

() Graduação (X) Pós-Graduação

**AVALIAÇÃO DE CUSTOS E IMPACTO AMBIENTAL DE MÉTODOS
EXPERIMENTAIS DO TESTE DE AMES: MÉTODO CONVENCIONAL *versus*
FLUTUAÇÃO EM MICROPLACAS**

Nathalia Stephanie Oliveira Nascimento,
Universidade Federal de Minas Gerais,
nathaliason@ufmg.br

Bárbara Moreira Amaral
Universidade Federal de Minas Gerais,
bamaral@ufmg.br

Keyla Silva Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais,
keylaoliveira@ufmg.br

Maria Eduarda Souza Leite Amorim
Universidade Federal de Minas Gerais,
mesla@ufmg.br

Carlos Alberto Tagliati
Universidade Federal de Minas Gerais,
carlostagliati@ufmg.br

RESUMO

O Teste de Ames é crucial na avaliação da mutagenicidade de substâncias, sendo amplamente utilizado na indústria farmacêutica e de produtos químicos. Este estudo compara o método convencional do Teste de Ames com uma abordagem miniaturizada, a flutuação em microplacas, considerando os aspectos financeiros e ecológicos de cada método. Foi avaliado o histórico de prestação de serviços do ToxLab UFMG (Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais), incluindo orçamentos, cálculos de insumos e protocolos operacionais padrão, com uma matriz S.W.O.T para comparação. Os insumos críticos influenciam tanto o custo quanto o impacto ambiental dos ensaios. Apesar do custo total ser maior, o método convencional tem um custo individual inferior ao método em microplacas, 55% e 85% respectivamente. O teste tradicional consome mais consumíveis e fração S9, aumentando o custo final e o impacto ambiental. A abordagem em microplacas é mais ecológica, produzindo menos resíduos e utilizando menos recursos naturais. No entanto, esta metodologia não é amplamente aceita pelas agências para medicamentos, sendo um fator essencial na escolha do método. Conclui-se que a microflutuação, embora seja uma alternativa viável e vantajosa em termos financeiros e ambientais, requer consideração cuidadosa das regulamentações vigentes.

Palavras-chave: OECD 471; Ensaio de Salmonella/microsoma; Mutação reversa; Mini Ames; Microflutuação.

1 INTRODUÇÃO

A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos enfrentam uma grande barreira em todas as etapas: a segurança (Silva *et al.* 2021). Nos últimos trinta anos, houve um notável avanço no desenvolvimento de diversas metodologias para avaliar os efeitos genotóxicos, mutagênicos e/ou cancerígenos de produtos farmacêuticos e químicos (Sponchiado *et al.* 2016).

Entre os ensaios de mutagenicidade, destaca-se o Teste de Ames, teste de mutação reversa bacteriana, que utiliza cepas bacterianas de *S. typhimurium* e *E. coli*, incapazes de produzir aminoácidos essenciais ao seu crescimento, para identificação de compostos mutagênicos (Ames, Lee & Durston, 1973) (OECD, 2020).

O ensaio detecta mutações nos genes relacionados à biossíntese de histidina (*S. typhimurium*) ou triptofano (*E. coli*) e fundamenta-se na capacidade da substância teste de reverter a mutação das cepas, permitindo que a bactéria sintetize seu aminoácido essencial e cresça (Kauffmann *et al.*, 2020; Levy *et al.*, 2019). A mutação reversa, causada pela exposição a um agente mutagênico, é verificada por meio da contagem do número de colônias. Esse procedimento é realizado no teste Ames padronizado pela diretriz 471 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), sendo tradicionalmente realizado em placas de Petri (OECD, 2020).

Alternativamente, a miniaturização do teste de Ames surge como uma abordagem que resulta na redução significativa do material necessário para sua realização, incluindo a substância teste, consumíveis e o S9 para ativação metabólica (Spiliotopoulos & Koelbert, 2020). Entre os ensaios em miniatura, destaca-se o teste de flutuação de Ames, realizado em microplacas. Nesse método, a contagem de poços revertentes é o parâmetro de avaliação, identificados pelo uso de um indicador de pH que detecta a diminuição do pH causada pelo crescimento das colônias bacterianas (Kauffmann *et al.*, 2020). Ambos os ensaios devem ser conduzidos com e sem ativação metabólica exógena, utilizando homogenato de fígado de rato (S9), conforme as recomendações da OECD e da ISO 11350 (OECD, 2020) (ISO 11350, 2012).

Assim, é crucial realizar estudos que investiguem o impacto ambiental e financeiro deste ensaio alternativo, contrastando os métodos tradicionais realizados em placas de Petri com o método miniaturizado de flutuação em microplacas. O objetivo do presente trabalho foi o de realizar uma avaliação financeira e ecológica, considerando as preconizações das agências regulatórias e os parâmetros de inovação sustentável, para orientar as empresas de biotecnologia na escolha do método mais adequado, destacando seus prós e contras.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Análise de Mutagenicidade

Mutação pode ser definida como uma alteração permanente ao DNA que é transmitida para as novas gerações, nas quais existem dois tipos diferentes deste fenômeno: Mutação somática que ao ocorrer é disseminada para as próprias células do indivíduo e mutação germinativa que é caracterizada pela a difusão dessa alteração para a prole do organismo exposto (Griffiths, *et. al*, 2001a).

Conforme mostrado nos estudos realizados por Santos e colaboradores (2007) existe uma alta correlação de substâncias mutagênicas com as carcinogênicas, estima-se que 80% das substâncias mutagênicas são também carcinogênicas (Targa & Rabello-Gay, 2017). Dado que, ambos os processos apresentam alterações inesperadas em uma única célula, modificações essas que são permanentes e transmitidas para as células filhas.

Por conta desta relação e por serem econômicos mais fáceis comparados aos testes de carcinogênicos, recomenda-se a utilização de ensaios de mutagenicidade para a triagem e avaliação da segurança de medicamentos de origem natural e sintética (Guido *et al*, 2001; Fagundes *et al*, 2005; Santos *et al.*, 2007).

Com o intuito de avaliar a mutagenicidade dos compostos foram desenvolvidos ao longo do tempo ensaios que determinam os danos causados por xenobióticos ao material genético dos indivíduos expostos. Desenvolvido na década de 70 por Bruce Ames, o teste de Ames (TA) é um dos ensaios mais comumente utilizados, sendo ainda preconizado pelas agências internacionais, principalmente por seus achados refletirem muito bem o observado na clínica. Um estudo realizado pela *National Toxicology Program* dos Estados Unidos, afirmou que o ensaio Ames fornece uma excelente correlação com ensaios *in vivo* (Santos *et al*, 2007; Umbuzeiro *et al*, 2009).

2.2. Teste de Ames

Em uso há mais de 20 anos, o teste de Ames é um dos métodos alternativos ao uso de animais com maior aceitabilidade pela as Agências Regulatórias e comunidade científicas (Anastácio Ferraz, 2008). É recomendado pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) para proteção da saúde humana e do meio ambiente, e é empregado por todo mundo como um teste *screening* para determinar o potencial mutagênico de novos fármacos e substâncias, visto que, seu valor preditivo para carcinogenicidade em roedores é alto quando se obtém resultados positivos para uma resposta mutagênica (Anastácio Ferraz, 2008).

O TA é caracterizado pela utilização de linhagens de bactérias de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* indicadoras e sensíveis à mutações por diferentes agentes mutagênicos, devido a característica auxotrofia a um aminoácido essencial. Na presença desses agentes, essas cepas reverterem esse caráter, por mutação (substituição ou deleção), para a prototrófica de histidina-biotina ou triptofano (dependendo da linhagem) e iniciam a formação de colônias em um meio de cultura que não possui esse aminoácido. O aumento do número de colônias é diretamente proporcional à capacidade mutagênica do composto avaliado (Maron & Ames, 1983; Santos *et. al.*, 2007). Esse teste pode ser realizado na presença ou ausência de ativação metabólica e pelas metodologias de incorporação de placa, pré-incubação, método de flutuação e o método de suspensão (OECD 471, 2020) .

A metodologia TA por incorporação em placa conforme indicado pelas as diretrizes da OECD 471 (2020) é mais aceita e utilizada, sendo denominada de Método Convencional ou Tradicional. São empregadas as 5 linhagens bacterianas (*Salmonella typhimurium* TA 98, *Salmonella typhimurium* TA 100, *Salmonella typhimurium* TA 1535, *Salmonella typhimurium* TA 1537 e *Salmonella typhimurium* TA102 ou *Escherichia coli* WP2 uvrA). Cada ensaio é realizado em triplicata e inicia-se com o preparo do inóculo da linhagem bacteriana que será utilizado; em seguida, ocorre a elaboração das concentrações definidas das amostras e dos meios de cultura necessários para a execução do teste (Maron & Ames, 1983; OECD 471, 2020).

Após esses procedimentos, realiza-se a incorporação da amostra e da cultura bacteriana em placas de Petri devidamente identificadas. Essas placas devem ser incubadas em estufa a 37° C por 48 horas. Após esse período, procede-se à contagem e ao registro do número de colônias revertentes em cada uma das placas (Maron & Ames, 1983; OECD 471, 2020).

2.2.1 Miniaturização do Teste de Ames

O ensaio de Ames é reconhecido como uma opção econômica e eficaz em comparação com os ensaios em animais para avaliação da carcinogenicidade. No entanto, quando contrastado com outros ensaios *in vitro*, o TA se revela como um processo demorado e oneroso, principalmente devido à necessidade de uma quantidade considerável de reagentes de alto custo, como o homogenato de fígado de rato (Fração S9)(OECD, 2021).

Surge então a miniaturização deste ensaio como uma alternativa ao método tradicional realizado em placas de ágar, sendo inicialmente utilizada pelas empresas como uma triagem para selecionar produtos químicos quanto ao potencial mutagênico, antes de investirem no teste em placas de Petri descrito pela OECD para fins regulatórios (Nicolette *et al*, 2018; OECD 471, 2020; Spiliotopoulos & Koelbert, 2024)

Por definição, a OECD preconiza um ensaio miniaturizado como um teste que requer menos reagentes em estudo e é caracterizado por uma redução no tamanho e/ou formato do recipiente para tratamento e pontuação; além disso, o ensaio miniaturizado utiliza menos bactérias (OECD,2021).

Essas abordagens apresentam benefícios significativos, como a redução substancial na quantidade de substância de teste e reagentes, além de maior agilidade, menor demanda por mão de obra e potencial para automação. Contudo ainda carecem de estudos para sua ampla aceitação regulatória (Spiliotopoulos & Koelbert, 2024; OECD 2020).

Em relação ao processo regulatório de medicamentos, os testes miniaturizados de mutação genética reversa bacteriana não são descritos em nenhum documento existente da OECD e não se beneficiam da Aceitação Mútua de Dados (MAD). O único documento existente refere-se a um projeto da OECD para compilar um documento de revisão detalhada (DRP) sobre esses métodos. Portanto, os resultados desses testes miniaturizados de mutação genética reversa bacteriana não são atualmente amplamente aceitos pelas agências reguladoras (OECD, 2021).

Para a avaliação de impurezas, a diretriz M7 da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH), intitulada "*Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk*", já preconiza o uso de testes miniaturizados para a avaliação da mutagenicidade. Esses testes demonstraram alta concordância com o teste de mutação bacteriana padrão e podem ser utilizados para avaliar o

potencial mutagênico de um composto que está em pouca quantidade, como uma impureza (ICH, 2018; Nicolette *et al.* 2018).

Outra informação relevante refere-se à norma ISO 11350, que preconiza o uso do teste miniaturizado de flutuação para análise de amostras ambientais. Esse método é amplamente empregado em avaliações ecotoxicológicas, devido à sua validação e aceitação científica reconhecidas no setor ambiental (ISO 11350, 2012).

Atualmente, existem vários tipos de ensaios de Ames em miniatura, como os realizados em placas de 6, 12 e 24 poços que utilizam ágar. Além disso, há versões miniaturizadas que empregam cepas bacterianas não padronizadas, como cepas bioluminescentes, e o teste de flutuação em microplacas de 384 poços, que utiliza o meio líquido em vez de ágar para medição de bactérias revertentes (OECD, 2021).

2.2.1.1 Método de Flutuação em microplaca ou Microflutuação

Os testes de microflutuação representam uma abordagem eficaz para a triagem de mutações reversas bacterianas, sendo descrito como o método de flutuação, também em 1970 quando a versão original do teste foi descrita (Green, Muriel & Bridges, 1976). Este método baseia-se no princípio do teste padrão de pré-incubação líquida, porém, em vez de contar colônias em ágar, a frequência de bactérias revertentes é determinada observando-se o crescimento em poços. Para otimizar sua aplicação em termos de tempo, custo e quantidade de reagentes necessários, o teste original foi modificado para permitir a automação do plaqueamento das células expostas em meio seletivo, facilitando sua adaptação ao rastreamento de alto rendimento (OECD, 2021).

Essas variantes de teste envolvem a incubação das bactérias com o composto em estudo em placas de 24 poços, seguida pela transferência do conteúdo de cada poço para placas de microtitulação de 384 poços para detecção de bactérias revertentes. A frequência dessas bactérias é determinada pelo número de poços que apresentam crescimento bacteriano, com a detecção facilitada pela observação da turbidez nos poços e pela diminuição do pH do meio de crescimento devido à liberação de metabólitos ácidos pelas bactérias. Essa metodologia oferece uma alternativa eficiente para a triagem de mutagenicidade, com diversos kits comerciais disponíveis, contendo meios prontos para uso e cepas testadas de *Salmonella*, adaptadas para diferentes necessidades de pesquisa (OECD, 2021).

2.3. Custo do Desenvolvimento farmacêutico e a Inovação sustentável na biotecnologia

As indústrias farmacêuticas são as que mais investem em desenvolvimento de novos produtos e inovação. No entanto, o desenvolvimento de novos medicamentos é um processo demorado, complexo e oneroso para essas empresas em escala global (Rename *et al.*, 2021).

De acordo com o relatório "*World Preview 2022 Outlook to 2028: Patents and Pricing*" em 2022, os gastos em PD&I (pesquisa, desenvolvimento e inovação) na indústria farmacêutica totalizaram cerca de 244 bilhões de dólares americanos em nível mundial. Sendo que há 10 anos atrás, para efeito de comparação, as despesas de PD&I totalizaram 137 mil milhões de dólares.

Como forma de reduzir os custos, uma grande parte das indústrias farmacêuticas está terceirizando algumas partes do processo de PD&I, subcontratando empresas e startups de biotecnologia para as etapas de pesquisa clínica e pré-clínica (World Preview, 2022).

Alinhado à pressão para equilibrar os cortes de custos financeiros e o valor do desenvolvimento de medicamentos, o discurso proferido pelo Comissário da FDA, Scott Gottlieb, durante a Conferência Regulatória de 2017 da Sociedade de Profissionais de Assuntos Regulatórios (RAPS), sugere a necessidade de tornar todo o processo menos dispendioso e mais eficiente. Gottlieb enfatiza que, caso contrário, os benefícios práticos dos avanços científicos, na forma de medicamentos novos e melhores, podem não ser plenamente percebidos (Gottlieb, 2017).

O processo de Pesquisa e Desenvolvimento na indústria farmacêutica também deve estar em consonância com os parâmetros da inovação e do desenvolvimento sustentável, conforme delineado na Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU) e seus 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Os ODS são concebidos como integrados e indivisíveis, buscando harmonizar as três dimensões do desenvolvimento sustentável: econômica, social e ambiental (Eckert *et al.* 2023; ONU, 2015).

Nesse contexto, é imperativo diminuir o impacto ambiental promovendo o consumo e a produção sustentáveis, gerenciando de forma sustentável os recursos naturais e adotando medidas urgentes para mitigar as mudanças climáticas, visando garantir a capacidade do planeta de satisfazer as necessidades das atuais e futuras gerações (Eckert *et al.* 2023; ONU, 2015)

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Neste estudo, avaliamos o histórico de prestação de serviços do ToxLab UFMG (Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais). Especializado em ensaios de biotecnologia, o ToxLab possui expertise na avaliação da segurança de produtos farmacêuticos (fármacos naturais ou sintéticos), cosméticos, alimentos, amostras ambientais e substâncias com potencial tóxico das mais diversas origens. O ToxLab é associado à RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais) e especializado em testes de toxicidade *in vitro* de mutagenicidade (Teste de Ames) e genotoxicidade (Teste de Micronúcleo em Células de Mamíferos *in vitro*), utilizando métodos baseados em diretrizes internacionais da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e também da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Consultamos orçamentos financeiros, cálculos de insumos e reagentes, bem como protocolos operacionais padrão (POPs). Utilizamos metodologias comparativas entre os métodos de Ames, Método da Concordância e Método da Diferença, para a criação de uma matriz SWOT que significa : *Strengths* (forças), *Weaknesses* (fraquezas), *Opportunities* (oportunidades) e *Threats* (ameaças).

Os custos financeiros foram avaliados por intermédio do orçamento realizado no dia 26 de março de 2024 pelo nosso grupo de pesquisa. Os custos foram orçados para ambos os testes, considerando uma amostra de medicamento, seguindo os parâmetros preconizados pela OECD 471. Foram utilizadas cinco 5 cepas de bactérias, 5 concentrações, com ensaios em triplicata, considerando a presença e ausência de ativação metabólica exógena (*mix S9*).

Os parâmetros comparados no estudo foram:

| Ecológico | Financeiro |
|--|---|
| Quantidade de produtos utilizados de forma geral (microplacas, placas de Petri descartáveis e outros produtos) | Custo por ensaio: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Insumos ➤ Reagentes ➤ Mão de obra ➤ Descarte |
| Resíduo produzido (descarte de reagentes e materiais) | |

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2024

Além disso, foram avaliadas diretrizes governamentais, artigos, livros e dissertações por meio das bases de dados PubMed e Portal Periódico CAPES, assim como sites de agências

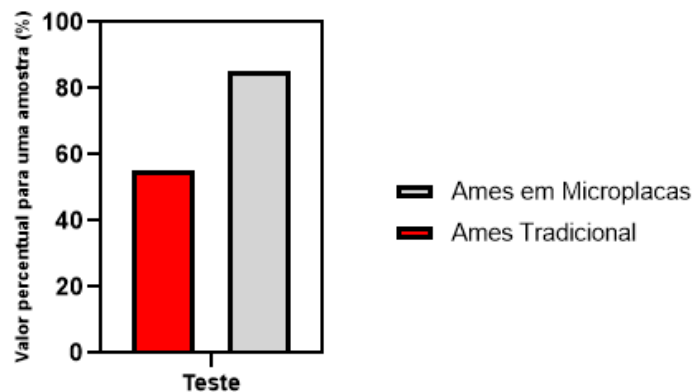
regulatórias. Seleccionamos artigos publicados em periódicos científicos dos últimos 20 anos que continham informações sobre o ensaio de Ames, abordando aspectos como definição, materiais e métodos de execução, aplicabilidade e desafios dos métodos, com foco na regulamentação e inovação sustentável, em inglês e português.

4 DISCUSSÃO E ANÁLISE DOS DADOS

4.1 *Insumos críticos influenciam diretamente no impacto ambiental e financeiro dos ensaios*

Os resultados das análises financeiras realizadas demonstraram que o ensaio de Ames tradicional possui um custo médio total maior do que o custo total para o ensaio de flutuação realizado em microplaca. No entanto, ao comparar os ensaios em valores percentuais para uma amostra de medicamento, observa-se que, para o ensaio de Ames tradicional, a diferença entre o custo total e o custo individual é de aproximadamente 55%, enquanto que, para o ensaio de flutuação em microplaca, essa diferença é de cerca de 85% (Figura 1).

Figura 1: Diferença percentual referente aos testes para uma amostra de medicamento

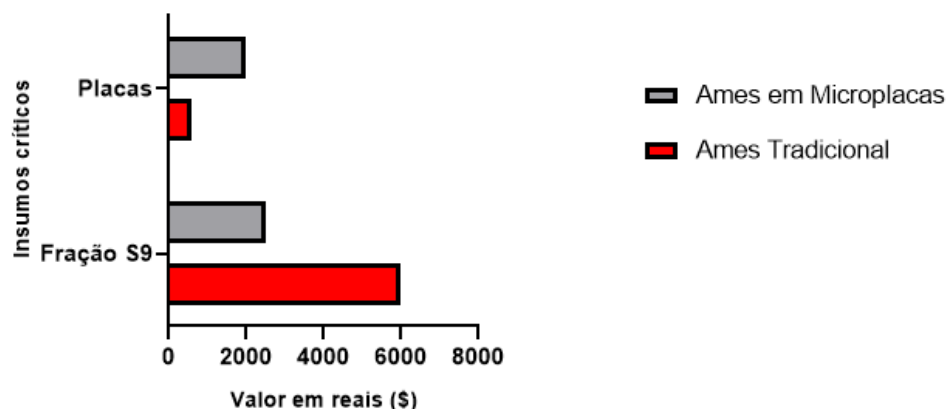


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2024

A interpretação desses resultados sugere que o custo por amostra em cada método é influenciado por diferentes fatores, como custos fixos, escalabilidade econômica e eficiência de recursos. Enquanto o ensaio de Ames tradicional pode ser mais adequado para testes de menor escala, o ensaio de flutuação em microplaca parece beneficiar-se mais da escalabilidade

econômica, tornando-se potencialmente mais vantajoso em termos de custo para volumes de testes mais elevados.

Figura 2: Análise da Relação entre Custos em Reais de Insumos Críticos



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2024

Tabela 1: Concentrações por placas de petri preconizadas pela OECD 471

| 5 concentrações | | |
|----------------------------|--------|------------|
| Condição | Sem S9 | Com S9 |
| Controle negativo | 3 | 3 |
| Concentração 1 | 3 | 3 |
| Concentração 2 | 3 | 3 |
| Concentração 3 | 3 | 3 |
| Concentração 4 | 3 | 3 |
| Concentração 5 | 3 | 3 |
| Controle positivo | 3 | 3 |
| Total - 1 linhagem | | 42 |
| Total - 5 linhagens | | 210 |

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2024

Os principais insumos que distinguem os métodos, do ponto de vista financeiro, são as placas de testagem, (Petri descartável, no método tradicional, e microplacas) e a fração S9 de fígado de ratos (Figura 2). Devido à necessidade de testar com 5 cepas bacterianas diferentes, tanto com ativação metabólica quanto sem, em triplicata e com um mínimo de cinco pontos de diluição das amostras, o método tradicional requer em média 210 placas de Petri por amostra

(Tabela 1). Isso exclui os ensaios preliminares de citotoxicidade e as placas utilizadas para manutenção das culturas, bem como para testar o genótipo e fenótipo das bactérias. Considerando esses fatores, são necessárias 300 placas para analisar um possível candidato a fármaco ou medicamento (Tabela 2).

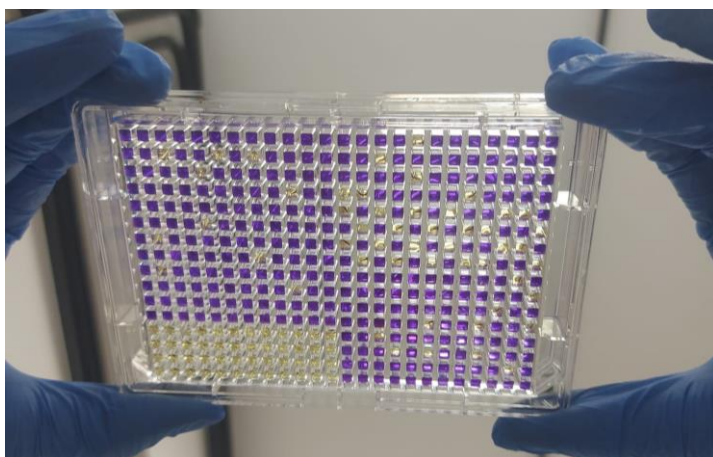
Tabela 2. Número de placas de testagem para cada método

| Teste de Ames | Nº de placas |
|----------------|--------------|
| Tradicional | 300 |
| em Microplacas | 30 |

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2024

O ensaio de Ames miniaturizado, devido aos seus 384 poços (Figura 3), permite uma redução de 10 vezes no número de placas utilizadas, totalizando 30 placas por amostra (Figura 4). No entanto, o custo financeiro entre as placas apresenta uma diferença exacerbada, visto que as Placas de Petri, descartáveis, com dimensões de 90 mm x 15 mm, custam aproximadamente R\$ 1,00 cada, enquanto as microplacas para cultivo de células de 384 poços de fundo plano custam R\$ 20,00 cada (Figura 4a).

Figura 3: Placa de 384 poços no método de Flutuação em Microplacas.



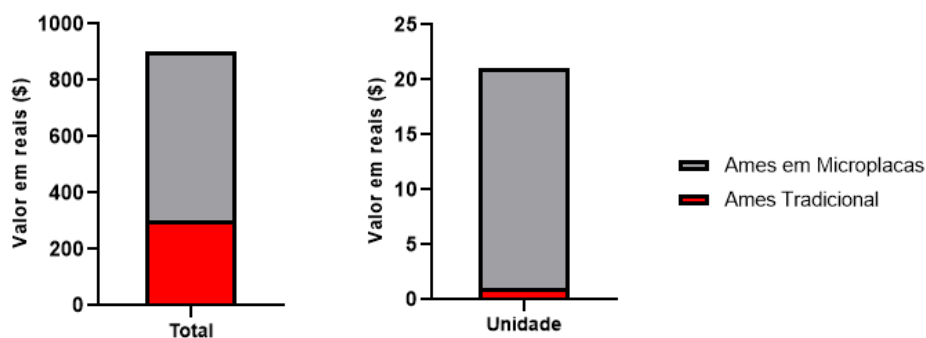
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2024

Portanto, mesmo que o número de placas utilizadas no teste de Ames tradicional seja 10 vezes maior em relação ao miniaturizado, do ponto de vista financeiro, as placas de Petri totais custam duas vezes menos que a quantidade total de microplacas necessárias para a realização de uma avaliação de mutagenicidade em uma amostra de medicamento (Figura 4b).

Figura 4. Comparação entre o custo financeiro referente às placas para uma amostra de medicamento

A) Total de placas

B) Unidade de placas



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2024

Outro aspecto relevante a ser ponderado refere-se ao processo de aquisição e à facilidade de obtenção das placas utilizadas. As placas de Petri são facilmente adquiridas, além de apresentarem baixo custo financeiro. Por outro lado, as placas de 384 poços, em sua maioria, são importadas pelas empresas. Em situações de calamidades públicas, como a pandemia da COVID-19, observou-se uma escassez no mercado devido à demanda dessas placas também para ensaios de RT-PCR (Rocha, 2020).

Do ponto de vista ecológico, é crucial abordar a questão da utilização excessiva de material descartável, como as placas de Petri, especialmente em ensaios com ampla utilização como o Teste de Ames. O plástico sintético, comumente empregado na fabricação dessas placas, representa um dos maiores desafios ambientais contemporâneos (Niglio & Germer, 2021), principalmente quando avaliamos que no processo de desenvolvimento de novos fármacos, de cada 30.000 moléculas sintetizadas, 20.000 moléculas entram na fase de estudos pré-clínicos (Calixto & Siqueira Júnior, 2008). Portanto, se todas as moléculas forem testadas para o ensaio de Ames, teremos, em média, 6.000.000 de placas de Petri descartadas.

Isso representa um grande problema ambiental, pois essas placas são feitas de poliestireno, e já está bem documentado na literatura o impacto negativo que isso causa no ecossistema, especialmente no ambiente marinho. Os polímeros plásticos são conhecidos por liberar produtos químicos industriais e contaminantes associados, contribuindo para a ecotoxicidade (De-La-Torre, 2020).

Em relação à fração S9, o homogenato de fígado rato é um insumo crítico mais caro de todo o procedimento. No Ames miniaturizado é possível a redução significativa desse reagente, sendo possível, aprimorar os pontos referentes ao três R's (*Reduction, Refinement, Replacement*), redução, refinamento e substituição (Cazarin *et al.*, 2004) dos métodos alternativos, reduzindo ainda mais a utilização de produtos de origem animal na experimentação científica.

4.2. Mão de obra e Kits de ensaios

Uma discussão pertinente refere-se ao pessoal encarregado da realização do ensaio de Ames. O ensaio tradicional é geralmente mais demorado e demanda um treinamento mais especializado para a correta identificação do crescimento das colônias revertentes. Por outro lado, o ensaio de flutuação em microplacas, além de possuir um ponto final de fácil contagem em relação ao crescimento das colônias revertentes (alteração de pH), oferece a possibilidade de automação ou até mesmo a aquisição de kits que simplificam o processo de execução do ensaio.

Esse prolongamento no tempo de ensaio acarreta um aumento nos custos financeiros associados aos Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), os quais também devem ser incorporados ao orçamento final de startups ou empresas de biotecnologia. Ademais, se o processo de contratação for realizado através de pessoa jurídica (PJ) ou bolsas de prestação de serviço, o ônus financeiro torna-se mais elevado para o contratante ao acrescentar maior tempo de trabalho.

Por outro lado, embora o treinamento para o uso dos kits do ensaio em microplacas seja mais simples e a execução seja mais rápida, esses produtos são geralmente importados e, sob o aspecto financeiro, sua aquisição nem sempre é vantajosa considerando, principalmente o objetivo dos clientes, que normalmente é o registro de patente de medicamentos, que normalmente não validam os resultados obtidos através dos testes realizados com os kits (Xenometrix. Ames Test - Scientific Background, 2024).

4.3. Descarte de resíduos

O manejo adequado e o descarte de resíduos sólidos infectantes são aspectos de suma importância para a sustentabilidade ecológica e sanitária. No Brasil, a regulamentação dessas práticas é regida pela Lei n.º 12.305, de 2010, que instituiu a Política Nacional de Resíduos

Sólidos, atribuindo aos Estados, municípios e ao Distrito Federal a responsabilidade pela gestão dos resíduos gerados em seus respectivos territórios (Sobral, 2022).

Conforme estabelecido por essa legislação, as empresas geradoras de resíduos são incumbidas da responsabilidade integral pela gestão, transporte e destinação adequada de seus resíduos, seja por meio de disposição em aterros sanitários ou mediante incineração (Brasil, 2010; Sobral, 2022). Portanto, esse gerenciamento de resíduos sólidos não impacta apenas do ponto de vista ambiental, mas também no aspecto financeiro das instituições.

Os resíduos provenientes dos ensaios de Ames também apresentam uma preocupação adicional devido à presença de substâncias mutagênicas (controles positivos), bem como a possibilidade de conter substâncias potencialmente mutagênicas (OECD, 2020). Além disso, esses resíduos contêm bactérias, ampliando a complexidade e a importância do seu manejo adequado.

4.4 Posição das agências regulatórias frente à miniaturização do teste de Ames

No Brasil, conforme o “Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos” publicado pela ANVISA, para avaliação da genotoxicidade de um medicamento é necessário a realização de múltiplos ensaios. Dentro das duas baterias de testes, é exigido um teste para avaliação de mutação gênica em bactérias, sendo preconizado seguir as diretrizes da OECD 471 para avaliação da mutagenicidade de um medicamento (ANVISA, 2013).

No entanto, não é especificado que haja necessidade de que seja o teste de Ames tradicional. Observa-se que existe a possibilidade de flexibilização, a qual será avaliada diretamente pela agência, visando permitir a evolução dos ensaios e técnicas de acordo com cada contexto (ANVISA, 2013).

Nas diretrizes da OECD 471, também se observa uma interpretação ampla em relação à possibilidade de alteração na escolha do método. Embora alguns termos sugiram essa flexibilização, frequentemente as empresas consideram arriscado optar por outro método, principalmente os miniaturizados, devido a uma ampla discussão sobre sua preditividade. Isso é evidenciado no *"Request for Review of the Detailed Review Paper on the Miniaturised Versions of the Bacterial Reverse Gene Mutation Test"* (Solicitação de Revisão do Documento Detalhado sobre as Versões Miniaturizadas do Teste de Mutação Gênica Reversa Bacteriana) (OECD, 2020; OECD, 2021).

4.5 Análise S.W.O.T dos ensaios

A análise SWOT comparativa entre o teste de Ames tradicional e a abordagem em microplacas revela que ambos os métodos possuem sensibilidade na detecção de agentes mutagênicos. Enquanto o teste tradicional é reconhecido pela sua validação e padronização para detecção de mutagenicidade em medicamentos, o teste em microplacas oferece a vantagem da automação, alinhando-se às tendências regulatórias de métodos alternativos à experimentação animal. Além disso, o teste em microplacas demonstra eficiência no tempo de execução e gera menos resíduos em comparação ao método tradicional. Contudo, devido à sua ampla aceitação regulatória e à base sólida estabelecida pela comunidade científica global, o teste de Ames tradicional continua sendo a escolha mais adequada para a avaliação da mutagenicidade de substâncias químicas (Figura 5 e 6).

Figura 5: Matriz SWOT teste Ames tradicional

| | |
|--|---|
| <p>FORÇAS</p> <p>Estabelecido</p> <p>Validado</p> <p>Padronizado</p> <p>Ampla Aceitação Regulatória</p> | <p>FRAQUEZAS</p> <p>Custo Elevado</p> <p>Tempo de Execução Prolongado</p> <p>Geração de Resíduos</p> |
| <p>AMEAÇAS</p> <p>Concorrência de Métodos Alternativos</p> <p>Pressão Regulatória por Alternativas</p> | <p>OPORTUNIDADES</p> <p>Avanços na tecnologia de automação e análise de dados</p> <p>Desenvolver novas abordagens que possam superar as limitações do método tradicional</p> |

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2024

Figura 6: Matriz SWOT teste Ames em microplaca

FORÇAS**Eficiência de Custos****Tempo de Execução Mais Rápido****Geração de Menos Resíduos****Potencial de Automação****FRAQUEZAS****Sensibilidade Reduzida****Padronização em Desenvolvimento****Aceitação Regulatória Limitada****AMEAÇAS****Desconfiança dos **Stakeholders*****Desenvolvimento de Métodos Alternativos: A****OPORTUNIDADES****Pesquisa e Desenvolvimento Contínuo****Adoção Crescente**

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2024

5 CONCLUSÕES

Em conclusão, a análise realizada demonstra que a adoção do método de flutuação em microplacas para o teste de Ames pode representar uma alternativa viável e vantajosa em termos financeiros e ambientais quando comparado aos métodos tradicionais em placas de Petri, principalmente quando houver um grande número de amostras ao serem testadas. A redução nos custos financeiros associados ao uso de menos reagentes e materiais consumíveis, juntamente com a menor geração de resíduos, indica um potencial significativo para melhorar a sustentabilidade ecológica das práticas laboratoriais. No entanto, é importante ressaltar que a aceitação regulatória do método de flutuação em microplacas ainda pode ser um desafio, especialmente no contexto da avaliação de medicamentos. Portanto, embora o método de

flutuação em microplacas apresente diversas vantagens, a escolha entre os métodos deve ser feita considerando cuidadosamente as regulamentações vigentes e as necessidades específicas de cada aplicação.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E.. **An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA, v. 70, n. 3, p. 782-786, 1 mar. 1973. DOI <https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.782>. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.70.3.782>. Acesso em: 23 mar. 2024

ANASTÁCIO FERRAZ, E. **Comparação da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13 utilizando o teste de mutagenicidade Salmonella/microsoma**. 2008. 102f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos - Versão 2**. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.

BRASIL. **Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 3 ago. 2010. Disponível em: [https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm]. Acesso em: 27 de março de 2024].

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. **Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios**. Gazeta Médica da Bahia, Bahia, v. 78, suplemento 1, p. 98-106, 2008.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L. ; ZAMBRONE, F. A. D . **Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 289-299, set. 2004. Fap.UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322004000300004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcf/a/DGHYZ8YZhqs3TS7SP4Dm8Fv/?lang=pt>. Acesso em: 27 mar. 2024.

ROCHA, L. **Falta de testes para Covid: dependência de importação de insumos ajuda a explicar**. CNN Brasil. São Paulo, 19 de janeiro de 2022. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/falta-de-testes-para-covid-dependencia-de-importacao-de-insumos-ajuda-a-explicar/>. Acesso em: 27 mar. 2024.

ICH. Conferência Internacional sobre Harmonização. (2018). **Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk**. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential-carcinogenic-risk-scientific-guideline>. Acesso em: 27 mar. 2024.

ECKERT N, RUSCH G, LYYTIMÄKI J, LEPENIES R, GIACONA F, PANZACCHI M, MOSONI C, PEDERSEN AB, MUSTAJOKI J, MILLE R, RICHARD D, JAX K. **Sustainable Development Goals and risks: The Yin and the Yang of the paths towards sustainability**. *Ambio*. 2023 Apr;52(4):683-701. doi: 10.1007/s13280-022-01800-5. Epub 2022 Nov 11. PMID: 36369605; PMCID: PMC9989090.

DE-LA-TORRE, G.E; DIOSES-SALINAS; D. C.; PIZARRO-ORTEGA; C. I.; SALDAÑA-SERRANO; M. **Global distribution of two polystyrene-derived contaminants in the marine environment: A review**. *Mar Pollut Bull*. 2020 Dec;161(Pt A):111729. doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111729. Epub 2020 Oct 8. PMID: 33039793.

FAGUNDES, F. A.. **Annona Coriacea induz efeito genotóxico em camundongos**. *Revista Eletrônica de Farmácia*, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 24-29, 04 jul. 2005.

GOTTLIEB, S. **Discurso para a Sociedade de Profissionais de Assuntos Regulatórios (RAPS) Conferência Regulatória 2017 - 11/09/2017**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/speeches-fda-officials/speech-regulatory-affairs-professionals-society-raps-2017-regulatory-conference-09112017>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

GREEN, M. H. L., MURIEL, W. J. & BRIDGES, B.A. (1976). **Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens**. *Mutation Res.*, 38, 33-42

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART,W.M.; MILLER,J.H.; LEWONTIN,R.C. **A Estrutura de Genes e Genomas** in: *Genética Moderna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001a. cap 2, p.23-48

GUIDO, R. V. C. *et al.* **Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofural (nitrofurazona)**. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 319-333, 2001.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11350: Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water - Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)**. Geneva, 2012. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:11350:ed-1:v1:en>. Acesso em: 24 mar. 2024.

KAUFFMANN, Kira et al. **Alternative type of Ames test allows for dynamic mutagenicity detection by online monitoring of respiration activity**. *Science Of The Total Environment*, [S.L.], v. 726, p. 137862, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137862>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969720313759?via%3Dihub>. Acesso em: 20 mar. 2024.

LEVY, Dan D. et al. **Demonstrating laboratory proficiency in bacterial mutagenicity assays for regulatory submission**. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, [S. l.], v. 848, p. 1-1, 1 dez. 2019. DOI

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.07.005>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571819300786?via%3Dihub>. Acesso em: 24 mar. 2024.

MARON, D. M.& AMES, B. N. **Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research/Environmental Mutagenesis And Related Subjects**, [S.L.], v. 113, n. 3-4, p. 173-215, mar. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9). Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165116183900109?via%3Dihub>. Acesso em: 30 mar. 2024.

NIGLIO, F. S. R.; GERMER, S. P. M.. **Na busca de soluções sustentáveis, cientistas desenvolvem bioplástico com resíduo agroindustrial**. 2021. Disponível em:
<https://pressreleases.scielo.org/blog/2021/01/27/na-busca-de-solucoes-sustentaveis-cientistas-desenvolvem-bioplastico-com-residuo-agroindustrial/>. Acesso em: 27 mar. 2024.

NICOLETTE J, DAKOULAS E, PANT K, CROSBY M, KONDRATIUK A, MURRAY J, SONDEERS P, KULKARNI R, JAYAKUMAR G, MATHUR M, PATEL A, VICENTE R, DATTA K, KOLAJA K. **A comparison of 24 chemicals in the six-well bacterial reverse mutation assay to the standard 100-mm Petri plate bacterial reverse mutation assay in two laboratories. Regul Toxicol Pharmacol**. 2018 Dec;100:134-160. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.10.005. Epub 2018 Oct 26. PMID: 30401633.

OECD (2020), **Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 4, Éditions OECD, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>. Disponível em: Acesso em: 24 mar. 2024.

OECD (2021), **Draft Detailed Review Paper on the miniaturised versions of the bacterial reverse gene mutation test: Request for review of the detailed review paper on the miniaturised versions of the bacterial reverse gene mutation test**. ENV/CBC/TG(2021)32. 2021.

ONU. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. (2015). **Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em: [<https://brasil.un.org/pt-br/91863-agenda-2030-para-o-desenvolvimento-sustent%C3%A1vel>]

RENNANE, Stephanie; BAKER, Lawrence; MULCAHY, Andrew. **Estimating the Cost of Industry Investment in Drug Research and Development: a review of methods and results**. Inquiry: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing, [S.L.], v. 58, jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1177/00469580211059731>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35170336/>. Acesso em: 27 mar. 2024.

SABATINI, M. T.; CHALMERS, M. **The Cost of Biotech Innovation: Exploring Research and Development Costs of Cell and Gene Therapies**. Pharm Med, v. 37, p. 365-375, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40290-023-00480-0>.

SANTOS, Jean L. *et al.* **Avaliação da atividade mutagênica da talidomida pelo teste de Ames**. Revista Eletrônica de Farmácia, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 154-158, 27 dez. 2007.

SILVA, Máisa Gomes da *et al.* **A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil.** *Research, Society And Development*, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 1-10, 30 set. 2021. Mensal.

SOBRAL, E. **Entenda a problemática do descarte dos resíduos biológicos.** *Globo Valor*. 5 de outubro de 2022. Disponível em: <https://valor.globo.com/empresas/esg/noticia/2022/10/05/entenda-a-problematica-do-descarte-dos-residuos-biologicos.gh.html>. Acesso em: 27 de março de 2024

SPILIOTOPOULOS, Dimitrios; KOELBERT, Cécile. **Assessment of the miniaturized liquid Ames microplate format (MPF™) for a selection of the test items from the recommended list of genotoxic and non-genotoxic chemicals.** *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, [S.L.], v. 856-857, p. 503218, ago. 2020. Elsevier BV. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503218>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383571820300887?via%3Dihub>. Acesso em: 23 mar. 2024.

SPONCHIADO, Graziela; et al. **Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: a systematic review.** *Journal Of Ethnopharmacology*, [S.L.], v. 178, p. 289-296, fev. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874115301859>. Acesso em: 27 mar. 2024.

TARGA, Hamilton João; RABELLO-GAY, Maria Nazareth. **Mutagênese, teratogênes, carcinogênese e o uso de alguns praguicidas.** *Revista do Serviço Público*, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 193-200, out. 1983. DOI: <https://doi.org/10.21874/rsp.v40i4.2168>. Disponível em: <http://repositorio.enap.gov.br/handle/1/3768>. Acesso em: 27 mar. 2024.

UMBUZEIRO G.A, VARGAS V.M.F, FELZENSZWALB I, HENRIQUES J.A.P, VARANDA E (2009) **Teste de mutação reversa com Salmonella typhimurium (Teste de Ames, Ensaio Salmonella/microsoma).** Disponível em: http://mutagen-brasil.org.br/_img/_documentos/8abf3bb568d1c7ba57cd3fff7a22880c.pdf. Acesso em : 01 de abril de 2024.

WORLD PREVIEW 2022 OUTLOOK TO 2028: PATENTS AND PRICING. 15TH EDITION – OCTOBER 2022 (2022). Evaluate Pharma.

XENOMETRIX. **Ames Test - Scientific Background.** Disponível em: <https://www.xenometrix.ch/ames-test-scientific-background.html>. Acesso em: 27 mar. 2024.

ZEIGER, Errol. **The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals.** *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, [S.L.], v. 841, n. 1, p. 43-48, maio 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383571819300956?via%3Dihub>. Acesso em: 27 mar. 2024.