeos transportadores do gene *mcr-1* podem, também, transportar outros genes de resistência a antibióticos, incluindo os genes que codificam carbapenemases e ESBLs <sup>(22)</sup>.

Por sua vez, o gene *mcr-1* foi identificado em bactérias responsáveis por infeções nosocomiais graves em doentes imunocomprometidos, nomeadamente, *K. pneumoniae* e *E.coli* <sup>(26)</sup>.

Todas as evidências, anteriormente apresentadas, têm despertado uma enorme preocupação a nível mundial, devido à possível perda de eficácia da colistina no tratamento de infeções provocadas por BGN-MR, mais especificamente, por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Aliando a elevada disseminação do gene *mcr-1* à co-existência de genes de resistência em infeções nosocomiais graves em doentes imunocomprometidos, coloca-se a hipótese de um possível aparecimento de infeções intratáveis, desencadeando-se, assim, o início de uma era pós-antibiótico, sem alternativas terapêuticas <sup>(26)</sup>.

#### **2.2.4. Medidas para evitar a disseminação – One Health**

A importância crescente da colistina na medicina humana, associada à disseminação do seu mecanismo de resistência e a uma limitada perspectiva de novas substâncias antimicrobianas alternativas num futuro próximo, leva à necessidade de desenvolver uma estratégia global que vise preservar a eficácia de colistina no tratamento de infeções por BGN-MR. A colistina foi, por isso, incluída na lista de antibióticos criticamente importantes em medicina humana, por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS) <sup>(27)</sup>. Considera-se que a sua utilização em medicina veterinária conduz a um risco para a saúde pública aceitável, desde que, sejam colocadas restrições sobre a sua utilização <sup>(7)</sup>.

A gestão da resistência à colistina, de acordo com a perspectiva do programa *One Health*, inclui ações de prevenção da disseminação da resistência. As ações preventivas devem englobar estudos que avaliem a utilização da colistina e traduzam os níveis de resistência antimicrobiana e, ainda, investigações e pesquisas científicas que permitam uma gestão adequada dos resíduos da colistina e dos seus genes de resistência no meio ambiente <sup>(9)</sup>. O programa *One Health* reconhece a importância do contributo de três componentes na gestão do controlo da resistência antimicrobiana, designadamente, a saúde humana, a saúde animal e o meio ambiente <sup>(23)</sup>.

Neste âmbito, serão apresentadas algumas medidas que visam evitar a disseminação da resistência à colistina, destacando-se as ações prioritárias ao nível da medicina humana e veterinária, e dos ecossistemas.

Na medicina veterinária, a colistina começou por ser utilizada com fins terapêuticos, profiláticos, metafiláticos e de promoção de crescimento nos animais destinados à produção de alimento. De modo a obter uma redução na disseminação do mecanismo de resistência da colistina, o uso da colistina com fins profiláticos e de promoção de crescimento, nos animais destinados à produção de alimento, deve ser banido. A administração da colistina em doses sub-terapêuticas, com o objetivo de promover o crescimento animal, está associada ao aparecimento de resistências. Por sua vez, a profilaxia (administração da colistina em períodos de maior suscetibilidade de ocorrência de doenças infecciosas) e a metafilaxia (administração durante surtos da doença, mais especificamente, o tratamento antes do aparecimento dos sinais e sintomas, devido à probabilidade dos animais se encontrarem no período de incubação, por pertencerem a um grupo onde se encontram animais infetados) estão associadas ao aumento da presença de resíduos de colistina no meio ambiente <sup>(7)</sup>.

Tendo em conta os factos anteriormente apresentados, a EMA recomendou a utilização da colistina em medicina veterinária, apenas, com fins terapêuticos ou metafiláticos, em infeções entéricas causadas por *E. coli* não invasiva, com uma duração do tratamento limitada ao tempo mínimo necessário, durante um período máximo de 7 dias <sup>(7)</sup>.

A prevenção de infeções em animais produtores de alimento deve basear-se na implementação de práticas sustentáveis, nomeadamente, a vacinação periódica com vista a garantir a imunização e a utilização de métodos de quarentena animal para impedir a disseminação da infeção, em detrimento da utilização da colistina <sup>(7,9)</sup>. Além disso, a utilização de pré e probióticos permite, a redução da administração de doses prolongadas de colistina, uma vez que possibilita a renovação das bactérias do aparelho digestivo <sup>(7)</sup>.

A colistina era utilizada em monoterapia ou em associação com outras substâncias antimicrobianas, nomeadamente antibióticos beta-lactâmicos, mais especificamente a ampicilina e a amoxicilina <sup>(9)</sup>. No entanto, em 2016, o Comité de Medicamentos para Uso Veterinário (CVMP), recomendou que a autorização de introdução no mercado de todas as formulações veterinárias cuja composição possuísse colistina associada a outras substâncias ativas fosse retirada <sup>(7)</sup>. Considerando a possibilidade de co-localização do gene *mcr-1* com outros genes de resistência, nomeadamente genes que codificam a síntese de carbapenemases e ESBLs, no mesmo elemento genético móvel, a alternativa terapêutica à colistina não deve ser um antibiótico pertencente à classe dos beta-lactâmicos <sup>(9)</sup>. Além disso, a redução da utilização da colistina em medicina veterinária, não deve ser associada a um aumento da utilização de outros antimicrobianos, especialmente de fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira e quarta geração <sup>(7,9)</sup>.

O meio ambiente representa outro reservatório importante do gene *mcr-1*. A contaminação do ambiente é passível de ocorrer através do estrume animal utilizado na fertilização de terras agrícolas, disseminando-se, assim, para as águas e alimentos de origem vegetal. Estima-se que mais de 75% da colistina é excretada através das fezes e da urina dos animais produtores de alimentos, uma vez que esta é fracamente absorvida através do trato gastrointestinal. Deste modo, o papel do estrume animal na disseminação do gene *mcr-1* deve ser tido em consideração, sendo, fundamental, implementar intervenções que visem uma gestão biológica do estrume <sup>(9)</sup>. É, também, importante considerar a necessidade de construir instalações com saneamento e de implementar estratégias de limpeza e desinfecção, nomeadamente, a utilização de biocidas, com vista a limitar a acumulação de genes de resistência ao longo dos vários ciclos de produção <sup>(7)</sup>.

A saúde humana é, também, um componente fundamental na gestão do controlo da resistência antimicrobiana. A colistina é utilizada em infeções provocadas por BGN-MR, em casos clínicos cuja disponibilidade de antimicrobianos alternativos efetivos é reduzida ou inexistente. A otimização do seu uso implica a realização de testes de pesquisa do gene *mcr-1*, previamente à sua administração <sup>(9)</sup>.

Vários estudos demonstraram que a eficácia clínica da terapêutica da colistina no tratamento de infeções provocadas por BGN-MR foi superior em associação com outros antibacterianos do que em monoterapia. No entanto, surgiram outras evidências controversas, demonstrando que a eficácia da colistina foi superior em monoterapia. Deste modo, deve ser re-avaliada a eficácia terapêutica da colistina e o seu impacto na ocorrência de resistência a BGN-MR <sup>(9)</sup>.

Na unidade de cuidados intensivos, a nível hospitalar, a colistina é, por vezes, administrada por via oral, em associação com um antimicrobiano de largo espectro de ação, com vista ao tratamento de infeções intestinais provocadas por BGN-MR. No entanto, um estudo demonstrou que o uso prolongado da colistina no tratamento destas infeções está associado ao aparecimento de resistências. Assim, é de extrema necessidade, que seja efetuada uma re-avaliação da utilização da colistina no tratamento destas infeções <sup>(9)</sup>.

O Homem pode ser contaminado através do contacto com indivíduos infetados, pelo que a higiene das mãos após contacto com doentes infetados, desempenha um papel preponderante na prevenção da disseminação da resistência à colistina. O isolamento dos doentes cujo teste de pesquisa do gene *mcr-1* associado a outros genes de resistência, nomeadamente aos genes responsáveis pela síntese de carbapenemases, seja positivo é, também, essencial na prevenção da disseminação da resistência antibacteriana <sup>(9)</sup>.

Tendo em conta que uma elevada percentagem das amostras bacterianas resistentes à colistina são isoladas a partir de alimentos de origem animal, mais especificamente, através da carne, os consumidores devem evitar qualquer tipo de contaminação cruzada entre a carne e outros alimentos ingeridos crus <sup>(7)</sup>.

A transmissão do animal para o Homem ocorre, também, através do contacto com os animais, em matadouros e em lojas de animais. Por esta razão, é particularmente importante a utilização de luvas e a desinfeção das mãos, após contacto com animais em matadouros e em lojas de animais <sup>(9)</sup>.

Na figura 7 encontram-se resumidas as ações preventivas da disseminação da resistência à Colistina, de acordo com a perspetiva do programa *One Health*.



**Figura 7** - Representação esquemática das várias medidas que devem ser implementadas para evitar a disseminação da resistência à colistina de acordo com a perspetiva *One Health*. (Fonte: Adaptado de <sup>(9)</sup>).

## Conclusão

O presente trabalho permitiu constatar que a colistina passou de um antibiótico em desuso a uma molécula de enorme importância no tratamento de infeções por BGN-MR. Atualmente, foi incluída na lista de antibióticos criticamente importantes em medicina humana, por parte da OMS <sup>(27)</sup>.

A colistina é um antibacteriano, extensivamente, utilizado em medicina veterinária. As suas indicações terapêuticas incluem, essencialmente, o controlo de infeções gastrointestinais em animais produtores de alimento. A recente descoberta de um novo mecanismo de resistência à colistina mediado por plasmídeo, gerou uma enorme preocupação, devido à possível perda da sua eficácia na medicina humana. A excessiva utilização da colistina em animais produtores de alimentos é apontada como uma das principais causas da amplificação e disseminação da resistência à colistina. Como consequência deste facto, a EMA recomendou uma redução na sua utilização, e clarificou que esta deve, apenas, ser utilizada com fins terapêuticos ou metafiláticos <sup>(7,9)</sup>.

O gene *mcr-1* possui uma ampla distribuição geográfica, tendo sido, isolado a partir de amostras de origem animal, humana e ambiental, provenientes de quatro dos sete continentes <sup>(22)</sup>. Em determinados casos, este gene foi associado a outros genes de resistência em infeções nosocomiais graves, em doentes imunocomprometidos. Por esta razão, coloca-se a hipótese de um possível aparecimento de infeções intratáveis, desencadeando-se, assim, o início de uma era pós-antibiótico, sem alternativas terapêuticas <sup>(26)</sup>. Os factos anteriormente apresentados, associados à importância crescente da colistina na medicina humana e a uma limitada perspectiva de novas substâncias antimicrobianas alternativas num futuro próximo, leva à necessidade de desenvolver uma estratégia global que vise preservar a eficácia de colistina no tratamento de infeções por BGN-MR <sup>(7,9)</sup>.

O programa *One Health* reconhece a importância do contributo da medicina humana e veterinária, e do meio ambiente, na preservação da eficácia terapêutica da colistina. Pode, assim, concluir-se que a gestão da resistência à colistina de acordo com a perspectiva deste programa é fundamental para assegurar ações de prevenção da disseminação da resistência à colistina <sup>(9)</sup>.

## Referências Bibliográficas

1. TILLOTSON, G.; ZINNER, S. - **Burden of antimicrobial resistance in an era of decreasing susceptibility.** Expert Review of Anti-infective Therapy. 15:7 (2017) 663-676.
2. LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. - **Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-I in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study.** The Lancet Infectious Diseases. 16:2 (2016) 161-168.
3. LOHO, T.; DHARMAYANTI, A. - **Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections.** The Indonesian Journal of Internal Medicine. 47:2 (2015) 157-168.
4. FALAGAS E. M., KASIAKOU, S. K., SARAVOLATZ, D. L. - **Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections.** Clinical Infectious Diseases. 40:9 (2005) 1333-41.
5. GALLARDO, G. A., MULDOON, C., BECKER, B., ELLIOTT, A. G., LASH, L. H., HUANG, J. X., BUTLER, S. M., PELINGON, R., KAVANAGH, M. A., RAMU. S., PHETSANG, W., BLASKOVICH, A. T. M., COOPER, M. A. - **Activity and predicted nephrotoxicity of synthetic antibiotics based on polymyxin B.** Journal of Medicinal Chemistry. 59:3 (2016) 1068–1077.
6. YAHAV, D.; FARBMAN, L.; LEIBOVICI, L.; PAUL, M. - **Colistin: new lessons on an old antibiotic.** Clinical Microbiology and Infection. 18:1 (2012) 18-29.
7. EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA) - **Updated advice on the use of colistin products in animals within the european union: development of resistance and possible impact on human and animal health.** Acedido a 20 de julho de 2017. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2016/07/WC500211080.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/07/WC500211080.pdf)

8. LI, J.; NATION, R. L.; TURNIDGE, J. D.; MILNE, R. W.; COULTHARD, K.; RAYNER, C. R.; PATERSON, D. L. - **Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections.** *Lancet Infectious Diseases.* 6:9 (2006) 589-601.
9. RHOUMA, M.; BEAUDRY, F.; THÉRIAULT, W.; LETELLIER, A. - **Colistin in pig production: chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives.** *Frontiers in Microbiology.* 7:1789 (2016) 1-22.
10. CLIFTON, L. A.; SKODA, M. W. A.; BRUN, A. P. L.; CIESIELSKI, F.; KUZMENKO, I.; HOLT, S. A.; LAKEY, J. H. **Effect of divalent cation removal on the structure of Gram-negative bacterial outer membrane models.** *Langmuir.* 31:1 (2015) 404-412.
11. VELKOV, T.; THOMPSON, P. E.; NATION, R. L.; LI, J. - **Structure-activity relationships of polymyxins antibiotics.** *Journal of Medicinal Chemistry.* 53:5 (2010) 1898-1916.
12. SAMPSON, T. R.; LIU, X.; SCHROEDER, M. R.; KRAFT, C. S.; BURD, E. M.; WEISS, D. S. - **Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 56:11 (2012) 5642-5649.
13. DERIS, Z. Z.; AKTER, J.; SIVANESAN, S.; ROBERTS, K. D.; PHILIP, E.; NATION, R. L.; LI, J.; VELKOV, T.; KERIAN, K. - **A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity.** *The Journal of Antibiotics.* 67:2 (2014) 147-151.
14. OLAITAN, A.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M.; - **Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria.** *Frontiers in Microbiology.* 5:643 (2014) 1-18.
15. GUPTA, S.; GOVIL, D.; KAKAR, P.N.; PRAKASH, O.; ARORA, D.; DAS, S.; GOVIL, P.; MALHOTRA, A. - **Colistin and polymyxin B: a re-emergence.** *Indian Journal of Critical Care Medicine.* 13:2 (2009) 49-53.

16. MICHALOPOULOS, A.; KARATZA, D. C.; GREGORAKOS, L. - **Pharmacokinetic evaluation of colistin sodium.** Drug Metabolism Toxicology. 7:2 (2011) 245-255.
17. GURJAR, M. - **Colistin for lung infection: an update.** Journal of Intensive Care. 3:1 (2015) 1-3.
18. ORDOOEI, J. A.; SHOKOUHI, S.; SAHRAEI, Z. - **A review on colistin nephrotoxicity.** European Journal of Clinical Pharmacology. 71:7 (2015) 801-810.
19. SPAPEN, H.; JACOBS, R.; VAN G. V.; TROUBLEYN, J.; HONORÉ, M. P. - **Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients.** Annals of Intensive Care. 1:14 (2011) 1-7.
20. JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. - **Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms.** International Journal of Antimicrobial Agents. 49:5 (2017) 526-535.
21. XAVIER, B. B.; LAMMENS, C.; RUHAL, R.; MALHOTRA-KUMAR, S.; BUTAYE, P.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. - **Identification of a novel plasmid-mediated colistinresistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016.** Euro Surveillance. 21:27 (2016) 1-6.
22. SCHWARZ, S.; JOHNSON, A. P.; - **Transferable resistance to colistin: a new but old threat.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 71:8 (2016) 2066-2070.
23. AL-TAWFIQ, J. A.; LAXMINARAYAN, R.; MENDELSON, M. - **How should we respond to the emerge of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals?** International Journal of Infectious Diseases. 54:1 (2017) 77-84.
24. FIGUEIREDO, R.; CARD, R. M.; NUNEZ, J.; POMBA, C.; MENDONÇA, N.; ANJUM, M. F.; DA SILVA, G. J. - **Detection of an *mcr-1*-encoding plasmid mediating colistin resistance in *Salmonella enterica* from retail meat in Portugal.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 71:8 (2016) 2338-2340.

25. CAMPOS, J.; CRISTINO, L.; PEIXE, L.; ANTUNES, P. - **MCR-I in multidrug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- and S. Rissen clones in Portugal, 2011 to 2015.** Euro Surveill. 21:26 (2016) 1-5.
26. NORDMANN, P.; POIREL, L. - **Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace.** Clinical Microbiology and Infection. 22:5 (2016) 308-400.
27. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Critically important antimicrobials for human medicine.** Acedido a 10 de junho de 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255027/1/9789241512220-eng.pdf?ua=1>